

Jihočeská univerzita v Českých Budějovicích
Přírodovědecká fakulta

**REAKCIA NA POŠKODENIE DNA V ZELENÝCH
RIASACH *CHLAMYDOMONAS REINHARDTII* A
*SCENEDESMUS QUADRICAUDA***

Doktorská disertační práce

Mgr. Monika Hlavová

Školitel: RNDr. Vilém Zachleder, CSc.

Školitel-špecialista: RNDr. Kateřina Bišová, Ph.D.

Mikrobiologický ústav AV ČR, Oddělení autotrofních mikroorganismů
Opatovický mlýn, Třeboň

České Budějovice

2011

Doktorská dizertačná práca

Hlavová, M., 2011: Reakcia na poškodenie DNA v zelených riasach *Chlamydomonas reinhardtii* a *Scenedesmus quadricauda*. [DNA damage response in green algae *Chlamydomonas reinhardtii* and *Scenedesmus quadricauda*. Ph.D. Thesis, in Slovak.] – 106 p., Faculty of Science, The University of South Bohemia, České Budějovice, Czech Republic.

Anotácia: The effect of FdUrd, zeocin, caffeine and their combination on the cell cycle of green algae *Chlamydomonas reinhardtii* and *Scenedesmus quadricauda* and response of these model organisms to DNA damage were studied. Both, FdUrd and zeocin, caused DNA damage that led to cell cycle arrest in these algae. In contrast, caffeine partially abolished G2 phase block imposed by zeocin. Protein levels of three crucial cell cycle regulators - CdkA, CdkB and Wee1 kinases were measured to identify mechanisms controlling reaction to DNA damage.

Táto práca je súčasťou riešenia projektov financovaných grantmi GAAV A500200614, GAČR 204/06/0102, GAČR 301/03/0289, GAČR 204/09/0111, SK-CZ-06906, EUREKA OE221.

Prehlasujem, že som svoju dizertačnú prácu vypracovala samostatne, len s použitím prameňov a literatúry uvedenej v zozname citovanej literatúry.

Prehlasujem, že v súlade s § 47b zákona č. 111/1998 Sb. v platnom znení súhlasím so zverejnením svojej dizertačnej práce, a to v úprave vzniknutej vypustením vyznačených častí archivovaných Prírodovedeckou fakultou elektronickou cestou vo verejne prístupnej časti databázy STAG prevádzkovanvej Jihočeskou univerzitou v Českých Budějoviciach na jej internetových stránkach, a to so zachovaním môjho autorského práva k odovzdanému textu tejto kvalifikačnej práce. Ďalej súhlasím s tým, aby rovnakou elektronickou cestou boli v súlade s uvedeným ustanovením zákona č. 111/1998 Sb. zverejnené posudky školiteľa a oponentov práce aj záznam o priebehu a výsledku obhajoby kvalifikačnej práce. Rovnako súhlasím s porovnaním textu mojej kvalifikačnej práce s databázou kvalifikačných prác These.cz prevádzkovanou Národným registrom vysokoškolských kvalifikačných prác a systémom na odhalovanie plagiatů.

V Třeboni, 19.05.2011

Monika Hlavová

PodĎakovanie

RNDr. Vilémovi Zachlederovi, CSc. by som rada poĎakovala za možnosť stať sa členom Laboratoře buněčných cyklů řas v Třeboni a jeho ľudský prístup a pomoc počas celého môjho doktorského štúdia. Predovšetkým by som však chcela poĎakovať mojej školiteľke-špecialistke RNDr. Kateřine Bišovej, Ph.D. za obrovskú trpezlivosť a nezištnú pomoc pri získavaní odborných skúseností ako aj pri čítaní a oprave mojich prvých písomných prejavov. V neposlednom rade jej Ďakujem za dôveru, ktorú do mňa vkladala a za podporu v dňoch, keď som si nebola istá sama sebou. Taktiež chcem poĎakovať Mgr. Majke Čížkovej, Ph.D. predovšetkým za pomoc pri oprave slovenčiny v tejto práci, ktorá už po niekoľkých rokoch strávených v Třeboni nie je úplne bezchybná. Našim laborantkám Ďakujem za prípravu sterilných kultivačných médií, skla a vôbec všetkého, čo som pre svoju prácu potrebovala. Všetkým členom laboratória Ďakujem za vytváranie príjemnej priateľskej atmosféry, ktorú si veľmi cením. Dlhoročnej skvelej kamarátke Mgr. Dáši Umysovej Ďakujem za to, že bola ochotná so mnou prísť študovať do Třebone, čo mi pomohlo predovšetkým na začiatku môjho doktorského štúdia. Svojim rodičom a priateľovi Ďakujem za ich záujem o moju prácu, psychickú podporu a všestrannú pomoc v priebehu môjho štúdia. Nakoniec chcem poĎakovať všetkým mojím kamarátom, ktorí boli vždy ochotný vypočuť si moje problémy, poradiť a hlavne udržať skvelú atmosféru nie len v pracovnom ale aj súkromnom živote.

VYSVETLIVKY A SKRATKY

- **APC** „anaphase promoting complex“ (komplex proteínov regulujúcich vstup do anafázy)
- **ATM** „Ataxia telangiectasia mutated“ kináza
- **ATR** „ATM and Rad3-related“ kináza
- **CAK** aktivačná kináza CDK
- **CDK** cyklín deependentná kináza
- **CKI** inhibítor CDK
- **CKS1** „CDK subunit“ (homológ kvasinkového suc1^{p13} proteínu)
- **CP** „commitment point“ (regulačný bod bunkového cyklu)
- **CTD** C-terminálna doména RNA polymerázy
- **Cyc** cyklín
- **DDC** „DNA damage checkpoint“ (kontrolný bod pre rozpoznanie DNA poškodenia po replikácii DNA)
- **DDRP** „DNA damage response pathway“ (odpoveď na poškodenie DNA)
- **DMSO** dimetylsulfoxid
- **DRC** „DNA repliation checkpoint“ (kontrolný bod pre rozpoznanie DNA poškodenia počas replikácie DNA)
- **FdUrd** 5-fluoro-2-deoxyuridín (inhibítor replikácie DNA)
- **HR** homologická rekombinácia
- **ICK** „Interactors of Cdc2 kinase“ (rastlinný inhibítor CDK)
- **KRP** „Kip-related protein“ (rastlinný inhibítor CDK)
- **MPF** „mitosis promoting factor“ (maturačný promočný faktor, historické označenie komplexu CDK/Cyc regulujúceho vstup do mitózy)
- **NHEJ** nehomologické spájanie koncov zlomov
- **qPCR** kvantitatívna polymerázová reakcia
- **RBR** „Retinoblastoma-related protein“
- **RT-PCR** reverzná polymerázová reakcia

OBSAH

1.	ÚVOD	1
2.	LITERÁRNY PREHĽAD	2
2.1.	Modelové organizmy <i>Chlamydomonas reinhardtii</i> a <i>Scenedesmus quadricauda</i>	2
2.1.1.	Základná charakteristika riasy <i>Chlamydomonas reinhardtii</i>	2
2.1.2.	Genóm riasy <i>Chlamydomonas reinhardtii</i>	3
2.1.3.	Základná charakteristika riasy <i>Scenedesmus quadricauda</i>	5
2.1.4.	Genóm riasy <i>Scenedesmus quadricauda</i>	5
2.1.5.	Bunkový cyklus s násobným delením	6
2.1.6.	Násobné delenie u riasy <i>Chlamydomonas reinhardtii</i>	7
2.1.7.	Bunkový cyklus riasy <i>Scenedesmus quadricauda</i>	8
2.2.	Regulácia bunkového delenia	8
2.2.1.	Cyklín-dependentné kinázy	9
2.2.2.	Cyklíny	11
2.3.	Regulácia aktivity CDK	12
2.3.1.	Aktivátory	13
2.3.2.	Regulácia fosforylácie Thr14/Tyr15	14
2.3.2.1.	Kináza WEE1	14
2.3.2.2.	Fosfatáza CDC25	16
2.3.3.	Inhibítory	17
2.4.	Kontrola bunkového cyklu rastlín	18
2.4.1.	Rastlinné cyklín-dependentné kinázy (CDK)	18
2.4.2.	Rastlinné cyklíny	20
2.4.3.	Vstup rastlinných buniek do mitózy	22
2.4.4.	Cyklín-dependentné kinázy a cyklíny riasy <i>Chlamydomonas reinhardtii</i>	23
2.4.5.	Cyklín-dependentné kinázy a cyklíny riasy <i>Scenedesmus quadricauda</i>	25
2.5.	Regulácia priebehu bunkového cyklu po poškodení DNA (DNA damage checkpoint and response pathway)	25
3.	METÓDY	29
3.1.	Použitý organizmus	29
3.2.	Kultivačné podmienky	29
3.3.	Synchronizácia kultúr	30
3.4.	Aplikácia činidiel	30
3.5.	Odoberanie a analýza vzoriek (počet buniek, commitment point, mikroskopická analýza)	31
3.6.	Stanovenie množstva DNA pomocou DNAzolu	31
3.7.	Izolácia RNA	32
3.8.	Syntéza cDNA a RT-PCR	32
3.9.	Kinázová esej	33
3.10.	Western blotting	33
3.11.	Mikroskopická analýza	34
4.	VÝSLEDKY	35
4.1.	Vplyv inhibítorov bunkového delenia (5-fluoro-2-deoxyuridín, kolchicín a kofeín) a zeocínu na bunkový cyklus buniek divokého kmeňa riasy <i>Chlamydomonas reinhardtii</i>	35
4.1.1.	Aplikácia 5-fluoro-2-deoxyuridínu (FdUrd)	35
4.1.2.	Aplikácia kolchicínu	36
4.1.3.	Aplikácia kolchicínu a jeho následné odmytie	37
4.1.4.	Aplikácia kofeínu	38

4.1.5.	Aplikácia zeocínu.....	40
4.2.	Vplyv kofeínu, zeocínu a ich kombinácie na bunky divokého kmeňa rias <i>Chlamydomonas reinhardtii</i>	41
4.2.1.	Vplyv rôznych koncentrácií kofeínu a zeocínu na prežívanie buniek <i>C. reinhardtii</i>	41
4.2.2.	Vplyv 2 mM kofeínu a 5 µg/ml zeocínu na rast synchronnej populácie buniek <i>C. reinhardtii</i>	42
4.2.3.	Vplyv 2 mM kofeínu a 5 µg/ml zeocínu na priebeh bunkového cyklu synchronnej populácie buniek <i>C. reinhardtii</i>	43
4.2.4.	Replikácia DNA.....	44
4.2.5.	Štruktúra buniek v synchronnej populácii riasy <i>C. reinhardtii</i> ovplyvnenej prítomnosťou 2 mM kofeínu a 5 µg/ml zeocínu.....	45
4.2.6.	Expresné profily mitotických kináz CdkB1 a Wee1 v populácii synchronných buniek <i>C. reinhardtii</i> ovplyvnenej prítomnosťou 2 mM kofeínu a 5 µg/ml zeocínu.....	47
4.2.6.1.	Sledovanie expresie kináz CdkB1 a Wee1 pomocou RT-PCR.....	47
4.2.6.2.	Špecifita protilátok proti kinázam CdkB1 a Wee1 z <i>C. reinhardtii</i>	48
4.2.6.3.	Sledovanie proteínovej expresie kináz CdkB1 a Wee1 pomocou Western blotu.....	49
4.2.7.	Purifikácia mitotických kináz z populácie synchronných buniek <i>C. reinhardtii</i> ovplyvnenej prítomnosťou 2 mM kofeínu a 5 µg/ml zeocínu a testovanie ich kinázovej aktivity.....	50
4.2.7.1.	Purifikácia mitotických kinázy z celkového mitotického proteínového extraktu.....	50
4.2.7.2.	Ovplyvnenie kinázovej aktivity CDK/Cyc komplexov pomocou kinázy Wee1 <i>in vitro</i>	51
4.2.7.3.	Kinázová aktivita CKS1-viazaných kináz, CdkB1 a Wee1 kináz v synchronizovanej populácii buniek <i>C. reinhardtii</i> ovplyvnenej prítomnosťou 2 mM kofeínu a 5 µg/ml zeocínu.....	52
4.3.	Vplyv inhibítorov bunkového delenia (FdUrd, kofeín) a zeocínu na bunkový cyklus buniek divokého kmeňa rias <i>Scenedesmus quadricauda</i>	54
4.4.	Vplyv kofeínu, zeocínu, FdUrd a ich kombinácie na bunky divokého kmeňa riasy <i>Scenedesmus quadricauda</i>	54
4.4.1.	Vplyv rôznych koncentrácií kofeínu a zeocínu na prežívanie buniek <i>S. quadricauda</i>	54
4.4.2.	Vplyv 2 mM kofeínu a 10 µg/ml zeocínu bez resp. v kombinácii s 25 µg/ml FdUrd na rast synchronnej populácie buniek <i>S. quadricauda</i>	55
4.4.3.	Vplyv 2 mM kofeínu a 10 µg/ml zeocínu na priebeh bunkového delenia synchronnej populácie buniek <i>S. quadricauda</i>	57
4.4.4.	Replikácia DNA.....	60
4.4.5.	Delenie jadier v synchronnej populácii buniek <i>S. quadricauda</i> ovplyvnenej prítomnosťou 2 mM kofeínu a 10 µg/ml zeocínu.....	62
4.4.6.	Expresné profily mitotických kináz CdkA1, CdkB1 a Wee1 v populácii synchronných buniek <i>S. quadricauda</i> ovplyvnenej prítomnosťou 2 mM kofeínu a 10 µg/ml zeocínu bez resp. v kombinácii s 25 µg/ml FdUrd.....	63
4.4.6.1.	Špecifita protilátok z <i>C. reinhardtii</i> proti kinázam CdkA1, CdkB1 a Wee1 z riasy <i>S. quadricauda</i>	64

4.4.6.2.	Sledovanie proteínovej expresie kináz CdkA1, CdkB1 a Wee1 pomocou Western blotu	65
4.4.7.	Purifikácia mitotických kináz (CdkA1 a CdkB1) z populácie synchronných buniek <i>S. quadricauda</i> ovplyvnenej prítomnosťou 2 mM kofeínu a 10 µg/ml zeocínu bez resp. v kombinácii s 25 µg/ml FdUrd a testovanie ich kinázovej aktivity.....	68
4.4.7.1.	Purifikácia kináz CdkA1 a CdkB1 z celkového mitotického proteínového extraktu	68
4.4.7.2.	Kinázová aktivita kináz CdkA1 a CdkB1 v synchronizovanej populácii buniek <i>S. quadricauda</i> detekovaná nepriamou metódou	69
4.4.7.3.	Kinázová aktivita kináz CdkA1 a CdkB1 v synchronizovanej populácii buniek <i>S. quadricauda</i> ovplyvnenej prítomnosťou 2 mM kofeínu a 10 µg/ml zeocínu bez resp. v prítomnosti FdUrd	70
5.	DISKUSIA	73
5.1.	Výber činidiel	74
5.2.	<i>Chlamydomonas reinhardtii</i>	76
5.2.1.	Rast a priebeh bunkového cyklu <i>C. reinhardtii</i>	76
5.2.2.	Regulácia bunkového cyklu <i>C. reinhardtii</i>	78
5.3.	<i>Scenedesmus quadricauda</i>	82
5.3.1.	Rast a priebeh bunkového cyklu <i>S. quadricauda</i>	82
5.3.2.	Regulácia bunkového cyklu <i>S. quadricauda</i>	84
6.	ZÁVERY	88
7.	ZOZNAM LITERATÚRY	90

1. ÚVOD

Dizertačnú prácu som vypracovala na Mikrobiologickom ústave AV ČR, v Laboratóriu bunkových cyklov rias v Třeboni a je zameraná na štúdium regulácie bunkového cyklu rias, vyznačujúcich sa špecifickým typom bunkového delenia, tzv. násobným delením. Výskum zameraný na túto problematiku má v tomto laboratóriu viac ako 40-ročnú tradíciu, počas ktorej sa získalo množstvo poznatkov, predovšetkým v oblasti kultivácie rias a molekulárno-biologických analýz, čo mi výrazne pomohlo pri mojej doktorskej práci.

Používanými modelovými organizmami sú riasy z triedy Chlorophyta, rod *Chlamydomonas* a *Scenedesmus*. Obe predstavujú ideálny modelový organizmus, a to vďaka nenáročnej kultivácii, pomerne rýchlemu rastu a predovšetkým jednoduchej synchronizácii prostredníctvom striedania svetelnej a tmavej periódy. Sú bežným modelovým organizmom pre štúdium bunkového cyklu na fyziologickej, cytologickej a molekulárno-biologickej úrovni.

Táto dizertačná práca zapadá do aktuálneho výskumného programu Laboratória a je zameraná na štúdium regulácie bunkového cyklu po poškodení DNA. Poškodenie DNA vedie v bunkách k zastaveniu bunkového cyklu, čo je regulované zložitou proteínovou dráhou v rámci tzv. „DNA damage response pathway“. Efektorovými proteínmi tejto dráhy sú aj regulátory bunkového cyklu a v tejto práci boli študované tri z nich – kinázy CdkA, CdkB a Wee1

Verím, že výsledky tejto práce pomôžu objasniť a lepšie pochopiť reakciu buniek na poškodenie DNA a jej prepojenie s priebehom bunkového cyklu.

2. LITERÁRNY PREHĽAD

2.1. Modelové organizmy *Chlamydomonas reinhardtii* a *Scenedesmus quadricauda*

2.1.1. Základná charakteristika riasy *Chlamydomonas reinhardtii*

Chlamydomonas reinhardtii (Obr. 1) je eukaryotická, fotoautotrofná, jednobunková zelená riasa z triedy Chlorophyceae (kmeň Chlorophyta), dlhá približne 10 μm a široká 3 μm .



Obr. 1 *Chlamydomonas reinhardtii*

Pohybuje sa pomocou dvoch bičíkov umiestnených na anteriornom konci bunky. V bunkách je prítomné haploidné jadro, chloroplast s 1-2 pyrenoidmi, ktorý zaberá 40 % objemu bunky a niekoľko malých mitochondrií. Základnými fotosyntetickými farbivami sú chlorofyl „a“ a „b“ (Hoek et al., 1995; Nakagami et al., 2002). Bunková stena je zložená predovšetkým z glykoproteínov bohatých na hydroxyprolín (Harris, 2001).

Obsahuje 3 autonómne genetické systémy, v jadre, v chloroplaste a v mitochondriách.

Divoký typ *C. reinhardtii* môže získavať energiu fotoautotrofne (v prítomnosti svetla a CO_2 ako jediného zdroja uhlíka), mixotrofne (v prítomnosti svetla a acetátu ako organického zdroja uhlíka) alebo heterotrofne (využívaním acetátu v tme). Bunky sa za ideálnych rastových podmienok rozmnožujú vegetatívne, pričom sa udržiava ich haploidný stav. V podmienkach hladovania na dusík a v prítomnosti svetla z modrého spektra sa vegetatívne bunky vyvíjajú na gaméty, pričom môžeme rozlíšiť dva párovacie typy mt^+ a mt^- (Weissig a Beck, 1991). Po splynutí týchto gamét vzniká diploidná zygota, ktorá môže podstúpiť meiózu a produkovať tetradu haploidných spór. Tieto ďalej môžu pokračovať vo vegetatívnom alebo generatívnom cykle.

Tetrádová analýza spolu s jednoduchou a rýchlou genetickou analýzou haploidov a s možnosťou stabilnej transformácie všetkých troch genómov poskytuje základ pre dobrý genetický modelový organizmus. Jadro môže byť transformované metódou sklenených guľičiek (Kindle, 1990) alebo elektroporáciou (Brown a Lemmon, 1991). Chloroplast a mitochondrie môžu byť transformované špecificky, balistickou metódou (Boynton et al., 1988; Randolpherson et al., 1993). Všetky tieto výhody spolu s nenáročnou kultiváciou, pomerne rýchlym rastom, jednoduchou synchronizáciou striedaním svetelnej a tmavej periódy a osekvenovaným genómom (Merchant et al., 2007) robia z *C. reinhardtii* ideálny modelový

organizmus. Často sa využíva pre štúdium eukaryotickej fotosyntézy (Harris, 2001), bičikov a bazálnych teliesok (Pazour et al., 2006) motility, biogenézy organel (Mitchell a Graziano, 2006), fototaxie, metabolizmu, dedičnosti a delenia chloroplastov (Dutcher, 2000), gametogenézy (Martin a Goodenough, 1975) a v neposlednom rade aj pre štúdium regulácie bunkového cyklu (Slaninová et al., 2003; Bisova et al., 2005; Fang et al., 2006). Nie je neznáma ani pri toxikologických štúdiách (De Schamphelaere a Janssen, 2006) a v posledných rokoch našla uplatnenie aj v bioremediácii (Vilchez et al., 2001) a produkcii bioplynov (Ghirardi et al., 2007). *C. reinhardtii* je taktiež výhodná aj pre štúdium reparácie DNA (Vlček et al., 2008) a je dostupná pre rôzne molekulárnobiologické a biochemické analýzy, vrátane RNA interferencie (Rohr et al., 2004).

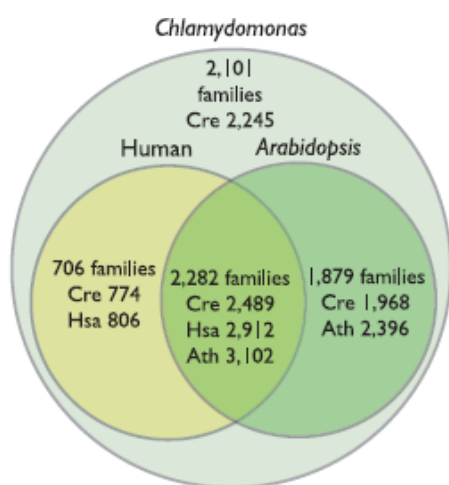
2.1.2. Genóm riasy *Chlamydomonas reinhardtii*

Chlamydomonas predstavuje vhodný modelový organizmus aj pre štúdium evolúcie genómu (Smith a Lee, 2008). Jej jadrový genóm zahŕňa v haploidnom stave 17 väzbových skupín, ktoré predstavujú 17 jadrových chromozómov. Genóm *C. reinhardtii* sa vyznačuje vysokým zastúpením (64 %) GC párov, uniformným zastúpením génov, jednoduchými repetitívnymi sekvenciami a transpozibilnými elementami. Podobne ako u väčšiny eukaryot, sú gény pre ribozomálnu RNA (rRNA) zoskupené do tandemových repetícií a taktiež gény pre transferové RNA (tRNA) a gény asociované so špecifickými biologickými funkciami sú lokalizované v klastroch (Merchant et al., 2007). U druhu *C. reinhardtii* bola zistená odchýlka od univerzálneho genetického kódu (bias kód), a to u génov so silnou expresiou (gény kódujúce proteíny fotosyntetického a bičikového aparátu, niektoré heat-shock proteíny) (Harris, 1989). Inou charakteristickou črtou jadrových génov riasy *C. reinhardtii* je prítomnosť veľkého počtu intrónov (asi 7 intrónov na každý gén kódujúci proteín). Napríklad gén pre heat-shock proteín Hsp70 obsahuje 6 intrónov, zatiaľ čo jeho kópia u rastlín neobsahuje žiadne, prípadne 1 intrón (Muller et al., 1992). Zastúpenie exónov je v priemere 8,3 exónu na jeden gén a len asi 8 % génov neobsahuje žiadne intróny. Priemerná dĺžka intrónov je väčšia ako u väčšiny eukaryotov a sú oveľa viac podobné intrónom mnohobunkových organizmov ako protozoám (Merchant et al., 2007; Palenik et al., 2007; Smith a Lee, 2008).

Veľkosť jadrového genómu *C. reinhardtii* bola odhadnutá približne na 121 Mb (Merchant et al., 2007), čo je porovnateľné s genómom rastliny *Arabidopsis thaliana*. Vyznačuje sa však menším počtom génových rodín, čo výrazne uľahčuje genetickú analýzu. Okrem jadrového genómu sú osekvenované aj chloroplastový (Lilly et al., 2002; Maul et al.,

2002) a mitochondriálny genóm (Gray a Boer, 1988; Michaelis et al., 1990). Na rozdiel od jadrového genómu, je mitochondriálny zorganizovaný efektívnejšie. Je to lineárna molekula DNA s veľkosťou 15,8 kb a zahŕňajúca 13 génov (Gray a Boer, 1988; Michaelis et al., 1990). Mitochondriálny genóm *C. reinhardtii* je najkompaktnejší spomedzi zelených rias, pretože obsahuje 82 % kódujúcich sekvencií (Pombert et al., 2006). Chloroplastový genóm je tvorený cirkulárnou molekulou DNA s veľkosťou 203,4 bp, ktorá sa však môže vyskytovať aj v lineárnej forme. Zastúpenie GC párov je 34,6 %, čo je porovnateľné s chloroplastovým genómom riasy *Chlorella* (31,6 %) a tiež s *Arabidopsis* (36,3 %). Kódujúca oblasť chloroplastového genómu *C. reinhardtii* zahŕňa gény pre vysoko konzervované proteíny s dobre definovanou funkciou. Je tu zastúpených 72 génov kódujúcich proteíny a 30 génov pre tRNA (Maul et al., 2002).

U *Chlamydomonas* bolo identifikovaných 1226 génových rodín kódujúcich 2 a viac proteínov, pričom obsahujú podobné zastúpenie génov ako u človeka a *Arabidopsis*. Genóm *Chlamydomonas*, podobne ako *Arabidopsis*, kóduje veľké rodiny kináz a cytochrómov P-450, pričom najväčšou je guanylyl- a adenilyl-cyklázová rodina (Merchant et al., 2007). Napriek tomu, že tieto cyklázy neboli identifikované u rastlín, u *Chlamydomonas* zohrávajú dôležitú úlohu pri pohlavnom rozmnožovaní (Pasquale a Goodenough, 1987) a vo funkcii bičikov (Gaillard et al., 2006). Taktiež sú tu prítomné gény kódujúce rôzne transportéry, ktoré sú blízko príbuzné ako rastlinám, tak aj živočíchom. *Chlamydomonas* zdieľa s človekom asi 706 proteínových rodín, ktoré neboli identifikované u *Arabidopsis*, pričom ide hlavne o gény súvisiace s motilitou (bičiky, cílie, bazálne telieska, centrioly). Na druhej strane u nej bolo identifikovaných asi 1879 proteínových rodín príbuzných *Arabidopsis*, ktoré sa nenachádzajú v ľudskom genóme (Merchant et al., 2007) (Obr. 2).



Na základe všetkých týchto údajov možno konštatovať, že *Chlamydomonas* zastáva miesto niekde medzi rastlinnou a živočíšnou ríšou. Je to špecifický organizmus nesúci znaky ako rastlinné, tak aj živočíšne, čo ho zvyhodňuje okrem iného, aj pre využitie ako modelového organizmu pri rôznych štúdiách.

Obr. 2 Proteínové rodiny spoločné pre *Chlamydomonas reinhardtii*, *Arabidopsis* a človeka (Merchant et al., 2007)

2.1.3. Základná charakteristika riasy *Scenedesmus quadricauda*



Obr. 3 *Scenedesmus quadricauda*

Scenedesmus quadricauda je jednobunková zelená riasa (Obr. 3) z triedy Chlorophyceae (kmeň Chlorophyta). Vyskytuje sa v sladkých a brakických vodách a už desaťročia sa využíva ako modelový organizmus pre štúdium toxicity rôznych látok. Bezbičíkaté bunky sú uložené v jednom rade a množia sa vegetatívne delením.

Dcérske bunky pochádzajúce z delenia jednej materskej bunky zostávajú spojené spoločnou bunkovou stenou a tvoria cenóbiom, zvyčajne zo 4 až 8 buniek. Koncové bunky cenóbia majú obvykle dva ostne (Hoek et al., 1995). Bunková stena je trojvrstvová a zabezpečuje mechanickú odolnosť buniek. Jej polysacharidovú časť tvorí mikrofibrilárna (celulóza, manány a xylány) a amorfná (hemicelulózy a pektíny) zložka. Taktiež obsahuje malé množstvo bielkovín, konkrétne extenzínu, čo je glykoproteín s vysokým obsahom hydroxyprolínu. Typickou súčasťou bunkovej steny je látka podobná sporopolenínu, ktorý sa obvykle nachádza v bunkovej stene peľových. Každá bunka cenóbia má jadro a jednoduchý miskovitý chloroplast s jedným pyrenoidom, ktorý nie je ohraničený membránou a na povrchu môže byť pokrytý škrobovými zrnami (Procházka et al., 1998). Chloroplasty obsahujú nukleoidy, ktorých množstvo sa počas životného cyklu zväčšuje, sú teda vedľa mitochondrií ďalším zdrojom mimojadrovej dedičnosti.

Rod *Scenedesmus* je súčasťou fytoplanktónu a významnou mierou sa podieľa na výžive živočíchov v rybníkoch. V sušine boli dokázané vitamín B12, kyselina pantoténová, kyselina nikotínová, kyselina listová a iné (Fott, 1967).

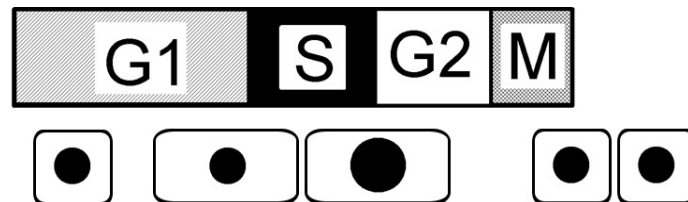
2.1.4. Genóm riasy *Scenedesmus quadricauda*

Jadrový genóm riasy *S. quadricauda* doposiaľ nebol osekvenovaný a aj chloroplastový a mitochondriálny genóm bol osekvenovaný len u iného zástupcu rodu *Scenedesmus* a to *S. obliquus*. Jeho mitochondriálny genóm má veľkosť 42 919 bp a kóduje 42 konzervovaných génov, ako sú gény pre veľkú a malú ribozomálnu podjednotku, 27 génov pre tRNA a 13 génov kódujúcich proteíny respiračného reťazca. Gény pre 5S-rRNA a ribozomálne proteíny identifikované neboli. Zvláštnosťou sú odchylky od štandardného genetického kódu, kde UAG kodón, ktorý bežne slúži ako stop kodón, kóduje aminokyselinu leucín, zatiaľ čo UCA kodón normálne kódujúci serín, slúži ako signál pre termináciu translácie (Nedelcu et al., 2000).

Chloroplastový genóm *S. obliquus* má 161 452 bp a kóduje 96 génov. Je bohatý (73,1 %) na AT páry a zastúpenie génov je podobné zastúpeniu u *Chlamydomonas*. Odlišuje sa len prítomnosťou dvoch ďalších génov, *infA* (kóduje translačný iniciačný faktor) a *rpl12* (gén pre 60S ribozomálny proteín) (De Cambiaire et al., 2006).

2.1.5. Bunkový cyklus s násobným delením

V klasickom bunkovom cykle prebiehajú procesy vedúce ku vzniku 2 dcérskych buniek z jednej materskej. Môžeme ho rozdeliť na 4 fázy – G1 a G2 fázu, počas ktorých bunka rastie a pripravuje sa na delenie, S fázu (syntetickú) s replikáciou DNA a M fázu (mitotickú) zahŕňajúcu samotné delenie jadier (genetického materiálu) (Obr. 4).



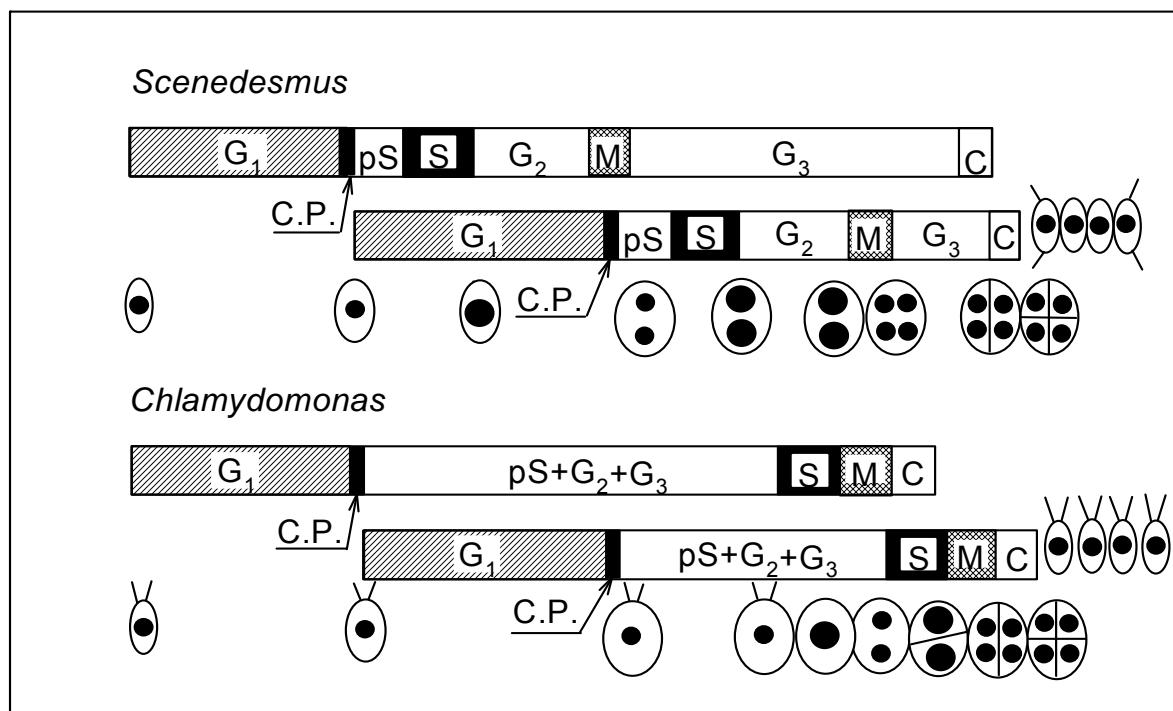
Obr. 4 Schéma štandardného bunkového cyklu eukaryot (Hlavová et al., 2011)

U rias sa vo všeobecnosti rozlišujú dva typy bunkového delenia, cyklus typu C1, pri ktorom sa materská bunka rozdelí na 2 dcérske bunky, t.j. klasický bunkový cyklus. Avšak častejšie sa vyskytuje bunkový cyklus typu Cn (násobné delenie) (Obr. 5), ktorý je charakteristický pre oba naše modelové organizmy. Každý z týchto organizmov zastupuje jeden z podtypov tohoto spôsobu delenia - typ *Chlamydomonas* (Lien a Knutsen, 1979) a typ *Scenedesmus* (Šetlík et al., 1972; Zachleder, 1983; Zachleder a Šetlík, 1990; Zachleder, 1997).

V prípade bunkového cyklu s násobným delením hovoríme o modifikovanom bunkovom delení, ktoré sa odlišuje od štandardného bunkového cyklu konečným počtom dcérskych buniek. V takomto prípade môžeme na konci bunkového delenia identifikovať viac ako 2 dcérske bunky (4, 8, 16, 32, 64...) uvoľnené z jednej materskej.

Bunkový cyklus rias začína podobne ako u ostatných organizmov G1 fázou, počas ktorej bunka rastie a pripravuje sa na prvú sériu reprodukčných procesov (replikáciu DNA a mitózu). K ich spusteniu dochádza po prechode bunky tzv. bodom rozhodnutia („commitment point“; CP). Zároveň s nimi môže bunka pokračovať v raste a príprave na ďalšiu sériu replikácie a mitózy, ktorá sa znovu spúšťa len po dosiahnutí druhého CP (Obr. 5). V priebehu jedného cyklu typu Cn sa môžu tieto reprodukčné pochody spustiť n-krát (odtiaľ

cyklus Cn). Cytokinéza môže byť niekedy časovo oddelená od mitózy a tento časový úsek je možné označiť ako fázu G3 (Obr. 5) (Zachleder, 1997). Tieto reprodukčné procesy sa navzájom prekrývajú a vedú k produkcii 2ⁿ dcérskych buniek z jednej materskej (Šetlík et al., 1972; Zachleder a Šetlík, 1990; Zachleder a van den Ende, 1992; Zachleder, 1995).

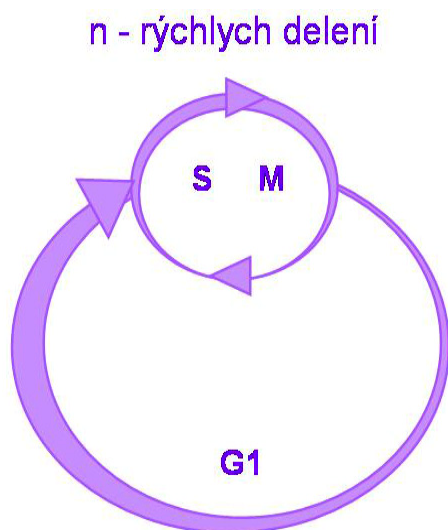


Obr. 5 Schéma bunkového cyklu rias *Chlamydomonas reinhardtii* a *Scenedesmus quadricauda* (Zachleder et al., 1997)

2.1.6. Násobné delenie u riasy *Chlamydomonas reinhardtii*

Pre bunkový cyklus *C. reinhardtii* je charakteristická predĺžená G1 fáza, počas ktorej môžu bunky niekoľkonásobne zväčšiť svoju pôvodnú veľkosť. Po skončení G1 fázy nasleduje rýchla séria (n-krát, zvyčajne 1-4) striedania S fázy (DNA syntéza) a mitózy nasledovaná cytokinézou, za tvorby 2ⁿ dcérskych buniek (Obr. 6). Každá z týchto sérií sa spúšťa v pomyselnom bode bunkového cyklu, tzv. bode rozhodnutia (CP; „commitment point“) (John, 1984, 1987).

Kontrolný bod (CP) je regulovaný veľkosťou, je dosiahnutý pri tzv. kritickej veľkosti bunky. S každým ďalším zdvojením kritickej veľkosti, bunky dosiahnu ďalší CP. Aby bunka narástla do kritickej veľkosti, potrebuje dostatočný prísun energie a v prípade fotoautotrofne rastúcej riasy *C. reinhardtii* je to dostatok svetla. Rastové procesy, vrátane dosiahnutia CP, sú



Obr. 6 Schéma bunkového cyklu s násobným delením u zelenej riasy *Chlamydomonas*

závislé na svetle, teda vyššia svetelná intenzita, resp. dlhšia svetelná perióda umožňujú bunke dosiahnuť viac CP (Zachleder et al., 1997). Naproti tomu, reprodukčné procesy (S fáza a mitóza) môžu prebiehať aj bez dodania ďalšej energie. Vďaka tomu je možné vhodným striedaním svetelnej a tmavej periódy riasové kultúry jednoduchým spôsobom synchronizovať.

To, či konkrétna bunka (resp. populácia synchronných buniek) prešla v určitom okamihu bodom rozhodnutia, je možné určiť spätne. O dosiahnutí CP totiž vypovedá schopnosť bunky rozdeliť sa, teda absolvovať všetky reprodukčné procesy bez ďalšieho dodania energie. Ak

po určitej dobe kultivácie na svetle nasleduje tmavá perióda, počas ktorej sa sledovaná bunka rozdelí napr. na 8 dcérskych buniek, je zrejmé, že v dobe ukončenia svetelnej periódy mala bunka za sebou prechod tretím CP (Šetlík et al., 1972; Zachleder a Šetlík, 1990; Zachleder a van den Ende, 1992; Zachleder, 1995).

2.1.7. Bunkový cyklus riasy *Scenedesmus quadricauda*

Podobne ako *C. reinhardtii* aj *S. quadricauda* sa vyznačuje modifikovaným bunkovým cyklom, násobným delením. Na rozdiel od typu *Chlamydomonas*, ktorý sa vyznačuje n-krát sa opakujúcimi procesmi G1 fázy, po ukončení ktorých prebehnú v krátkom časovom úseku procesy ďalších fáz, u typu *Scenedesmus* prebieha s určitým časovým odstupom niekoľko postupností bunkového cyklu (Obr. 5). Fázy bunkového delenia sa navzájom prekrývajú (Šetlík a Zachleder, 1984; Zachleder a Šetlík, 1990). Počas G1 fázy bunky rastú a môžu dosiahnuť rôzny počet CP. Po každom z nich nasleduje replikácia DNA a delenie jadra, nie však bunky, čo je ďalší rozdiel v porovnaní s typom *Chlamydomonas*. Bunky *S. quadricauda* sú teda počas bunkového cyklu mnohjadrové a až po skončení jadrových delení nasleduje delenie bunky (Šetlík a Zachleder, 1984; Zachleder et al., 2002), zatiaľ čo u *C. reinhardtii* nasleduje cytokinéza hneď po každom jadrovom delení.

2.2. Regulácia bunkového delenia

Ako už bolo povedané, eukaryotické bunky v priebehu svojho života podstupujú sériu udalostí zloženú zo štyroch fáz (G1, S, G2 a M) súhrnne označovanú ako bunkový cyklus. Ide

o cyklický proces zahŕňajúci duplikáciu genetického materiálu s následným rozdelením jadier – mitózu (karyokinézu) a vlastné bunkové delenie – cytokinézu. Všetky deje zúčastňujúce sa bunkového cyklu sú na sebe závislé a iniciácia neskoršej udalosti nastane iba po úspešnom ukončení predchádzajúcej udalosti.

