

Abstrakt

Každý vyšší organismus se skládá z několika set různých buněčných typů. Buněčná diferenciací je proces, který vyžaduje vysoce přesnou regulaci produkce mRNA a následně také proteinovou syntézu. Během vývoje získává každá buňka unikátní sadu mRNA a proteinových molekul, které určují buněčný osud. Pro pochopení základní funkce a regulace vývojových genů je nezastupitelným nástrojem určení časového a prostorového průběhu jejich exprese na úrovni mRNA. Bohužel většina technik pro stanovení obsahu mRNA, jako Northern blotting, microarrays a *in situ* hybridizace, trpí určitými omezeními z hlediska specifity, dynamického rozsahu a/nebo citlivosti. Kvantitativní PCR v reálném čase (qPCR) vypracovaná pro kvantifikaci nukleových kyselin v posledním desetiletí však překonává výše zmíněné nevýhody. qPCR se tak rychle stala standardním nástrojem pro kvantifikaci mRNA nejen v základním výzkumu, ale i ve výzkumu aplikovaném, jako jsou např. molekulární diagnostika, detekce patogenů v jídle, analýza geneticky modifikovaných organismů (GMO) atd.

My jsme se rozhodli využít qPCR k pochopení základních biologických procesů odehrávajících se ve vyvíjejícím se organismu. Jednou z oblastí zájmu Laboratoře genové exprese na Ústavu molekulární genetiky AV ČR, kam jsem nastoupil na doktorandské studium, bylo objasnění úlohy Src tyrosinových kináz v časném vývoji obratlovců, studované na žábě drápatce (*Xenopus laevis*). Oocyty a časná embrya *X. laevis* jsou obrovská ve srovnání se savčími a obsahují takové množství biologického materiálu (RNA, proteiny, ribosomy a mitochondrie), které je jinak možno získat pouze z tisíců somatických buněk. Z těchto důvodů se stal *Xenopus* jedním z nejpopulárnějších modelových organismů pro vývojové studie.

Během svých PhD studií jsem se zabýval pěti úkoly:

1. Nalézt vhodné referenční geny pro normalizaci v časových analýzách exprese mRNA v časném vývoji *Xenopus*. Naše qPCR pokusy odhalily, že žádný z běžně rutinně užívaných referenčních genů u *X. laevis* nesplňuje kritéria pro vývojový referenční gen. Namísto toho jsme zjistili, že důvěryhodné výsledky mohou být dosaženy normalizací oproti celkovému množství RNA v jednotlivých vzorcích.
2. Zjistit časové průběhy exprese skupiny vývojových genů v časném vývoji *X. laevis* a porovnat je s předpokládanou funkcí těchto genů. Byly určeny expresní profily 21 důležitých genů během časného vývoje a byla nalezena blízká spojitost mezi úlohou genů v různých stádiích vývoje a jejich genovou expresí. Na těchto výsledcích byly také testovány nové metody pro předběžnou úpravu dat a statistickou analýzu multidimensionálních dat.
3. Určit časové a prostorové expresní profily *X. laevis* Src tyrosinových kináz (STK) a Csk, což je přirozený inhibitor STK v časném vývoji. Vše bylo stanoveno pomocí qPCR a "whole mount" *in situ* hybridizace.
4. Stanovit profily prostorové distribuce vývojových mRNA ve vajíčku *X. laevis*. Pro tento účel byla vyvinuta nová metoda, kterou jsme nazvali qPCR tomografie. Zjistili jsme, že zkoumané mRNA jsou ve vajíčku rozprostřeny formou dvou opačných gradientů podél jeho animálně-vegetativní osy. První skupina mRNA je převážně lokalizována v animální hemisféře a tvoří ji mRNA exprimované z genů: FoxH1, Oct60, Xmam, elongation factor 1-alpha, GAPDH, GSK3-beta, disheveled, beta-catenin, Tcf-3 and Xpar1. Druhá skupina mRNA molekul tvoří gradient s maximem ve vegetativní části a tvoří ji mRNA exprimované z genů: VegT, Vg1, Wnt11, Otx1, Deadsouth, Xcad2, Xpat and Xdazl.
5. Analyzovat genovou expresi během imunitní odpovědi v masačce *Sarcophaga bullata*. Byly určeny expresní profily 8 genů (transferrin, sapecin, Ppo1, Ppo2, storage binding protein, cathepsin L, 18S rRNA, sarcocystatin), které se pravděpodobně účastní imunitní odpovědi. Vše bylo provedeno ve spolupráci s Ústavem organické chemie a biochemie, AV ČR.

Naše výsledky naznačují, že kvantitativní PCR v reálném čase (qPCR) je vhodná metoda pro studium genové exprese a lokalizace mRNA v průběhu časného vývoje. Výsledky získané během mého PhD studia byly prezentovány v 7 člících, v několika ústních prezentacích na mezinárodních konferencích a na mnoha posterech. Další článek je nyní ještě připravován k publikování.