Prechod bunkovým cyklom je závislý na mnohých faktoroch, do jeho priebehu sa premieta stav bunky ako aj podmienky okolia. Pre každú bunku je životne dôležité, aby vstúpila do bunkového cyklu len vtedy, ak je na to dostatočne pripravená, teda keď má vhodnú veľkosť a dostatočné energetické zásoby, ktoré jej umožnia dokončiť delenie. Ďalšou dôležitou úlohou bunkového cyklu je udržanie genómovej stability, teda aby sa celý genetický materiál počas S fázy zreplikoval len raz a následne sa v mitóze rovnomerne rozdelil medzi dcérske bunky. Všetky tieto deje sú bunkou prísne regulované, a to v tzv. kontrolných bodoch bunkového cyklu. Dva z týchto bodov sa považujú za kľúčové.

Jeden sa nachádza v druhej polovici G1 fázy a je zodpovedný za spustenie reprodukčných procesov. U kvasiniek sa tento bod označuje ako „START“ a u rias je označovaný termínom „commitment point“ (CP). V prípade nedostatočnej veľkosti bunky je daná bunka zadržaná v G1 fáze, lebo nie je schopná vstúpiť do S fázy.

Druhý kľúčový bod, v G2 fáze, spúšťa procesy vedúce k jadrovému deleniu. Ak sa DNA správne nezreplikuje, prípadne bunka nie je dost' veľká (u *S. pombe*) (Rupes, 2002) alebo sa nachádza v nepriaznivom prostredí, tak je zadržaná týmto kontrolným bodom a nevstupuje do mitózy. Okrem kontroly poškodení v DNA či replikačných chýb je pre genómovú stabilitu dôležité taktiež presné rozdelenie chromozómov v mitóze. V tomto prípade je dôležitý kontrolný bod, ktorý sa vyskytuje v M fáze a kontroluje správnosť pripojenia chromozómov k mitotickému vretienku.

2.2.1. Cyklín-dependentné kinázy

Prechod kontrolnými bodmi bunkového cyklu je regulovaný heterodimerickými kinázami, čo sú enzýmy tvorené katalytickou podjednotkou - cyklín-dependentnou kinázou (CDK) a regulačnou podjednotkou - cyklínom. Regulačná podjednotka umožňuje periodickú aktiváciu CDK, a tým aj vykonávanie jej funkcie len v určitej fáze bunkového cyklu (Evans et al., 1983; Pines, 1991). CDK kontrolujú prechod medzi G1/S i G2/M fázami (zahájenie replikácie DNA a vstup do mitózy) u eukaryotických organizmov vo všetkých troch ríšach: v kvasinkách (Lörincz a Reed, 1984; Hindley et al., 1987), v živočíšnych bunkách (Fang a Newport, 1991; Murray, 2004) aj v rastlinných bunkách (Doonan a Fobert, 1997; Dewitte a Murray, 2003).

CDK predstavujú konzervovanú skupinu proteínových kináz fosforylujúcich serínové a treonínové zvyšky (Ser/Thr) cieľových proteínov (Hindley a Phear, 1984). Pre ich kinázovú aktivitu je nevyhnutná väzba cyklínovej podjednotky, ktorá slúži ako jeden z aktivátorov CDK. Okrem toho sa na ich regulácii podieľajú ďalšie proteíny, ako aktivačné proteíny cyklín-dependentných kináz (CAK), inhibítory CDK (CKI), kináza Wee1, fosfatáza Cdc25.

Základnou úlohou cyklín-dependentných kináz je fosforylácia a tým pádom pozitívna, či negatívna regulácia rôznych proteínov potrebných pre replikáciu DNA a mitózu (Murray, 2004). Medzi ich substráty patria rôzne transkripčné faktory, retinoblastomový (Rb) proteín, proteíny jadrovej membrány a cytoskeletu, ale aj špecifické zložky bunkového cyklu, ktoré pre svoju ubiquitínom riadenú proteolytickú degradáciu vyžadujú predchádzajúcu fosforyláciu (King et al., 1996). Ďalším substrátom je histón H1 v mitotických chromozómoch, ktorý sa z tohto hľadiska používa aj ako substrát pre CDK-cyklínový komplex pri fosforylačnej eseji (assay).

Po prvý krát bola úloha CDK identifikovaná u kvasiniek a v súvislosti s reguláciou mitotických procesov živočíšnych buniek, a to ako tzv. MPF (mitosis promoting factor). Ďalšou analýzou sa zistilo, že ide o komplex CDK a cyklínu, pričom podľa prvej identifikácie bola táto kináza pomenovaná *cdc2* (cell division cycle) (Nurse a Thuriaux, 1980) a podľa molekulej hmotnosti p34 (34 kDa) (Simanis a Nurse, 1986).

Napriek tomu, že sekvenácia kvasinkového genómu odhalila prítomnosť 5 CDK medzi 113 proteínovými kinázami (Hunter a Plowman, 1997), je u kvasiniek *Saccharomyces cerevisiae* a *Schizosacchomyces pombe* zodpovedná za reguláciu celého bunkového cyklu jediná CDK - Cdc28/Cdc2 (Nurse a Bissett, 1981; Mendenhall a Hodge, 1998), ktorá bola súčasne objavená u oboch týchto modelových organizmov, z čoho vyplýva jej označenie. Táto kináza sa môže viazať s rôznymi cyklínmi v závislosti od fázy bunkového cyklu, čím sa mení repertoár fosforylovaných cieľových proteínov. Takto dokáže jediná CDK regulovať ako vstup do S fázy (G1/S prechod), tak aj do mitózy (G2/M prechod) (Francis, 2007).

U vyšších eukaryotov je, na rozdiel od kvasiniek, počet CDK podieľajúcich sa na regulácii bunkového cyklu podstatne vyšší. V každej fáze bunkového cyklu je prítomná špecifická cyklín-dependentná kináza, ktorá sa viaže so špecifickým cyklínovým partnerom (Pines, 1993). Je identifikovaných 12 ľudských CDK (Kaldis, 1999), z ktorých len 5 sa aktívne podieľa na regulácii bunkového cyklu, konkrétne v G1 fáze sú to Cdk4, Cdk6 a Cdk2, S fáze - Cdk2, G2 a mitóze - Cdk1 (Vermeulen et al., 2003). Cdk7 v komplexe s cyklínom H tvorí CDK aktivačnú kinázu (CAK), ktorá sa zúčastňuje všetkých fáz bunkového cyklu (Fisher a Morgan, 1994). Vyšší počet CDK, možnosť väzby s rôznymi cyklínmi a prítomnosť

väčšieho množstva proteínov (CAK, CKI...) regulujúcich aktivitu samotných CDK-cyklínových komplexov svedčí o komplexnejšej a špecializovanejšej kontrole bunkového cyklu vyšších eukaryot.

2.2.2. Cyklíny

Cyklíny predstavujú rodinu proteínov s krátkym polčasom rozpadu, ktorých množstvo sa periodicky mení počas bunkového cyklu, od čoho bol odvodený aj ich názov (Evans et al., 1983). Tvoria regulačnú podjednotku heterodimerických komplexov CDK-cyklín, pričom ich väzba s CDK je nevyhnutná pre aktiváciu jej kinázovej aktivity. Pri vysokej koncentrácii cyklínu v bunke sa tento viaže na danú kinázu, čím ju aktivuje a v čase, keď nastane zníženie jeho hladiny, sa z komplexu s CDK uvoľňuje a následne sa inhibuje aj enzýmová aktivita CDK (Kong et al., 2000). K periodickému kolísaniu hladiny cyklínov počas bunkového cyklu dochádza v dôsledku rýchlych zmien syntézy (transkripcie) a proteolýzy (ubiquitínom riadenej degradácie) týchto proteínov (Morgan, 1995).

Cyklíny tvoria rôznorodú skupinu proteínov s nízkou homológiou, ktoré však zdieľajú veľký, aj keď slabo konzervovaný, úsek zodpovedný za ich väzbu s CDK, tzv. jadro cyklínu. Je tvorené asi 250 aminokyselinami a organizované do dvoch záhybov s piatimi α helixmi. Prvý záhyb sa skladá zo sekvencie asi 100 aminokyselín (tzv. cyclin box) (Noble et al., 1997) a vykazuje najvyššiu konzervovanosť (Dewitte a Murray, 2003). Niektoré cyklíny (CycA a CycB) obsahujú ďalšiu dôležitú sekvenciu, a to predovšetkým z hľadiska bunkového cyklu, tzv. „destruction box“, ktorý je nevyhnutný pre ubiquitináciu a následné proteolytické štiepenie cyklínov (Francis, 2007).

Rôzne cyklíny sa zúčastňujú rôznych fáz bunkového cyklu (Vermeulen et al., 2003) a sú špecifické pre určitú CDK. Cyklínová podjednotka ovplyvňuje lokalizáciu aj substrátovú špecificitu katalytickej kinázovej podjednotky. Cyklíny sa podľa funkčnej príslušnosti k jednotlivým fázam bunkového cyklu a sekvenčnej príbuznosti delia do niekoľkých skupín. U *Saccharomyces cerevisiae* boli identifikované cyklíny G1 fázy (Cln1, Cln2 a Cln3), S fázy (Clb5 a Clb6) a cyklíny M fázy (Clb1, Clb2, Clb3 a Clb4), ktoré pôsobia pri prechode z G2 do fázy M (Nasmyth, 1995, 1996). U živočíchov bolo identifikovaných 13 tried cyklínov (A-L a T) (Pines, 1995) zatiaľ čo u rastlín len 7 (A, B, C, D, H, P, T), avšak medzi ne sa zaraďuje 60 známych génov rastlinných cyklínov, čo je oveľa viac ako u iných organizmov. Na bunkovom cykle sa spomedzi nich podielajú len 3 triedy - A (S fáza), B (mitóza) a D (G1 fáza) (Francis, 2007). Cyklíny typu D regulujú G1/S prechod, cyklíny typu A zodpovedajú za S/M prechodný bod a cyklíny typu B vykonávajú funkciu v G2/M prechode a samotnej

mitóze (Breyne a Zabeau, 2001). Zatiaľ čo rastlinné cyklíny A a B majú homológy u živočíchov, cyklíny typu D sa u rastlín a živočíchov odlišujú (Renaudin et al., 1996) (Murray, 2004).

2.3. Regulácia aktivity CDK

Eukaryotické serín-treonínové kinázy obsahujú 300 aminokyselinové katalytické jadro (Hanks a Hunter, 1995). Štruktúra katalytického jadra ľudskej monomérskej CDK2 pozostáva z malej terminálnej časti bohatej na β -listy a z väčšej C-terminálnej časti bohatej na α -helixy. Na rozhraní N- a C-terminálnej časti sa nachádza hlboký žliabok, ktorý obsahuje T-slučku a väzobné miesto pre ATP fosfát a substrát. V štruktúre monomérskej CDK2 slúžia dve oblasti ako regulačné prvky (De Bondt et al., 1993). Jednou z nich je α -helix s unikátnou sekvenciou PSTAIRE, ktorá sa vyskytuje iba u cyklín-dependentných kináz. Druhú tvorí T-slučka s aktivačným regulačným miestom.

Kryštalografická analýza komplexu Cdk2-CycA odhalila, že tzv. „cyklin box“ v cyklíne predstavuje kľúčový prvok pre ich vzájomnú interakciu a tiež pre interakciu CycA s cyklín-dependentnými kinázami príbuznými s Cdk2 (Jeffrey et al., 1995). Práve tento box sa viaže na vysoko konzervovaný motív PSTAIRE kinázy Cdk2 a indukuje konformačné zmeny v katalytickom žliabku (Joubes et al., 2000).

Pre aktiváciu kináz je rozhodujúce predovšetkým naviazanie cyklínovej podjednotky na α -helix s motívom PSTAIRE, čím kináza získa čiastočnú aktivitu. K aktivácii kinázy dôjde v dôsledku konformačnej zmeny spôsobenej väzbou cyklínu, ktorá indukuje rotáciu α -helixu do katalytického žliabku. Tým sa sprístupní aj fosforylačné miesto s konzervovaným treonínovým zvyškom (Thr160) na T-slučke. Toto je dôležité pre úplnú aktiváciu komplexu CDK-cyklín, ktorá nastane po fosforylácii Thr160 prostredníctvom CDK aktivačnej kinázy (CAK) (Fisher a Morgan, 1994). Táto zvyšuje kinázovú aktivitu až 100-násobne. Po fosforylácii Thr160 na T-slučke nastane ďalšia konformačná zmena umožňujúca správne naviazanie substrátu a ATP (Dewitte a Murray, 2003).

Pre ďalšiu reguláciu aktivity komplexu CDK-cyklín je dôležitá inhibičná fosforylácia na treonínovom (Thr14) a tyrozínovom (Tyr15) zvyšku v blízkosti ATP-väzobného miesta, ktorú katalyzuje kináza Wee1 (Russell a Nurse, 1987). Fosforylovaný treonín a tyrozín bránia naviazaniu ATP na komplex CDK-cyklín, a to v dôsledku vzniku elektrostatického odporu medzi fosfátmi naviazanými na CDK a fosfátmi v molekule ATP (Lodish et al., 1999). V takto fosforylovanom stave je komplex CDK-cyklín inaktívny a pre jeho aktiváciu je potrebné odstrániť inhibičné fosfáty z Thr14 a Tyr15, čo zabezpečuje fosfatáza Cdc25

(Russell a Nurse, 1986, 1987). Vznikne plne aktívny komplex CDK-cyklín, ktorý má fosforylovaný len Thr160 na T-slučke.

Regulácia aktivity komplexov CDK-cyklín, nie je teda regulovaná len prostredníctvom množstva CDK a cyklínov v bunke, ale aj cez aktivačnú a inhibičnú fosforyláciu a interakciu s rôznymi regulačnými proteínmi.

2.3.1. Aktivátory

CDK-aktivačné kinázy (CAK) zohrávajú dôležitú úlohu v regulácii bunkového cyklu prostredníctvom aktivácie CDK. Fosforylujú konzervovaný treonínový zvyšok (Thr160) na T-slučke CDK, ktorá v nefosforylovanom stave blokuje vstup substrátu do katalytického žliabku (Nigg, 1996).

U stavovcov je CAK komplex zložený z katalytickej podjednotky Cdk7 a regulačnej podjednotky cyklínu H (Fisher a Morgan, 1994). Samotná Cdk7 má nízku CAK aktivitu, ktorá sa však v prítomnosti cyklínu H signifikantne zvyšuje. Ďalšou zložkou komplexu je proteín Mat1, ktorý celý komplex stabilizuje (Tassan et al., 1995). Tento trimérický CAK komplex bol identifikovaný aj ako transkripčný faktor TFIIH (Shiekhattar et al., 1995), čo naznačuje duálnu funkciu CAK - v regulácii bunkového cyklu a v regulácii bazálnej transkripcie.

CAK komplex kvasinky *S. pombe* je zložený z niekoľkých proteínov, ktoré sú blízko príbuzné zložkám CAK komplexu stavovcov (Cdk7, CycH a Mat1) a je schopný fosforylovať kinázu Cdc2 ako aj C-terminálnu doménu (CTD) RNA polymerázy II (Damagnez et al., 1995). Podobne je to aj u *S. cerevisiae*, ale táto obsahuje dva CAK komplexy. Jeden s kinázou Kin28p zodpovednou za fosforyláciu CTD (Feaver et al., 1994) a druhý s kinázou Cak1p fosforylujúcou Cdc28 (Espinoza et al., 1996).

U rastlín sú známe dva typy CAK – CdkF (Umeda et al., 1998; Umeda et al., 2000), ktorá dokáže komplementovať CAK (csk1) mutáciu u kvasiniek (Umeda et al., 2005) a CdkD, homológ živočíšnej Cdk7, ktorá je aktívna v komplexe s cyklínom H (Dewitte a Murray, 2003). CdkF je rastlinne špecifická CAK, ktorá na rozdiel od CdkD, pre svoju aktiváciu nevyžaduje väzbu s cyklínom H (Yamaguchi et al., 2003). Výsledky z posledných rokov naznačujú, že CdkF fosforyluje a aktivuje CdkD u *Arabidopsis* (Shimotohno et al., 2004), teda slúži ako CAK-aktivačná kináza (CAKAK). CdkD je funkčne príbuzná CAK zo stavovcov a je schopná fosforylovať C-terminálnu doménu (CTD) veľkej podjednotky RNA polymerázy II (Inze a De Veylder, 2006). Preferenčne sa exprimuje počas S fázy bunkového cyklu (Fabian-Marwedel et al., 2002).

2.3.2. Regulácia fosforylácie Thr14/Tyr15

Mitotické komplexy CDK-cyklín sformované počas S a G2 fázy sa v bunke udržujú v inaktívnom stave prostredníctvom inhibičnej fosforylácie na Tyr15 (kvasinky) resp. na Tyr15 a Thr14 (vyššie eukaryoty) (De Veylder et al., 2003). Za túto fosforyláciu je zodpovedná rodina kináz, do ktorej sa zaraďujú Wee1 (Russell a Nurse, 1987), Mik1 (Lundgren et al., 1991) a Myt1 (Mueller et al., 1995) kinázy. Pre aktiváciu týchto komplexov je nevyhnutná fosfatáza Cdc25.

2.3.2.1. Kináza WEE1

Za inhibičnú fosforyláciu Cdc2 u kvasinky *S. pombe* sú zodpovedné dve kinázy z rodiny Wee kináz - Wee1 a Mik1 (Lundgren et al., 1991), obe fosforylujú Tyr15 a Wee1 aj Thr14 (Den Haese et al., 1995). Zatiaľ čo Wee1 v bunkách *S. pombe* inhibuje vstup do mitózy na základe veľkosti buniek, Mik1 reaguje na replikačný stres (Rhind a Russell, 2001). U kvasinky *S. cerevisiae* je prítomný homológ *WEE1* označovaný ako *SWE1* a je zodpovedný za fosforyláciu tyrozínového zvyšku kinázy Cdc28 (Booher et al., 1993). V živočíšnych bunkách boli identifikované dve kinázy zodpovedné za inhibičnú fosforyláciu - Wee1, ktorá fosforyluje Tyr15 a Myt1 fosforylujúca preferenčne Thr14, menej Tyr15 (Mueller et al., 1995). Wee1/Mik1 typy kináz boli identifikované v mnohých eukaryotoch ako je *S. cerevisiae* (Booher et al., 1993), *Drosophila* (Campbell et al., 1995), *Xenopus* (Mueller et al., 1995), myš (Honda et al., 1995) a človek (Igarashi et al., 1991; Parker et al., 1995; Watanabe et al., 1995). U rastlín boli identifikované homológy *WEE1* u kukurice (Sun et al., 1999), *Arabidopsis* (Sorrell et al., 2002) a paradajky (Gonzalez et al., 2004), pričom kukuričná *WEE1* vykazuje najvyššiu homológiu (50 %) s ľudskou *WEE1* (Sun et al., 1999). U *Arabidopsis* nebola Mik1 ani Myt1 identifikovaná (Francis, 2007).

Hlavnou funkciou kinázy Wee1 u kvasiniek a cicavcov je regulácia bunkového cyklu, konkrétne prechod z G2 do M fázy (Dunphy, 1994), avšak zistila sa jej úloha aj v S fáze. Ľudská Wee1 dokáže fosforylovať mitotický Cdk1-CycB komplex rovnako ako aj komplexy Cdk2-CycE (CycA) nevyhnutné pre vstup do S fázy (Watanabe et al., 1995; Booher et al., 1997). U *S. pombe* a cicavcov sú kinázy Wee1 a Mik1 súčasťou „DNA damage checkpoint“ (kontrolného bodu poškodenia DNA). Wee1 je u kvasinky *S. pombe* hyperfosforylovaná Chk1 (checkpoint kinázou 1) v bunkách ovplyvnených UV žiarením (O'Connell et al., 1997; Raleigh a O'Connell, 2000), zatiaľ čo Mik1 sa akumuluje v bunkách s poškodenou DNA v závislosti na kináze Chk1 (Baber-Furnari et al., 2000).

Rastlinné homológy Wee1 majú funkčné vlastnosti, ktoré sú charakteristické pre kvasinkové aj živočíšne kinázy Wee1. Overexpresia *ZmWEE1* a *AtWEE1* v kvasinke *S. pombe* má za následok inhibíciu bunkového delenia a signifikantné predĺženie buniek v porovnaní s kontrolnými bunkami (Sun et al., 1999; Sorrell et al., 2002), čo sa deje aj v ľudských bunkách a bunkách *S. pombe* po overexpresii *WEE1* (Igarashi et al., 1991). *In vitro* kinázová esej odhalila, že GST-fúzovaný proteín ZmWee1 dokáže inhibovať aktivitu CDK (Sun et al., 1999), avšak doposiaľ nebola u rastlín popísaná špecifická fosforylácia na tyrozínovom zvyšku CDK v oblasti ATP viažuceho miesta.

Najvyššia expresia *WEE1* u *Arabidopsis* (Sorrell et al., 2002) a paradajky (Gonzalez et al., 2004) bola zaznamenaná v pletivách s vysokou frekvenciou bunkového delenia, čo naznačuje jej úlohu v regulácii bunkového delenia. Gonzalez a kol. zistili, že expresia *WEE1* je regulovaná v priebehu bunkového cyklu a k najväčšej akumulácii Wee1 transkriptu dochádza v S fáze (Gonzalez et al., 2004). Podobný priebeh expresie má aj *WEE1* z *Arabidopsis* (Menges et al., 2003).

Rastlinná kináza Wee1 je okrem regulácie bunkového cyklu zahrnutá aj v ďalších procesoch. Je vysoko pravdepodobné, že sa zúčastňuje mechanizmu, ktorý spôsobuje zastavenie bunkového cyklu v G2/M prechodnom bode a bunky tak vstupujú do tzv. endocyklu. Vysoká hladina ZmWee1 transkriptu bola zaznamenaná v endosperme kukurice v čase, keď v jadrách endospermu prebiehala endoreduplikácia (Sun et al., 1999). Podobne u paradajky, expresia *WEE1* bola zaznamenaná v tých častiach plodu, v ktorých v priebehu vývoja dochádzalo k endoreduplikácii (Gonzalez et al., 2004). Táto regulácia pravdepodobne súvisí s fosforyláciou mitotickej CDK a tým jej inhibíciou a zároveň s aktiváciou CDK, ktorá je špecifická pre S fázu bunkového cyklu (Sun et al., 1999). Predpokladá sa, že ak *WEE1* kontroluje priebeh endocyklu, deje sa tak v závislosti na druhovej špecificite (De Schutter et al., 2007).

Ďalšou významnou úlohou kinázy Wee1 je kontrola DNA checkpointu u rastlín vystavených stresovým podmienkam (Boudolf et al., 2006). Rastliny *Arabidopsis thaliana* s *wee1* deléciou sú schopné rásť normálne za optimálnych kultivačných podmienok, ale vykazujú hypersenzitivitu k činidlám poškodzujúcim DNA. V štandardných bunkách tieto agensy indukujú zvýšenú expresiu *WEE1*, čo vedie k zastaveniu bunkového cyklu. Toto naznačuje, že Wee1 je podstatnou zložkou mechanizmu, ktorý prepája mitózu s DNA reparáciou v bunkách s poškodenou DNA (De Schutter et al., 2007). Dokonca sa zdá, že u *Arabidopsis* nie je kináza Wee1 limitujúca pre priebeh normálneho bunkového cyklu, avšak

je esenciálnym komponentom pre zastavenie bunkového cyklu po poškodení DNA (Boudolf et al., 2006; De Schutter et al., 2007).

2.3.2.2. Fosfatáza CDC25

Pre aktivačnú fosforyláciu komplexu CDK/cyklín je u *S. pombe* nevyhnutná funkčná fosfatáza Cdc25. Je to duálne špecifická fosfatáza, ktorá defosforyluje Thr14 a Tyr15, čím znovu aktivuje komplex CDK-cyklín a umožní vstup bunky do M fázy. Jej homológy boli nájdené aj u ďalších eukaryotov. U *S. cerevisiae* sa označuje ako Mih1 (Pal et al., 2008). Živočichy majú niekoľko fosfatáz Cdc25, napr. u *Xenopus laevis* sú prítomné 3 – Cdc25A, B a C (Izumi et al., 1992). V cicavčích bunkách Cdc25C defosforyluje komplex Cdk2/CycB1 (Strausfeld et al., 1994) a je esenciálna pre prechod bunky G2/M fázou (Heald et al., 1993). Cdc25A je dôležitá pre replikáciu a vstup do S fázy (Hoffmann et al., 1994), zatiaľ čo Cdc25B zohráva pravdepodobne úlohu v mitóze spolu s Cdc25C (Karlsson et al., 1999).

Výnimku predstavuje rastlinná ríša, kde fosfatáza Cdc25 bola doposiaľ identifikovaná len u jednobunkovej riasy *Ostreococcus taurii* (Khadaroo et al., 2004). Napriek tomu, že genómy *Arabidopsis*, ryže aj *Chlamydomonas* boli kompletne osekvenované, žiaden gén kódujúci fosfatázu Cdc25 nebol doposiaľ identifikovaný (Vandepoele et al., 2002; Bisova et al., 2005). Avšak prítomnosť antagonistickej kinázy Wee1 ako aj biochemické a genetické analýzy naznačujú, že vyššie rastliny majú fosfatázu aktivujúcu CDK-cyklínové komplexy (Zhang et al., 1996). V roku 2004 bol u *Arabidopsis* identifikovaný proteín podobný fosfatáze Cdc25 s funkčnou fosfatázovou doménou s rodanínom, ktorý je schopný viazať sa na fosfotreonín 14 a fosfotyrozín 15 a následne aktivovať CDK *in vitro*. Na rozdiel od klasickej fosfatázy Cdc25 chýba tomuto novému proteínu N-terminálna regulačná doména, ktorá je typická pre Cdc25 (Landrieu et al., 2004). Taktiež nie je schopný komplementovať *cdc25* mutáciu u kvasiniek a jeho overexpresia alebo down-regulácia neovplyvňuje bunkový cyklus rastlín (Inze a De Veylder, 2006).

Na regulácii samotnej fosforylácie sa podieľajú aj rôzne extracelulárne podnety ako je vysoký osmotický tlak (Shiozaki a Russell, 1995), vápnik (Mizunuma et al., 1998) resp. UV žiarenie (O'Connell et al., 1997). Posledný spomínaný agens je aktívne využívaný rôznymi signálnymi dráhami pre zastavenie bunkového cyklu. Napr. u *S. pombe* a cicavcov, ale taktiež rastlín, UV žiarenie spúšťa ATM (ataxia telangiectasia mutated) a ATR (ATM and Rad3-related) kinázovú signálnu kaskádu, ktorá súčasne aktivuje reparačné komplexy a zároveň zastavuje bunkové delenie (Zhou a Elledge, 2000; Abraham, 2001; Garcia et al., 2003; Kurz a Lees-Miller, 2004).

2.3.3. Inhibitory

Inhibitory CDK hrajú významnú úlohu v kontrole bunkového cyklu. Označujú sa ako CKI (CDK inhibitors) a ich úlohou je viazať a inhibovať CDK (Morgan, 1997).

U *Saccharomyces cerevisiae* boli identifikované tri CKI (Far1p, Sic1p a Pho81p), z ktorých každý má úlohu v inej fáze bunkového cyklu (Mendenhall, 1998). Kvasinka *Schizosaccharomyces pombe* má túto situáciu oveľa jednoduchšiu, keďže je u nej prítomný len jeden CKI (Rim1) kontrolujúci mitotické CDK-cyklínové komplexy (Moreno a Nurse, 1994).

Sedem CKI, ktoré sa delia do dvoch veľmi odlišných tried, bolo identifikovaných u cicavcov. INK4 rodina selektívne inhibuje CDK G1 fázy (Cdk4 a Cdk6), zatiaľ čo Cip/Kip rodina je zameraná na široké spektrum CDK-cyklínových komplexov zahrnutých v kontrole G1/S aj G2/M prechodu (Nakayama a Nakayama, 1998). Členovia tejto rodiny môžu interagovať s monomérmi, ale s oveľa vyššou afinitou sa viažu ku komplexom CDK-cyklín (Joubes et al., 2000).

U rastlín sú CKI známe ako KRP (Kip-related proteins) alebo ICK (Interactors of Cdc2 kinase) a pravdepodobne sú schopné viazať samotnú CDK ako aj cyklínovú podjednotku (Wang et al., 1999). KRP sú odvodené od cicavčích proteínov Cip/Kip, s ktorými majú podobnú N-terminálnu doménu (De Veylder et al., 2001). Rastlinné CKI sa vyznačujú špecifickou štruktúrou. Všetky majú na C-terminálnom konci lokalizovanú konzervovanú doménu z 31 aminokyselín, ktorá viaže CDK a cyklíny a je esenciálna pre inhibičnú aktivitu týchto proteínov (Wang et al., 1997; De Veylder et al., 2001).

Dĺžka a primárna štruktúra N-terminálnej časti rastlinných CKI (ICK, KRP) vysoko varíruje medzi jednotlivými rastlinnými druhmi (De Veylder et al., 2001). Funkčná analýza naznačuje, že N-terminálna doména obsahuje sekvenciu, ktorá znižuje proteínovú stabilitu *in vivo*, a teda pravdepodobne zodpovedá za selektívnu degradáciu proteínov CKI v rôznych fázach bunkového cyklu (Zhou et al., 2003).

Množstvo proteínov CKI v rastlinnej bunke je regulované podobne ako u cicavcov a kvasiniek, a to prostredníctvom fosforylácie cyklín-dependentnými kinázami, následným rozpoznaním fosforylovaných proteínov a ich degradáciou v proteazóme (Vlach et al., 1997; Nishizawa et al., 1998). Napríklad u *Arabidopsis* je proteolýza proteínu Krp2 kontrolovaná CdkB fosforyláciou (Verkest et al., 2005).

Niektoré z rastlinných CKI sú schopné viazať sa s CdkA (ICK1, 2, 7), avšak priama interakcia s CdkB zatiaľ identifikovaná nebola (Zhou et al., 2002). Pomocou kvasinkového

dvoj-hybridného systému však boli identifikované interakcie proteínov KRP pochádzajúcich z *Arabidopsis* a tabaku s cyklínmi typu D a A. Toto naznačuje, že KRP sú pravdepodobnými regulátormi CDK-CycD komplexov (Wang et al., 1998; De Veylder et al., 2001; Jasinski et al., 2002) a taktiež komplexov CDK-CycA (Coelho et al., 2005).

Proteíny CKI sa prostredníctvom regulácie aktivity CDK-cyklínových komplexov podieľajú aj na kontrole endoreduplikácie, konkrétne na „prepínaní“ medzi štandardnou mitózou a endoreduplikáciou. Slabá overexpresia proteínu *ICK2/KRP2* alebo *CKII/KRP1* u *Arabidopsis* špecificky inhibuje mitotický CdkA-cyklínový komplex, čo vedie k spusteniu endoreduplikácie (Verkest et al., 2005; Weinl et al., 2005).

2.4. Kontrola bunkového cyklu rastlín

Hoci bunkové delenie rastlín prebieha podobne ako u ostatných eukaryotov, predsa len sa u neho vyskytujú určité odlišnosti. Väčšina regulačných proteínov ako napr. cyklíny a CKI sa u rastlín nachádzajú vo väčšom počte, čo odráža schopnosť rastlín modifikovať ich post-embryonálny vývin. Taktiež niektoré rastliny opakovane replikujú DNA bez predchádzajúcej mitózy (endoreduplikácia), čím zvyšujú ploiditu svojich buniek a pletív.

Gény pre CDK a mitotické cyklíny boli prvé gény bunkového cyklu charakterizované u rastlín (Colasanti et al., 1991; Ferreira et al., 1991; Hirt et al., 1991). Prvý rastlinný homológ *CDC2* bol identifikovaný u jednobunkovej riasy *C. reinhardtii* a tiež u pšenice v roku 1989 (John et al., 1989). Za ním nasledovalo množstvo ďalších objavov, vrátane prvého rastlinného cyklínu identifikovaného v roku 1991 (Hata et al., 1991).

V súčasnosti predstavujú rastlinné CDK asi 50 odlišných sekvencií u viac ako dvadsiatich druhov nižších i vyšších rastlín (Joubes et al., 2000). Všetky vykazujú vysoký stupeň homológie a zároveň aj určité štruktúrne a funkčné odlišnosti v porovnaní so živočíšnymi a kvasinkovými CDK (Jacobs, 1995; Mironov et al., 1999; Umeda et al., 1999).

2.4.1. Rastlinné cyklín-dependentné kinázy (CDK)

Rastliny kódujú 7 tried CDK označených veľkými písmenami A - G (CDKA-G) (Joubes et al., 2000; Umeda et al., 2005; Francis, 2007) a novú triedu tzv. CKL (CDK-like kinases) proteínov identifikovaných v roku 2005 (Menges et al., 2005).

Najpočetnejšiu rodinu kináz predstavuje CDKA, ktorá ako jediná zahŕňa CDK s cyklín väzobným motívom PSTAIRE a zároveň je to jediný typ CDK u vyšších rastlín, ktorý komplementuje kvasinkovú mutáciu *cdc2/cdc28* (Colasanti et al., 1991; Ferreira et al., 1991; Hirt et al., 1993). U *Arabidopsis* je kódovaná jedným génom a podobne ako u ostatných

rastlín, hladina jej mRNA zostáva počas celého bunkového cyklu konštantná (Sorrell et al., 2001; Menges a Murray, 2002). Rovnako ani proteínová hladina CdkA sa počas cyklu nemení (Magyar et al., 1997). Aktivita CdkA je regulovaná post-translačne (Hemerly et al., 1995), stúpa počas G1 fázy a maximum dosahuje v S fáze (Dewitte a Murray, 2003), pričom zohráva dôležitú úlohu v G1/S a G2/M prechode (Umeda et al., 2005; Inze a De Veylder, 2006). Expresia *CDKA* je viazaná na pletivá udržiavajúce si deliacu schopnosť (Segers et al., 1996) a jej aktivita je esenciálna pre delenie buniek (Dewitte a Murray, 2003). Lokalizácia CdkA počas bunkového cyklu naznačuje jej funkciu. Behom interfázy ju môžeme detekovať v jadre a v cytoplazme asociovanej s chromatinom, v priebehu mitózy je lokalizovaná v blízkosti chromatinu (profáza), mitotického vretienka (prometáfáza, anafáza) a fragmoplastu (telofáza) (Weingartner et al., 2001), čo indikuje kľúčovú úlohu CdkA v kontrole dynamiky mikrotubulov a tým aj v priebehu mitózy (Steinborn et al., 2002).

CDKB je unikátna trieda CDK vyskytujúca sa len u rastlín (Joubes a Chevalier, 2000; Boudolf et al., 2001). Motív PSTAIRE je u nej modifikovaný na PPTALRE resp. PPTTLRE, čo hovorí o prítomnosti dvoch podskupín – CDKB1 a CDKB2 (Vandepoele et al., 2002). Oba typy sa vyznačujú expresiou závislou od fázy bunkového cyklu, čo zatiaľ nebolo pozorované u žiadnej inej CDK izolovanej z ostatných eukaryotov (Mironov et al., 1999; Dewitte a Murray, 2003). Expresia *CDKB* prebieha v aktívne sa deliacich pletivách s výnimkou pletív podliehajúcich endoreduplikácii (Riou-Khamlichi et al., 1999) a pravdepodobne je limitujúca pre prechod bunky G2/M bodom (Porceddu et al., 2001). Rastliny *Arabidopsis* s nadexpresiou dominantne negatívnej alely *CDKB1;1* predčasne vystupujú z bunkového cyklu (Boudolf et al., 2004), čo je u nich spojené so začiatkom endoreduplikácie. *CDKB1;1* je teda zodpovedná za potlačenie predčasného ukončenia bunkového cyklu a zároveň za inhibíciu endoreduplikácie, čo sa deje prostredníctvom fosforylácie CDK-inhibičného proteínu ICK2 (Verkest et al., 2005). Oba typy CDKB vykazujú maximálnu kinázovú aktivitu v čase mitózy (Inze a De Veylder, 2006), avšak líšia sa v čase transkripcie v priebehu bunkového cyklu. *CDKB1* transkript sa hromadí počas S, G2 a M fázy, zatiaľ čo transkript *CDKB2* sa objavuje neskôr, v G2 a M fáze (Fobert et al., 1996; Umeda et al., 1999; Porceddu et al., 2001). Rastlinné *CDKB* nie sú schopné komplementovať kvasinkové *cdc2/cdc28* mutanty (Mironov et al., 1999; Boudolf et al., 2004). V súčasnej dobe však bolo zistené, že *CDKB* z morskej jednobunkovej riasy *Ostreococcus tauri* (Corellou et al., 2005) a podobne aj zo sladkovodnej riasy *C. reinhardtii* (Čížková et al., 2008) sú schopné komplementovať kvasinkovú *cdc28* mutáciu. U *C. reinhardtii* je prítomný len jeden gén pre *CDKB*, ktorý zodpovedá génu pre *CDKB1* z vyšších rastlín (Bisova et al., 2005).

Úloha CDKC a CDKE v bunkovom cykle nie je úplne objasnená. CdkC vytvára komplex s CycT a zohráva pravdepodobne úlohu v elongácii transkripcie (Barroco et al., 2003), prípadne u *Medicago truncatula* vo fosforylácii proteínu RBR (retinoblastoma-related), čo môže súvisieť s úlohou v kontrole bunkovej diferenciácie prostredníctvom inaktivácie proteínu RBR (Fulop et al., 2005).

CDKE sa pravdepodobne podieľa na regulácii RNA polymerázy II (Francis, 2007) a tiež na diferenciácii listov a kvetných orgánov (Wang a Chen, 2004).

CDKD a CDKF majú úlohu v aktivácii CDK. CdkF pôsobí ako CAKAK (CAK aktivačná kináza) a fosforyluje a aktivuje CdkD. Aktivovaná CdkD z ryže dokáže fosforylovať nielen CdkA z ryže, ale aj ľudskú Cdk2 a CTD doménu veľkej podjednotky RNA polymerázy II z *Arabidopsis* (Shimotohno et al., 2004), čo naznačuje jej úlohu v regulácii transkripcie (Umeda et al., 2005). Gén *CDKD* u ryže sa preferenčne exprimuje počas G1 a S fázy bunkového cyklu (Umeda et al., 1999).

CDKG bola identifikovaná na základe konzervovaného motívu PLTSLRE a homológie s ľudskou kinázou (motív PITSLRE) asociovanou s galaktozyltransferázou (p58/GTA) (Menges et al., 2005).

Proteíny CKL boli prvý krát identifikované u *Arabidopsis*, kde tvoria samostatnú skupinu 15 príbuzných sekvencií označených ako *CKL1-15* (Menges et al., 2005). Vykazujú vysokú homológiu s CDK v tých častiach proteínu, ktoré sú ekvivalentné ku konzervovaným fosforylovaným zvyškom ako je Thr160 v T-sľučke, rovnako ako aj k Thr15 a Tyr16 kinázy CdkA z *Arabidopsis*. Hoci je PSTAIREI cyklín väzobný motív z CdkA nahradený v CKL podobnou sekvenciou (V,I,L)(K,R)FMAREI, zachovanie kľúčových fosforylovaných zvyškov naznačuje paralelný mechanizmus aktivácie CDK a CKL kináz. Gény pre kinázy CKL vykazujú vysokú pletivovú špecificitu v porovnaní s ostatnými génmi bunkového cyklu a tiež expresia niektorých závisí na fáze bunkového cyklu. U takýchto CKL sa predpokladá, že by mohli zohrávať úlohu v regulácii bunkového cyklu (Menges et al., 2005). Proteíny CKL boli identifikované aj u iných rastlinných druhov, avšak celkový počet členov tejto rodiny ešte nie je známy.

2.4.2. Rastlinné cyklíny

Rastliny obsahujú na rozdiel od iných organizmov oveľa vyšší počet cyklínov (Vandepoele et al., 2005). Napr. *Arabidopsis thaliana* kóduje prinajmenšom 32 cyklínov, ktoré sa zúčastňujú bunkového cyklu. Bolo u nej identifikovaných 10 cyklínov typu A, 11 cyklínov typu B, 10 cyklínov typu D a 1 cyklín H. Okrem toho obsahuje asi 17 cyklínom-

podobných génov (typy C, P, L a T), ktoré síce môžu asociovať s CDK, ale úloha v bunkovom cykle nebola identifikovaná ani u jedného z nich (Wang et al., 2004).

A a B typ cyklínov bol izolovaný u rôznych rastlinných druhov a je sekvenčne príbuzný živočíšnym typom cyklínov (Renaudin et al., 1996). Ich hladina v bunke je prísne kontrolovaná proteolýzou závislou od priebehu bunkového cyklu a je zabezpečená prostredníctvom N-terminálnej sekvencie, tzv. deštrukčného boxu (Genschik et al., 1998).

Cyklíny typu A zahŕňajú tri odlišné podtriedy – CYCA1, CYCA2 a CYCA3 (Renaudin et al., 1996). Expresné analýzy naznačujú, že A cyklíny sa exprimujú pred cyklínmi typu B, pred začiatkom S fázy (Fuerst et al., 1996; Ito et al., 1997). Analýza cyklínov u tabaku odhalila, že rôzne podtriedy cyklínov sa môžu exprimovať v rôznych fázach bunkového cyklu, a teda pravdepodobne zohrávajú aj odlišnú biologickú úlohu (Reichheld et al., 1996). CycA3 má pravdepodobne úlohu v znovuspustení bunkového cyklu alebo prechode bunky G1/S bodom (Meskiene et al., 1995). Analýza fúzneho proteínu CycA3-GFP odhalila jeho prítomnosť v jadre a jadierku počas S fázy, zatiaľ čo v bunkách prechádzajúcich mitózou jeho prítomnosť detekovaná nebola (Criqui et al., 2001).

Cyklíny typu B zahŕňajú dve podtriedy, CYCB1 a CYCB2 (Renaudin et al., 1996). Nedávno však bola u *Arabidopsis* identifikovaná aj tretia podtrieda, CYCB3, tvorená proteínmi podobnými cyklínom B, vyznačujúcimi sa absenciou typického deštrukčného boxu (Vandepoele et al., 2002). Primárny transkript *CYCB* chýba počas S fázy, začína stúpať v G2, pričom maximum dosahuje počas G2 a v skorej mitóze, následne v priebehu mitózy dochádza k rýchlemu poklesu jeho hladiny (Hirt et al., 1992; Menges a Murray, 2002). Z toho sa usudzuje, že cyklín B sa podieľa na prechode bunky G2/M bodom (Dewitte a Murray, 2003). Regulácia hladiny CycB prebieha na transkripčnej úrovni, ale aj prostredníctvom proteolýzy za účasti APC (anaphase promoting complex). Degradácia CycB APC komplexom indikuje prechod bunky z metafázy do anafázy (Genschik et al., 1998).

Cyklíny typu D pôsobia v G1 fáze a sú štruktúrne podobné cicavčím D cyklínom (Dewitte a Murray, 2003). Väčšina cyklínov typu D obsahuje typický motív LXCXE pre väzbu proteínu Rb (Huntley et al., 1998; Vandepoele et al., 2002) a PEST sekvenciu potrebnú pre proteínovú degradáciu (Oakenfull et al., 2002). Za charakteristickú funkciu cyklínov D je považované spustenie replikácie DNA, ale cyklín D3 je schopný indukovať aj mitózu (Schnittger et al., 2002).

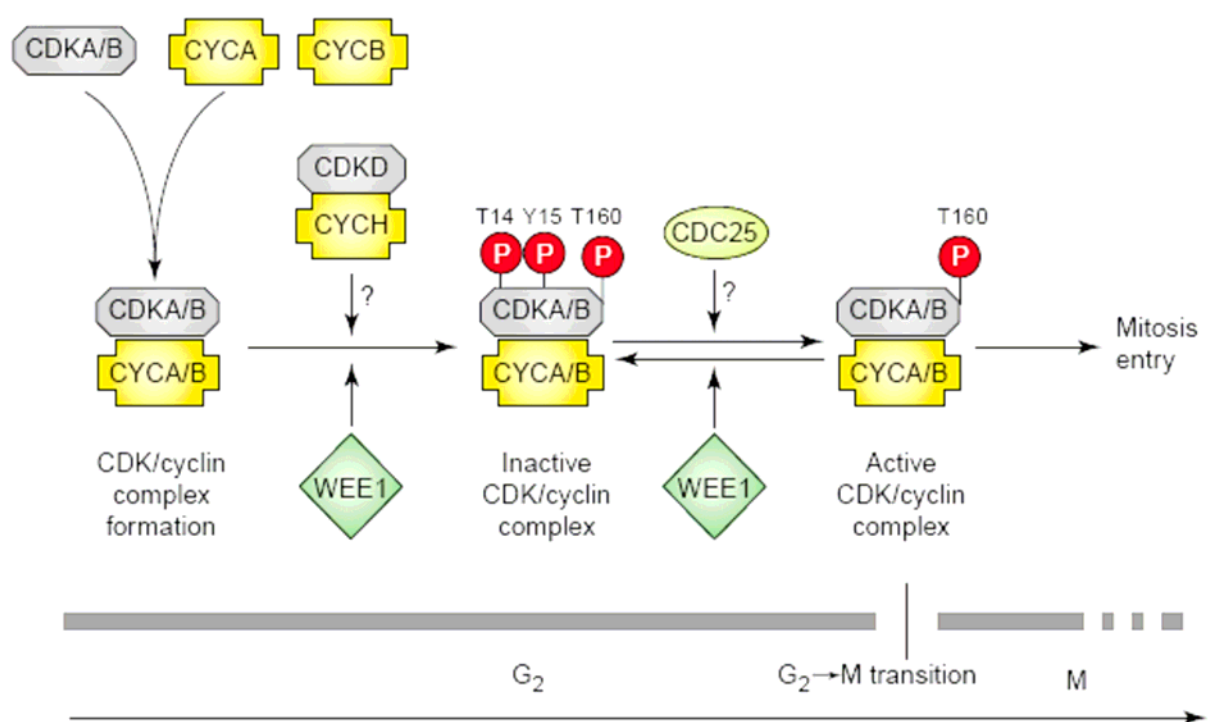
Gény kódujúce H typ cyklínov boli identifikované u *Arabidopsis*, ryže a topoľa. V deliacich sa bunkách bola zaznamenaná vysoká hladina *CYCH* transkriptu. Cyklín H špecificky interaguje s CdkD, čím zvyšuje jej kinázovú aktivitu. Keďže CdkD má úlohu

v regulácii ako CDK-aktivačná kináza, cyklín H predstavuje regulačnú podjednotku tejto CAK (Yamaguchi et al., 2000).

2.4.3. Vstup rastlinných buniek do mitózy

Regulácia vstupu buniek do mitózy predstavuje u všetkých živých organizmov dôležitý bod, ktorý je nevyhnutný pre zachovanie ich integrity. Rastliny sa vyznačujú špecifickou reguláciou prechodu z G₂ do M fázy, čo súvisí so syntézou novej bunkovej steny a možnosťou vstúpiť do endocyklu (Larkins et al., 2001; Boudolf et al., 2004).

Počas G₂ fázy CdkA aj CdkB môžu asociovať s cyklínom B (Magyar et al., 1997; Porceddu et al., 2001), pričom CdkB pravdepodobne reguluje rastlinne špecifické procesy bunkového cyklu (De Veylder et al., 2003). Ďalším regulačným partnerom týchto kináz je pravdepodobne aj A typ cyklínov. CDK-cyklínové komplexy sa formujú už počas S a G₂ fázy avšak v dôsledku inhibičnej fosforylácie kinázou Wee1 na Thr14 a Tyr15 zostávajú inaktívne a to do doby, kým nedôjde k ich aktivácii fosfatázou Cdc25, v prípade rastlín zrejme proteínmi podobnými fosfatáze Cdc25. Táto počas G₂/M prechodu defosforyluje CDK na Thr14 a Tyr15, čím sa zabezpečí úplná aktivácia CdkA(B), ktorá potom spätne prostredníctvom fosforylácie deaktivuje kinázu Wee1 a aktivuje fosfatázu Cdc25. Toto umožní bunkám vstúpiť do delenia (Francis, 2007) (Obr.7).



Obr.7: Schéma mechanizmu regulácie G₂-M prechodu u rastlín (De Veylder et al., 2003)

2.4.4. Cyklín-dependentné kinázy a cyklíny riasy *Chlamydomonas reinhardtii*

Genóm *Chlamydomonas* kóduje ortológy všetkých hlavných rastlinných CDK a cyklínov, pričom obsahuje aj dve špecifické CDK a dva cyklíny, ktoré neboli identifikované u vyšších rastlín, húb ani živočíchov. Zatiaľ čo u vyšších rastlín väčšina génov regulujúcich bunkový cyklus podstúpila v priebehu evolúcie mnohonásobnú duplikáciu (Mironov et al., 1999; Vandepoele et al., 2002), u *Chlamydomonas* sú tieto regulátory prítomné len v jednej kópii (Bisova et al., 2005).

V tabuľke 1 je prehľad proteínov zodpovedných za reguláciu bunkového cyklu u *Chlamydomonas* a ich porovnanie s regulátormi u ďalších živých organizmov - kvasiniek, rastlín a človeka. U *Chlamydomonas* sú prítomné homológy všetkých typov rastlinných CDK (CDKA, B, C, D a E) okrem CDK F. Taktiež kóduje aj ďalších štyroch členov CDK rodiny, ktorí nie sú homológmi žiadnej známej CDK u rastlín ani CDK z iných databáz (tab.1) (Bisova et al., 2005). Dve z týchto nových CDK sú kódované génmi *CDKG1* a *CDKG2*, ktoré sú si navzájom veľmi podobné, avšak výrazne sa odlišujú v cyklín väzobnej doméne (SDSTIRE a AASTLRE). Tieto domény nie sú podobné ani doméne (PLTSLRE) vyskytujúcej sa u *CDKG1* a *CDKG2* v *Arabidopsis* (Menges et al., 2005) a teda nie sú ani jej homológmi. Gén *CDKH1* kóduje proteín s motívom PVSTIRE. Štvrtá CDK kódovaná génom *CDKII* je príbuzná kináze CDKF u *Arabidopsis*, ale napriek tomu zjavne nebude jej homológom, pretože neobsahuje N-terminálnu inzerciu typickú pre CDKF.

Rodina		<i>S. cerevisiae</i>	ľudské	<i>Arabidopsis</i>	<i>Chlamy</i>	
CDK	CDKA	1	3 (6)	1	1	
	CDKB	0	0	4	1	
	CDKC	1	1	2	1	
	CDKD	1	1	3	1	
	CDKE	1	1	1	1	
	CDKF	0	0	1	0	
	CDKG	0	0	0	2	
	CDKH	0	0	0	1	
	Cyklin	cyclin A	3	1	10	1
		cyclin B	3	2	9	1
cyclin D		3	3	10	3	
cyclin E		0	1	0	0	
cyclin AB		0	0	0	1	
Wee1	Wee1	1	2	1	1	
Cdc25/ -like	Cdc25	1	3	1	3	

Tab.1 Porovnanie regulátorov bunkového cyklu (Bisova et al., 2005)

Expresné profily cyklín-dependentných kináz u riasy *Chlamydomonas* sú podobné ako u rastlín. Mediátorová RNA (mRNA) génu pre CDKA1 je prítomná konštitutívne počas celého bunkového cyklu, ale jej expresia je zvýšená na začiatku rastovej fázy a následne počas S/M fázy. Primárny transkript génu *CDKB1* vykazuje 2 vrcholy expresie, jeden počas prechodu CP a druhý veľmi ostrý počas S/M fázy. CDKC1 a E1 sú exprimované konštitutívne počas celého bunkového cyklu, rovnako ako cyklín-dependentné kinázy CDKG1 a H1 špecifické pre *Chlamydomonas*, avšak len na nízkej úrovni. Expresiu CDKD1, G2 a I1 nebolo možné z rôznych dôvodov určiť (Bisova et al., 2005).

U riasy *Chlamydomonas* boli identifikované homológy cyklínov typu A a B, označené CYCA1 a CYCB1 a tri cyklíny typu D, CYCD1, CYCD2, CYCD3. Pre cyklíny typu A a B je charakteristická prítomnosť tzv. deštrukčného boxu (D-box) v N-terminálnej doméne, ktorý je zodpovedný za ich degradáciu proteolýzou závislou na ubiquitíne (Glotzer et al., 1991). Rovnako ako rastlinné a živočíšne D-cyklíny aj CycD2 a CycD3 majú v ich N-terminálnej doméne motív LXCXE, ktorý ich radí do tejto cyklínovej triedy a je zodpovedný za väzbu proteínu RBR. *Chlamydomonas* kóduje aj dva nové typy cyklínov. Prvý je označený CycAB1 a s cyklínmi A1 a B1 má podobný iba D-box motív v N-terminálnej doméne. Druhý CycM1 je veľmi odlišný cyklín, ktorý nevykazuje podobnosť s ostatnými charakterizovanými skupinami cyklínov (Bisova et al., 2005). Cyklín H, ktorý po väzbe na CDKD tvorí CAK komplex (Fisher a Morgan, 1994; Makela et al., 1994; Yamaguchi et al., 2000), u riasy *Chlamydomonas* chýba. Jeho funkciu pravdepodobne plní buď CycC1 z veľmi príbuznej vetvy alebo nový typ CycM1 (Bisova et al., 2005).

Komplexy CDK-cyklín sú negatívne regulované kinázami Wee1, ktoré fosforylujú konzervovaný Tyr zvyšok CDK podjednotky, čo je dôležité pre presné načasovanie mitózy (Gould a Nurse, 1989). Riasa *Chlamydomonas* má len jeden homológ Wee1, kódovaný génom *WEE1*. Jeho expresia je zvýšená počas S/M fázy a v skorších štádiách bunkového cyklu nebola detekovaná (Bisova et al., 2005).

Duálne-spezifická fosfatáza, kódovaná génom *CDC25*, pôsobí na CDK aktivačne tak, že odstráni inhibičné fosfátové skupiny pridané kinázou Wee1 (Russell a Nurse, 1986). Gény kódujúce funkčnú fosfatázu Cdc25 boli objavené u morskej riasy *Ostreococcus tauri* (Khadaroo et al., 2004), ale nie sú prítomné v genóme riasy *Chlamydomonas* ani rastliny *Arabidopsis*. Landrieu a kol. objavili u *Arabidopsis* malú fosfatázu podobnú Cdc25 s funkčnou fosfatázovou doménou s rodanínom, avšak bez N-terminálnej regulačnej domény, ktorá je typická pre Cdc25 (Landrieu et al., 2004). Tri proteíny u *Chlamydomonas*, označené ako RDP1-3 (rhodanese domain protein) (Bisova et al., 2005), vykazujú homológiu

s konzervovanými doménami z Cdc25 rodiny a majú katalytický motív nevyhnutný pre fosfatázovú aktivitu (Denu a Dixon, 1995; Fauman a Saper, 1996). Bližšia analýza odhalila, že RDP1 a RDP2 sú homológmi malých fosfatáz zo *Schizosaccharomyces pombe*, *Arabidopsis* a ďalších rastlín a sú fylogeneticky blízko príbuzné s proteínmi Cdc25 (Bisova et al., 2005).

2.4.5. Cyklín-dependentné kinázy a cyklíny riasy *Scenedesmus quadricauda*

Existuje veľmi málo informácií o počte a zastúpení regulačných proteínov bunkového cyklu. Priebeh bunkového cyklu je regulovaný podobne ako u ostatných eukaryotov, a to kinázou podobnou CDK s histón H1 kinázovou aktivitou. U riasy *S. quadricauda* sa vyskytujú minimálne dva odlišné komplexy vyznačujúce sa aktivitou podobnou CDK. Jeden sa uplatňuje pri dosiahnutí CPs a teda je asociovaný s rastom bunky. Ďalší dokáže interagovať s proteínom suc1^{P13} kódovaným kvasinkovým génom *suc1* a jeho aktivita je špecifická pre mitózu, resp. mitózy. Keďže CDK s histón H1 kinázovou aktivitou sa viažu na proteín suc1^{P13} z *S. pombe* a vykazujú kinázovú aktivitu, predpokladá sa existencia proteínu podobného suc1^{P13} aj u riasy *S. quadricauda* (Bišová et al., 2000). Homológ tohto proteínu, ktorý sprostredkováva interakciu medzi CDK a ich substrátmi, resp. regulačnými proteínmi, (Endicott a Nurse, 1995) bol identifikovaný u príbuznej zelenej riasy *C. reinhardtii*, kde je kódovaný génom *CKS1* (Bisova et al., 2005). U kvasinky *S. cerevisiae* sa CKS podieľa na priebehu mitózy a to aktiváciou APC ubiquitín ligázy (Morris et al., 2003). Podobne aj u *S. quadricauda* sa predpokladá regulačná úloha suc1^{P13} -podobného proteínu v priebehu mitózy (Bišová et al., 2000).

Je vysoko pravdepodobné, že v bunkách *S. quadricauda* sú prítomné hlavné regulačné proteíny bunkového cyklu, ktoré sú rovnaké alebo podobné iným eukaryotom. Podobne ako u všetkých rastlín a tiež u zelenej riasy *C. reinhardtii*, aj u *S. quadricauda* sa pravdepodobne vyskytujú hlavné regulačné CDK bunkového cyklu - CdkA aj CdkB a tiež homológ kinázy Wee1, ktorá negatívne reguluje vstup buniek do mitózy.

2.5. Regulácia priebehu bunkového cyklu po poškodení DNA (DNA damage checkpoint and response pathway)

Pre prežitie všetkých živých organizmov je dôležité predovšetkým správne rozdelenie genetického materiálu z materskej do dcérskych buniek. To vyžaduje nielen kontrolu presnej replikácie DNA a distribúcie chromozómov, ale aj kontrolu poškodenia DNA a jej opravu.

Mechanizmus zodpovedný za detekciu a reparáciu poškodenej DNA zahŕňa veľké množstvo proteínov navzájom poprepájaných do zložitej siete, ktorá sa označuje ako „DNA damage response pathway“ (DDR) (odpoveď na poškodenie DNA). Súčasťou odpovede na poškodenie DNA je proces zodpovedný za zastavenie priebehu bunkového cyklu po poškodení DNA, ktorý sa nazýva „DNA damage checkpoint“ (DDC) (kontrolný bod poškodenia DNA) (Zhou a Elledge, 2000; Bartek et al., 2004; Harper a Elledge, 2007). Spomalenie alebo zastavenie bunkového cyklu poskytuje reparačným mechanizmom dostatok času na opravu poškodenej DNA.

Kontrola priebehu bunkového cyklu v odpovedi na poškodenie DNA bola prvýkrát pozorovaná u *Escherichia coli* (George et al., 1975) a v cicavčích bunkách, ktoré majú nefunkčný gén *atm* (ataxia telangiectasia mutated) (Painter a Young, 1980). Bunky s *atm* mutáciou sú defektné v reakcii na ionizačné žiarenie, ako je zastavenie bunkového cyklu v G1 (Clarke et al., 1993), resp. G2 (Paules et al., 1995) fáze a zastavenie syntézy DNA (Painter a Young, 1980). Táto kontrolná dráha bola neskôr objavená aj u kvasiniek a termín „checkpoint“ bol používaný predovšetkým pre túto dráhu (Weinert a Hartwell, 1988).

Proteínová dráha odpovedajúca na poškodenie DNA je dobre preskúmaná u cicavcov a kvasiniek (Zhou a Elledge, 2000; Bartek et al., 2004; Harper a Elledge, 2007), avšak v prípade rastlín je týchto poznatkov oveľa menej (Culligan et al., 2006). Vo všeobecnosti ide o signálnu dráhu zostavenú zo senzorov, prenášačov a efektorových proteínov, pričom mnohé z týchto komponentov dráhy sú konzervované u rôznych organizmov. Dva z týchto konzervovaných proteínov sú štruktúrne príbuzné rodine fosfatidyl-inozitol kináz (PI3K), sú to proteín kinázy (Ser/Thr kinázy) (Tibbetts et al., 2000) a predstavujú centrálny komponenty dráhy odpovedajúcej na poškodenie DNA. Prvým je kináza ATM (ataxia telangiectasia mutated), ktorá sa uplatňuje predovšetkým pri dvojreťazcových zlomoch v DNA a druhým je kináza ATR (ATM and Rad3-related) reagujúca na zastavenú replikačnú vidlicu alebo na jednoreťazcovú DNA (Zhou a Elledge, 2000; Bartek et al., 2004; Culligan et al., 2006; Harper a Elledge, 2007). Ortológy génov kódujúcich tieto dva proteíny boli identifikované aj v *Arabidopsis thaliana* (Garcia et al., 2003; Culligan et al., 2004).

Ďalšími vysoko konzervovanými proteínmi tejto dráhy sú tzv. checkpoint kinázy – Chk1 a Chk2, ktoré sú regulované kinázami ATR a ATM. Chk1 a Chk2 patria medzi Ser/Thr kinázy, navzájom sa štruktúrne nepodobajú, ale vyznačujú sa podobnou substrátovou špecifitou (Zhou a Elledge, 2000; Lam a Rosen, 2004) Chk2 je homológom kvasinkového Rad53 a Cds1, ktoré sú potrebné pri odpovedi na poškodenie DNA a pri zastavení replikácie. Chk1 je v kvasinkách zodpovedná predovšetkým za zastavenie

bunkového cyklu po poškodení DNA (Matsuoka et al., 1998; Chaturvedi et al., 1999). Chk1 sa uplatňuje v regulácii vstupu do S fázy, má dôležitú úlohu pri kontrole presnosti replikácie DNA a zabraňuje vstupu buniek do mitózy v prítomnosti poškodenej DNA (Lam a Rosen, 2004). Aktívna Chk1 u cicavcov fosforyluje Cdc25A a Cdc25C, ktoré zohrávajú úlohu v priebehu S fázy a G2/M prechodu (Zhao et al., 2002; Sorensen et al., 2003) (Sanchez et al., 1997). Fosforyláciou Cdc25 dôjde k jej degradácii, v dôsledku čoho nemôžu byť komplexy CDK-cyklín aktivované a bunkový cyklus sa zastaví (Harper a Elledge, 2007). Ďalším významným cieľovým proteínom odpovede na poškodenie DNA je kináza Wee1, ktorej stabilizácia po poškodení DNA udržuje mitotické CDK v inhibovanom stave (Harper a Elledge, 2007).

Keďže u rastlín nebol identifikovaný funkčný homológ fosfatázy Cdc25 (Boudolf et al., 2006), aktivácia checkpointu po poškodení DNA je kontrolovaná prostredníctvom kinázy Wee1, ktorá je jedným z proteínov regulovaných ATM/ATR signálnou dráhou (De Schutter et al., 2007).

U rastlín bola identifikovaná úloha kináz ATM a ATR v expresii niektorých génov uplatňujúcich sa pri reparácii DNA, ako sú napr. *RAD51* a *PARP1* (Garcia et al., 2003), avšak molekulárny mechanizmus tejto signálnej dráhy je preštudovaný málo. V súčasnosti vieme, že gén *WEE1* z *Arabidopsis* je aktivovaný na úrovni transkripcie ako odpoveď na poškodenie DNA alebo replikačný stres. Táto indukcia je závislá na aktivite kináz ATR a ATM, a teda *WEE1* je jedným z cieľových génov ATM/ATR signálnych dráh. Keďže nadexpresia *WEE1* vedie k zastaveniu bunkového cyklu, predpokladá sa, že ATM a ATR rozpoznávajú genotoxický stres a následne cez aktiváciu expresie *WEE1* umožnia zastavenie bunkového cyklu v G2 fáze, čím bunka získa čas na opravenie poškodenej DNA a dokončenie replikácie pred vstupom do mitózy. V rastlinách, ktorým chýba kináza Wee1, vstupujú bunky do mitózy predčasne, čo vedie k narušeniu genómovej integrity (De Schutter et al., 2007). De Schutter a kol (2007) na základe svojich výsledkov predpokladajú, že hlavným cieľom fosforylácie kinázy Wee1 je CdkA1 (De Schutter et al., 2007), ktorá má dôležitú úlohu pri vstupe bunky do S a tiež do M fázy (Reichheld et al., 1999; Menges a Murray, 2002). Táto v komplexe s CycB2 je pravdepodobne hlavným cieľom inhibície aktivovanej signálnej dráhy kontrolujúcej poškodenie DNA. Keďže expresia *WEE1* prebieha počas S fázy (Gonzalez et al., 2004; Menges et al., 2005) a fosforylácia CDK bola zaznamenaná prevažne v priebehu replikácie DNA (Meszaros et al., 2000) predpokladá sa, že Wee1 bráni vstupu replikujúcich sa buniek do mitózy prostredníctvom inhibície proteínových komplexov zodpovedných za G2/M prechod. Expresia *WEE1* sa udržuje na vysokej hladine v bunkách zastavených v G2

fáze, až pokým sa nedokončia všetky reparačné a replikačné procesy (De Schutter et al., 2007).

3. METÓDY

3.1. Použitý organizmus

Kultúry chlorokokálnych rias *Chlamydomonas reinhardtii* CC-125 wild type mt⁺ 137c a *Scenedesmus quadricauda* (Turp.) Bréb., kmeň Greifswald/15 pochádzali zo Zbierky autotrofných organizmov Botanického ústavu AV ČR v Třeboni, ČR.

3.2. Kultivačné podmienky

Pre kultiváciu *C. reinhardtii* bolo použité minimálne HS médium podľa (Sueoka, 1960) s niekoľkými modifikáciami. Zloženie je uvedené v tabuľke č. 2 .

zlúčenina	koncentrácia	zlúčenina	koncentrácia
NH ₄ Cl	1,9 M	ZnSO ₄ · 7H ₂ O	15 mM
CaCl ₂ · 2H ₂ O	28 mM	H ₃ BO ₃	37 mM
MgSO ₄ · 7H ₂ O	160 mM	MnCl ₂ · 2H ₂ O	5,2 mM
K ₂ HPO ₄	1,65 M	CuCl ₂ · 2H ₂ O	1,3 mM
KH ₂ PO ₄	1,02 M	H ₂ MoO ₄ · H ₂ O (resp. Na ₂ MoO ₄ · 2H ₂ O)	1,1 mM
Na ₂ EDTA · 2H ₂ O (resp. Na ₄ EDTA · 2H ₂ O)	27 mM	CoCl ₂ · 6H ₂ O	1,3 mM
FeSO ₄ · 7H ₂ O	3,6 mM		

Tab. č. 2 – zloženie HS média

Pre kultiváciu *S. quadricauda* bolo použité anorganické ½ ŠS médium (Zachleder a Šetlík, 1982). Zloženie je uvedené v tabuľke č. 3.

zlúčenina	koncentrácia	zlúčenina	koncentrácia
KNO ₃	10 mM	MnSO ₄ · 4H ₂ O	2,5 μM
KH ₂ PO ₄	2,5 mM	CoSO ₄ · 7H ₂ O	2,5 μM
MgSO ₄ · 7H ₂ O	4 mM	CuSO ₄ · 5H ₂ O	2,5 μM
chelatonát železito-sodný	25 μM	ZnSO ₄ · 7H ₂ O	2,5 μM
CaCl ₂ · 6H ₂ O	25 μM	(NH ₄) ₆ Mo ₇ O ₂₄ · 4H ₂ O	2,5 μM
H ₃ BO ₃	25 μM		

Tab. č. 3 – zloženie ½ ŠS média

Riasové kultúry boli udržiavané na Petriho miskách s HS resp. s ½ ŠS médiom spevneným 2 % agarom (Sigma Aldrich) pri teplote 25°C.

Pre pokusy boli kultúry pestované v tekutom HS resp. ½ ŠS médiu v 300 ml kultivačných valcoch, resp. 2,5 l nádobách, prevzdušňovaných zmesou 2 % (v/v) CO₂ so vzduchom. Zdrojom svetla bol panel so žiarivkami OSRAM L36/41, pričom intenzita dopadajúceho svetla bola 490 μmol.m⁻².s⁻¹. Teplota kultivácie bola udržiavaná na 30 °C.

3.3. Synchronizácia kultúr

Kultúra rias *C. reinhardtii* bola synchronizovaná striedaním svetelnej a tmavej periódy v pomere 13 h : 11 h, a to počas najmenej troch cyklov. Dĺžka svetelnej periódy sa zvolila tak, aby kultúra bola zatemnená v čase, keď sa začali uvoľňovať prvé dcérske bunky. Po 13 hodinách svetla sa kultúra *C. reinhardtii* rozdelila na 4 - 8 dcérskych buniek.

Kultúra rias *S. quadricauda* bola synchronizovaná striedaním minimálne dvoch cyklov svetelnej a tmavej periódy v pomere 15 h/9 h.

Hustota kultúr bola udržiavaná medzi 10⁵ - 10⁶ buniek/ml riedením čerstvým médiom na začiatku každej svetelnej fázy. Na začiatku každého experimentu boli kultúry nariedené na počiatočnú koncentráciu 10⁶ buniek/ml.

3.4. Aplikácia činidiel

Pri počiatočných pokusoch boli použité tri rôzne inhibítory bunkového delenia - 5-fluoro-2-deoxyuridín (FdUrd) (Sigma), kolchicín (Serva) a kofeín (Fluka). Zeocín (Duchefa) bol použitý ako činidlo spôsobujúce poškodenie DNA. Činidlá boli aplikované na synchronnú kultúru *C. reinhardtii* samostatne, resp. v ďalších pokusoch v kombinácii so zeocínom.

V prípade riasy *S. quadricauda* boli vybrané činidlá (FdUrd, kofeín, zeocín) aplikované na synchronnú kultúru samostatne alebo vo vzájomnej kombinácii.

Pred aplikáciou boli všetky chemikálie rozpustené v sterilnej destilovanej vode, čím sa pripravili zásobné roztoky – 1 M FdUrd (0,2462 g/ml), 100 mM kolchicín (0,0399 g/ml), 100 mM kofeín (0,019 g/ml) a 100 mg/ml zeocín. Z nich sa potom pridávali zodpovedajúce množstvá do testovaných kultúr a to na začiatku bunkového cyklu (*S. quadricauda*), v ôsmej (*C. reinhardtii*, *S. quadricauda*) resp. desiatej (počiatočné pokusy *C. reinhardtii*) hodine bunkového cyklu. Kultúry boli vždy na začiatku bunkového cyklu nariedené na asi 10⁶ buniek/ml.

Na odmytie kolchicínu z kultúry bolo použité sterilné HS médium, ktorým sa ovplyvnená kultúra 3 krát premyla, pričom bola zakaždým scentrifugovaná 3 minúty pri 3000 g.

3.5. Odoberanie a analýza vzoriek (počet buniek, commitment point, mikroskopická analýza)

Objem (veľkosť) buniek bol meraný pomocou prístroja Coulter Counter (MULTISIZER 3, Beckman Coulter) zo vzoriek odoberaných každú hodinu (dve hodiny) počas bunkového cyklu a fixovaných roztokom glutaraldehydu do výslednej koncentrácie 0,25 % (w/v) uskladnených v chladovej miestnosti pri 4 – 7 °C. Pre samotné meranie boli vzorky nariadené 200 krát v sterilnom roztoku 0,9 % NaCl (50 µl vzorky do 10 ml NaCl), pričom v priebehu merania minimálne 200 buniek spadalo svojou veľkosťou do oblasti okolo mediánu.

Vzorky fixované roztokom Lugolu (výsledná koncentrácia 1 %) boli použité na mikroskopickú analýzu, pomocou ktorej bolo zistené zastúpenie buniek v kultúre, ktoré dokončili bunkové delenie. Boli počítané ako materské bunky, tak aj bunky naryhované na 2, 4, 8, 16 a prípadne viac dcérskych buniek (v závislosti od kmeňa rias) a taktiež vydelené dcérske bunky. Napočítané hodnoty boli potom prevedené na percentá.

Prechod cez „commitment point“ (CP) bol v prípade *C. reinhardtii* stanovený na základe vzoriek odoberaných každé dve hodiny, v prípade *S. quadricauda* každú hodinu počas bunkového cyklu až do doby než boli kultúry zatemnené. Odoberalo sa 10 ml suspenzie z každej kultúry, ktoré boli ďalej kultivované v tme pri 30 °C a prevzdušňované zmesou 2 % (v/v) CO₂ so vzduchom. Po 8 hodinách bol 1 ml z takto zatemnených kultúr vysiaty na Petriho misky s pevným HS resp. ½ ŠS médium a ďalej inkubovaný pri 30 °C v tme minimálne 12 hodín (resp. pokým najpomalšia kultúra nedokončila delenie). Po skončení inkubácie boli všetky vzorky zafixované roztokom Lugolu a následne boli u *C. reinhardtii* spočítané nedeliace sa bunky a bunky naryhované na 2, 4, 8, 16, prípadne viac, dcérskych buniek. V prípade *S. quadricauda* bolo počítané zastúpenie 2-jadrových dcérskych buniek, 4- a 8-bunkových dcérskych coenóbií a nedeliacich sa materských buniek. Všetky výsledky boli spracované v programoch Excel a SigmaPlot a vynesené ako závislosť v čase.

3.6. Stanovenie množstva DNA pomocou DNAzolu

Vzorky na stanovenie množstva DNA boli odoberané každé 2 hodiny v priebehu bunkového cyklu. Po centrifugácii 20 ml kultúry boli bunky premyté SCE pufrom (100 mM citrát sodný, 2,7 mM EDTA-Na², pH 7 (kyselina citrónová)) a zmrazené v tekutom dusíku.

Vzorky boli ďalej skladované pri $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$. Pri analýzach bolo, podľa pokynov výrobcu, k bunkovému peletu pridaných $500\text{ }\mu\text{l}$ DNazolu ES (MRC) a $500\text{ }\mu\text{l}$ chloroformu, ktorým boli odstránené pigmenty a nerozpustné časti rias. Následne bola DNA precipitovaná pridaním 100 % etanolu. RNA bola z peletu odstránená pridaním RNázy. Izolovaná DNA bola premývaná 75 % etanolom pokým neboli odstránené všetky zvyšky chlorofylu. Následne bola premytá DNA rozpustená v 8 mM NaOH a jej koncentrácia bola zmeraná spektrofotometrom pri vlnových dĺžkach 260 a 280 nm. Namerané hodnoty boli spracované v programoch Excel a SigmaPlot.

3.7. Izolácia RNA

Bunkový pelet obsahujúci 2×10^7 buniek bol získaný odbermi každé dve hodiny v priebehu bunkového cyklu. Pelet bol premytý SCE pufrom (100 mM citrát sodný, 2,7 mM EDTA- Na^2 , pH 7 (kyselina citrónová)) a rýchlo zmrazený v tekutom dusíku. Vzorky boli uskladnené pri $-70\text{ }^{\circ}\text{C}$. RNA bola izolovaná pomocou TRIreagentu RT (MRC) podľa protokolu výrobcu.

3.8. Syntéza cDNA a RT-PCR

Pre odstránenie DNA kontaminácie bolo 5 μg celkovej RNA prečistené RQ1 Rnase-free Dnase kitom (Promega), podľa doporučení výrobcu. Čistá RNA bola následne pomocou ThermoScript RT-PCR systému (Invitrogen) reverzne transkribovaná do cDNA podľa protokolu (Bisova et al., 2005) s použitím náhodných hexamérov.

Pre každú kvantitatívnu RT-PCR (qPCR) reakciu bol použitý 1 μl cDNA, vhodná kombinácia primerov a MaximTM SYBR Green qPCR Master Mix (Fermentas). Pre amplifikáciu CDKB transkriptu a 18S rRNA boli použité primery popísané Fang a kol. (Fang et al., 2006). Pre amplifikáciu WEE transkriptu to boli primery:

- forward primer 5'-GCGTCACAGTCCTGCCTCAA-3'
- reverse primer 5'-CGCTTGTAGCGTGGTGATGG-3'

qPCR prebiehala v Rotor-Gene, RG-3000 (Cobertt Science) za týchto reakčných podmienok:

iniciačná denaturácia		5 min	95 $^{\circ}\text{C}$
45 cyklov amplifikácie DNA:	denaturácia	20 sek	95 $^{\circ}\text{C}$
	nasadnutie primerov	20 sek	65 $^{\circ}\text{C}$
	syntéza DNA	30 sek	72 $^{\circ}\text{C}$

3.9. Kinázová esej

Kinázová aktivita CdkB a Wee1 bola detekovaná pomocou histón H1 kinázovej aktivity podľa Morena a kol. (Moreno et al., 1989) s nasledujúcimi modifikáciami:

Príprava proteínového lyzátu: Bunkový pelet obsahujúci 2×10^7 buniek bol získaný odbermi v priebehu bunkového cyklu. Tento bol premytý SCE pufrom (100 mM citrát sodný, 2,7 mM EDTA- Na^2 , pH 7 (kyselina citrónová)), zmrazený v tekutom dusíku a uskladnený pri -70°C . Proteínové extrakty boli pripravené podľa (Bišová et al., 2003) (*S. quadricauda*) a (Bisova et al., 2005) (*C. reinhardtii*).

Afinitná purifikácia CDK pomocou CrCKS1 guličiek: 20 μl proteínového lyzátu bolo nariedených 10 krát RIPA pufrom (50 mM HEPES, pH 7,5, 150 mM NaCl, 5 mM EDTA, 5 mM EGTA, 0.1 % SDS, 1 % NP-40), ktorý obsahoval 1x zmes proteázových inhibítorov (Sigma P9599), 1 mM Na_3VO_4 , 5 mM para nitrofenyl-fosfát, 50 mM glycerofosfát a 10 mM NaF. Táto zmes bola inkubovaná 2 hodiny pri 4°C spolu s 20 μl 50 % CrCKS1 guličiek.

Imunoprecipitácia CrCDKB1: 20 μl proteínového lyzátu bolo nariedených ako v predchádzajúcom prípade a inkubovaných 1 hodinu pri 4°C v prítomnosti 5 μl špecifickej protilátky. Následne bolo pridaných 20 μl 50 % agarózových guličiek s naviazaným proteínom A (Sigma, P1925) a inkubovaných ďalších 30 minút pri 4°C .

Nenaviazané proteíny boli odmyté štyrmi po sebe idúcimi premytiami RIPA pufrom a dvoma premytiami kinázovým pufrom (20 mM HEPES (pH 7,5), 15 mM MgCl_2 , 5 mM EGTA, 1 mM DTT) (Brizuela et al., 1987; Draetta et al., 1987).

Kinázová aktivita bola sledovaná podľa postupu (Bišová et al., 2003; Bisova et al., 2005). Fosforylované bandy histónu H1 boli vizualizované autorádiograficky.

3.10. Western blotting

Prečistený proteínový lyzát bol zmiešaný s 5x SDS-PAGE vzorkovým pufrom (250 mM Tris-HCl, pH 6.8, 50 % (w/v) glycerol, 10 % SDS, 100 mM dithiothreitol, 0,5 % (w/v) brómfenolová modrá), inkubovaný 5 min. pri 65°C a separovaný na 12 % SDS-PAGE (Laemmli, 1970). Následne boli proteíny prenesené na PVDF membránu (veľkosť pórov 0,45 μm , Immobilon-P, Millipore) (Towbin et al., 1979) pri 1 mA/cm^2 počas 1,5 hodiny. Membrána bola blokována v 5 % (w/v) roztoku odtučneného sušeného mlieka v TBS-T pufre (20 mM Tris, pH 7.5, 0,5 M NaCl, 0,05 % Tween 20) cez noc pri 4°C . Imunodetekcia bola robená podľa doporučení výrobcu. Imunoreaktívne bandy boli detekované chemilumi-

niscenčne (Pierce ECL western blotting substrát, Pierce). Ako primárne protilátky boli použité: protilátka anti-PSTAIR (P7962, Sigma), protilátka anti-p-Cdc2 p34 (Tyr 15) špecifická pre proteín Cdc2 fosforylovaný na Tyr 15 (sc-7989, Santa Cruz), anti-CDKB1 králičie antiserum (nariedené 1:1000) vytvorené voči QDLHRIFPSLDDSGC peptidu obsiahnutému v proteíne Cdk1 *C. reinhardtii* (Genscript) a anti-WEE1 králičie antiserum (nariedené 1:1000) vytvorené voči SQPSQEQYTPDHLTC peptidu obsiahnutému v proteíne Wee1 *C. reinhardtii* (Genscript). Ako sekundárne protilátky boli použité kozia anti-králičia IgG konjugovaná s peroxidázou (Sigma A9169) (nariedená 1:20000), králičia anti-kozia IgG konjugovaná s peroxidázou (Sigma A5420) (nariedená 1:40000) a kozia anti-myšia IgG konjugovaná s peroxidázou (Sigma A4416) (nariedená 1:20000).

3.11. Mikroskopická analýza

Pre pozorovanie buniek vo svetelnom a fluorescenčnom mikroskope bol použitý Olympus BX51 mikroskop s CCD kamerou (F-ViewII). U-MWIBA2 filter bol použitý pre SYBR Green I fluorescenciu. Vzorky z kultúry boli odoberané po 1 ml a fixované 10 μ l Lugolu. Následne boli uložené v chlade pri 5 °C. Pre samotné farbenie jadier pomocou SYBR Green I (Molecular Probes) boli vzorky scentrifugované pri 3000 rpm a premyté HS médiom s SDS (100:1). Z premytej suspenzie bolo odobraných 25 μ l do eppendorfky ku ktorým bolo pridaných 12,5 μ l SYBR Green I (2:1). Zmes bola dobre pretrepaná a inkubovaná pri izbovej teplote v tme 2-12 hodín podľa druhu a štádia rias. Následne bol prostredníctvom fluorescencie pozorovaný počet jadier vo vzorkách v závislosti od štádia bunkového cyklu. Pre porovnanie boli tie isté bunky pozorované aj vo svetelnom mikroskope.

Na elektrónovú mikroskopiu boli vzorky fixované glutaraldehydom (0,2 % finálna koncentrácia) vo fosfátovom pufré (160 mM Na₂HPO₄, 40 mM KH₂PO₄, pH 7.2). S prípravou ultratenkých rezov nám pomohla Dr. J. Nebesářová z Jihočeskej Univerzity v Českých Budějoviciach. Vzorky boli ošetrené oxidom osmičelým, dehydratované a zaliaté LR bielou živcou. Ultratenké rezy boli prichytené na niklovú mriežku a farbené najskôr octanom uranylu a potom citrátom olovnatým. Pre samotné fotografovanie bol použitý elektrónový mikroskop TEM JEOL 1010.

4. VÝSLEDKY

4.1. Vplyv inhibítorov bunkového delenia (5-fluoro-2-deoxyuridín, kolchicín a kofeín) a zeocínu na bunkový cyklus buniek divokého kmeňa riasy *Chlamydomonas reinhardtii*

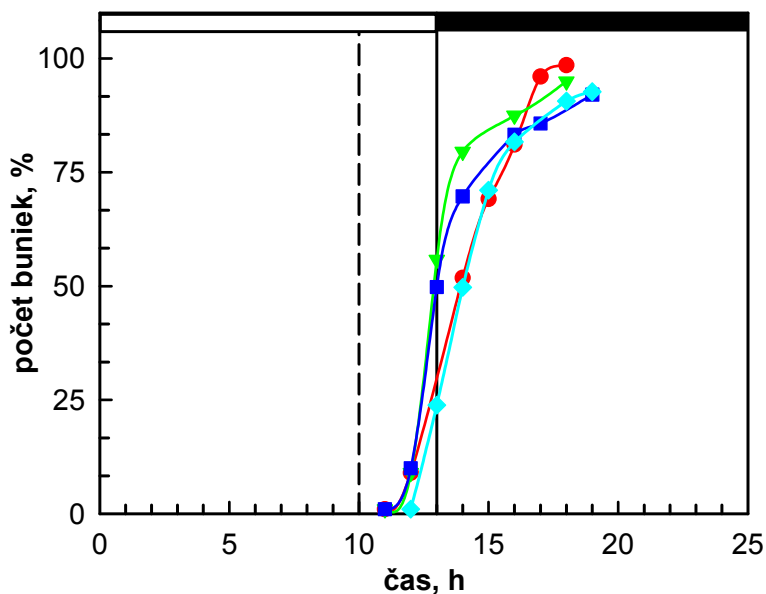
Prvým cieľom bolo vybrať vhodný inhibítor bunkového delenia riasy *C. reinhardtii*, ktorý by bol vhodný pre skúmanie bunkového cyklu tejto riasy, konkrétne vstupu do mitózy a jeho prepojenie s opravou poškodení DNA po pôsobení činidla. Ako činidlo spôsobujúce poškodenie DNA bol vybraný zeocín, patriaci do rodiny bleomycínových antibiotík spôsobujúcich štiepenie oboch reťazcov v molekule DNA (Ehrenfeld et al., 1987; Gatignol et al., 1988; Kostrub et al., 1997).

Na základe dostupnej literatúry sme vybrali tri potenciálne inhibítory bunkového delenia, a to 5-fluoro-2-deoxyuridín (FdUrd) (Chiu a Hastings, 1972), kolchicín a kofeín (Flavin a Slaughter, 1974). Všetky tri patria do kategórie mitotických jedov, avšak ich účinok je odlišný. FdUrd je analógom tymínu a u príbuznej zelenej riasy *Scenedesmus quadricauda* vedie jeho inkorporácia do DNA k zastaveniu replikácie (Zachleder, 1994; Zachleder et al., 1996). Kolchicín inhibuje polymerizáciu mikrotubulov (Taylor, 1965; Dustin, 1978) a kofeín inhibuje DNA reparačné mechanizmy, je inhibítorom kináz ATM a ATR *in vitro* (Blasina et al., 1999; Cortez, 2003). Účinok každého z nich bol testovaný samostatne na synchronnej populácii buniek *C. reinhardtii* a to v troch rôznych koncentráciách.

4.1.1. Aplikácia 5-fluoro-2-deoxyuridínu (FdUrd)

Vo všetkých pokusoch bola synchronizovaná populácia buniek divokého kmeňa *C. reinhardtii* kultivovaná v tekutom minimálnom HS médiu v neprítomnosti a v prítomnosti činidla, ktoré bolo pridávané vždy v 10. hodine bunkového cyklu. Kultúry boli synchronizované troma po sebe idúcimi cyklami striedania svetelnej a tmavej periódy v pomere 13 h/11 h. Rovnaký režim svetlo/tma bol použitý aj pre samotné experimenty.

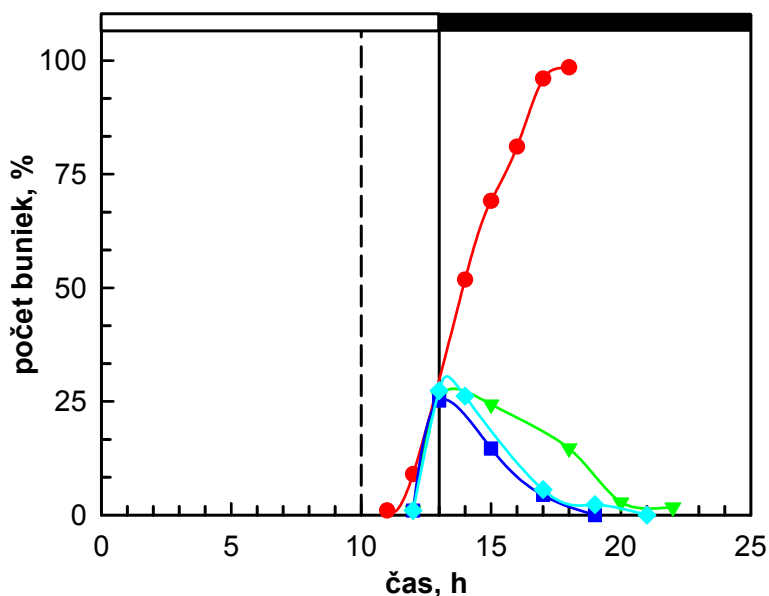
Tri rôzne koncentrácie FdUrd (1 mM, 5 mM a 10 mM) boli testované u *C. reinhardtii*. Priebeh bunkového cyklu v ovplyvnených kultúrach (▼, ■, ◆) bol takmer zhodný s priebehom cyklu v kontrolnej variante (●) (Obr. 6). Medzi jednotlivými použitými koncentraciami FdUrd nie sú žiadne viditeľné rozdiely ani v porovnaní s kontrolou, čo znamená, že FdUrd, na rozdiel od jeho inhibičného účinku na bunky riasy *S. quadricauda*, pravdepodobne nemá nami hľadaný inhibičný efekt na delenie buniek *C. reinhardtii*.



Obr. 6: Delenie synchronnej populácie buniek zelenej riasy *Chlamydomonas reinhardtii* v neprítomnosti (●) a v prítomnosti 1 mM (▼), 5 mM (■) a 10 mM (◆) FdUrd (os x predstavuje hodinu bunkového cyklu, os y počet buniek v %, prerušovaná čiara predstavuje čas pridania FdUrd, biela lišta predstavuje svetelnú fázu kultivácie, čierna tmavú fázu kultivácie).

4.1.2. Aplikácia kolchicínu

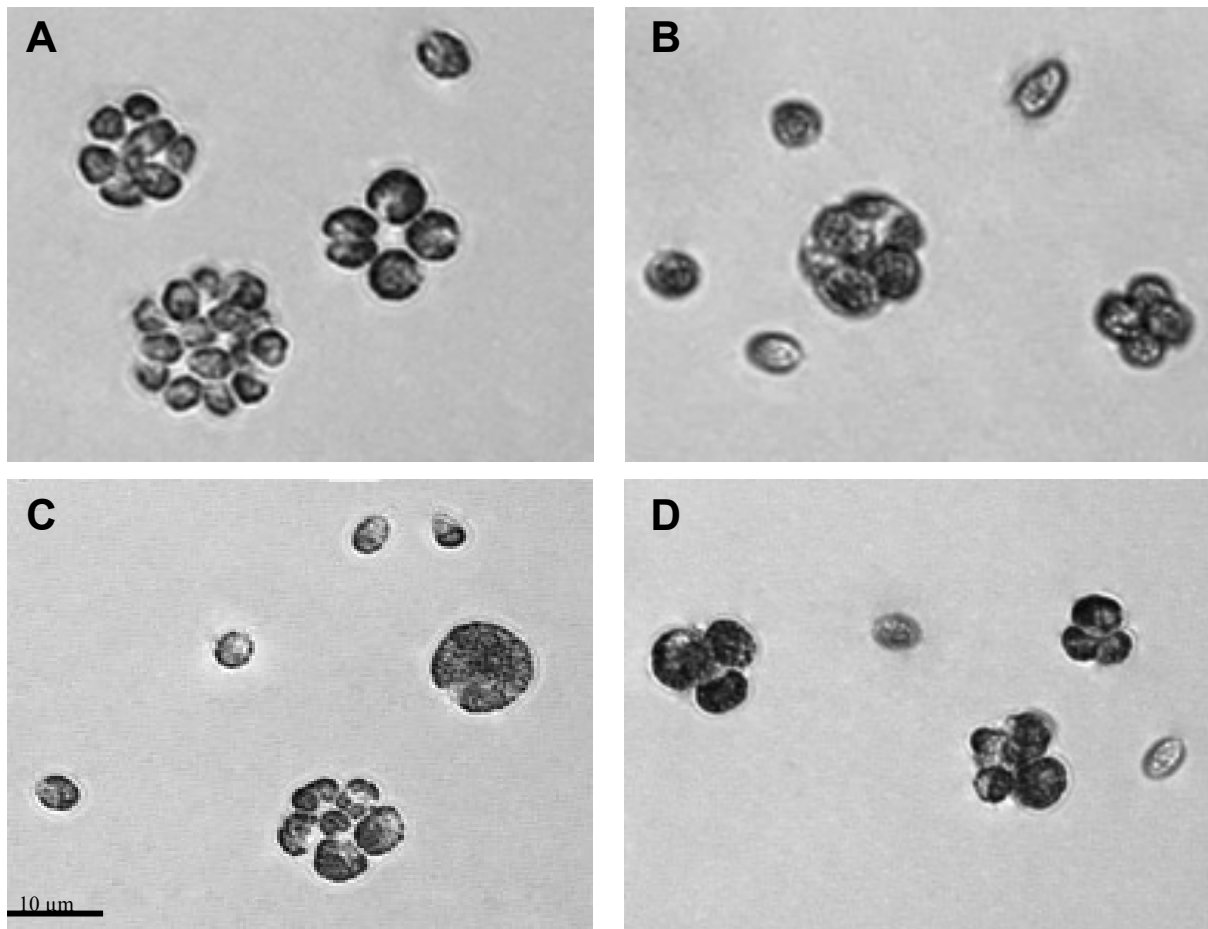
Účinok kolchicínu bol testovaný v troch rôznych koncentráciách – 2 mM, 3 mM a 4 mM. Vo všetkých ovplyvnených variantoch sa bunky prestávali deliť v 13. hodine bunkového cyklu, čo je 3 hodiny po pridaní kolchicínu (Obr. 7), s tým rozdielom, že spomalenie delenia v prípade 2 mM kolchicínu (▼) trvalo dlhšiu dobu v porovnaní s účinkom 3 mM (■) a 4 mM kolchicínu (◆).



Obr. 7: Delenie synchronnej populácie buniek zelenej riasy *Chlamydomonas reinhardtii* v neprítomnosti (●) a v prítomnosti 2 mM (▼), 3 mM (■) a 4 mM (◆) kolchicínu (os x predstavuje hodinu bunkového cyklu, os y počet buniek v %, prerušovaná čiara predstavuje čas pridania kolchicínu, biela lišta predstavuje svetelnú fázu kultivácie, čierna tmavú fázu kultivácie).

To potvrdzujú aj fotografie, na ktorých v prípade 2 mM kolchicínu vidíme bunky naryhované na 4 a 8 dcérskych buniek a zároveň niekoľko vydelených dcérskych buniek (Obr. 8 B), zatiaľ čo v prípade 4 mM kolchicínu sú na fotografii aberantné tvary

naryhovaných materských buniek (Obr. 8 D). Naopak neovplyvnený variant (●) sa delil bežným spôsobom (Obr. 7, 8 A).



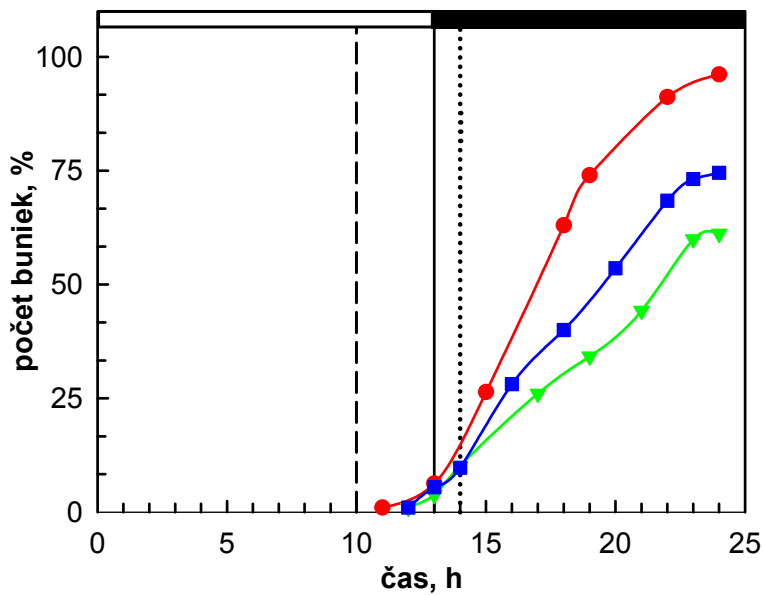
Obr 8: Morfológia buniek v synchronnej populácii rias *Chlamydomonas reinhardtii* v kontrolnej kultúre (A) a po aplikácii 2 mM (B), 3 mM (C) a 4 mM (D) kolchicínu.

4.1.3. Aplikácia kolchicínu a jeho následné odmytie

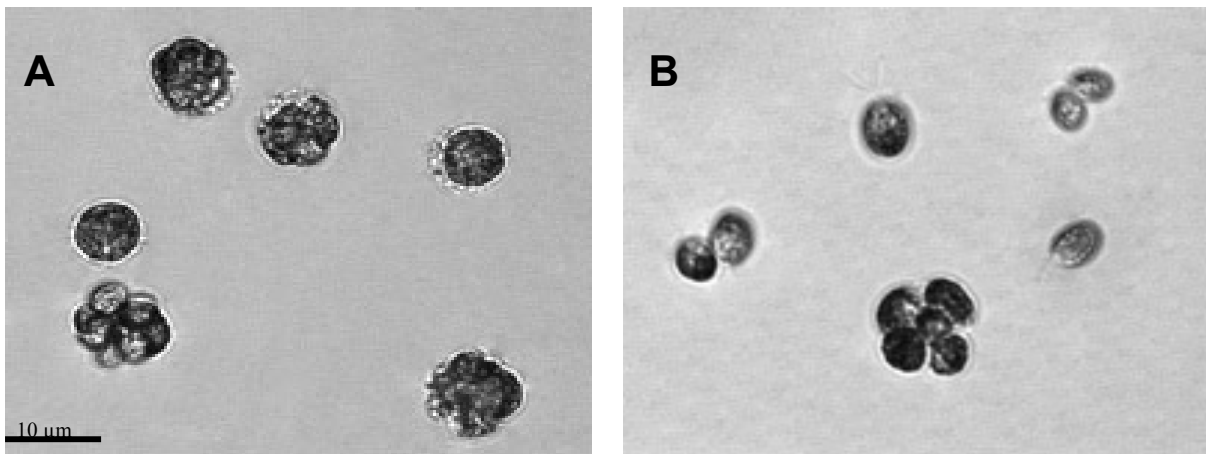
Vzhľadom na to, že kolchicín inhibuje bunkové delenie úplne a to vo všetkých použitých koncentráciách, v ďalšom pokuse bolo vyskúšané jeho odmytie po 4 hodinách pôsobenia.

K synchronizovanej populácii buniek divokého kmeňa *C. reinhardtii* boli v 10. hodine bunkového cyklu pridané dve nižšie koncentrácie kolchicínu, 1 mM a 2 mM. Tieto pôsobili na bunky 4 hodiny a následne boli odmyté, čo viedlo k obnoveniu bunkového cyklu, avšak kultúry (▼, ■) sa rozdelili len na 60 - 70 % (Obr. 9). To potvrdzujú aj fotografie zo svetelného mikroskopu (Obr. 10). V kultúre rastúcej v stálej prítomnosti kolchicínu vidíme nenaryhované resp. nerozdelené štruktúry materských buniek (Obr. 10 A), zatiaľ čo v kultúre,

v ktorej došlo k odmytiu kolchicínu po 4. hodinách pôsobenia sú prítomné aj nové vydelené dcérske bunky (Obr. 10 B).



Obr. 9: Delenie synchronnej populácie buniek zelenej riasy *Chlamydomonas reinhardtii* v neprítomnosti (●) a v prítomnosti 1 mM (▼) a 2 mM (■) kolchicínu (os x predstavuje hodinu bunkového cyklu, os y počet buniek v %, prerušovaná čiara predstavuje čas pridania kolchicínu, bodkovaná čiara predstavuje čas odmytia kolchicínu, biela líšta predstavuje svetelnú fázu kultivácie, čierna tmavú fázu kultivácie).

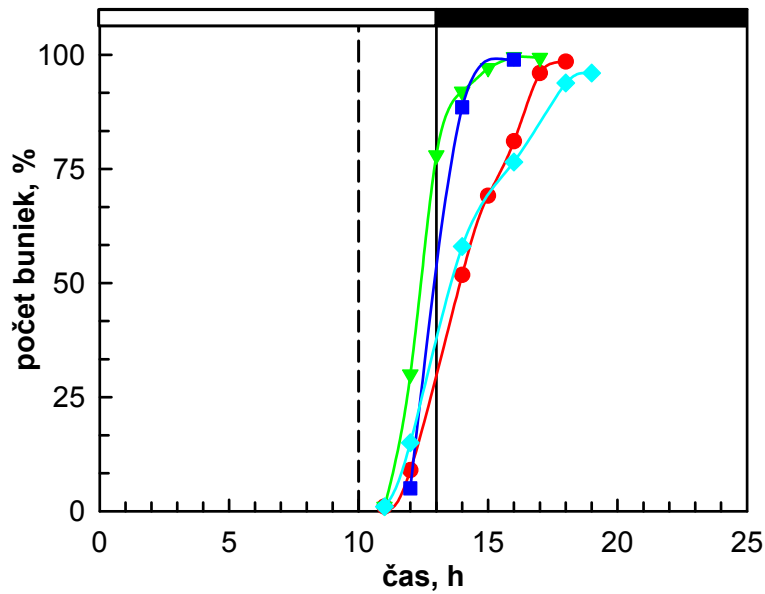


Obr. 10: Morfológia buniek *Chlamydomonas reinhardtii* po aplikácii kolchicínu a jeho následnom odmytí. **A:** bunky po nepretržitom pôsobení 2 mM kolchicínu bez jeho odmytia, veľké nedeliace sa materské bunky, **B:** bunky po 4 hodinách pôsobenia 2 mM kolchicínu a jeho následnom odmytí, vydelené dcérske bunky.

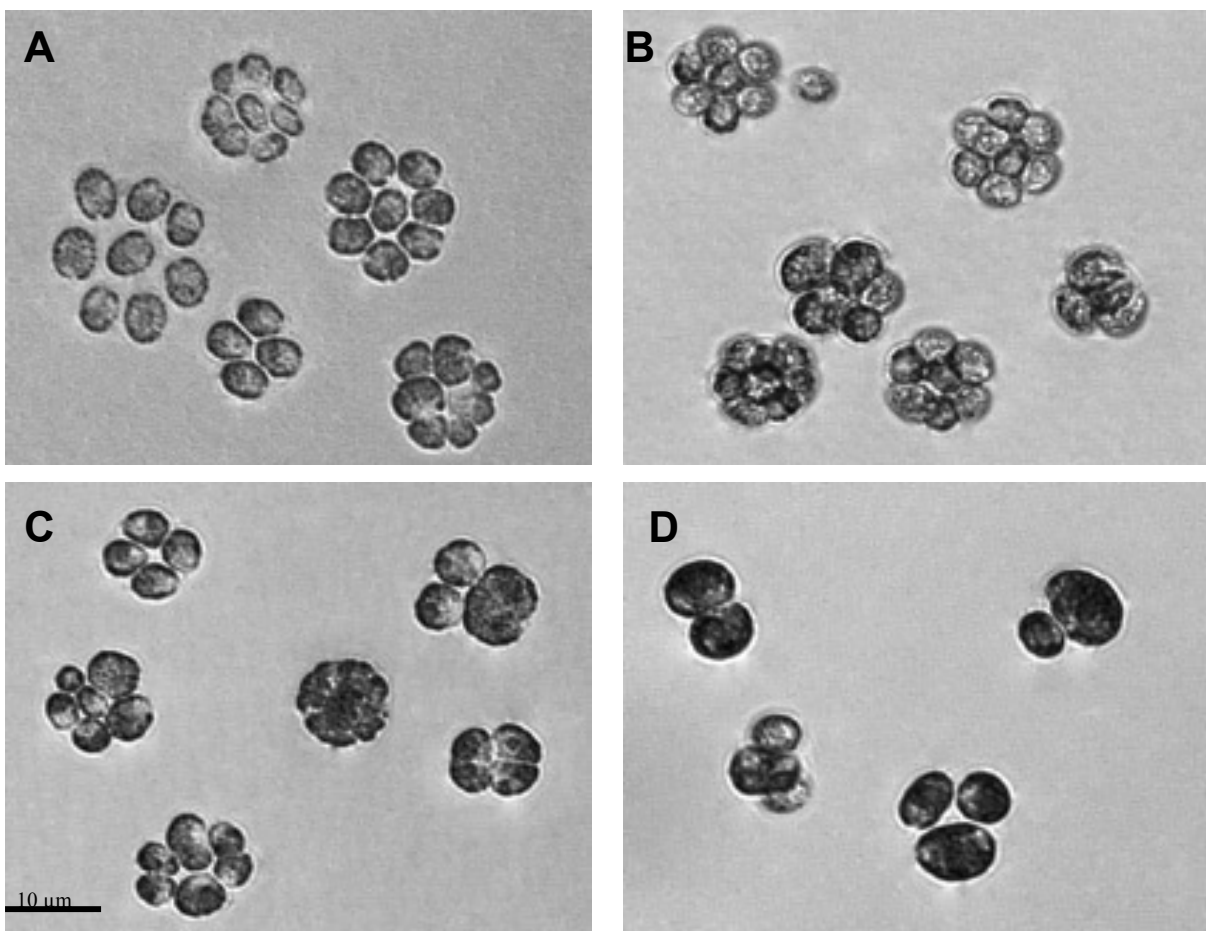
4.1.4. Aplikácia kofeínu

Populácia buniek divokého kmeňa *C. reinhardtii* bola ovplyvnená tromi rôznymi koncentraciami kofeínu (1 mM, 2 mM a 4 mM). Priebeh bunkového cyklu po aplikácii 4 mM kofeínu (◆) bol podobný kontrole (●), zatiaľ čo v prípade 1 mM (▼) a 2 mM (■) kofeínu bolo toto delenie rýchlejšie v porovnaní s kontrolou (●) (Obr. 11).

Pre rovnaký pokus bola použitá aj 3 mM koncentrácia kofeínu (nezobrazené v grafe), ktorá však mala účinok porovnateľný s 2 mM kofeínom.



Obr. 11: Delenie synchronnej populácie buniek zelenej riasy *Chlamydomonas reinhardtii* v neprítomnosti (●) a v prítomnosti 1 mM (▼), 2 mM (■) a 4 mM (◆) kofeínu (os x predstavuje hodinu bunkového cyklu, os y počet buniek v %, prerušovaná čiara predstavuje čas pridania kofeínu, biela lišta predstavuje svetelnú fázu kultivácie, čierna tmavú fázu kultivácie).



Obr 12: Morfológia buniek *C. reinhardtii* po aplikácii 1 mM (A), 2 mM (B), 3 mM (C) a 4 mM (D) kofeínu.

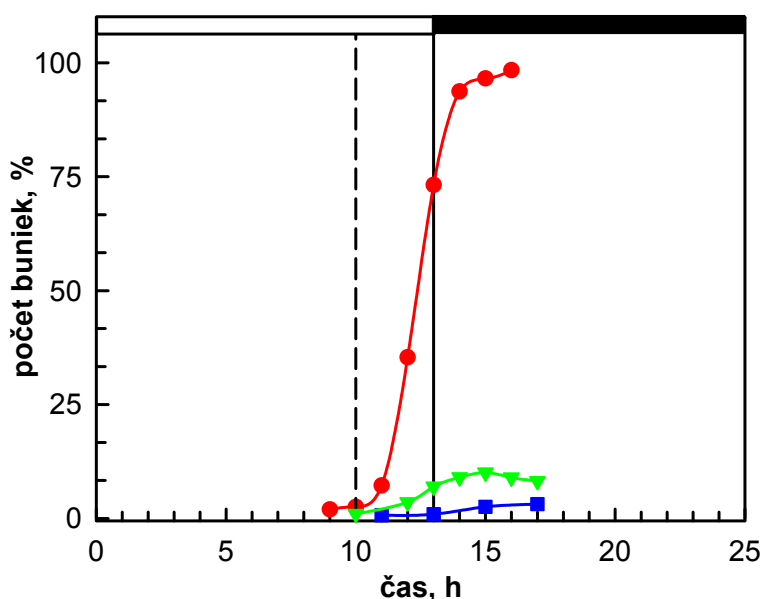
Mikroskopické fotografie (Obr. 12) zobrazujú morfológiu buniek v kultúrach ovplyvnených jednotlivými koncentráciami kofeínu. Po aplikácii 1 mM a 2 mM kofeínu vidíme štandardné delenie materských buniek na 4 – 8 dcérskych buniek (Obr. 12 A, B), zatiaľ čo v prípade 3 mM kofeínu sa objavujú neštandardné štruktúry (Obr. 12 C) materských buniek, ktorých počet sa po aplikácii 4 mM kofeínu zvýšil (Obr. 12 D).

Hoci v prípade 4 mM kofeínu (◆) bolo pozorované mierne spomalenie bunkového cyklu, táto koncentrácia je príliš vysoká na využitie v ďalších pokusoch. Dochádzalo pri nej totiž k inhibícii takmer všetkých bunkových komponentov, čo pravdepodobne viedlo ku vzniku aberantných bunkových štruktúr v populácii s touto koncentráciou kofeínu (Obr. 12 D). Zo všetkých použitých inhibítorov a ich koncentrácií sa zdá byť najvhodnejší pre ďalšie experimenty 2 mM kofeín (■).

4.1.5. Aplikácia zeocínu

Dve rôzne koncentrácie zeocínu (5 µg/ml a 20 µg/ml) boli testované na populácii buniek divokého kmeňa *C. reinhardtii*.

Zeocín, ako činidlo spôsobujúce poškodenie DNA, viedol k výraznému obmedzeniu bunkového delenia. Vyššia, 20 µg/ml (■), koncentrácia zeocínu úplne inhibovala bunkové delenie. V prípade nižšej, 5 µg/ml (▼), koncentrácie sa dokázalo rozdeliť len 8 % buniek z celej populácie (Obr. 13). Táto koncentrácia bola neskôr použitá aj pri ďalších experimentoch.



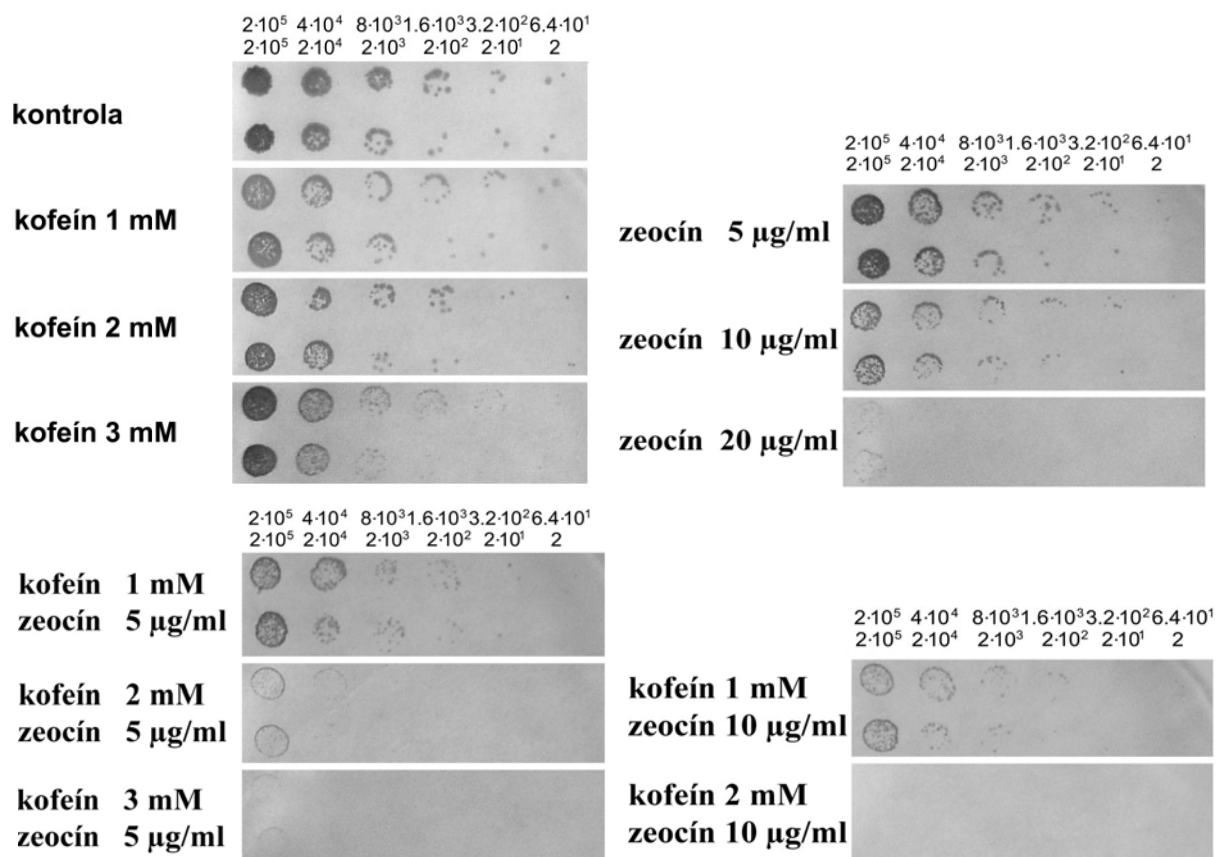
Obr. 13: Delenie synchronizovanej populácie buniek zelenej riasy *Chlamydomonas reinhardtii* v neprítomnosti (●) a v prítomnosti 5 µg/ml (▼) a 20 µg/ml (■) zeocínu (os x predstavuje hodinu bunkového cyklu, os y počet buniek v %, prerušovaná čiara predstavuje čas pridania zeocínu, biela lišta predstavuje svetelnú fázu kultivácie, čierna predstavuje tmavú fázu kultivácie).

4.2. Vplyv kofeínu, zeocínu a ich kombinácie na bunky divokého kmeňa rias *Chlamydomonas reinhardtii*

V ďalších pokusoch bola ovplyvnená synchronná kultúra divokého kmeňa rias *C. reinhardtii* vybranou koncentráciou kofeínu a zeocínu, a to buď samostatne alebo ich kombináciou.

4.2.1. Vplyv rôznych koncentrácií kofeínu a zeocínu na prežívanie buniek *C. reinhardtii*

Prežívanie buniek bolo stanovené pomocou spot testu na Petriho miskách s minimálnym HS médiom obsahujúcim rôzne koncentrácie inhibítorov. Bunky boli riedené v dvoch sériách a to 5-krát (Obr. 14, horný rad), resp. 10-krát (Obr. 14, dolný rad,). Po kultivácii na trvalom svetle sa hodnotila schopnosť ich rastu a prežívania na rôznych koncentráciách inhibítorov.



Obr. 14: Spot-test: prežívanie buniek divokého kmeňa *Chlamydomonas reinhardtii* na minimálnom HS médiu s prídavkom kofeínu, zeocínu a ich kombinácie.

Zvyšujúca sa koncentrácia kofeínu len mierne ovplyvnila prežívanie buniek na rozdiel od stúpajúcej koncentrácie zeocínu. Ani v prípade 1 mM ani 2 mM kofeínu nedošlo k žiadnej

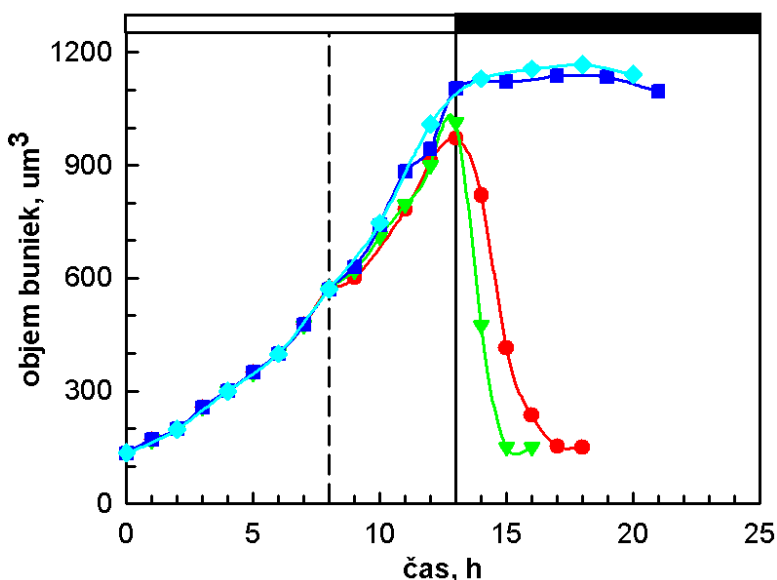
viditeľnej zmene v prežívaní v porovnaní s kontrolou. Zvyšujúca sa koncentrácia zeocínu naopak výrazne znížila prežívanie v dôsledku poškodenia DNA spôsobeného antibiotikom.

Kombinácia kofeínu a zeocínu mala oveľa výraznejší efekt na prežívanie buniek. 2 mM koncentrácia kofeínu neovplyvnila prežívanie a podobne ani 5 µg/ml zeocínu nespôsobilo žiadne výrazné zníženie životaschopnosti buniek. Avšak ich spolupôsobenie malo výrazný inhibičný efekt na prežívanie buniek.

Vzhľadom na to, že aplikácia 10 µg/ml zeocínu viedla k nižšiemu prežívaniu a v kombinácii s kofeínom mala takmer letálne účinky, v ďalších pokusoch bola použitá 5 µg/ml koncentrácia zeocínu v kombinácii s 2 mM kofeínom.

4.2.2. Vplyv 2 mM kofeínu a 5 µg/ml zeocínu na rast synchronizovanej populácie buniek *C. reinhardtii*

Kultúry boli synchronizované rovnako ako vo vyššie uvedených pokusoch, avšak činidlá, 2 mM kofeín, 5 µg/ml zeocín, resp. ich kombinácia, boli pridávané vždy v 8. hodine svetelnej periódy, teda po prechode buniek CP a pred začiatkom S/M fázy. Vzorky boli odoberané každú hodinu a z nich následne vyhodnotené zmeny vo veľkosti buniek rastúcich bez prítomnosti daných látok, v prítomnosti jednotlivých látok a ich kombinácie.



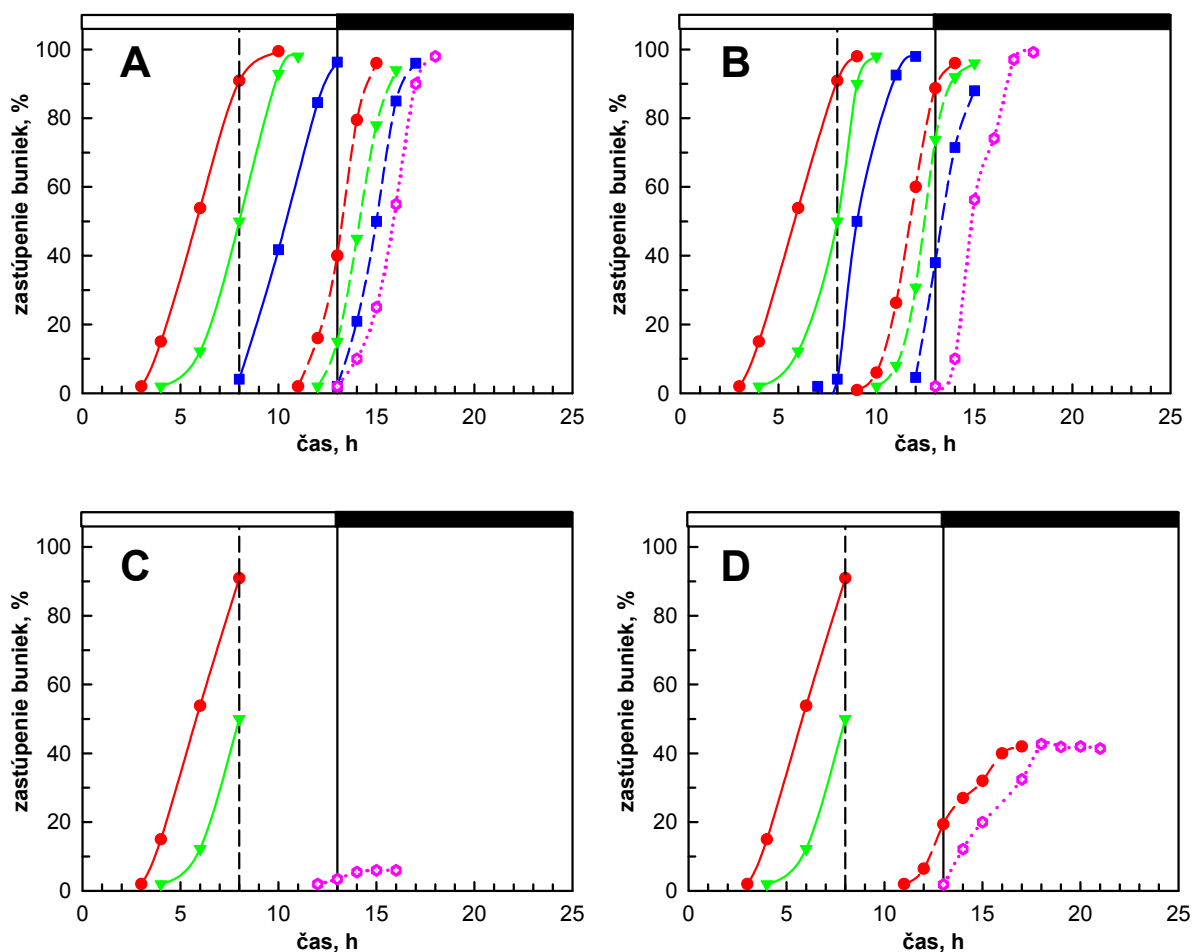
Obr. 15: Zmeny vo veľkosti buniek *Chlamydomonas reinhardtii* rastúcich v neprítomnosti činidiel (●), v prítomnosti 2 mM kofeínu (▼), 5 µg/ml zeocínu (■) a ich kombinácie (◆) (os x predstavuje hodinu bunkového cyklu, os y objem buniek v µm³, biela lišta predstavuje svetelnú fázu kultivácie, čierna predstavuje tmavú fázu kultivácie, prerušovaná čiara predstavuje hodinu pridania činidiel).

Nárast veľkosti buniek počas svetelnej periódy bol porovnateľný vo všetkých kultúrach, rozdiel bol v samotnom rozdelení buniek. Neovplyvnená kultúra (●) a kultúra s kofeínom (▼) sa začali deliť hneď po zatemnení a k úplnému rozdeleniu u kontroly došlo v 17. hodine bunkového cyklu. Zaujímavé je, že kultúra s kofeínom sa rozdelila asi o dve hodiny skôr, t.j. v 15. hodine bunkového cyklu. Bunky v kultúre pestované v prítomnosti zeocínu (■)

a kofeínu/zeocínu (◆) síce narástli na veľkosť porovnateľnú s kontrolou, ale ich rozdelenie na dcérske bunky už nepreběhlo.

4.2.3. Vplyv 2 mM kofeínu a 5 µg/ml zeocínu na priebeh bunkového cyklu synchronizovanej populácie buniek *C. reinhardtii*

Za rovnakých synchronizačných a kultivačných podmienok sa sledoval aj priebeh bunkového cyklu *C. reinhardtii* po ovplyvnení činidlami.



Obr. 16: Priebeh bunkového cyklu synchronizovanej populácie buniek *Chlamydomonas reinhardtii* v neprítomnosti činidiel (A), v prítomnosti 2 mM kofeínu (B), 5 µg/ml zeocínu (C) a ich kombinácie (D) Graf zobrazuje percento buniek, ktoré dosiahli CP pre rozdelenie sa na 2 (●, plná čiara), na 4 (▼, plná čiara) a na 8 (■, plná čiara) dcérskech bunkách a tiež delenie protoplastov na 2 (●, prerušovaná čiara), 4 (▼, prerušovaná čiara) a 8 (■, prerušovaná čiara) dcérskech bunkách. Bodkovaná čiara (○) predstavuje celkové delenie buniek v populácii (os x predstavuje hodinu bunkového cyklu, os y zastúpenie buniek v %, biela lišta predstavuje svetelnú fázu kultivácie, čierna predstavuje tmavú fázu kultivácie, prerušovaná čiara predstavuje hodinu pridania činidiel).

Počas rastovej (svetelnej) fázy bunky *C. reinhardtii* postupne dosiahnu jeden alebo viac CP, čo im umožní následne sa rozdeliť na príslušný počet dcérskech buniek. Bunky vo všetkých variantoch dosiahli 1. CP (●, plná čiara) a 2. CP (▼, plná čiara) (Obr. 16)

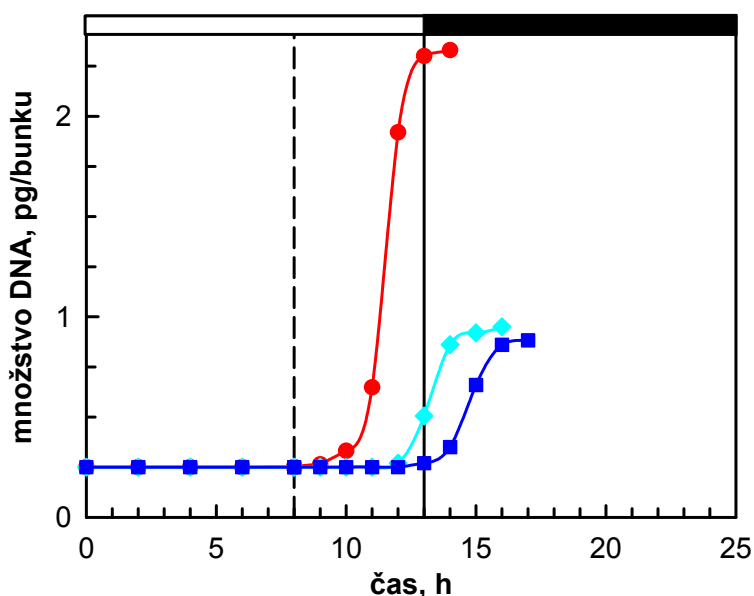
a čiastočne aj 3. CP (■, plná čiara) (Obr. 16 A, B) ešte pred pridaním kofeínu a zeocínu v 8. hodine bunkového cyklu. Pridanie kofeínu malo za následok rýchlejšie dosiahnutie CP, takže variant s kofeínom (Obr. 16 B) dosiahol 3. CP a tým aj možnosť deliť sa na 8 dcérskych buniek asi o hodinu skôr v porovnaní s kontrolou (Obr. 16 A). Populáciám buniek, ku ktorým bol pridaný zeocín (Obr. 16 C), resp. kofeín so zeocínom (Obr. 16 D), sa už nepodarilo dosiahnuť 3. CP a 2. CP dosiahlo asi len 50 % buniek, ktoré to stihli ešte pred pridaním činidiel v 8. hodine bunkového cyklu.

Delenie protoplastov, podobne ako dosiahnutie CP, prebehlo rýchlejšie u varianty ovplyvnenej kofeínom (Obr. 16 B - prerušované čiary) v porovnaní s kontrolou (Obr. 16 A - prerušované čiary). V prítomnosti zeocínu nebolo zaznamenané žiadne delenie protoplastov (Obr. 16 C). Prítomnosť kofeínu v kultúre ovplyvnenej zeocínom viedla k čiastočnému deleniu protoplastov na 2 (●, prerušovaná čiara) dcérske bunky (Obr. 16 D).

Porovnaním celkového delenia buniek (◐, bodkovaná čiara) v populácii rôznych variantov vidíme, že samotný kofeín urýchl'oval priebeh bunkového cyklu a teda stimuloval delenie protoplastov (Obr. 16 B – bodkovaná čiara). V kombinácii so zeocínom, kofeín umožnil 40 % buniek delenie, pravdepodobne na základe prekonania bloku vzniknutého v dôsledku účinku zeocínu (Obr. 16 D – bodkovaná čiara).

4.2.4. Replikácia DNA

Ďalším faktorom sledovaným po ovplyvnení synchronnej kultúry kofeínom a zeocínom, resp. ich kombináciou bola replikácia DNA u jednotlivých variant (Obr. 17).



Obr. 17: Zmeny v replikácii DNA buniek *Chlamydomonas reinhardtii* rastúcich v neprítomnosti činidiel (●), v prítomnosti 5 µg/ml zeocínu (■) a v prítomnosti kofeínu so zeocínom (◐) (os x predstavuje hodinu bunkového cyklu, os y množstvo DNA v pg/bunku, biela lišta predstavuje svetelnú fázu kultivácie, čierna predstavuje tmavú fázu kultivácie, prerušovaná čiara predstavuje hodinu pridanía činidiel).

U kontrolnej kultúry (●) a buniek pestovaných v prítomnosti kofeínu (nie je zobrazené v grafe) sa hladina DNA zvýšila 8 krát, pričom replikácia začala v 11. hodine bunkového cyklu. U kultúr pestovaných v prítomnosti zeocínu (■) a kofeínu/zeocínu (◆) sa množstvo DNA zvýšilo len 4 krát v porovnaní so začiatkom bunkového cyklu a samotný začiatok replikácie bol oneskorený asi o 2 – 3 hodiny.

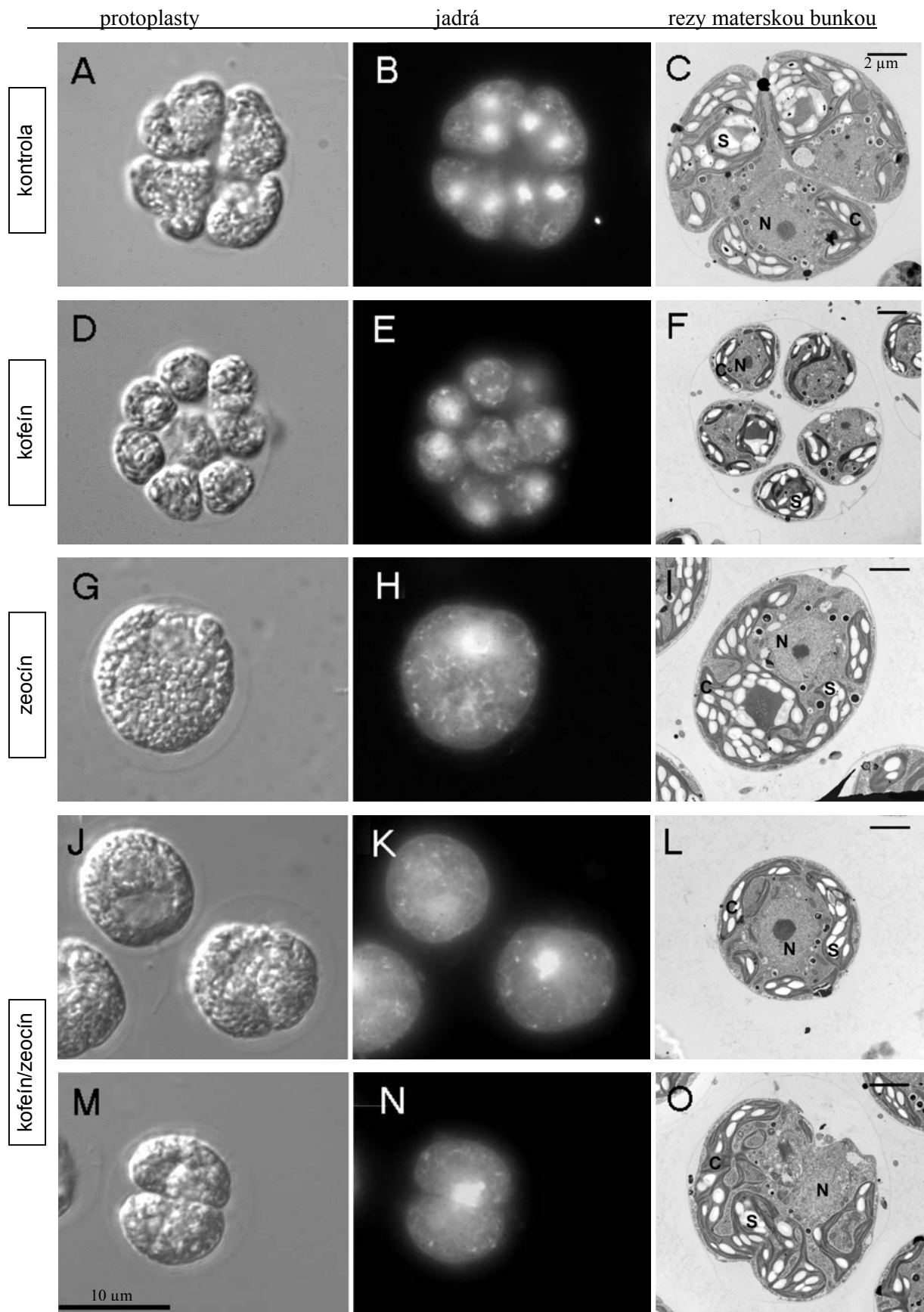
Hoci rast buniek (Obr. 15) nie je ovplyvnený prítomnosťou činidiel, replikácia DNA je v prítomnosti zeocínu a kofeínu/zeocínu oneskorená (Obr. 17). Taktiež množstvo DNA je u kultúr ovplyvnených zeocínom a kofeínom/zeocínom dvakrát nižšie v porovnaní s kontrolou (Obr. 17), čo naznačuje, že v oboch prípadoch bunky dosiahli 2. CP a majú kapacitu pre rozdelenie sa na 4 dcérske bunky. Avšak v skutočnosti v prípade zeocínu nedošlo k žiadnemu rozdeleniu protoplastov (Obr. 16 C) a v prípade kofeínu/zeocínu sa materské bunky rozdelili prevažne len na 2 dcérske bunky (Obr. 16 D).

4.2.5. Štruktúra buniek v synchronnej populácii riasy *C. reinhardtii* ovplyvnenej prítomnosťou 2 mM kofeínu a 5 µg/ml zeocínu

Priebeh bunkového cyklu, predovšetkým delenie jadier a protoplastov, bol v jednotlivých variantoch sledovaný aj pomocou mikroskopických techník. Prvý stĺpec predstavuje delenie protoplastov pozorované pomocou svetelného mikroskopu. V druhom stĺpci sú jadrá farbené SYBR Green I zobrazené fluorescenčným mikroskopom. Posledný stĺpec predstavuje fotky z elektrónového mikroskopu, ktoré zobrazujú rezy materskou bunkou.

V kontrolnom (Obr. 18 A, B) a kofeínom (Obr. 18 D, E) ovplyvnenom variante sa delili ako jadrá tak aj protoplasty, zatiaľ čo bunky kultivované v prítomnosti zeocínu (Obr. 18 G, H) a zeocínu/kofeínu (Obr. 18 J, K, M, N) zostávali jednojadrové. Len malá časť populácie ovplyvnenej zeocínom/kofeínom sa rýhovala na dve dcérske bunky (Obr. 18 M), avšak ani u nej k deleniu jadra nedochádzalo (Obr. 18 N).

Elektrónová mikroskopia odhalila, že deliace sa bunky v neovplyvnenom (Obr. 18 C) a kofeínom ovplyvnenom variante (Obr. 18 F) delia svoje jadrá (N) a chloroplasty (C) s veľkým množstvom škrobu (S). Bunky kultivované v prítomnosti zeocínu (Obr. 18 I) a kofeínu/zeocínu (Obr. 18 L, O) zostávajú jednojadrové avšak niektoré z kofeín/zeocín ovplyvneného variantu vykazujú delenie chloroplastov (Obr. 18 O).



Obr. 18: Mikroskopické fotografie zo svetelného (1. stĺpec - protoplasty), fluorescenčného (2. stĺpec - jadrá) a elektrónového mikroskopu (3. stĺpec - rezy bunkou) buniek *Chlamydomonas reinhardtii* neovplyvnenej kultúry (A, B, C), kofeínom (D, E, F), zeocínom (G, H, I) a kofeín/zeocínom (J, K, L, M, N, O).

M, N, O) ovplyvnenej kultúry. Jadrá sú farbené SYBR Green I. Mierka: prvé dva stĺpce – 10 μm , posledný stĺpec - 2 μm . Na priereze bunkou: N – jadro, C – chloroplasty, S – škrob.

4.2.6. Expresné profily mitotických kináz CdkB1 a Wee1 v populácii synchronónnych buniek *C. reinhardtii* ovplyvnenej prítomnosťou 2 mM kofeínu a 5 $\mu\text{g/ml}$ zeocínu

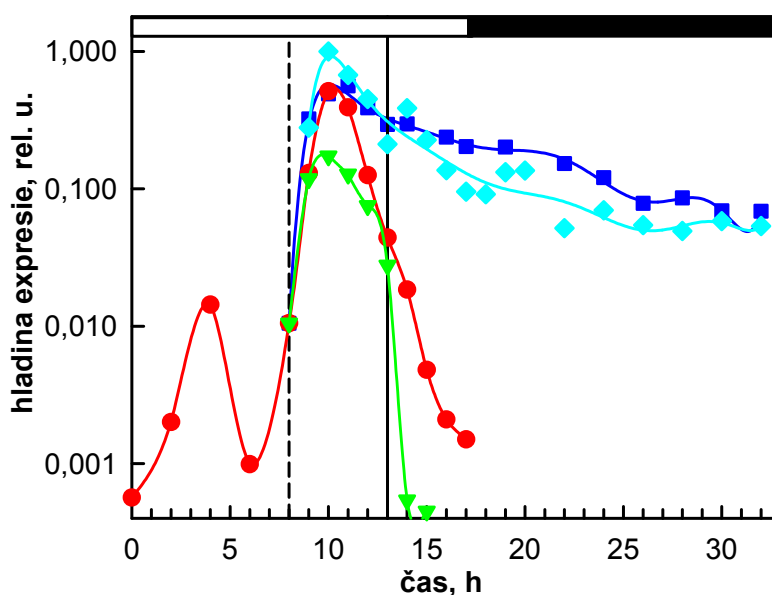
V ďalších pokusoch bol sledovaný vplyv kofeínu a zeocínu na expresiu proteínov regulujúcich bunkový cyklus *C. reinhardtii*, konkrétne kináz CdkB1 a Wee1.

CdkB1 aj kináza Wee1 sa exprimujú u *C. reinhardtii* v S/M fáze bunkového cyklu (Bisova et al., 2005), pričom o kináze Wee1 u *A. thaliana* je známe, že jej expresia sa zvyšuje po poškodení DNA (De Schutter et al., 2007). Preto sa sledovala expresia oboch génov po poškodení DNA spôsobenom zeocínom, a to pomocou RT-PCR a Western blotu. Taktiež sa študovala expresia týchto kináz po pôsobení kofeínu a spolupôsobení oboch látok. O kofeíne je známe, že má synergické účinky s väčšinou látok poškodzujúcich DNA.

Jednotlivé varianty boli kultivované za štandardných kultivačných podmienok, synchronizované striedaním svetla a tmy v pomere hodín 13: 11 a ovplyvnené v 8. hodine bunkového cyklu pridaním látok do kultivačného HS média.

4.2.6.1. Sledovanie expresie kináz CdkB1 a Wee1 pomocou RT-PCR

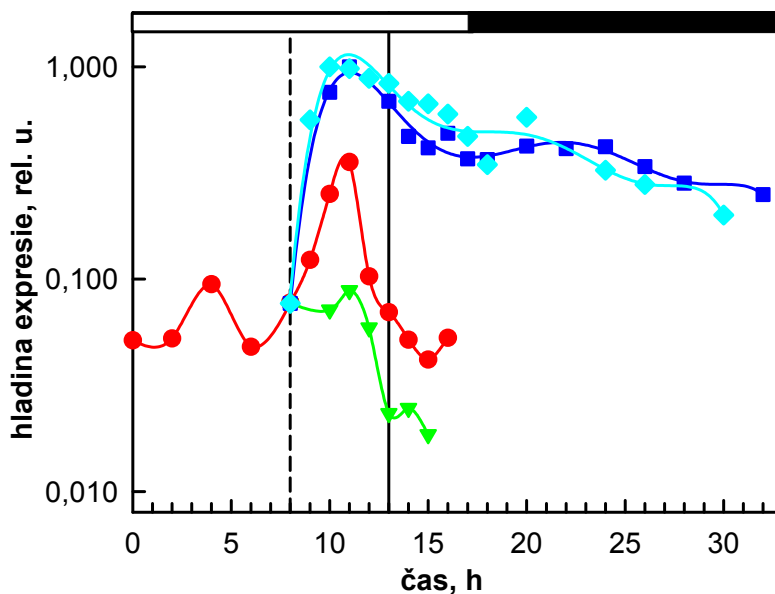
Množstvo mRNA kinázy CdkB1 (Obr. 19) v neovplyvnenej kultúre (●) vykazuje prvé mierne zvýšenie v čase dosiahnutia 1. CP, čo je asi 4. hodina bunkového cyklu. Za ním nasleduje výrazné zvýšenie množstva primárneho transkriptu v čase S/M fázy, čo je asi okolo 10.-11. hodiny bunkového cyklu. V porovnaní s kontrolou bol v kofeínom (▼) ovplyvnenej kultúre zaznamenaný nižší pík v čase S/M fázy a aj jeho pokles bol rýchlejší. V prítomnosti



Obr. 19: Hladina transkripce *CDKB1* génu analyzovaná pomocou RT-PCR v synchronizovanej populácii buniek *Chlamydomonas reinhardtii* v neprítomnosti činidiel (●) a v prítomnosti 2 mM kofeínu (▼), 5 $\mu\text{g/ml}$ zeocínu (■) a ich kombinácie (◆). Génová expresia bola normalizovaná voči expresii 18S rRNA génu (os x predstavuje hodinu bunkového cyklu, os y hladinu expresie *CDKB1* v relatívnych jednotkách, biela lišta predstavuje svetelnú fázu kultivácie, čierna predstavuje tmavú fázu kultivácie, prerušovaná čiara predstavuje hodinu pridania činidiel).

zeocínu (■) a kofeínu/zeocínu (◆) množstvo primárneho transkriptu kinázy CdkB1 vzrástlo okamžite po pridaní zeocínu a zostalo na tejto vysokej úrovni niekoľko hodín. Následne toto množstvo začalo v oboch variantoch pomaly klesať, avšak v porovnaní s kontrolnou a kofeínom ovplyvnenou kultúrou zostalo naďalej na vysokej hladine.

V prípade kinázy Wee1 bolo v neovplyvnenej kultúre (●) zaznamenané prvé maximum v čase 1. CP a potom v S/M fáze (Obr. 20). V kofeínom (▼) ovplyvnenej kultúre bol expresný profil podobný, s tým rozdielom, že hladina primárneho transkriptu sa udržiavala v porovnaní s kontrolou na oveľa nižšej úrovni. V prítomnosti zeocínu (■) a kofeínu/zeocínu (◆) množstvo primárneho transkriptu *WEE1* vzrástlo, podobne ako v prípade primárneho transkriptu *CDKB1*, okamžite po pridaní zeocínu, zostalo na tejto vysokej úrovni niekoľko hodín a následne začalo pozvoľne klesať. Rovnako ako v prípade *CDKB1* aj tu zostávala, napriek poklesu, hladina primárneho transkriptu *WEE1* na vysokej úrovni v porovnaní s kontrolnou a kofeínom ovplyvnenou kultúrou.

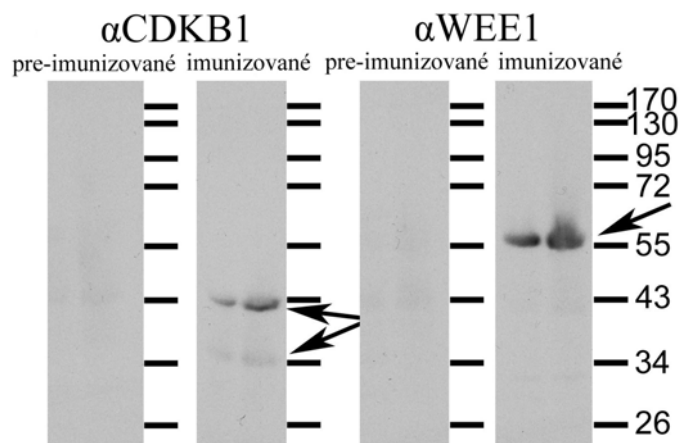


Obr. 20: Hladina transkripcie *WEE1* génu analyzovaná pomocou RT-PCR v synchronizovanej populácii buniek *Chlamydomonas reinhardtii* v neprítomnosti číndiel (●) a v prítomnosti 2 mM kofeínu (▼), 5 µg/ml zeocínu (■) a ich kombinácie (◆). Génová expresia bola normalizovaná voči expresii 18S rRNA génu (os x predstavuje hodinu bunkového cyklu, os y hladinu expresie *WEE1* v relatívnych jednotkách, biela lišta predstavuje svetelnú fázu kultivácie, čierna predstavuje tmavú fázu kultivácie, prerušovaná čiara predstavuje hodinu pridaní číndiel).

4.2.6.2. Špecificita protilátok proti kinázam CdkB1 a Wee1 z *C. reinhardtii*

Aby bolo možné overiť, či zmeny v transkripcii vedú k zmene hladiny proteínov CdkB1 a Wee1 v jednotlivých variantoch, boli použité špecifické protilátky proti daným kinázam. Tieto protilátky boli overované prostredníctvom Western blotu na celkovom proteínovom extrakte z mitotických buniek, ktorý bol detekovaný prostredníctvom pre-imunizovaného a imunizovaného séra. Ani jedna zo sledovaných kináz nebola detekovaná pre-imunizovaným sérom, zatiaľ čo v imunizovanom sére každá protilátka vykazovala špecifickú reakciu. Protilátka anti-CDKB1 reagovala s dvoma proteínmi. Slabšia reakcia bola s proteínom

o veľkosti 36 kDa a silnejšia s proteínom, ktorý mal veľkosť okolo 38 - 39 kDa (Obr. 21). Proteín o veľkosti 36 kDa tiež reagoval s protilátkou proti motívu PSTAIRE (Obr. 23), preto predpokladáme, že sa jedná o CdkA. Naopak proteín o veľkosti 38 - 39 kDa je zrejme kináza CdkB. Protilátka anti-WEE1 rozpoznávala proteín s veľkosťou 55 kDa, čo predikuje prítomnosť kinázy Wee1 v proteínovom extrakte (Obr. 21).



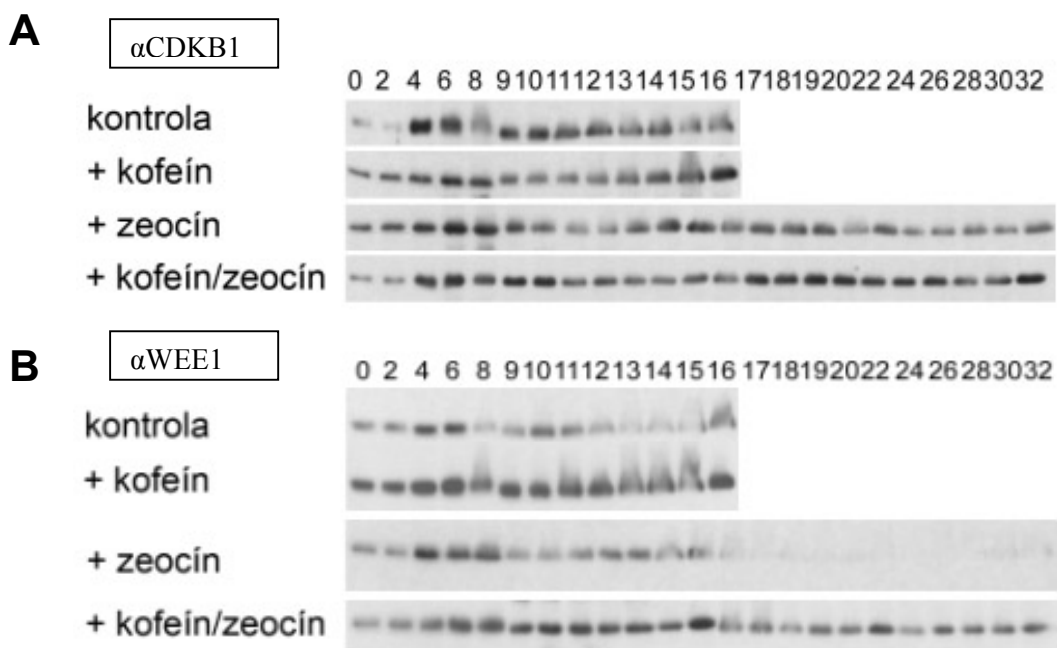
Obr. 21: Overenie špecificity protilátok proti CrCdkB1 a CrWee1 na celkovom proteínovom extrakte z mitotických buniek zelenej riasy *Chlamydomonas reinhardtii* pomocou 12 % SDS-PAGE a PVDF blotovacej membrány, detekcia pre-imunizovaným sérom a sérom vytvoreným proti CdkB1 resp. Wee1 proteínu, špecifické reakcie s proteínmi o veľkosti 36 kDa (CdkA), 38 - 39 kDa (CdkB1) a 55 kDa (Wee1) sú označené šipkami.

4.2.6.3. Sledovanie proteínovej expzie kináz CdkB1 a Wee1 pomocou Western blotu

V neovplyvnenej kultúre bol proteín CdkB1 (Obr. 22 A) detekovateľný prvýkrát v čase 1. CP (4. hodina bunkového cyklu) a jeho hladina zostala vysoká až do skončenia bunkového delenia. V prípade kofeínom ovplyvnenej kultúry bolo množstvo aj priebeh akumulácie proteínu CdkB1 porovnateľné s kontrolou. V oboch prípadoch korešponduje proteínová hladina s priebehom transkripcie. Kultúry ovplyvnené samotným zeocínom alebo kofeínom v spolupôsobení so zeocínom vykazovali podobnú hladinu proteínu CdkB1 ako kontrolný variant s tým rozdielom, že v kofeínom/zeocínom ovplyvnenej kultúre sa udržala na vysokej úrovni až do skončenia experimentu.

Proteín Wee1 bol v neovplyvnenej kultúre *C. reinhardtii* (Obr. 22 A) prítomný počas celého bunkového cyklu, pričom sa jeho hladina zvýšila v čase 1. CP a maximum dosiahla v 10. hodine bunkového cyklu. V prítomnosti kofeínu bola hladina tohto proteínu porovnateľná s neovplyvnenou kultúrou, hoci tu nebolo zaznamenané žiadne signifikantné zvýšenie v priebehu cyklu. V kultúrach ovplyvnených samotným zeocínom a zeocínom v spolupôsobení s kofeínom bola hladina proteínu Wee1 o niečo vyššia ako v kontrole a tiež k jej zvýšeniu došlo o trochu skôr. V zeocínom ovplyvnenej kultúre sa proteín Wee1 udržoval na vysokej úrovni do 16. hodiny bunkového cyklu a potom bol degradovaný. Naopak,

v kultúre ovplyvnenej kofeínom/zeocínom nebol Wee1 proteín degradovaný a teda jeho hladina bola vysoká až do skončenia experimentu.



Obr. 22: Proteínová hladina kináz CdkB1 (**A**) a Wee1 (**B**) v synchronizovanej populácii buniek *Chlamydomonas reinhardtii*. Bunky rástli v neprítomnosti činidiel a v prítomnosti 2 mM kofeínu, 5 μ g/ml zeocínu a ich kombinácie. Polovičné množstvo proteínového extraktu bolo nanášané od 9. hodiny bunkového cyklu.

4.2.7. Purifikácia mitotických kináz z populácie synchronných buniek *C. reinhardtii* ovplyvnenej prítomnosťou 2 mM kofeínu a 5 μ g/ml zeocínu a testovanie ich kinázovej aktivity

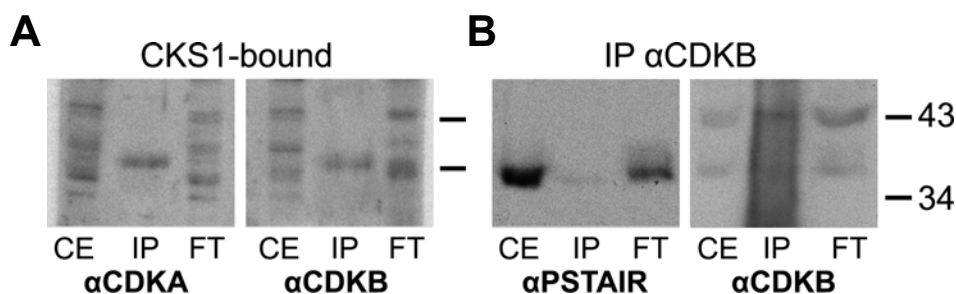
V nasledujúcich experimentoch bola sledovaná kinázová aktivita mitotických kináz a kinázy Wee1 po ovplyvnení buniek jednotlivými činidlami a tiež po ich spolupôsobení. Kinázy boli získané purifikáciou dvoma rôznymi metódami a následne bola testovaná ich aktivita pomocou histónu H1 (aktivita CKS1-viazaných kináz a kinázy CdkB1 imunoprecipitovanej pomocou anti-CDKB) a množstva fosforylovaných tyrozínov na CDK (Wee1 aktivita).

Oba typy kináz boli izolované z populácií buniek ovplyvnených v 8. hodine svetelnej periódy pridaním činidiel do živného média.

4.2.7.1. Purifikácia mitotických kinázy z celkového mitotického proteínového extraktu

Pre sledovanie aktivity mitotických kináz bolo potrebné izolovať ich z celkového mitotického proteínového extraktu. Na to boli použité dve purifikačné metódy. Prvou

metódou bolo vyviazanie kináz na CrCKS1 guličky obsahujúce CKS1 proteín z *C. reinhardtii*, ktorý špecificky viaže mitotické kinázy. Touto metódou sme získali špecifickú reakciu CKS1 s proteínom o veľkosti okolo 36 kDa, ktorý pravdepodobne zodpovedá kináze CdkA (Obr. 23 A). Prítomnosť ďalšej mitotickej kinázy, CdkB, ktorá má veľkosť okolo 38 - 39 kDa (vid'. kapitolu 4.2.6.2) sme nezaznamenali. Druhou purifikačnou metódou bola imunoprecipitácia pomocou špecifickej protilátky anti-CDKB. Táto viedla k úspešnej purifikácii ako kinázy CdkB, tak aj proteínu s veľkosťou 36 kDa, ktorý zodpovedá CdkA (Obr. 23 B).



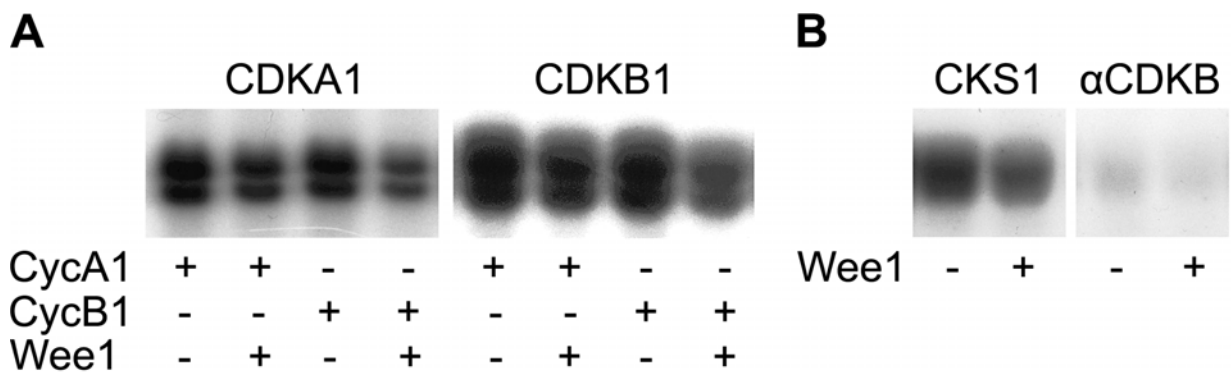
Obr. 23: Purifikácia mitotických kináz z celkového mitotického proteínového extraktu buniek *Chlamydomonas reinhardtii* pomocou CKS1-guličiek (A), resp. protilátky anti-CDKB1 (B) a následná detekcia pomocou protilátok anti-CDKA (A), anti-CDKB (A, B) a anti-PSTAIR (B), CE - celkový mitotický extrakt, IP – eluát po purifikácii CKS1-guličkami resp. po imunoprecipitácii protilátkou anti-CDKB, FT - nenaviazané proteíny po purifikácii CKS1-guličkami, resp. anti-CDKB imunoprecipitácii.

4.2.7.2. Ovplyvnenie kinázovej aktivity CDK/Cyc komplexov pomocou kinázy *Wee1 in vitro*

Nepriama kinázová esej bola robená pre overenie, či sa kinázová aktivita proteínov CdkA a CdkB, resp. ich komplexov s cyklínom zmení po fosforylácii kinázou Wee1. Kinázové komplexy boli získané buď súčasnou produkciou cyklínu a CDK v hmyzích bunkách alebo boli izolované z riasových extraktov.

Hmyzie bunky Sf-9 boli infikované bakulovírusom pre príslušnú CDK a cyklín. Kinázové komplexy vzniknuté po produkcii oboch proteínov boli izolované pomocou His kotvy na cyklínovej podjednotke a inkubované v prítomnosti, resp. neprítomnosti 250 ng rekombinantného proteínu His-Wee1. Okrem toho boli kinázové komplexy imunoprecipitované z 250 µg celkového mitotického proteínového extraktu *C. reinhardtii*, a to buď pomocou CKS1 guličiek alebo pomocou protilátky anti-CDKB. Tieto komplexy boli opäť inkubované v prítomnosti resp. neprítomnosti 250 ng purifikovanej His-tagovanej kinázy CrWee1.

Vo všeobecnosti sa v prítomnosti proteínu His-CrWee1 kinázová aktivita CDK/Cyc komplexov znížila. V prípade, že sa CdkA alebo CdkB viazali s CycA bolo toto zníženie len na úrovni asi 10 %. K výraznejšiemu poklesu kinázovej aktivity (asi o 30 %) však došlo v komplexoch, v ktorých sa CdkA a CdkB viazali s mitotickým CycB (Obr. 24 A). Rovnako aj v prípade CKS1 a anti-CDKB purifikovaných proteínov viedla prítomnosť Wee1 k poklesu kinázovej aktivity, a to ako kinázy CdkA tak aj CdkB (Obr. 24 B). Tieto výsledky naznačujú, že kináza Wee1 čiastočne inhibuje aktivitu komplexov kináz CdkA a CdkB.

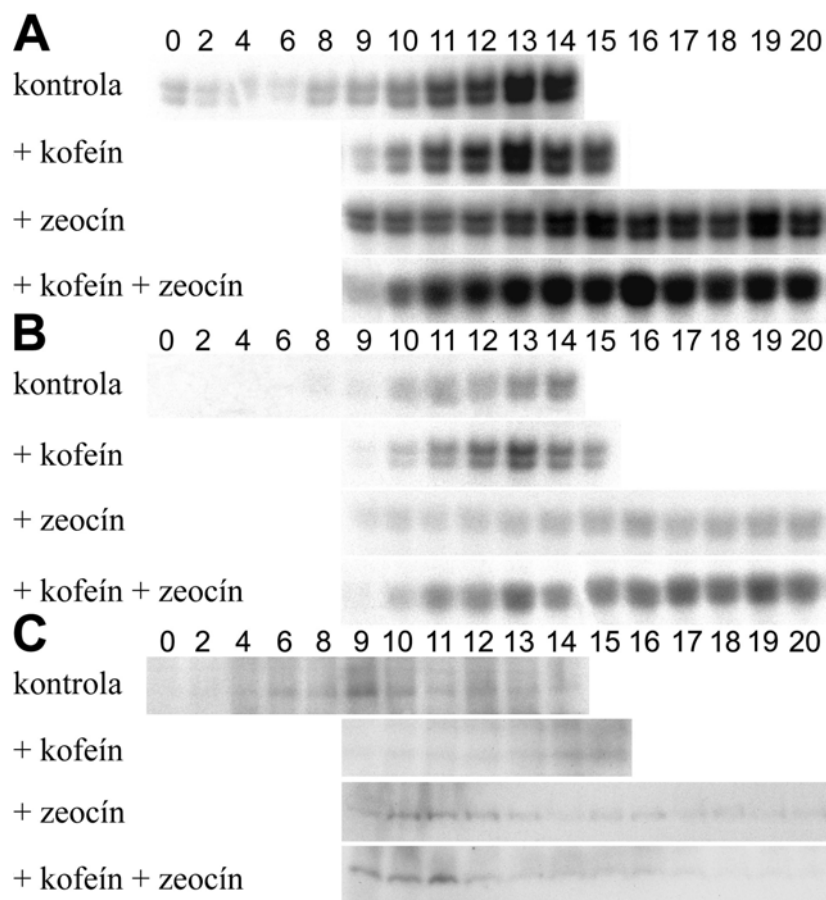


Obr. 24: Zmeny v kinázovej aktivite komplexov CdkA1/CycA1(CycB1) resp. CdkB1/CycA1(CycB1) (A) a kináz viazaných na proteín CrCKS1 resp. imunoprecipitovaných pomocou anti-CDKB (B) u riasy *Chlamydomonas reinhardtii* v prítomnosti proteínu CrWee1. Purifikované komplexy boli inkubované s kinázou His-CrWee1 a následne boli detekované zmeny vo fosforylácii histónu H1 ako ich substrátu. Obrázky znázorňujú kinázovú aktivitu *in vitro* detekovanú autorádiograficky

4.2.7.3. Kinázová aktivita CKS1-viazaných kináz, CdkB1 a Wee1 kináz v synchronizovanej populácii buniek *C. reinhardtii* ovplyvnenej prítomnosťou 2 mM kofeínu a 5 µg/ml zeocínu

Kinázová aktivita proteínov naviazaných na CKS1 guľičky a kinázy CdkB1 imunoprecipitovanej pomocou špecifickej protilátky bola sledovaná pomocou histónu H1, ktorý je ich substrátom a vykazovala rovnaký priebeh (Obr. 25 A, B). V kontrolnej a kofeínom ovplyvnenej kultúre aktivita stúpa od 11. hodiny bunkového cyklu, čo predstavuje začiatok S/M fázy, pričom maximum dosahuje v 13. hodine a následne začne klesať. V prípade zeocínom ovplyvnenej kultúry sa aktivita udržiava na nízkej hladine asi do 12. hodiny bunkového cyklu. Následne začína stúpať, čo je asi o 2 hodiny neskôr ako v kontrolnom variante, avšak udržiava sa na vysokej úrovni počas celého experimentu. V kultúre ovplyvnenej spolupôsobením kofeínu a zeocínu začala kinázová aktivita stúpať v rovnakom čase ako u kontrolnej a kofeínom ovplyvnenej kultúry, ale na rozdiel od nich sa udržiava na tejto vysokej úrovni po celý experiment (Obr. 25 A, B).

Aktivita kinázy Wee1 bola meraná pomocou špecifickej protilátky rozpoznávajúcej množstvo fosforylovaných tyrozínov na CDK. Tyrozínová fosforylácia v neovplyvnenej kultúre stúpala od času, kedy kultúra dosiahla 1. CP až do 12. hodiny bunkového cyklu a potom začala klesať. V kofeínom ovplyvnenej variante nebola fosforylácia detekovateľná takmer celý bunkový cyklus a objavila sa až po skončení bunkového delenia. V kultúre ovplyvnenej zeocínom bola tyrozínová fosforylácia vysoká od pridania zeocínu v 8. hodine až do 12. - 13. hodiny cyklu a hneď potom začala klesať. V prítomnosti kofeínu so zeocínom bol priebeh podobný, s tým rozdielom, že vysoká fosforylácia sa udržala len do 11. hodiny cyklu a potom už nebola detekovateľná (Obr. 25 C).



Obr. 25: Kinázová aktivita CKS1-viazaných kináz (A) a kinázy CdkB1 imunoprecipitovanej pomocou anti-CDKB1 (B) z neovplyvnených a kofeínom a zeocínom ovplyvnených buniek *Chlamydomonas reinhardtii* detekovaná prostredníctvom histónu H1 ako ich substrátu a aktivita kinázy Wee1 (C) kvantifikovaná ako množstvo Tyr-fosforylácie na CDK pomocou špecifickej protilátky anti-p-Cdc2 p34 Tyr 15. Tyr-fosforylácia bola meraná u synchronnej populácie buniek *Chlamydomonas reinhardtii* rastúcich v neprítomnosti a v prítomnosti inhibítorov. Polovičné množstvo proteínového extraktu bolo nanášané od 9. hodiny bunkového cyklu.

4.3. Vplyv inhibítorov bunkového delenia (FdUrd, kofeín) a zeocínu na bunkový cyklus buniek divokého kmeňa rias *Scenedesmus quadricauda*

Podobne ako u riasy *C. reinhardtii* aj u riasy *S. quadricauda* bol testovaný vplyv inhibítorov bunkového delenia na priebeh bunkového cyklu a jeho prepojenie s reparáciou DNA po jej poškodení vplyvom chemického činidla. Ako činidlo poškodzujúce DNA bol vybraný zeocín, ktorý sa nám osvedčil u predchádzajúceho modelového organizmu. Rovnako bol použitý aj kofeíns ohľadom na fakt, že ovplyvňuje reakciu buniek na poškodenie DNA.

Na základe publikovaných výsledkov týkajúcich sa vplyvu FdUrd na bunky riasy *S. quadricauda*, bol tento inhibítor bunkového delenia taktiež použitý v pokusoch s touto riasou. FdUrd je účinným inhibítorom jadrovej replikácie DNA u *S. quadricauda*, pričom neovplyvňuje rast buniek (Zachleder, 1994; Vítová et al., 2008). Naopak u *C. reinhardtii* FdUrd nemá žiadny vplyv na replikáciu jadrovej DNA, ani na priebeh bunkového cyklu (Wurtz et al., 1977; Wurtz et al., 1979) (viď výsledky vyššie), a preto toto činidlo nebolo u *C. reinhardtii* použité.

4.4. Vplyv kofeínu, zeocínu, FdUrd a ich kombinácie na bunky divokého kmeňa riasy *Scenedesmus quadricauda*

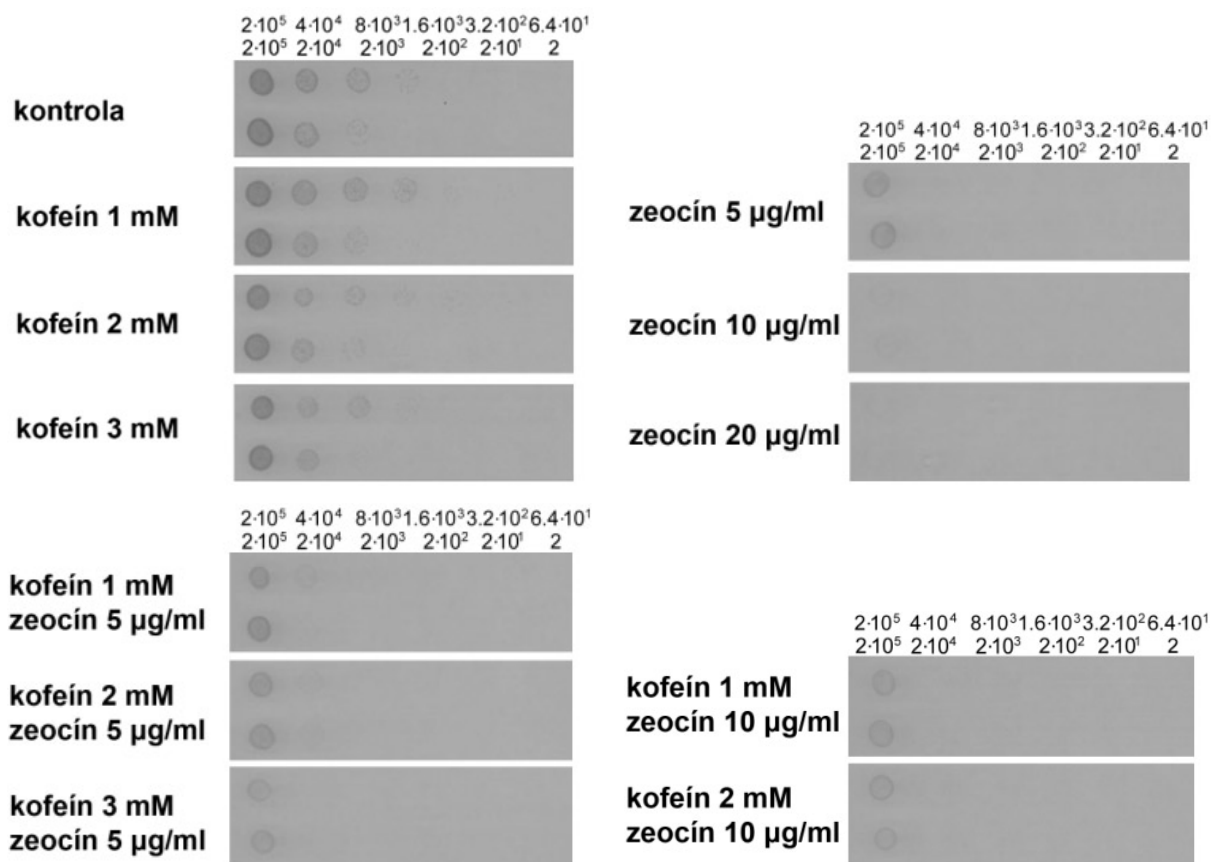
Bunky divokého kmeňa riasy *S. quadricauda* boli ovplyvňované vybranými koncentraciami kofeínu, zeocínu a FdUrd, a to buď samostatne alebo v rôznych kombináciách. V prípade kofeínu a zeocínu sme vychádzali z koncentrácií použitých u *C. reinhardtii*, avšak bolo potrebné overiť, prípadne vybrať novú, vhodnú kombináciu týchto dvoch činidiel. V prípade FdUrd bola použitá overená koncentrácia 25 µg/ml (Zachleder, 1994; Vítová et al., 2008). FdUrd bol aplikovaný samostatne alebo v kombinácii s kofeínom, zeocínom, resp. oboma týmito činidlami.

4.4.1. Vplyv rôznych koncentrácií kofeínu a zeocínu na prežívanie buniek *S. quadricauda*

Prežívanie buniek bolo stanovené pomocou spot testu na Petriho miskách s anorganickým médiom ½ ŠS obsahujúcim rôzne koncentrácie inhibítorov. Bunky boli riedené v dvoch sériách a to 5-krát (Obr. 26, horný rad), resp. 10-krát (Obr. 26, dolný rad). Po kultivácii na trvalom svetle sa hodnotila schopnosť ich rastu a prežívania pri rôznych koncentraciách inhibítorov.

Zvyšujúca sa koncentrácia kofeínu len veľmi mierne ovplyvnila prežívanie buniek na rozdiel od stúpajúcej koncentrácie zeocínu. Ani pri jednej z použitých koncentrácií kofeínu nedošlo k žiadnej viditeľnej zmene v prežívaní v porovnaní s kontrolou. Naopak, zvyšujúca sa koncentrácia zeocínu výrazne znížila prežívanie ovplyvnených buniek.

Kombinácia kofeínu a zeocínu mierne zvýšila prežívanie buniek v porovnaní so samotným zeocínom, a to predovšetkým pri koncentrácii zeocínu 10 µg/ml. Vzhľadom na to, že aplikácia samotného 10 µg/ml zeocínu viedla k úplnej inhibícii rastu buniek, zatiaľ čo v kombinácii s kofeínom boli tieto bunky schopné prežiť, vybrali sme pre ďalšie analýzy kombináciu 2 mM kofeínu s 10 µg/ml zeocínu.



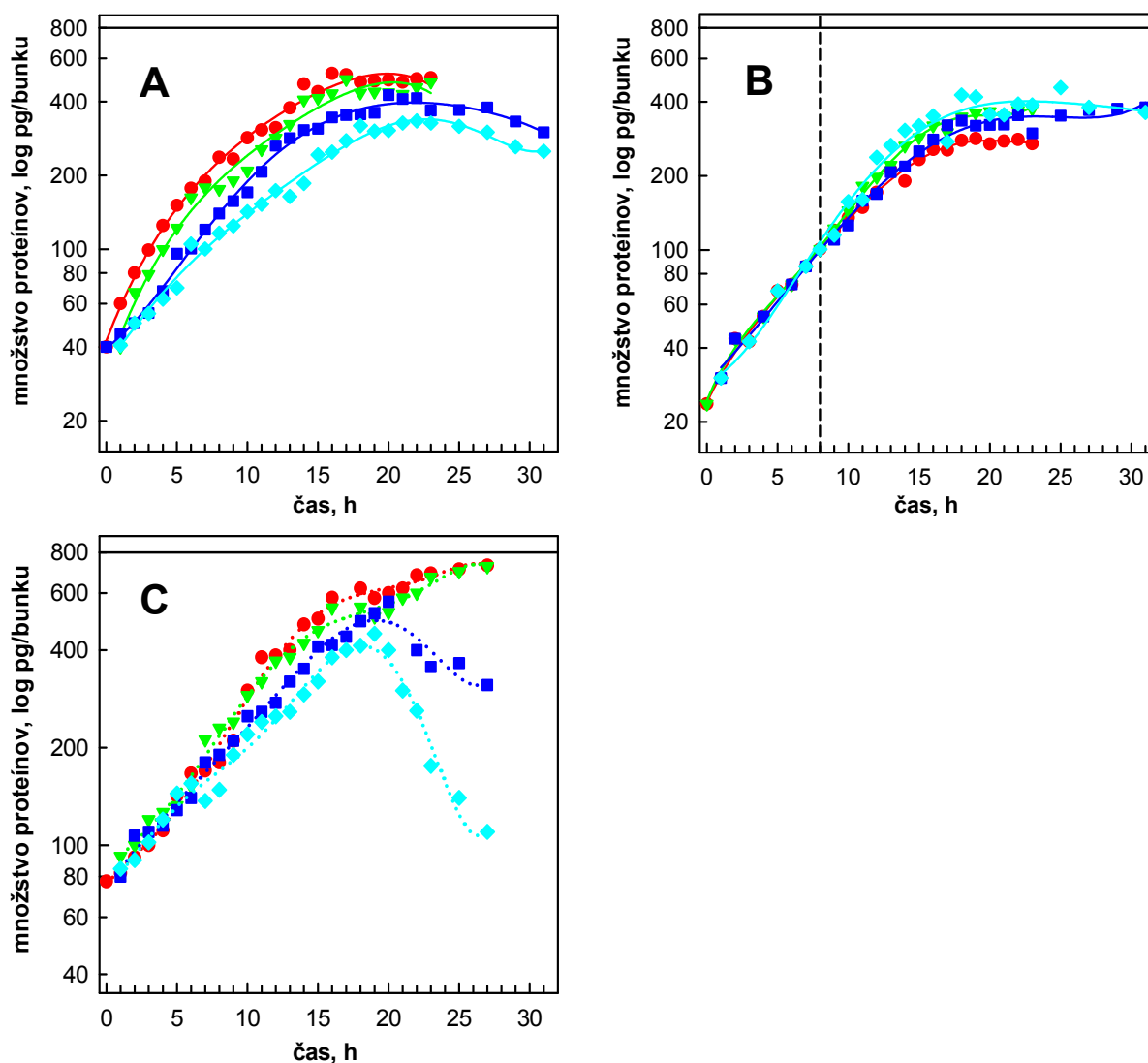
Obr. 26: Spot-test: prežívanie buniek divokého kmeňa *Scenedesmus quadricauda* na anorganickom ½ ŠS médiu s prídavkom kofeínu, zeocínu a ich kombinácie.

4.4.2. Vplyv 2 mM kofeínu a 10 µg/ml zeocínu bez resp. v kombinácii s 25 µg/ml FdUrd na rast synchronizovanej populácie buniek *S. quadricauda*

Pre všetky experimenty boli kultúry *S. quadricauda* synchronizované troma po sebe idúcimi cyklami striedania svetelnej a tmavej periódy v pomere 15 h/9 h, pričom pre samotné

experimenty bol použitý režim trvalého svetla, a teda bunky neboli limitované v raste. Pre kultiváciu buniek bolo použité tekuté anorganické $\frac{1}{2}$ ŠS médium buď bez prídania činidiel, alebo s prídavkom kofeínu (2 mM), zeocínu (10 $\mu\text{g/ml}$) a ich kombinácie. Rovnaké rozloženie experimentu bolo použité aj pre kombináciu s FdUrd. Činidlá boli pridávané buď na začiatku bunkového cyklu alebo v 8. hodine svetelnej periódy. V prípade FdUrd boli vždy všetky činidlá pridané na začiatku bunkového cyklu.

Vzorky boli odoberané každú hodinu a z nich následne vyhodnotené zmeny vo veľkosti buniek rastúcich bez prítomnosti daných činidiel, v prítomnosti jednotlivých činidiel a ich



Obr. 27: Zmeny vo veľkosti buniek *Scenedesmus quadricauda* merané na základe zmeny koncentrácie proteínov na bunku. Bunky rástli v neprítomnosti činidiel (●), v prítomnosti 2 mM kofeínu (▼), 10 $\mu\text{g/ml}$ zeocínu (■) a ich kombinácie (◆) (A, B). Rovnaké činidlá boli kombinované aj s FdUrd (C) – FdUrd (●, bodkovaná čiara), FdUrd + 2 mM kofeín (▼, bodkovaná čiara), FdUrd + 10 $\mu\text{g/ml}$ zeocínu (■, bodkovaná čiara) a FdUrd + kombinácia kofeínu a zeocínu (◆, bodkovaná čiara). Činidlá boli pridávané na začiatku bunkového cyklu (A, C), resp. v 8. hodine bunkového cyklu (B) (os x predstavuje hodinu bunkového cyklu, os y množstvo proteínov (pg/bunku), biela čiara predstavuje svetelnú fázu kultivácie, prerušovaná zvislá čiara predstavuje hodinu prídania činidiel).

kombinácie. Veľkosť buniek bola meraná jednak pomocou prístroja Coulter Counter, rovnako ako aj na základe zmien v koncentrácii proteínov na bunku, pričom výsledky boli v oboch prípadoch porovnateľné.

Kontrolná neovplyvnená kultúra rástla exponenciálne a veľkosť buniek vzrástla asi 10 krát oproti počiatočnej hodnote (●) (Obr. 27 A, B). Podobný priebeh rastu mala aj kultúra ovplyvnená kofeínom (▼), a to bez ohľadu na to, či bol pridaný na začiatku bunkového cyklu alebo v jeho 8. hodine (Obr. 27 A, B). Kultúry ovplyvnené zeocínom (■) vykazovali rozdiel v závislosti od toho, v ktorej fáze bunkového cyklu bol zeocín pridaný ku kultúram. Jeho aplikácia na začiatku bunkového cyklu spomalila rast buniek v porovnaní s neovplyvnenou kultúrou a tiež ich konečná veľkosť bola menšia asi o 20 % (Obr. 27 A). Na druhej strane, aplikácia v 8. hodine bunkového cyklu nemala žiadny efekt na rast buniek (Obr. 27 B). Podobne, aj kombinácia kofeín/zeocín (◆) spomalila rast buniek v prípade, keď činidlá boli pridané v nulte hodine bunkového cyklu (Obr. 27 A), avšak nemala žiadny účinok na rast buniek, ak činidlá boli aplikované v 8. hodine bunkového cyklu (Obr. 27 B).

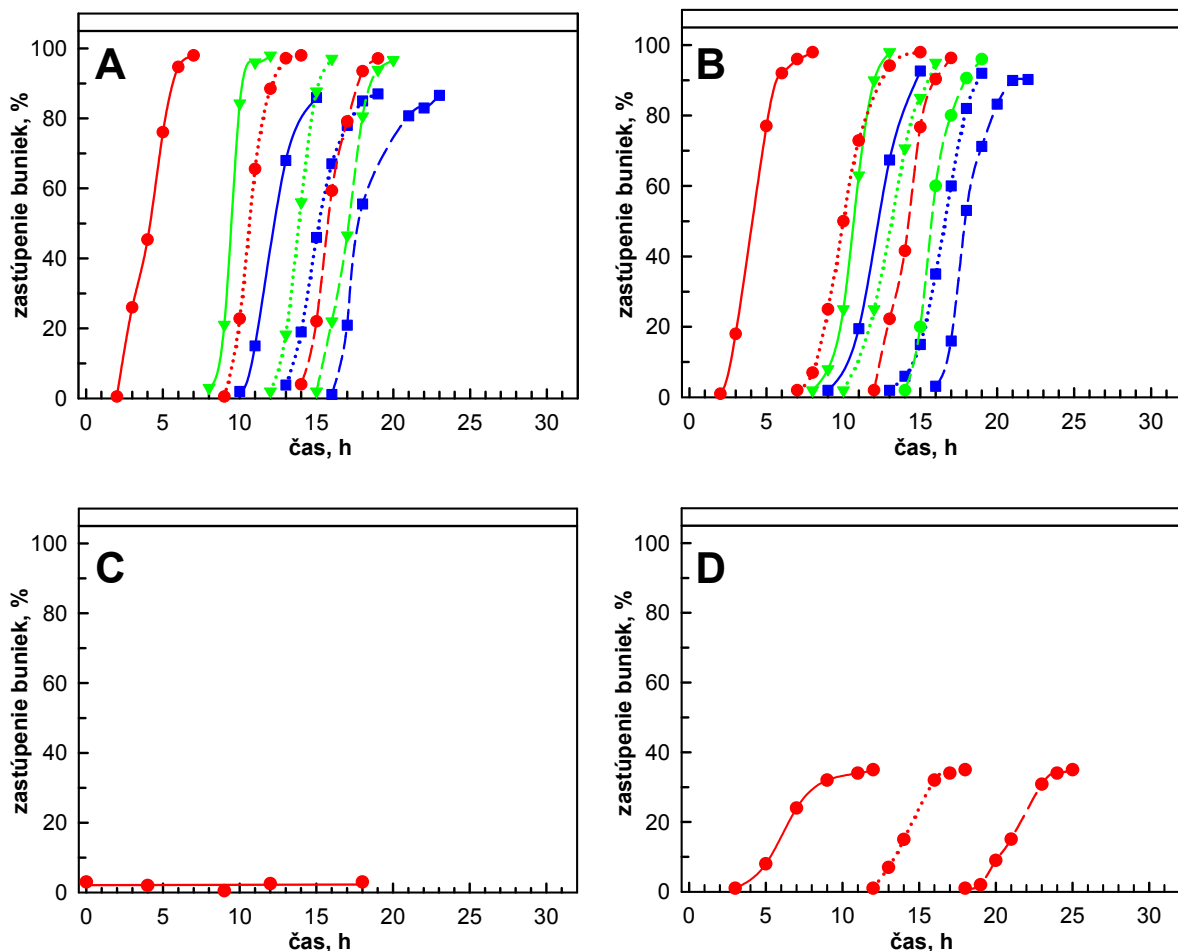
Po ovplyvnení buniek inhibítorom FdUrd (●, bodkovaná čiara) a FdUrd s kofeínom (▼, bodkovaná čiara) bola akumulácia proteínov (Obr. 27 C) podobná tej, ktorá bola zaznamenaná pri kontrolnej a kofeínom ovplyvnenej kultúre po pridaní činidiel na začiatku bunkového cyklu (Obr. 27 A). V prípade FdUrd v kombinácii so zeocínom (■, bodkovaná čiara) a FdUrd s kofeínom a zeocínom (◆, bodkovaná čiara) bol najprv rast podobný kultúre ovplyvnenej len samotným FdUrd, avšak neskôr bola zaznamenaná proteínová degradácia. Toto naznačuje veľmi silný tlak kombinácie daných činidiel na bunky a s najväčšou pravdepodobnosťou vedie k smrti niektorých buniek.

4.4.3. Vplyv 2 mM kofeínu a 10 µg/ml zeocínu na priebeh bunkového delenia synchronnej populácie buniek *S. quadricauda*

Počas rastovej (svetelnej) fázy bunky *S. quadricauda* postupne dosiahnu jeden alebo viac CP, čo im umožní následne sa rozdeliť na príslušný počet dcérskych buniek, pričom maximálny počet buniek v cenóbiu je 8. Toto zodpovedá dosiahnutiu troch CP.

Všetky bunky v oboch kontrolných variantoch (Obr. 28 A, 29 A) dosiahli 1. CP (●, plná čiara), 2. CP (▼, plná čiara) a 3. CP (■, plná čiara), pričom každý z nich bol nasledovaný delením jadier (●, ▼, ■, bodkované čiary) a protoplastov (●, ▼, ■, prerušované čiary) a vznikom 8-bunkových cenóbií. Kultúry ovplyvnené kofeínom (Obr. 28 B, 29 B), bez ohľadu na čas pridanía činidla, mali priebeh bunkového cyklu podobný kontrole. Pridanie zeocínu na začiatku bunkového cyklu (Obr. 28 C) malo za následok výrazné zmeny v jeho

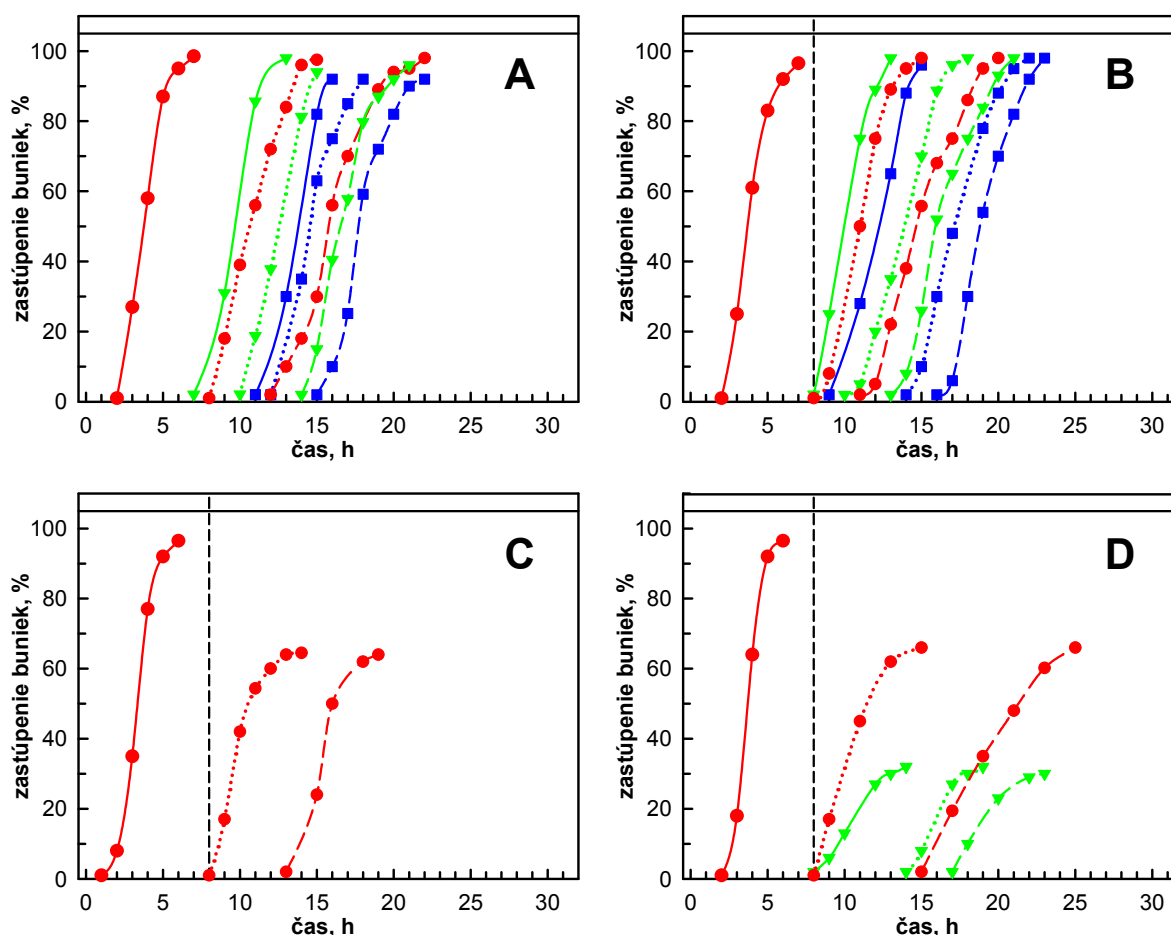
priebehu. Bunky neboli schopné dosiahnuť ani jeden CP a neprebehlo u nich ani jadrové delenie ani delenie protoplastov. Spolupôsobenie kofeínu a zeocínu pridaných na začiatku bunkového cyklu (Obr. 28 D) spôsobilo čiastočné prekonanie inhibície indukovanej účinkom samotného zeocínu. Z celkovej populácie dosiahlo 35 % buniek 1. CP (●, plná čiara), za ktorým u nich nasledovalo jadrové delenie (●, bodkovaná čiara) a delenie protoplastov (●, prerušovaná čiara).



Obr. 28: Priebeh bunkového cyklu synchronizovanej populácie buniek *Scenedesmus quadricauda* v neprítomnosti činidiel (A), v prítomnosti 2 mM kofeínu (B), 10 µg/ml zeocínu (C) a ich kombinácie (D). Činidlá boli pridané na začiatku bunkového cyklu. Graf zobrazuje percento buniek, ktoré dosiahli CP pre rozdelenie sa na 2 (●, plná čiara), na 4 (▼, plná čiara) a na 8 (■, plná čiara) dcérskych buniek, delenie jadier na 2 (●, bodkovaná čiara), na 4 (▼, bodkovaná čiara), na 8 (■, bodkovaná čiara) a tiež delenie protoplastov na 2 (●, prerušovaná čiara), 4 (▼, prerušovaná čiara) a 8 (■, prerušovaná čiara) dcérskych buniek (os x predstavuje hodinu bunkového cyklu, os y zastúpenie buniek v %, biela lišta predstavuje svetelnú fázu kultivácie).

V prípade aplikácie činidiel v 8. hodine bunkového cyklu (Obr. 29) mala kontrolná kultúra (Obr. 29 A) a kultúra ovplyvnená kofeínom (Obr. 29 B) rovnaký priebeh bunkového delenia ako v prípade pridávania činidiel na začiatku cyklu (viď odstavec vyššie). Ešte pred pridaním činidiel dosiahli bunky vo všetkých kultúrach (Obr. 29 A-D) 1. CP (●, plná čiara).

V zeocínom ovplyvnenej kultúre (Obr. 29 C) bunky nedosiahli žiadny ďalší CP a z ďalších procesov ako je jadrové a bunkové delenie sa tiež uskutočnili len tie, ktoré už boli naindukované pred pridaním zeocínu. Asi u dvoch tretín populácie (okolo 66 %) sa jadrá rozdelili na dve (●, bodkovaná čiara), čo pokračovalo aj delením protoplastov (●, prerušovaná čiara). V kofeínom a zeocínom ovplyvnenej kultúre (Obr. 29 D) bolo dosiahnutie jednotlivých CP tiež redukované v porovnaní s kontrolnou a kofeínom ovplyvnenou kultúrou



Obr. 29: Priebeh bunkového cyklu synchronizovanej populácie buniek *S. quadricauda* v neprítomnosti činidiel (A), v prítomnosti 2 mM kofeínu (B), 10 µg/ml zeocínu (C) a ich kombinácie (D). Činidlá boli pridané v 8. hodine bunkového cyklu. Graf zobrazuje percento buniek, ktoré dosiahli CP pre rozdelenie sa na 2 (●, plná čiara), na 4 (▼, plná čiara) a na 8 (■, plná čiara) dcérskych buniek, delenie jadier na 2 (●, bodkovaná čiara), na 4 (▼, bodkovaná čiara), na 8 (■, bodkovaná čiara) a delenie protoplastov na 2 (●, prerušovaná čiara), 4 (▼, prerušovaná čiara) a 8 (■, prerušovaná čiara) dcérskych buniek (os x predstavuje hodinu bunkového cyklu, os y zastúpenie buniek v %, biela lišta predstavuje svetelnú fázu kultivácie, prerušovaná zvislá čiara predstavuje hodinu pridania činidiel).

(Obr. 29 A, B). 66 % buniek dokončilo prvú postupnosť reprodukčných procesov (●, všetky typy čiar) a rozdelilo sa na 2 dcérske bunky (Obr. 29 D), podobne ako v zeocínom (Obr. 29 C) ovplyvnenom variante. Okrem toho asi 30 % buniek dosiahlo aj 2. CP (▼, plná čiara) a dokončilo 2. delenie jadier (▼, bodkovaná čiara) a protoplastov (▼, prerušovaná čiara). To

znamená, že pri spolupôsobení kofeínu/zeocínu sú bunky schopné čiastočne prekonať inhibičný účinok zeocínu. Zatiaľ čo v zeocínom ovplyvnenej kultúre (Obr. 29 C) vôbec nedošlo k 2. postupnosti reprodukčných procesov, v kofeínom/zeocínom ovplyvnenej kultúre (Obr. 29 D) táto postupnosť (▼, všetky typy čiar) prebehla u 30 % buniek.

Po aplikácii FdUrd nebolo možné zaznamenať v bunkách dosiahnutie CP, a to v dôsledku inhibície replikácie a teda aj ďalších reprodukčných procesov ako je delenie jadier a protoplastov, na základe ktorých sa CP určuje.

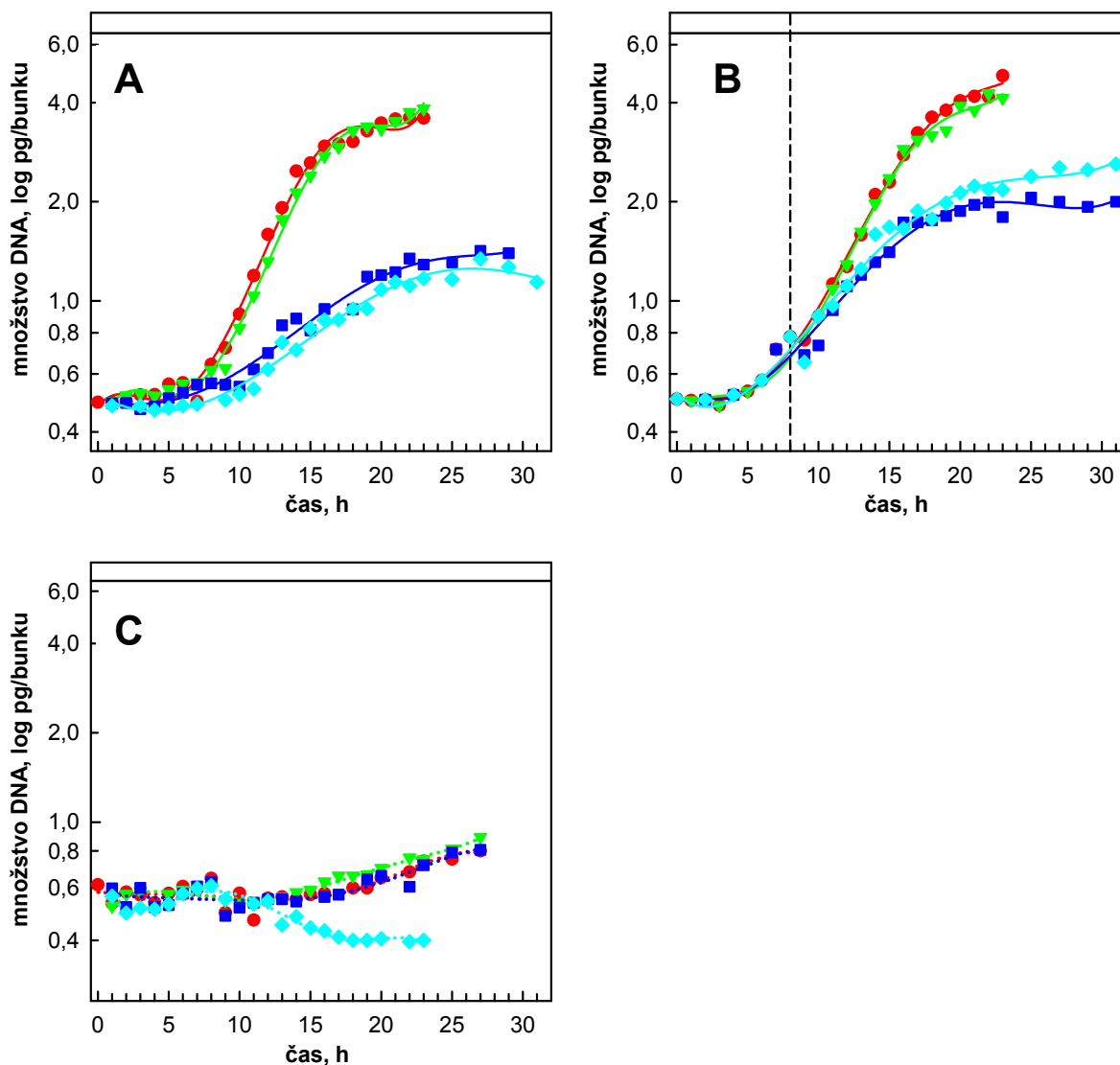
4.4.4. Replikácia DNA

Ďalším faktorom sledovaným po ovplyvnení synchronnej kultúry kofeínom, zeocínom a ich kombináciou, resp. pri spolupôsobení s FdUrd bola replikácia DNA. Kultúry boli synchronizované za rovnakých podmienok ako v predchádzajúcich pokusoch a činidlá sa pridávali na začiatku, resp. v 8. hodine bunkového cyklu.

U kontrolnej kultúry (●) a kultúry ovplyvnenej kofeínom (▼) sa hladina DNA zvýšila 8 krát, bez ohľadu na čas pridania kofeínu (Obr. 30 A, B). Kofeín (▼) teda nemá žiadny efekt na replikáciu DNA (Obr. 30 A, B) ani na rast buniek (Obr. 27 A, B).

Naopak, účinok zeocínu (■) na bunky sa prejaví znížením počtu replikácií, čo znamená, že množstvo DNA sa po pridaní zeocínu v nulte hodine len zdvojnásobí (Obr. 30 A) a po aplikácii v 8. hodine cyklu sa zvýši 4-násobne (Obr. 30 B). Na základe toho sa dá predpokladať, že bunky v prvom prípade dosiahli 1. CP pre delenie na 2 dcérske bunky a v druhom prípade dosiahli 2. CP pre delenie na 4 dcérske bunky. Avšak v skutočnosti po aplikácii zeocínu na začiatku bunkového cyklu nebol zaznamenaný ani jeden CP (Obr. 28 C), čo bolo pravdepodobne spôsobené metodickým postupom. S ohľadom na návaznosť procesov počas bunkového cyklu *S. quadricauda*, dosahujú bunky najprv 1. CP a potom prebieha prvá replikácia DNA (viď. literárny prehľad, kapitola 2.2.3). To znamená, že bunky ovplyvnené zeocínom 1. CP dosiahli, len ho nebolo v dôsledku zastavenia bunkového cyklu vo fáze po replikácii, teda v G2 fáze, možné identifikovať (Obr. 28 C), pretože procesy, ako je delenie jadier a protoplastov, na základe ktorých sa CP určuje, vôbec neprebehli.

Po aplikácii zeocínu v 8. hodine bunkového cyklu (■) sa na základe 4-násobného zvýšenia množstva DNA (Obr. 30 B) predpokladalo, že bunky dosiahli aj 2. CP. Nebolo však zaznamenané ani jadrové ani bunkové delenie (Obr. 29 C), a teda reprodukčné procesy s výnimkou replikácie DNA boli zablokované. Tieto výsledky naznačujú, že bunky zostali účinkom zeocínu zastavené v G2 fáze 2. postupnosti reprodukčných procesov.



Obr. 30: Zmeny v replikácii DNA buniek *Scenedesmus. quadricauda* rastúcich v neprítomnosti činidiel (●), v prítomnosti 2 mM kofeínu (▼), 10 µg/ml zeocínu (■) a ich kombinácie (◆) (A, B). Rovnaké činidlá boli kombinované aj s FdUrd (C) – FdUrd (●, bodkovaná čiara), FdUrd + 2 mM kofeín (▼, bodkovaná čiara), FdUrd + 10 µg/ml zeocínu (■, bodkovaná čiara) a FdUrd + kombinácia kofeínu a zeocínu (◆, bodkovaná čiara). Činidlá boli pridávané na začiatku bunkového cyklu (A, C), resp. v 8. hodine bunkového cyklu (B) (os x predstavuje hodinu bunkového cyklu, os y množstvo proteínov (pg/bunku), biela lišta predstavuje svetelnú fázu kultivácie, prerušovaná zvislá čiara predstavuje hodinu pridania činidiel).

Rovnako ako v prípade zeocínu, aj u kultúr pestovaných v prítomnosti kofeínu/zeocínu (◆) sa množstvo DNA zvýšilo len 2 krát, ak boli činidlá pridané v nulte hodine bunkového cyklu (Obr. 30 A) a 4 krát pri ich aplikácii v 8. hodine cyklu (Obr. 30 B). Analogicky, ako v predchádzajúcom prípade, sa na základe replikácie (Obr. 30 A) predpokladalo, že všetky bunky, ovplyvnené na začiatku bunkového cyklu, dosiahli 1. CP pre delenie na dve dcérske bunky. Avšak, bolo zaznamenané, že len 35 % buniek podstúpilo delenie na dve dcérske bunky (●, prerušovaná čiara, Obr. 28 D) a zvyšných 65 % zostalo zablokovaných v G2 fáze.

V porovnaní s účinkom samotného zeocínu (■) pridaného na začiatku bunkového cyklu (Obr. 28 C), dokázalo 35 % buniek prekonať zablokovanie v G2 fáze v prítomnosti kofeínu (Obr. 28 D).

Znásobenie množstva DNA (Obr. 30 B) v situácii, keď bol kofeín a zeocín pridaný v 8. hodine bunkového cyklu naznačuje, že všetky bunky v kultúre by mali dosiahnuť 1. aj 2. CP. V skutočnosti však len 30 % buniek dokončilo delenie na 4 dcérske bunky (▼, bodkovaná čiara, prerušovaná čiara, Obr. 29 D). V porovnaní so samotným zeocínom, kde 2. postupnosť reprodukčných procesov vôbec neprebehla (Obr. 29 C), v prítomnosti kofeínu bolo 30 % buniek schopných prekonať zastavenie bunkového cyklu v G2 fáze 2. postupnosti reprodukčných procesov.

Aplikácia činidiel v nulte hodine bunkového cyklu viedla, okrem vyššie uvedených dôsledkov, aj k oneskorenému začiatku replikácie v porovnaní s kontrolnou a kofeínom ovplyvnenou kultúrou (Obr. 30 A).

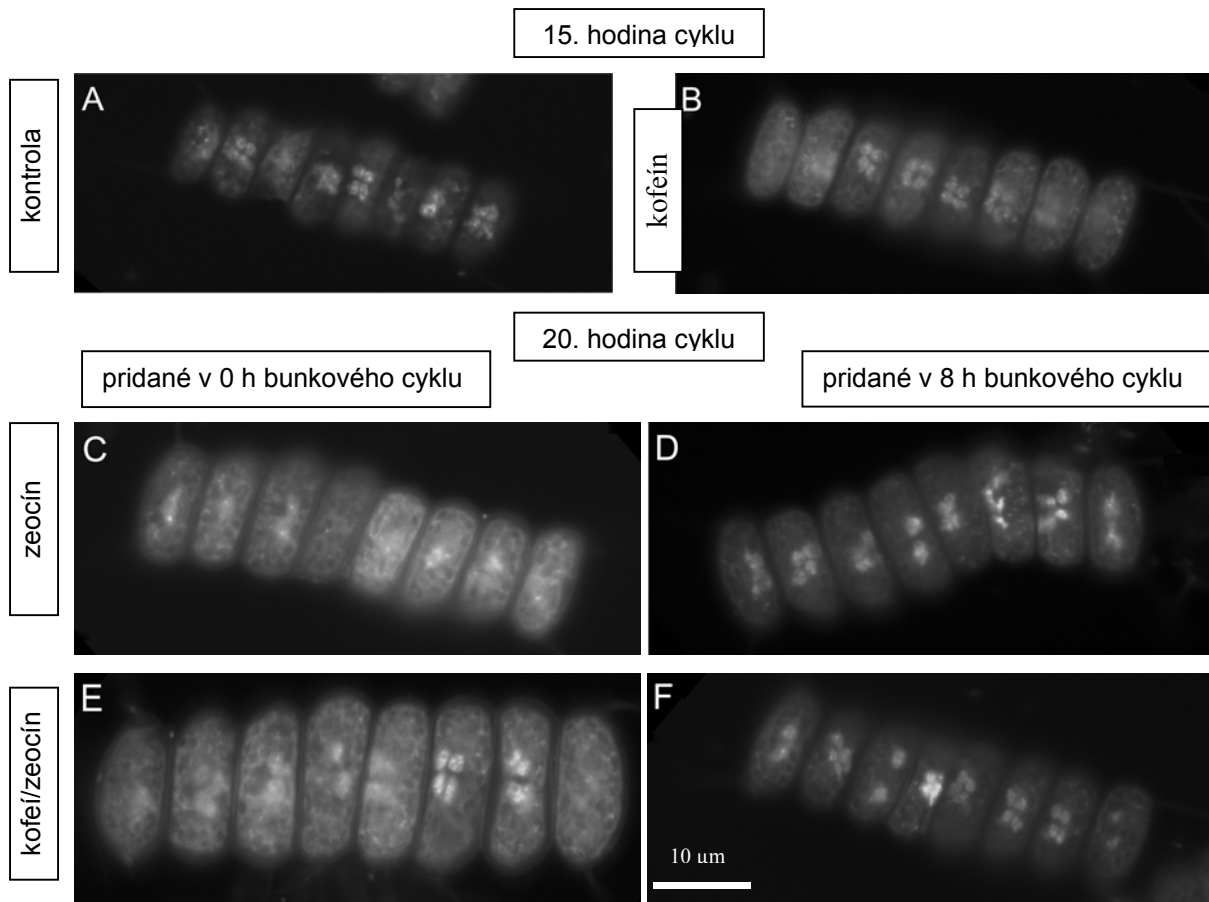
Množstvo DNA vo variantoch ovplyvnených FdUrd (●, ▼, ■, bodkovaná čiara) sa takmer nezmenilo v porovnaní s počiatočnou hodnotou, a to v dôsledku inhibičného účinku FdUrd na jadrovú replikáciu (Obr. 30 C). Slabé zvýšenie množstva DNA, je spôsobené replikáciou chloroplastovej DNA, ktorá nie je účinkom FdUrd ovplyvnená. V prípade kombinácie FdUrd s kofeínom/zeocínom (◆, bodkovaná čiara) dokonca došlo k degradácii DNA.

4.4.5. Delenie jadier v synchronnej populácii buniek *S. quadricauda* ovplyvnenej prítomnosťou 2 mM kofeínu a 10 µg/ml zeocínu

Delenie jadier bolo sledované pomocou fluorescenčnej mikroskopickkej techniky, pričom jadrá boli farbené farbičkou DAPI.

V kontrolnej (Obr. 31 A) a kofeínom (Obr. 31 B) ovplyvnenej variante bolo zaznamenané normálne delenie jadier, teda vznik 8-jadrových buniek, ktoré sa neskôr delili na 8 dcérskych buniek. V prípade pridaní zeocínu na začiatku bunkového cyklu jadrá neboli kompaktné a niektoré vykazovali aberantné tvary, ako napr. tvar činky (Obr. 31 C). Ak bol zeocín aplikovaný v 8. hodine bunkového cyklu, boli niektoré bunky schopné deliť svoje jadrá na 2 (Obr. 31 D), avšak u niektorých buniek boli zaznamenané aj aberantné štruktúry jadier. Pri spolupôsobení kofeínu a zeocínu od začiatku bunkového cyklu (Obr. 31 E) bolo delenie jadier podobné účinku zeocínu pridaného v nulte hodine (Obr. 31 C). Niektoré jadrá vykazovali aberantné štruktúry a niektoré boli schopné rozdeliť sa na 2. Po pridaní kofeínu a zeocínu v 8.

hodine bunkového cyklu (Obr. 31 F) vyzeralo jadrové delenie normálne, bolo podobné kontrole, pričom jadrá sa delili na 2 a na 4.



Obr. 31: Mikroskopické fotografie jadier z fluorescenčného mikroskopu buniek riasy *Scenedesmus quadricauda*. Neovplyvnená kultúra (A), kofeínom (B), zeocínom (C, D) a kofeínom/zeocínom (E, F) ovplyvnená kultúra. Činidlá boli pridávané na začiatku bunkového cyklu (B, C, D) resp. v 8. hodine bunkového cyklu (D, F). Vzorky boli odoberané v 15. hodine (A, B), resp. 20. hodine (C, D, E, F) bunkového cyklu. Jadrá sú farbené DAPI.

4.4.6. Expresné profily mitotických kináz CdkA1, CdkB1 a Wee1 v populácii synchronných buniek *S. quadricauda* ovplyvnenej prítomnosťou 2 mM kofeínu a 10 µg/ml zeocínu bez resp. v kombinácii s 25 µg/ml FdUrd

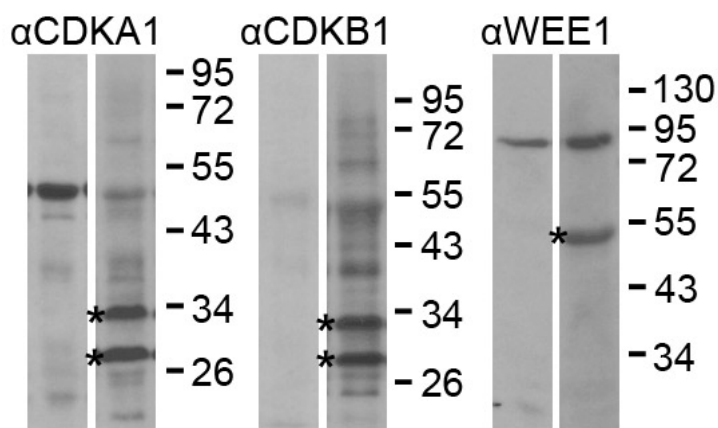
V ďalších pokusoch sa sledoval vplyv kofeínu, zeocínu a FdUrd na expresiu proteínov regulujúcich bunkových cyklus *S. quadricauda*, konkrétne kináz CdkA1, CdkB1 a Wee1.

U príbuznej riasy *C. reinhardtii* je kináza CdkA1 prítomná v bunkách konštitutívne počas celého bunkového cyklu, ale jej expresia je zvýšená na začiatku rastovej fázy a následne počas S/M fázy. CdkB1 aj kináza Wee1 sa exprimujú u *C. reinhardtii* v S/M fáze bunkového cyklu (Bisova et al., 2005), pričom o kináze Wee1 u *A. thaliana* je známe, že jej

expresia sa zvyšuje po poškodení DNA (De Schutter et al., 2007). Preto sa sledovala expresia všetkých troch génov po poškodení DNA spôsobenom zeocínom, a to pomocou Western blotu. Taktiež sa študovala expresia týchto kináz po pôsobení kofeínu a spolupôsobení oboch činidiel. O kofeíne je známe, že má synergické účinky s väčšinou látok poškodzujúcich DNA. Účinok kofeínu a zeocínu bol tiež sledovaný v prítomnosti FdUrd, ktorý je inhibítorom jadrovej replikácie u *S. quadricauda* (Zachleder, 1994; Zachleder et al., 1996).

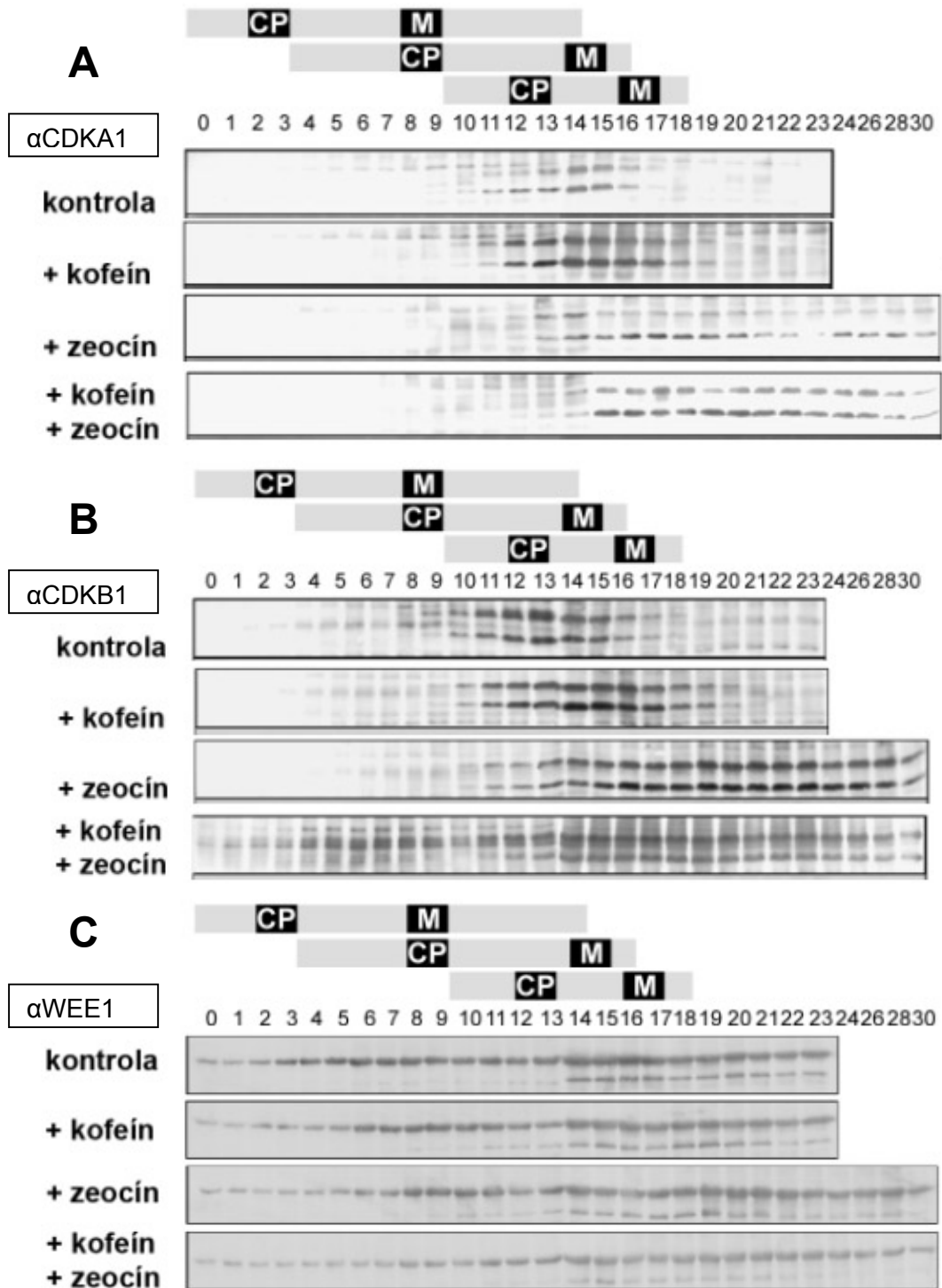
4.4.6.1. Špecificita protilátok z *C. reinhardtii* proti kinázam CdkA1, CdkB1 a Wee1 z riasy *S. quadricauda*

Aby bolo možné sledovať zmeny v expresii vybraných proteínov po poškodení DNA, boli použité špecifické protilátky proti týmto proteínom. Využili sme už pripravené protilátky proti študovaným proteínom, ktoré ale pochádzali z riasy *C. reinhardtii*. Tieto protilátky boli overované prostredníctvom Western blotu na celkovom proteínovom extrakte z mitotických buniek *S. quadricauda*, ktorý bol detekovaný prostredníctvom pre-imunizovaného a imunizovaného séra. Ani jedna zo sledovaných kináz nebola detekovaná pre-imunizovaným sérom, zatiaľ čo imunizované sérum rozpoznávalo proteíny o špecifickej veľkosti reprezentujúce dané kinázy. Protilátky proti CdkA a CdkB vždy špecificky reagovali s dvomi proteínmi o veľkosti 28 a 34 kDa. Každá protilátka bola teda schopná vyviazať oba proteíny z bunkového lyzátu, avšak anti-CDKA viazala približne rovnaké množstvá oboch proteínov, na rozdiel od anti-CDKB, ktorá reagovala predovšetkým s proteínom s veľkosťou 28 kDa. Z toho sa usúdilo, že 28 kDa proteín predstavuje kinázu CdkB a 34 kDa proteín kinázu CdkA. Protilátka anti-WEE1 dávala špecifickú reakciu s proteínom o veľkosti 55 kDa, čo predikuje prítomnosť kinázy Wee1 v proteínovom extrakte (Obr. 32).



Obr. 32: Overenie špecificity protilátok pochádzajúcich z *Chlamydomonas reinhardtii* proti proteínom CdkA1, CdkB1 a Wee1 z riasy *Scenedesmus quadricauda* na celkovom proteínovom extrakte z mitotických buniek *Scenedesmus quadricauda*, detekcia pre-imunizovaným sérom (stĺpce v ľavo) a sérom vytvoreným proti CrCdkA1, CrCdkB1, resp. CrWee1 proteínu (stĺpce v pravo), špecifické reakcie s proteínmi o veľkosti 28 kDa a 34 kDa (CdkA1, CdkB1) a 55 kDa (Wee1) sú označené hviezdikami.

4.4.6.2. Sledovanie proteínovej expresie kináz CdkA1, CdkB1 a Wee1 pomocou Western blotu



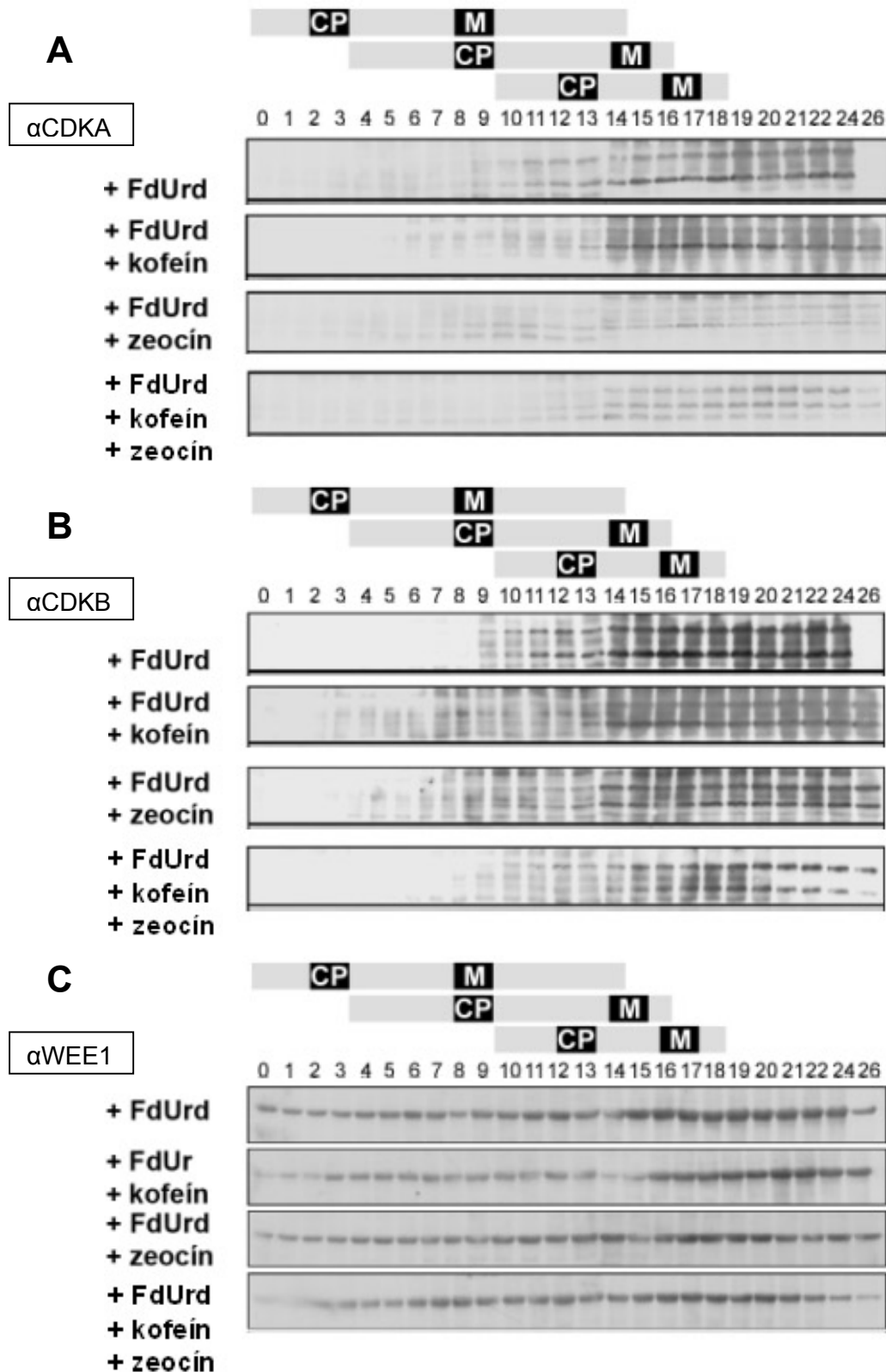
Obr. 33: Proteínová hladina kináz CdkA (A), CdkB (B) a Wee1 (C) v synchronizovanej populácii buniek *Scenedesmus quadricauda*. Bunky rástli v neprítomnosti a v prítomnosti kofeínu, zeocínu a ich kombinácie. Činidlá boli pridávané na začiatku bunkového cyklu. Rovnaké objemy proteínového extraktu v prepočte na bunku boli nanášané na gél. Lišty v horných častiach obrázkov reprezentujú významné fázy bunkového cyklu (CP – commitment point, M - mitóza).

Akumulácia proteínov CdkA a CdkB mala podobný priebeh počas celého experimentu. Vo všetkých kultúrach boli tieto proteíny detekovateľné od 11. – 12. hodiny bunkového cyklu (Obr. 33, 34). V kontrolnej kultúre dosiahlo množstvo CdkA svoje maximum v 14. – 15. hodine (Obr. 33 A), zatiaľ čo maximálne množstvo CdkB pokrylo širší časový úsek, a to od 10. – 16. hodiny bunkového cyklu (Obr. 33 B). Množstvo oboch kináz začalo klesať okolo 17. hodiny cyklu. V kofeínom ovplyvnenej kultúre mala akumulácia kinázy CdkA podobný priebeh ako v kontrolnej kultúre (Obr. 33 A), kináza CdkB sa udržala na maximálnej hodnote dlhšie v porovnaní s kontrolnou kultúrou, až do 19. hodiny cyklu (Obr. 33 B). V kultúrach ovplyvnených samotným zeocínom a kombináciou zeocínu s kofeínom pretrvávali obe kinázy na približne rovnakej úrovni počas celého experimentu (Obr. 33 A, B).

V prípade kinázy Wee1 bola zaznamenaná jej prítomnosť počas celého bunkového cyklu, a to u všetkých ovplyvnených variantov (Obr. 33, 34). V kontrolnej kultúre stúpala hladina kinázy Wee1 2 krát. Najprv medzi 6. a 8. hodinou, čo je čas prvého jadrového delenia a následne v čase medzi 13. a 16. hodinou, kedy prebieha 2., 3. a prípadne 4. jadrové delenie. Podobná situácia bola aj v prítomnosti kofeínu v kultúre (Obr. 33 C). V prítomnosti samotného zeocínu začala hladina kinázy Wee1 stúpať neskôr ako v predchádzajúcich dvoch variantoch, a to v 8. hodine bunkového cyklu. Taktiež dosiahla dva vrcholy, v 10. a 13. hodine, a potom sa udržala na vysokej hladine až do 23. hodiny cyklu, kedy začala klesať. Kináza Wee1 v prítomnosti kofeínu/zeocínu začala stúpať až v 11. hodine bunkového cyklu a následne sa udržala na podobnej hladine až do konca experimentu (Obr. 33 C).

V kultúrach ovplyvnených FdUrd a FdUrd s kofeínom bola situácia v prípade kinázy CdkA aj CdkB (Obr. 34 A, B) podobná situácii, ktorá nastala v prípade ovplyvnenia buniek zeocínom a kofeínom/zeocínom (Obr. 33 A, B). Obe kinázy teda pretrvávali počas celého experimentu na približne rovnakej hladine. V FdUrd/zeocín a FdUrd/kofeín/zeocín ovplyvnených kultúrach boli hladiny proteínov CdkA a CdkB na detekčnom limite, avšak aj tak sa dá rozpoznať, že u oboch proteínov nedošlo k degradácii skôr ako na konci experimentu.

Vo všeobecnosti bola hladina kinázy Wee1 vyššia v prítomnosti FdUrd ako v jeho neprítomnosti (porovnaj Obr. 33 C a 34 C). V kultúre ovplyvnenej samotným FdUrd dosiahla hladina kinázy Wee1 dva vrcholy, v 6. a potom v 11. hodine bunkového cyklu. Následne sa udržovala na približne rovnakej hladine (Obr. 34 C). V kofeínom ovplyvnenej kultúre začala



Obr. 34: Proteínová hladina kináz CdkA (A), CdkB (B) a Wee1 (C) v synchronizovanej populácii buniek *Scenedesmus quadricauda*. Bunky rástli v prítomnosti samotného FdUrd a v prítomnosti FdUrd s kofeínom, zeocínom alebo v ich kombinácii. Činidlá boli pridávané na začiatku bunkového cyklu. Rovnaké objemy proteínového extraktu v prepočte na bunku boli nanášané na gél. Lišty v horných častiach obrázkov reprezentujú významné fázy bunkového cyklu (CP – commitment point, M - mitóza).

kináza Wee1 stúpať oveľa neskôr, a to až v 16. hodine bunkového cyklu, pričom maximum dosiahla v 22. hodine a potom začala klesať. Vo FdUrd/zeocín a FdUrd/kofeín/zeocín kultúrach bol priebeh akumulácie kinázy Wee1 podobný priebehu v kultúre ovplyvnenej len samotným FdUrd, avšak celkové množstvo proteínu Wee1 bolo nižšie (Obr. 34 C).

Tieto zistenia naznačujú, že proteínové hladiny kináz CdkA a CdkB sú stabilizované v prítomnosti zeocínu, zatiaľ čo hladina kinázy Wee1 nie je jeho vplyvom nijak zmenená.

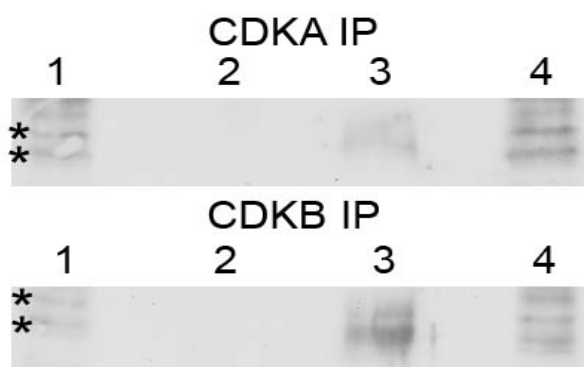
4.4.7. Purifikácia mitotických kináz (CdkA1 a CdkB1) z populácie synchronných buniek *S. quadricauda* ovplyvnenej prítomnosťou 2 mM kofeínu a 10 µg/ml zeocínu bez resp. v kombinácii s 25 µg/ml FdUrd a testovanie ich kinázovej aktivity

V nasledujúcich experimentoch bola sledovaná kinázová aktivita kináz CdkA1 a CdkB1 po ovplyvnení buniek jednotlivými činidlami a tiež pri ich spolupôsobení. Kinázy boli získané purifikáciou pomocou špecifických protilátok a následne bola testovaná ich aktivita pomocou histónu H1 (CdkB1 aktivita), ktorý slúžil ako ich substrát.

Obe kinázy boli izolované z populácií buniek ovplyvnených na začiatku bunkového cyklu pridaním činidiel do živného média.

4.4.7.1. Purifikácia kináz CdkA1 a CdkB1 z celkového mitotického proteínového extraktu

Pre sledovanie aktivity mitotických kináz CdkA1 a CdkB1 bolo potrebné izolovať ich z celkového mitotického proteínového extraktu. Na to bola použitá metóda imunoprecipitácie pomocou špecifických protilátok anti-CDKA1 a anti-CDKB1, vytvorených proti proteínom CdkA a CdkB z *C. reinhardtii*. Pravdepodobne v dôsledku podobností v štruktúre týchto

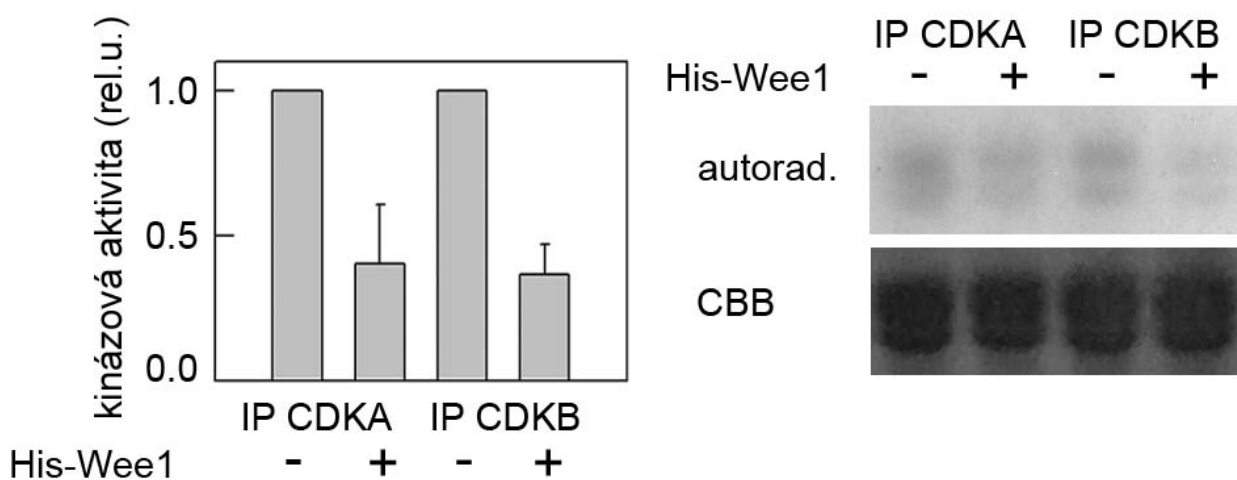


Obr. 35: Špecifita imunoprecipitácie CdkA1 a CdkB1 kináz z celkového mitotického proteínového extraktu buniek *Scenedesmus quadricauda*. Proteíny boli imunoprecipitované pomocou protilátok a detekované sekundárnou protilátkou s peroxidázovou aktivitou. Stĺpec 1 – celkový mitotický proteínový extrakt, stĺpec 2 – imunoprecipitát z 50 µg celkového extraktu, stĺpec 3 – imunoprecipitát z 250 µg celkového extraktu, stĺpec 4 – neviazané proteíny po imunoprecipitácii. Hviezdičky označujú špecifické reakcie s proteínmi o veľkosti 28 a 34 kDa.

kináz a faktu, že protilátky pochádzali z príbuzného organizmu, riasy *C. reinhardtii*, mohlo dojsť k zníženiu ich špecificity, čím každá protilátka bola schopná vyväzovať obe kinázy z mitotického extraktu. Vyviazanie kináz z mitotického proteínového extraktu nebolo úplne efektívne, pretože časť týchto kináz zostala medzi ostatnými nenaviazanými proteínmi po imunoprecipitácii (Obr. 35).

4.4.7.2. Kinázová aktivita kináz CdkA1 a CdkB1 v synchronizovanej populácii buniek *S. quadricauda* detekovaná nepriamou metódou

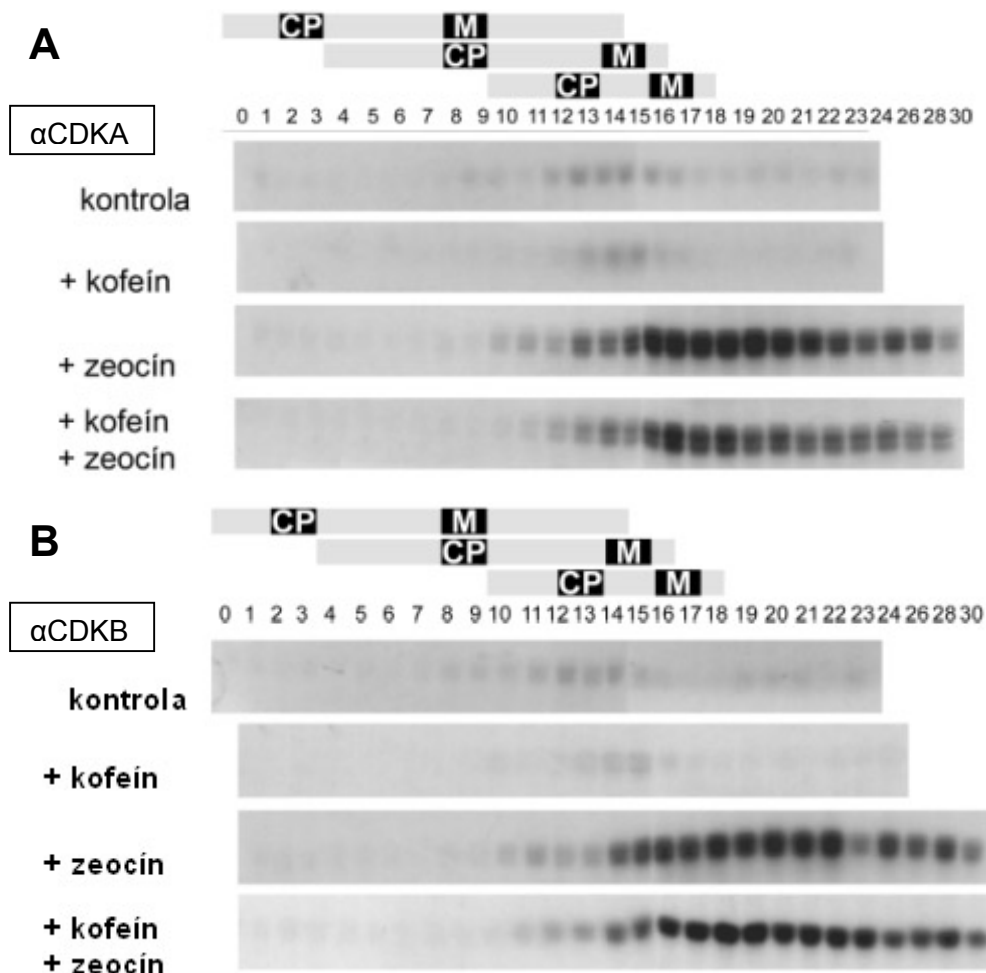
Nepriama kinázová esej bola robená pre overenie, či sa kinázová aktivita proteínov CdkA a CdkB zmení po ich fosforylácii kinázou Wee1. Kinázové komplexy imunoprecipitované z 250 µg celkového mitotického proteínového extraktu *S. quadricauda* boli inkubované v prítomnosti resp. neprítomnosti 250 ng purifikovanej His-tagovanej kinázy Wee1 pochádzajúcej z *C. reinhardtii*. V prítomnosti proteínu His-CrWee1 sa kinázová aktivita oboch imunoprecipitovaných kinázových komplexov znížila o 60 % v porovnaní s neovplyvneným variantom (Obr. 36). Tento výsledok naznačuje, že obe kinázy, CdkA aj CdkB, sú do určitej miery inhibované kinázou Wee1.



Obr. 36: Zmeny v kinázovej aktivite kináz CdkA a CdkB riasy *Scenedesmus quadricauda* v prítomnosti proteínu CrWee1. Bunky boli inkubované s kinázou His-CrWee1 a následne bola detekovaná fosforylácia histónu H1 ako ich substrátu. Graf znázorňuje množstvo fosforylovaného histónu H1. V pravej časti obrázku (hore) je reálny stav kinázovej aktivity detekovaný autorádiograficky a (dole) proteíny nanosené na gél a zafarbené Coomassie brilliant blue (CBB).

4.4.7.3. Kinázová aktivita kináz CdkA1 a CdkB1 v synchronizovanej populácii buniek *S. quadricauda* ovplyvnenej prítomnosťou 2 mM kofeínu a 10 µg/ml zeocínu bez resp. v prítomnosti FdUrd

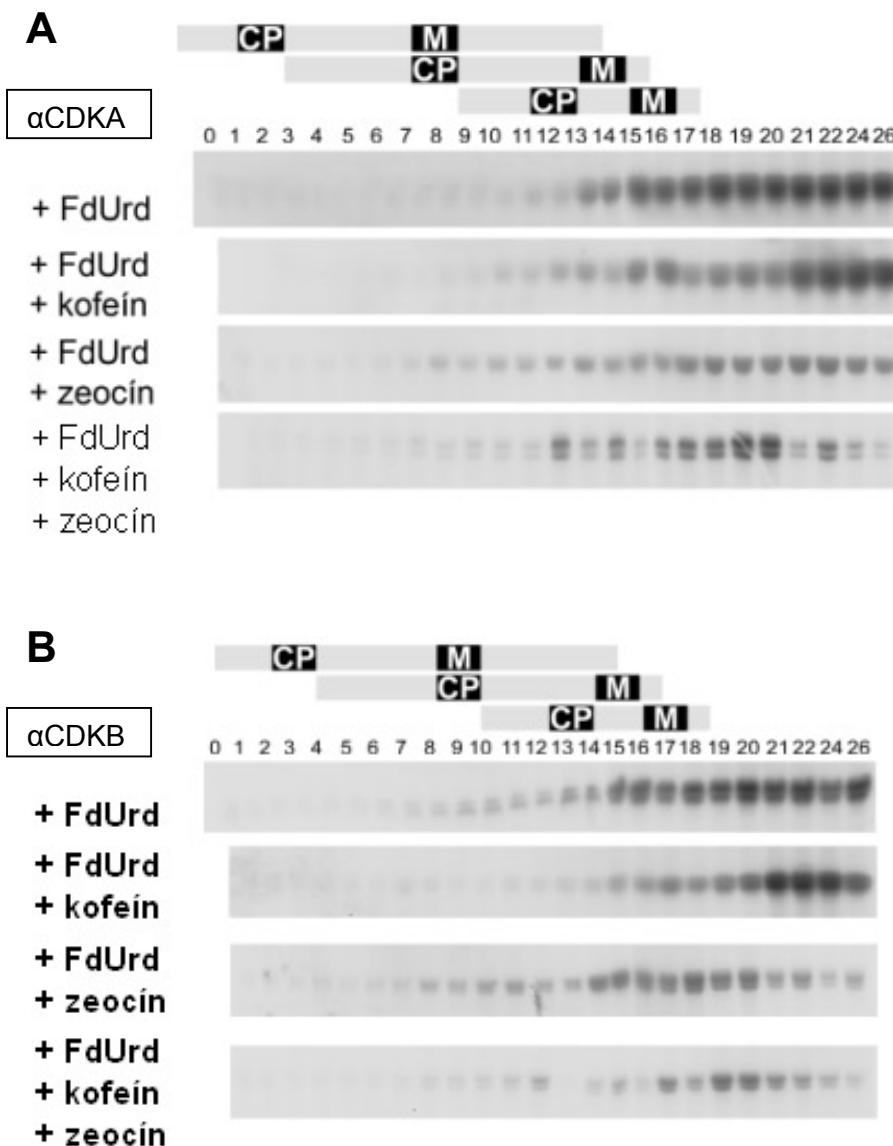
Kinázová aktivita kináz CdkA a CdkB imunoprecipitovaných pomocou špecifických protilátok bola testovaná pomocou kinázovej eseje. Pre imunoprecipitáciu bolo použitých 20 µg celkového proteínového extraktu z buniek odobraných na začiatku bunkového cyklu a maximálne 500 µg celkového proteínového extraktu z buniek odobraných na konci experimentu. Pre každú kinázovú esej bol použitý rovnaký objem celkového proteínového extraktu, ktorý bol pripravený z konštantného počtu buniek. Takto kinázová esej odráža zmeny v kinázovej aktivite na bunku počas experimentu. Oba imunoprecipitáty vykazujú podobné zmeny v kinázovej aktivite, čo je podľa očakávaní, keďže obe protilátky boli schopné viazať CdkA aj CdkB.



Obr. 37: Kinázová aktivita kináz CdkA (A) a CdkB (B) v synchronizovanej populácii buniek *Scenedesmus quadricauda*. Kinázová aktivita bola detekovaná prostredníctvom histónu H1 ako ich substrátu. Bunky rástli v neprítomnosti a v prítomnosti kofeínu, zeocínu a ich kombinácie. Činidlá boli pridávané na začiatku bunkového cyklu. Lišty v horných častiach obrázkov reprezentujú významné fázy bunkového cyklu (CP – commitment point, M - mitóza).

V kontrolnej kultúre bola zaznamenaná maximálna kinázová aktivita proteínu CdkA v 12. – 16. bunkového cyklu (obr 37 A), v prípade CdkB to bolo medzi 12. a 14. hodinou (Obr. 37 B). To koreluje s 2. a 3. jadrovým delením a tiež s delením buniek. Kinázová aktivita v kofeínom ovplyvnenej kultúre bola nižšia v porovnaní s kontrolou, avšak priebeh zmien v kinázovej aktivite bol podobný, a teda tiež spojený s jadrovým delením (Obr. 37 A, B). V zeocínom a kofeínom/zeocínom ovplyvnenej kultúre bola kinázová aktivita oveľa vyššia v porovnaní s predchádzajúcimi dvoma variantami. Začala sa zvyšovať v približne rovnakom čase ako pri kontrole, ale dosiahla oveľa vyššie hodnoty a aj pretrvala na tejto vysokej úrovni niekoľko hodín. Následne začala klesať pred koncom experimentu (Obr. 37 A, B).

Tieto výsledky naznačujú, že aplikáciou zeocínu dôjde v bunkách k výraznému zvýšeniu mitotickej kinázovej aktivity, pričom načasovanie tohto zvýšenia je podobné ako v kontrolnej kultúre. Naopak kofeín tento účinok na bunky nemá.



Obr. 38: Kinázová aktivita CdkA (A) a CdkB (B) kináz v synchronizovanej populácii buniek riasy *Scenedesmus quadricauda*. Kinázová aktivita bola detekovaná pomocou histónu H1 ako ich substrátu. Bunky rástli v prítomnosti samotného FdUrd a v prítomnosti FdUrd s kofeínom, zeocínom alebo v ich kombinácii. Činidlá boli pridávané na začiatku bunkového cyklu. Lišty v horných častiach obrázkov reprezentujú významné fázy bunkového cyklu (CP - commitment point, M - mitóza).

Podobné výsledky boli zaznamenané aj pri kultúrach ovplyvnených FdUrd. Kinázová aktivita začala stúpať v čase, keď u kontrolnej kultúry prebiehalo jadrové delenie a následne pretrvávala na vysokej hladine až do konca experimentu. Pri kultúre ovplyvnenej FdUrd s kofeínom boli zaznamenané dva vrcholy v kinázovej aktivite. Prvé slabšie zvýšenie nastalo v čase jadrového delenia (okolo 15. hodiny) a ďalšie výraznejšie zvýšenie aktivity bolo zaznamenané okolo 21. hodiny a dosiahlo približne rovnakú intenzitu ako pri kultúre ovplyvnenej samotným FdUrd. Naopak, v kultúrach ovplyvnených FdUrd/zeocínom a FdUrd/kofeínom/zeocínom bola kinázová aktivita oveľa nižšia ako v prítomnosti samotného FdUrd alebo zeocínu a tiež kofeínu/zeocínu. Čas kedy začala stúpať kinázová aktivita bol však podobný ostatným kultúram (Obr. 38 A, B).

Na základe výsledkov možno konštatovať, že aplikácia zeocínu a FdUrd spôsobí v bunkách zvýšenie mitotickej kinázovej aktivity, avšak načasovanie kedy dôjde k tomuto zvýšeniu zostáva rovnaké ako v kontrolnej kultúre.

5. DISKUSIA

Väčšina modelových organizmov pre štúdium bunkového cyklu sa vyznačuje klasickým bunkovým cyklom typu C1, pri ktorom sa materská bunka rozdelí na dve dcérske bunky. Pre naše modelové organizmy, zelené jednobunkové riasy *C. reinhardtii* a *S. quadricauda*, je však charakteristický modifikovaný bunkový cyklus označovaný ako typ Cn (tzv. násobné delenie) (Šetlík et al., 1972; Lien a Knutsen, 1979; Zachleder, 1983). V priebehu tohto cyklu prebehne bezprostredne za sebou niekoľko sérií reprodukčných procesov (replikácia DNA a mitóza), ktoré vedú ku vzniku 2ⁿ dcérskych buniek z jednej materskej. Počas reprodukčných procesov zostávajú dcérske bunky v spoločnom obale a k ich uvoľneniu dochádza až po úplnom dokončení tohto bunkového cyklu.

Vo všeobecnosti je priebeh bunkového cyklu regulovaný veľkým množstvom proteínov. Hlavnými regulátormi sú proteíny označované ako cyklín-dependentné kinázy (CDK) a sú aktívne len vo väzbe s príslušnými cyklínovými partnermi (Evans et al., 1983; Pines, 1991). U vyšších eukaryotov je pre každú fázu bunkového cyklu charakteristický určitý komplex CDK s cyklínom (Pines, 1993).

V prípade *C. reinhardtii* boli identifikované homológy takmer všetkých typov rastlinných CDK a tiež niekoľko nových členov rodiny CDK (Bisova et al., 2005). Významnými regulátormi reprodukčných procesov *C. reinhardtii* sú kinázy z rodiny CdkA a CdkB a taktiež kináza Wee1, ktorá prostredníctvom fosforylácie negatívne reguluje komplexy CDK-cyklín. Naopak, aktivačnú úlohu v bunkovom cykle má duálne-spezifická fosfatáza Cdc25, ktorá však u *C. reinhardtii* nebola identifikovaná. Túto úlohu u nej pravdepodobne zastávajú 3 proteíny označované ako RDP1-3 (Bisova et al., 2005), ktoré vykazujú homológiu s Cdc25.

U riasy *S. quadricauda* existuje veľmi málo informácií o počte a zastúpení regulačných proteínov bunkového cyklu. Je však vysoko pravdepodobné, že rovnako ako u všetkých rastlín a tiež u príbuznej zelenej riasy *C. reinhardtii*, aj u *S. quadricauda* sú prítomné hlavné regulátory bunkového cyklu - CdkA aj CdkB a tiež homológ kinázy Wee1.

Rastlinná kináza Wee1 zohráva okrem regulácie mitózy dôležitú úlohu aj v kontrole DNA checkpointu u rastlín vystavených stresovým podmienkam (Boudolf et al., 2006). Je jedným z proteínov regulovaných ATM/ATR signálnou dráhou (De Schutter et al., 2007), ktorá je zodpovedná za odpoveď na poškodenie DNA (DDRP). Táto dráha zostavená zo senzorov, prenášačov a efektorových proteínov je zodpovedná za detekciu a reparáciu poškodenej DNA rôznymi faktormi zahŕňajúcimi ionizačné žiarenie, UV žiarenie, rôzne

chemikálie a bunkové metabolity. Pre bunky je životne dôležité kontrolovať a prípadne opravovať poškodenia DNA z hľadiska zachovania ich integrity.

Jedným z najlepšie charakterizovaných poškodení DNA je dvojreťazcový zlom, ktorý u cicavcov a kvasiniek aktivuje kinázu ATM (Zhou a Elledge, 2000; Bartek et al., 2004; Kastan a Bartek, 2004; Harper a Elledge, 2007). Zastavenie postupu replikačnej vidlice, resp. ďalšie situácie vedúce k tvorbe jednoreťazcového DNA zlomu aktivujú jej príbuznú kinázu ATR (Hurley a Bunz, 2007; Rhind, 2009; Shiotani a Zou, 2009). V cicavčích bunkách kinázy ATM a ATR blokujú vstup do mitózy aktiváciou kináz Chk1 a Chk2 a následnou fosforyláciou Cdc25, čím sa zabráni aktivácii CDK (Harper a Elledge, 2007). Takto dochádza k prepojeniu bunkového cyklu s DDRP, čo sa deje v tzv. kontrolnom bode pre poškodenie DNA (DDC).

V tejto práci sme sa zamerali na štúdium odpovede rias *C. reinhardtii* a *S. quadricauda* na poškodenie DNA, konkrétne na úlohu regulačných proteínov bunkového cyklu, CdkA, CdkB1 a kinázy Wee1, v tejto odpovedi.

5.1. Výber činidiel

Testovali sme niekoľko inhibítorov bunkového delenia (FdUrd, kolchicín a kofeín), ktoré by boli vhodné pre skúmanie bunkového cyklu rias *C. reinhardtii* a *S. quadricauda*, konkrétne vstupu do mitózy a jeho prepojenie s opravou poškodenej DNA. V prípade FdUrd nebolo delenie buniek *C. reinhardtii* v porovnaní s kontrolou nijak výrazne ovplyvnené (Obr. 6). To znamená, že na rozdiel od overeného účinku FdUrd v koncentrácii 25 µg/ml na bunky riasy *S. quadricauda*, u ktorých inhibuje replikáciu a následne aj delenie buniek (Zachleder, 1994; Vítová et al., 2008), tento účinok na bunky *C. reinhardtii* potvrdený nebol. Účinok FdUrd na bunky *C. reinhardtii* bol zaznamenaný už v roku 1977, avšak v tomto prípade bolo dokázané, že FdUrd inhibuje replikáciu DNA v chloroplastoch ale nie v jadre (Wurtz et al., 1977). Preto sme v ďalších pokusoch aplikovali 25 µg/ml koncentráciu FdUrd len na kultúru *S. quadricauda*. Aplikácia kolchicínu viedla u *C. reinhardtii* k úplnému zastaveniu bunkového delenia (Obr. 7) a ani jeho odmytie po troch hodinách pôsobenia nevedlo k požadovanému obnoveniu delenia, kultúra sa delila len na 60 – 70 % (Obr. 9). Naopak aplikácia kofeínu, v prípade dvoch nižších koncentrácií (1 mM a 2 mM), urýchlila delenie buniek v porovnaní s kontrolou (Obr. 11). Najvyššia testovaná koncentrácia kofeínu (4 mM) nemala vplyv na samotný priebeh bunkového delenia (Obr. 11), avšak viedla k výskytu neštandardných bunkových štruktúr, ako napr. k výrazným rozdielom vo veľkosti dcérskych buniek a k deleniu materskej bunky na nezvyčajný počet dcérskych buniek, ktorý

sa vymyká zásade delenia 2ⁿ (Obr. 12 D). Toto bolo pravdepodobne spôsobené inhibičným účinkom tejto koncentrácie kofeínu na takmer všetky bunkové komponenty. Vzhľadom na tieto výsledky sme dospeli k záveru, že 4 mM kofeín nie je vhodný pre ďalšie pokusy. O kofeíne je známe, že v rôznych organizmoch pôsobí synergicky s mnohými činidlami vedúcimi k poškodeniu DNA (Lau a Pardee, 1982), čo sme využili v ďalších pokusoch.

Ako činidlo spôsobujúce poškodenie DNA sme vybrali zeocín. Patrí do rodiny bleomycínových antibiotík a vedie k poškodeniu DNA štiepením oboch reťazcov tejto molekuly (Ehrenfeld et al., 1987; Gatignol et al., 1988; Kostrub et al., 1997). Jeho aplikácia na populáciu buniek *C. reinhardtii* viedla k okamžitému a výraznému obmedzeniu bunkového delenia. Pri koncentrácii 5 µg/ml zeocínu sa rozdelilo len 8 % buniek z celkovej populácie, 20 µg/ml zeocínu inhibovalo bunkové delenie úplne (Obr. 13). V prípade *S. quadricauda* sme účinok zeocínu testovali len pomocou spot testu (viď nižšie), kde sme vybrali 10 µg/ml koncentráciu zeocínu. U zelenej riasy *C. reinhardtii* je zeocín účinným mutagénom spôsobujúcim dvojreťazcové zlomy DNA. Jeho účinok je závislý od koncentrácie, so stúpajúcou koncentráciou zeocínu stúpa počet dvojreťazcových zlomov v molekule DNA (Chankova et al., 2007). Doteraz nebolo popísané jeho pôsobenie na bunky *S. quadricauda*, ale predpokladali sme, že bude podobné ako u príbuznej riasy *C. reinhardtii*.

Vplyv kofeínu a zeocínu na rast a prežívanie buniek u oboch modelových organizmov sme overili aj pomocou spot testu (Obr. 14, 26), pričom sme skúšali rôzne koncentrácie jednotlivých činidiel a zároveň sme sa snažili nájsť vhodnú kombináciu ich koncentrácií. Vo všeobecnosti stúpajúca koncentrácia kofeínu mala na prežívanie buniek len malý vplyv a ani v prípade 1 mM ani 2 mM koncentrácie nebola pozorovaná žiadna výrazná zmena v prežívaní buniek. Naopak, zeocín výrazne ovplyvňoval prežívanie buniek, v závislosti od jeho koncentrácie. So zvyšujúcou sa koncentráciou zeocínu sa znižovalo prežívanie buniek *C. reinhardtii* pravdepodobne v dôsledku poškodenia DNA. V prípade *S. quadricauda* bol účinok zeocínu výraznejší, už 5 µg/ml koncentrácia zeocínu inhibovala rast podobne ako 10 µg/ml zeocínu u riasy *C. reinhardtii*. Účinok kombinácie kofeínu a zeocínu bol odlišný u testovaných organizmov. U riasy *C. reinhardtii* mala kombinácia činidiel oveľa vážnejšie dôsledky na prežívanie buniek v porovnaní s účinkom jednotlivých činidiel. Ani 2 mM kofeín ani 5 µg/ml zeocín nespôsobili samostatne takú výraznú inhibíciu ako v prípade ich spolupôsobenia (Obr. 14). Predpokladáme, že je to spôsobené synergickým účinkom kofeínu pri jeho spolupôsobení so zeocínom, čo vedie k záveru, že kofeín zvyšuje citlivosť buniek *C. reinhardtii* na poškodenie DNA spôsobené zeocínom. **Pre ďalšie pokusy s *C. reinhardtii* sme sa rozhodli použiť 2 mM kofeín a 5 µg/ml zeocín.** Naopak, kombinácia kofeínu

a zeocínu zvýšila prežívanie buniek *S. quadricauda* v porovnaní s účinkom samotného zeocínu. Najvýraznejší efekt sme zaznamenali pri kombinácii 10 µg/ml zeocínu s 1 mM alebo 2 mM kofeínom (Obr. 26). V tomto prípade by sa dalo uvažovať o protektívnom účinku kofeínu voči poškodeniu DNA. Pre ďalšie experimenty sme preto vybrali **2 mM** koncentráciu kofeínu a **10 µg/ml** koncentráciu zeocínu.

5.2. Chlamydomonas reinhardtii

5.2.1. Rast a priebeh bunkového cyklu *C. reinhardtii*

Okrem prežívania buniek nás tiež zaujímalo ako bude ovplyvnený rast synchronných populácií buniek *C. reinhardtii* po pridaní vybraných koncentrácií činidiel a to buď samostatne alebo v kombinácii. V prípade *C. reinhardtii* sme činidlá (kofeín, zeocín) pridávali v 8. hodine bunkového cyklu, teda v čase kedy bunky mali za sebou prechod 1. CP a boli pred začiatkom S/M fázy. Ani v jednom z variantov nedošlo ku zmene v náraste veľkosti buniek, bola podobná vo všetkých kultúrach (Obr. 15), avšak aplikácia zeocínu, či už samostatne alebo v kombinácii s kofeínom spôsobila, že sa tieto kultúry nerozdelili na dcérske bunky v porovnaní s kontrolnou, resp. s kofeínom ovplyvnenou kultúrou. **Samotný rast buniek *C. reinhardtii* teda nie je ovplyvnený prítomnosťou kofeínu ani zeocínu.**

Určité zmeny sme však zaznamenali v priebehu bunkového cyklu u tohto modelového organizmu. Bunky *C. reinhardtii* dosiahnu počas svetelnej fázy niekoľko CP, čo im následne umožní rozdeliť sa na príslušný počet dcérskych buniek (John, 1984, 1987). Pri striedaní svetlej a tmavej periódy v pomere 13h/11h sa materské bunky *C. reinhardtii* bežne rozdelia na 8 dcérskych buniek, čo znamená, že prešli cez 3 CP. Kontrolná aj kofeínom ovplyvnená kultúra vykazovala túto štandardnú situáciu s tým rozdielom, že v prítomnosti kofeínu sa bunkový cyklus urýchlil asi o 1 hodinu v porovnaní s kontrolou (Obr. 16). Naopak, po aplikácii zeocínu sa bunkový cyklus zastavil úplne, čo znamená, že materské bunky neboli schopné dosiahnuť ďalšie CP okrem tých, ktoré už dosiahli pred 8. hodinou a nedošlo ani k deleniu na dcérske bunky. Len veľmi malé percento (7 %) buniek tejto populácie dokázalo uniknúť DDC a deliť sa, prevažná časť populácie zostala zablokovaná v priebehu bunkového cyklu v G2 fáze (Obr. 16 C). Podobná situácia nastala aj v prípade kombinácie kofeínu so zeocínom, kde bunky dosiahli 1. resp. 2. CP ešte pred pridaním činidiel. Avšak na rozdiel od kultúry ovplyvnenej len zeocínom, došlo v tomto prípade aj k deleniu protoplastov (Obr. 16 D). **V bunkách *C. reinhardtii* nedošlo vplyvom kofeínu k zastaveniu bunkového cyklu, napriek tomu, že mali DNA poškodenú prítomnosťou zeocínu. Začalo delenie**

protoplastov avšak bez jadrového delenia, čo viedlo ku vzniku aberantných, takmer rozdelených, buniek s jedným jadrom (Obr. 18 M, N, O).

Tento predpoklad potvrdili aj mikroskopické fotografie protoplastov, jadier a tiež rezov materskou bunkou *C. reinhardtii* (Obr. 18). V kontrole a v kultúre ovplyvnenej kofeínom boli zaznamenané materské bunky naryhované na 4 – 8 dcérskych buniek, čomu zodpovedal aj počet jadier v jednotlivých protoplastoch, resp. v ryhujúcich sa materských bunkách. Fotografie dokazujú, že bunky ovplyvnené zeocínom sa nedelia vôbec, zostávajú jednojadrové, zatiaľ čo v prítomnosti kofeínu so zeocínom sa časť populácie snaží pokračovať v delení protoplastov aj napriek tomu, že delenie jadra neprebehlo. Preto sme v tejto kultúre zaznamenali ako nedeliace sa jednojadrové bunky, tak aj deliace sa bunky, ktoré však tiež zostávali jednojadrové a tvorili rôzne aberantné štruktúry. Tieto výsledky navádzajú k predpokladu, že pod vplyvom kofeínu, na rozdiel od pôsobenia samotného zeocínu, nie sú procesy vedúce k cytokinéze inhibované, a to aj napriek tomu, že jadrové delenie je zablokované aj v týchto bunkách. Prítomnosť kofeínu teda môže viesť k prekonaniu DDC. U cicavcov kofeín vedie k inhibícii kináz ATM a ATR, čo má za následok prechod bunky cez DDC aj napriek poškodenej DNA (Blasina et al., 1999; Cortez, 2003). Zdá sa, že **v bunkovom cykle *C. reinhardtii* dokáže kofeín prekonať DDC.**

Za štandardných podmienok vegetatívneho delenia *C. reinhardtii* prebieha v bunkách séria replikácií DNA, z ktorých každá je nasledovaná jadrovým delením (Coleman, 1982). Počas experimentov sme zistili, že v kontrolnej kultúre a v kultúre ovplyvnenej kofeínom začína replikácia v 11. hodine bunkového cyklu, pričom hladina DNA stúpne asi 8 krát (Obr. 17). Približne hodinu od začiatku replikácie nasleduje u nich delenie jadra a bunky. U kultúr ovplyvnených zeocínom a kofeín/zeocínom došlo ku 4-násobnému zvýšeniu množstva DNA a v oboch variantoch bola replikácia DNA oneskorená v porovnaní s kontrolnou a kofeínom ovplyvnenou kultúrou. Pridanie zeocínu má za následok obmedzenie resp. pozastavenie replikácie DNA, čo naznačuje, že prítomnosť zeocínu aktivovala kontrolný bod pre rozpoznanie poškodenej DNA počas replikácie (DRC). To viedlo k oneskoreniu replikácie DNA podobne ako u cicavcov (Bartek et al., 2004). Pri spolupôsobení zeocínu a kofeínu bola replikácia DNA menej oneskorená, čo naznačuje, že kofeín dokáže aspoň čiastočne prekonať DRC a urýchliť vstup do G2 fázy. Toto zistenie je v rozpore s efektom kofeínu u vyšších rastlín, kde kofeín je schopný prekonať DDC, ale nie DRC (Amino a Nagata, 1996; Pelayo et al., 2001; Weingartner et al., 2003). **Na rozdiel od DDC, DRC je len čiastočne ovplyvnený kofeínom, čo je v rozpore so situáciou u vyšších rastlín.**

5.2.2. Regulácia bunkového cyklu *C. reinhardtii*

Mitóza je u eukaryotov spúšťaná komplexom mitotickej kinázy s cyklínom B, tzv. maturačným promočným faktorom (MPF) (Coleman a Dunphy, 1994; Morgan, 1997), ktorého správna aktivita je závislá na inhibičnej fosforylácii zvyškov Thr14 a Tyr15 prostredníctvom kináz Wee1/Myt1 (Featherstone a Russell, 1991; Parker a Piwnica-Worms, 1992; McGowan a Russell, 1995). Dôležitú úlohu v tomto procese zohráva aj fosfatáza Cdc25, ktorá túto inhibičnú fosforyláciu odstraňuje (Dunphy a Kumagai, 1991; Gautier et al., 1991). U niektorých organizmov je inhibičná fosforylácia regulovaná aj mechanizmom, ktorý zodpovedá za rozpoznanie poškodenej DNA a je udržiavaná v prípade nekompletne zreplikovanej, resp. poškodenej DNA (Morgan, 1997; O'Connell et al., 2000).

O dvoch základných regulátoroch mitózy (CdkB1 a Wee1) u *C. reinhardtii* je známe, že sú exprimované počas S/M fázy bunkového cyklu (Bisova et al., 2005). Nás zaujímala expresia týchto dvoch proteínov v odpovedi na poškodenie DNA. V neovplyvnenej kultúre bol proteín CdkB1 prítomný od 4. hodiny bunkového cyklu (Obr. 22 A), čo predstavuje čas 1. CP, pričom jeho transkripcia vykazovala dva hlavné vrcholy, v čase 1. CP a v S/M fáze (Obr. 19). Toto je v súlade so známou bimodálnou transkripciou zaznamenanou u tohto modelového organizmu (Bisova et al., 2005; Fang et al., 2006). Zaujímavé je, že tento proteín nebol aktívny až do 11. hodiny bunkového cyklu (Obr. 25 B), kedy jeho kinázová aktivita začala stúpať. Toto koreluje so špecifickou inhibičnou tyrozínovou fosforyláciou CDK (Obr. 25 C), ktorá začala asi v čase CP a udržala sa do 12. hodiny bunkového cyklu. Nie je úplne jasné, či CdkB1 tvorí hneď od začiatku komplex s cyklínovým partnerom, ale je to veľmi pravdepodobné, keďže obaja potenciálni cyklínoví partneri (Cyc A1 a Cyc B1) vykazujú rovnaký priebeh transkripcie ako CdkB1 (Bisova et al., 2005). Túto teóriu podporuje aj zistenie, že kináza Wee1 vykonáva inhibičnú fosforyláciu na komplexoch CDK/cyklín (Watanabe et al., 1995). Okrem kinázovej aktivity imunoprecipitovanej CdkB1 sme sledovali aj aktivitu mitotických kináz viazaných na proteín CrCKS1, pričom sme zistili, že aktivita kináz purifikovaných oboma spôsobmi vykazovala podobný priebeh (Obr. 25 A, B), s tým rozdielom, že aktivita CdkB1 bola viac špecifická pre S/M fázu a chýbala v počiatkových fázach bunkového cyklu. V náväznosti na tieto výsledky sme sa snažili identifikovať, aké kinázy sa viažu na proteín CrCKS1 a tým určiť, aký typ kináz sa zúčastňuje regulácie v určitých fázach bunkového cyklu. Použili sme protilátku anti-CDKA, ktorá dávala špecifickú reakciu s proteínom veľkosti okolo 36 kDa. Rovnakú reakciu sme zaznamenali aj pri použití protilátky anti-PSTAIRE, ktorá rozpoznáva cyklín väzobný motív PSTAIRE na

kináze CdkA, na základe čoho predpokladáme, že ide o túto kinázu. Kináza CdkA je v malom množstve prítomná v celkovom proteínovom extrakte a tiež medzi nenaviazanými proteínmi po CrCKS1 purifikácii, avšak najväčšie množstvo tohoto proteínu sme zaznamenali v eluáte (Obr. 23 A). Tu však protilátka anti-CDKA špecificky reaguje s proteínom s trochu väčšou veľkosťou, pričom predpokladáme, že stále ide o CdkA, ale nejakú jej fosforylovanú formu. Tento predpoklad podporuje aj fakt, že proteín CrCKS1 sa viaže s CDK-cyklínovými komplexmi, v ktorých je už CDK čiastočne aktivovaná fosforyláciou, čo následne uľahčuje ich interakciu s fosfoproteínmi, čím sa ďalej zvyšuje ich kinázová aktivita (Pines, 1995). V snahe zistiť, či je na proteín CrCKS1 naviazaná aj kináza CdkB1, sme neuspeli. Táto kináza bola prítomná medzi nenaviazanými proteínmi po CrCKS1 purifikácii, v eluáte ju nebolo možné detekovať. Tieto výsledky naznačujú, že na rozdiel od *Arabidopsis* (De Veylder et al., 1997; De Veylder et al., 2001) a morskej riasy *Ostreococcus tauri* (Stals et al., 2000), u ktorých bolo dokázané, že proteín AtCKS1 sa viaže s kinázou CdkA aj s CdkB, proteín CrCKS1 sa u *C. reinhardtii* viaže len s kinázou CdkA. Zaujímavé je, že aktivita kinázy vyviazanej pomocou proteínu CrCKS1 bola vyššia v porovnaní s aktivitou kináz imunoprecipitovaných anti-CDKB1 (Obr. 25 A, B). To bolo pravdepodobne spôsobené tým, že proteín CKS1 sa špecificky viaže s aktívnymi CDK/cyklínovými komplexmi (Egan a Solomon, 1998) a ďalej zvyšuje ich kinázovú aktivitu (Pines, 1995). Vzhľadom na fakt, že aktivita kinázy naviazanej na proteín CrCKS1 (Obr. 25 A) je vysoká od začiatku bunkového cyklu v porovnaní s aktivitou proteínu purifikovaného pomocou protilátky anti-CDKB (Obr. 25 B) predpokladáme, že **kináza CdkA by mohla zohrávať úlohu nie len v regulácii mitózy, ale aj v skorých fázach bunkového cyklu pri regulácii CP.** To je v čase, kedy špecifická kinázová aktivita CdkB1 nebola ešte detekovaná (Obr. 25 B), ale zato bola v bunkách *C. reinhardtii* identifikovaná aktivita podobná CDK (John et al., 1989; Zachleder et al., 1997; Oldenhof et al., 2004).

Zeocín je antibiotikum z bleomycínovej rodiny, ktoré viaže DNA a spôsobuje v nej dvoj-reťazcové zlomy (Ehrenfeld et al., 1987; Gatignol et al., 1988; Kostrub et al., 1997; Chankova et al., 2007). Podobne ako Chankova v roku 2007 (Chankova et al., 2007), aj my sme zistili, že stúpajúca koncentrácia zeocínu vážne ovplyvňuje prežívanie buniek (Obr. 14) a blokuje jadrové a bunkové delenie (Obr. 16 C, 18 G, H, I). Taktiež po aplikácii zeocínu došlo okamžite k indukcii transkripcie *CDKB1* aj *WEE1* (Obr. 19, 20), čo naznačuje úlohu oboch proteínov v reakcii na poškodenie DNA. V našich pokusoch sme zaznamenali, že v zeocínom ovplyvnenej kultúre transkripcia *CDKB1* stúpala podobne ako v kontrole (Obr. 19), bola nasledovaná zvýšenou proteínovou hladinou (Obr. 22 A), avšak bez zvýšenia

kinázovej aktivity (Obr. 25 B). Jazayeri a kol zistili, že pre opravu dvoj-reťazcových zlomov DNA v ľudských bunkách je špecificky vyžadovaná kinázová aktivita CDK (Jazayeri et al., 2006). To by vysvetľovalo, prečo je zvýšená expresia *CDKBI*, aj keď kináza nie je aktívna. Podobná situácia nastala aj v prípade kinázy Wee1. Zvýšená hladina transkripcie (Obr. 20) viedla k zvýšeniu proteínovej hladiny (Obr. 22 B), ale zatiaľ čo množstvo primárneho transkriptu vzrástlo 2-3 krát v porovnaní s najvyššou hladinou v kontrolnej kultúre, množstvo proteínu vzrástlo len veľmi mierne. Napriek tomu, že proteínová hladina kinázy Wee1 sa takmer nezmenila v porovnaní s kontrolou, jej kinázová aktivita meraná množstvom fosforylovaných tyrozínov na CDK vzrástla a udržala sa vysoko aktívna dlhšiu dobu v porovnaní s kontrolou (Obr. 25 C). Predpokladáme, že zvýšená transkripcia tohto proteínu zabezpečuje neustálu produkciu aktívneho proteínu s krátkym polčasom rozpadu, čím dopĺňa jeho hladinu. Úloha kinázy Wee1 v DDRP bola zistená u *Arabidopsis*, kde je po poškodení DNA táto kináza transkripčne aktivovaná ATR-závislou signálnou dráhou (De Schutter et al., 2007). Podobne u *S. pombe* a *Xenopus laevis* bolo zistené, že po poškodení DNA alebo nekompletnej replikácii je kináza Wee1 stabilizovaná kinázami ATM/ATR, a to prostredníctvom fosforylácie kinázy Chk1 (Michael a Newport, 1998; O'Connell et al., 2000; Raleigh a O'Connell, 2000; Lee et al., 2001; Stanford a Ruderman, 2005). Naopak, kinázy ATM/ATR dokážu rovnakým mechanizmom inhibovať aj aktivitu fosfatázy Cdc25 (Zhao et al., 2002; Boutros et al., 2006), čo vedie k inaktivácii mitotických kináz. To, že doteraz nebol u rastlín identifikovaný jasný homológ kinázy Chk1 a konzervovaná indukcia transkripcie *WEE1* u *Arabidopsis* a *C. reinhardtii* naznačujú, že u nich existuje alternatívny spôsob reakcie na poškodenie DNA. Zaujímavý je dôkaz, že fosforylácia CdkA sprostredkovaná kinázou Wee1 nezohráva úlohu v bunkovej proliferácii, raste orgánov, ani v odpovedi na poškodenie DNA u *Arabidopsis* (Dissmeyer et al., 2009). Taktiež fosfatáza Cdc25 nezohráva u tejto rastliny úlohu bunkového regulátora, ale vyznačuje sa arzenát-reduktázovou aktivitou a je zapojená do metabolizmu arzenátu (Dissmeyer et al., 2009). Toto poukazuje na rastlinne špecifický mechanizmus priebehu bunkového cyklu v neprítomnosti fosfatázy Cdc25. Existuje predpoklad, že u rastlín, v ktorých došlo ku strate génu *CDC25*, je za reguláciu prechodu z G2 fázy do mitózy zodpovedný B typ rastlinnej CDK (Boudolf et al., 2006; Dissmeyer et al., 2009). S prihliadnutím na naše výsledky môžeme polemizovať o tom, že **CdkB by mohla byť cieľovým proteínom kinázy Wee1 pri poškodení DNA alebo v priebehu mitózy**. Jedným z dôkazov v prospech tejto teórie je, že v *in vitro* podmienkach sú komplexy CdkA a CdkB s mitotickým cyklínom B inhibované kinázou Wee1. V menšej miere sú inhibované aj komplexy CdkA a CdkB s cyklínom A (Obr. 24). V *in vivo*

podmienkach sme v bunkách ovplyvnených zeocínom zaznamenali prepojenie aktivácie CdkB1 (Obr. 25 B) s poklesom tyrozínovej fosforylácie (Obr. 25 C). Je dokázané, že u morskej riasy *O. tauri* je CdkB fosforylovaná a tým inhibovaná v reakcii na zastavenie replikácie DNA, pričom jej proteínová hladina zostáva na rozdiel od vyšších rastlín konštantná. Taktiež po aktivácii DRC prebieha regulácia kinázy CdkB prostredníctvom tyrozínovej fosforylácie a nie na úrovni proteosyntézy. Zaujímavé je, že táto kontinuálna proteosyntéza CdkB a následná akumulácia komplexov CdkB/cycB môže do určitej miery prekonať jej inaktiváciu spôsobenú prostredníctvom tyrozínovej fosforylácie, čo vedie k celkovému zvýšeniu aktivity CdkB a môže slúžiť ako adaptácia na DDC (Corellou et al., 2005).

Po určitej dobe trvania DDC dochádza v bunkách k tzv. „adaptácii na checkpoint“, a to i v prípade, že bunky nie sú schopné opraviť poškodenú DNA. To znamená, že bunky pokračujú v bunkovom cykle a delia sa aj v prítomnosti poškodenej DNA. K tejto adaptácii dochádza aj napriek pretrvávajúcemu signálu pre zastavenie bunkového cyklu po poškodení DNA (Yoo et al., 2004). V našich experimentoch sa bunky adaptovali asi po 2 hodinách od pridania zeocínu, čo sa prejavilo ich uvoľnením zo zablokovaného bunkového cyklu a aktiváciou mitotických CDK (Obr. 25 A, B) Táto aktivácia je spojená s poklesom tyrozínovej fosforylácie a degradáciou kinázy Wee1 (Obr. 25 C, 22 B). U vyšších eukaryot je adaptácia na DDC spojená s degradáciou Wee1 (Bartek a Lukas, 2007) a zdá sa, že tento mechanizmus je konzervovaný aj u *C. reinhardtii*. Aktivita CDK po tejto adaptácii bola relatívne vysoká a udržiavala sa až pokým bunky neprešli delením jadier alebo protoplastov (Obr. 16, 25, porovnať). Aktivácia mitotických kináz je spojená so znásobením DNA (Obr. 17), čo vedie v kultúrach so zeocínom k asi 4-násobnému nárastu množstva DNA na bunku. Toto je zaujímavý fenomén, pretože v neovplyvnených bunkách *C. reinhardtii* je replikácia DNA bezprostredne nasledovaná delením jadra. Zdá sa teda, že bunky adaptované na poškodenie DNA tolerujú endoreduplikáciu. Táto je pravdepodobne spojená s vysokou mitotickou kinázovou aktivitou, ktorá je v rozpore s inhibičnou úlohou kinázy CdkB v endoreduplikácii vyšších rastlín (Boudolf et al., 2004; John a Qi, 2008). Replikácia DNA bola oddialená v kultúrach ovplyvnených zeocínom aj kofeín/zeocínom, čo naznačuje, že poškodenie DNA spôsobilo dočasné zastavenie replikácie nezávisle na prítomnosti kofeínu. Avšak obnovenie replikácie prebehlo skôr v kultúre, kde bol prítomný aj kofeín. Tieto výsledky vedú k hypotéze, že u *C. reinhardtii* existujú dva samostatné mechanizmy odpovede na poškodenie DNA, ktoré sú rôzne citlivé k prítomnosti kofeínu - 1; na kofeín čiastočne

citlivé oddialenie replikácie DNA a 2; odpoveď citlivá na kofeín, ktorá vedie k aberantnému bunkovému deleniu.

O kofeíne je známe, že ruší prepojenie mitózy s kontrolou správnej replikácie DNA (Schlegel a Pardee, 1986) a urýchľuje priebeh mitózy (Kumagai et al., 1998a; Kumagai et al., 1998b; Moser et al., 2000) prostredníctvom špecifickej inhibície kináz ATM/ATR (Sarkaria et al., 1999; Moser et al., 2000; Zhou et al., 2000). Takto prevažuje nad DRC a tiež DDC u rôznych organizmov (Schlegel a Pardee, 1986; Dasso a Newport, 1990; Kumagai a Dunphy, 1995; Poon et al., 1997), avšak u vyšších rastlín má vplyv len na DDC (Pelayo et al., 2001; Weingartner et al., 2003). Aplikáciou kofeínu sme zistili, že bunky *C. reinhardtii* sú hypersenzitívne k poškodeniu DNA pri kombinácii zeocínu s kofeínom (Obr. 14). Kofeín má pravdepodobne za následok inaktiváciu Wee1 (Obr. 25 C) po poškodení DNA. Toto vedie k urýchleniu aktivácie mitotických kináz a k aberantnej mitóze. Na rozdiel od vyšších rastlín, u *C. reinhardtii*, dokáže kofeín prekonať DDC a čiastočne aj DRC (viď aj kap. 5.2.1)

5.3. *Scenedesmus quadricauda*

5.3.1. Rast a priebeh bunkového cyklu *S. quadricauda*

Bunky *S. quadricauda* sme ovplyvňovali činidlami (FdUrd, kofeín, zeocín) na začiatku bunkového cyklu alebo v jeho 8. hodine. Bez ohľadu na čas pridania kofeínu bol rast kultúry porovnateľný s kontrolným variantom, rovnako to bolo aj v prípade FdUrd a FdUrd s kofeínom (Obr. 27). Účinok zeocínu bol závislý na čase aplikácie. Jeho pridanie na začiatku bunkového cyklu spomalilo rast buniek, zatiaľ čo aplikácia v 8. hodine nemala žiadny efekt na rast. Pridanie zeocínu spolu s FdUrd na začiatku bunkového cyklu nemalo spočiatku žiaden vplyv na rast buniek, ale neskôr kombinácia týchto dvoch činidiel vyvolala v bunkách degradáciu proteínov a pravdepodobne viedla aj k smrti niektorých buniek. Kombinácia kofeínu a zeocínu vykazovala veľmi podobný účinok a závislosť na čase aplikácie ako to bolo u zeocínu, avšak v ich kombinácii s FdUrd bola proteínová degradácia oveľa výraznejšia. **Rast buniek *S. quadricauda* je ovplyvnený prítomnosťou zeocínu, avšak záleží na čase jeho aplikácie.** V prípade *C. reinhardtii* sme túto závislosť nezistili, pretože činidlá boli testované len v 8. hodine bunkového cyklu. Každopádne **u oboch modelových organizmov aplikácia zeocínu v 8. hodine bunkového cyklu nemá vplyv na rast buniek.**

Bunky *S. quadricauda* dosiahnu postupne počas svetelnej periódy maximálne 3 CP, čo vedie k tvorbe osembunkových coenóbií. V kontrolnej a kofeínom ovplyvnenej kultúre prebehli všetky 3 CP, za ktorými nasledovalo jadrové a bunkové delenie, a to bez ohľadu na

to, či bol kofeín pridaný na začiatku bunkového cyklu alebo v jeho 8. hodine (Obr. 28 a 29 A, B). Zeocín mal veľmi výrazný efekt na priebeh bunkového cyklu. V podstate môžeme konštatovať, že bez ohľadu na čas jeho aplikácie silne inhibuje reprodukčné procesy buniek, tieto zostávajú zablokované v G2 fáze prvej (pri aplikácii zeocínu na začiatku bunkového cyklu), resp. druhej (aplikácia v 8. hodine bunkového cyklu) postupnosti reprodukčných procesov (Obr. 28 a 29 C). Prítomnosť kofeínu v kultúrach ovplyvnených zeocínom viedla u časti populácie k prekonaniu zablokovania bunkového cyklu v G2 fáze, a teda tieto bunky boli schopné prejsť sadou reprodukčných procesov nasledujúcou za týmto G2 blokom (Obr. 28 a 29 D). Po aplikácii FdUrd sme neboli schopní zaznamenať jadrové ani bunkové delenie, toto činidlo kompletne inhibovalo priebeh bunkového cyklu.

Replikácia DNA v bunkách *S. quadricauda* bola výrazne ovplyvnená prítomnosťou zeocínu, zatiaľ čo u kofeínu sme žiaden vplyv nezaznamenali (Obr. 30). Podobne ako u *C. reinhardtii* aj tu bola replikácia v prítomnosti zeocínu obmedzená resp. pozastavená, avšak nie úplne inhibovaná. V bunkách došlo k 2-násobnému (pridanie zeocínu na začiatku bunkového cyklu), resp. k 4-násobnému (aplikácia zeocínu v 8. hodine cyklu) zvýšeniu množstva DNA, podľa čoho sme predpokladali, že sa materské bunky budú deliť na 2 resp. na 4 dcérske bunky. V skutočnosti však nebolo zaznamenané žiadne delenie po aplikácii zeocínu na začiatku bunkového cyklu (Obr. 28 C) a po jeho pridaní v 8. hodine bunkového cyklu došlo k deleniu len na dve dcérske bunky miesto očakávaných štyroch (Obr. 29 C). Toto potvrdzuje vyššie uvedené tvrdenie, že **bunky *S. quadricauda* zostali v dôsledku pôsobenia zeocínu zablokované v G2 fáze prvej (pri aplikácii zeocínu na začiatku bunkového cyklu), resp. druhej (aplikácia v 8. hodine bunkového cyklu) postupnosti reprodukčných procesov.** Prítomnosť kofeínu v zeocínom ovplyvnených kultúrach nijak neovplyvnila znásobenie množstva DNA v porovnaní so samotným zeocínom. Rozdiel sme však zaznamenali v nasledujúcich reprodukčných procesoch. Na základe podobného očakávania ako v prípade samotného zeocínu, sa kultúra ovplyvnená na začiatku bunkového cyklu mala celá rozdeliť na 2 dcérske bunky. V skutočnosti však toto delenie prebehlo len u 35 % populácie (Obr. 28 D), čo znamená, že len táto časť populácie prekonala, pravdepodobne v dôsledku prítomnosti kofeínu, inhibičné zablokovanie spôsobené zeocínom v G2 fáze. Aplikáciou kofeínu spolu so zeocínom v 8. hodine bunkového cyklu prekonalo zastavenie v G2 fáze 30 % buniek (Obr. 29 D). Na základe týchto výsledkov môžeme konštatovať, že **kofeín dokáže čiastočne prekonať zablokovanie bunkového cyklu riasy *S. quadricauda* v G2 fáze, ktoré je indukované zeocínom.**

Zaujímavé je, že pridanie zeocínu na začiatku bunkového cyklu, teda ešte pred S fázou, vedie k zablokovaniu buniek v G2 fáze, zatiaľ čo po jeho aplikácii v 8. hodine bunkového cyklu, teda v čase keď sa bunky nachádzajú tesne pred začiatkom S/M fázy, sme tento efekt nepozorovali. Účinkom zeocínu aplikovaného na začiatku bunkového cyklu dôjde k oddialeniu S fázy, ale samotná replikácia inhibovaná nie je (Obr. 30 A). Naopak, jadrové a bunkové delenie neprebehnú (Obr. 28 C). Ovplyvnenie buniek zeocínom počas G2 fázy (8. hodina) vôbec nezmení priebeh bunkového cyklu, replikácia DNA (Obr. 30 B), jadrové a bunkové delenie (Obr. 29 C) prebehnú s rovnakým načasovaním ako v kontrole. Ďalšia postupnosť reprodukčných procesov však už ovplyvnená je, bunky sú zablokované v G2 fáze, ale až tejto druhej postupnosti. Jednou z možností, prečo nedôjde k zablokovaniu bunkového cyklu pri aplikácii zeocínu v G2 fáze by mohlo byť, že v tomto čase nie je prijímaný bunkami. Toto však asi nie je opodstatnené, pretože G1 a S fázy nasledujúcej sady reprodukčných procesov ovplyvnené sú, čo znamená, že sa zeocín do buniek dostal. V opačnom prípade by priebeh bunkového cyklu zobrazený v grafe na Obr. 29 C vyzeral ako v kontrolnej kultúre (Obr. 29 A). Ďalšou možnosťou je, že bunky v G2 fáze sú menej citlivé k účinku zeocínu. To môže byť vďaka prítomnosti nejakých DNA protektívnych mechanizmov, prípadne naopak, že v tejto fáze bunky nedokážu rozpoznať alebo reagovať na poškodenie DNA.

5.3.2. Regulácia bunkového cyklu *S. quadricauda*

Nevieme presne aké veľké poškodenie DNA spôsobuje 10 µg/ml zeocín v bunkách *S. quadricauda*, ale je známe, že podobná koncentrácia u príbuznej riasy *C. reinhardtii* (Chankova et al., 2007) aj u rastliny *A. thaliana* (De Schutter et al., 2007) je účinným činidlom pre indukciu poškodenia DNA. Pre spustenie DDRP je dostatočný jeden zlom v tejto molekule (Bennett et al., 1993; Bennett et al., 1996), a teda predpokladáme, že pozorovaný účinok na bunky *S. quadricauda* bol v dôsledku poškodenia DNA účinkom zeocínu. V eukaryotických bunkách existujú dva hlavné mechanizmy opravy dvoj-reťazcových zlomov DNA, nehomologické spájanie koncov zlomov (NHEJ) a homologická rekombinácia (HR) medzi sesterskými chromatídami (Shiloh, 2006). Poškodenie DNA indukované pred S fázou by mohlo byť opravované prostredníctvom mechanizmu NHEJ, ktorý je aktívny počas celého bunkového cyklu (Lieber et al., 2004), zatiaľ čo na oprave poškodenia v G2 fáze by sa mohla podieľať ako NHEJ oprava, tak aj HR, ktorá sa uplatňuje v neskoršej S fáze a v G2 fáze (Wyman et al., 2004) pričom využíva rekombináciu medzi sesterskými chromatídami. Nie je zatiaľ známe, ktorý z týchto procesov je využívaný bunkami *S. quadricauda*, avšak u riasy *C. reinhardtii* je preferenčne využívaným reparačným mechanizmom NHEJ (Rohr et al.,

2004; Vlček et al., 2008), hoci sú u nej prítomné gény pre oba typy opravy (Vlček et al., 2008).

Citlivosť buniek *S. quadricauda* voči zeocínu bola čiastočne redukovaná u 30 % buniek v prítomnosti nízkej koncentrácie kofeínu, o ktorom je známe, že dokáže prekonať DRC a DDC (Schlegel a Pardee, 1986; Dasso a Newport, 1990; Pelayo et al., 2001; Weingartner et al., 2003) prostredníctvom inhibície kináz ATM a ATR (Sarkaria et al., 1999; Moser et al., 2000; Zhou et al., 2000). Aplikácia kofeínu špecificky prekonala zablokovanie buniek v G2 fáze spôsobené zeocínom (Obr. 28 a 29 D), avšak oddialenie S fázy zostalo v porovnaní s účinkom samotného zeocínu nezmenené (Obr. 30 A). V tomto prípade teda, **na rozdiel od *C. reinhardtii*, nedošlo k ovplyvneniu DRC**, čo znamená, že účinok kofeínu je porovnateľný s jeho účinkom u vyšších rastlín. Kofeín nevykazoval žiadny účinok v prípade, keď bol aplikovaný spolu s FdUrd, čo bolo pravdepodobne spôsobené nielen úplnou inhibíciou replikácie DNA, ale aj nasledujúcich procesov bunkového cyklu.

Pri testovaní prežívania (Obr. 26) buniek riasy *S. quadricauda* na vybraných činidlách (kofeín, zeocín) zvyšoval kofeín prežívanie buniek ovplyvnených zeocínom. To bolo pravdepodobne spôsobené tým, že **hoci mechanizmus zodpovedný za zastavenie bunkového cyklu v G2 fáze bol inhibovaný účinkom kofeínu, pokračovanie bunkového cyklu, napriek prítomnosti poškodenej DNA, bolo pre bunky menej letálne ako jeho trvalé zastavenie**. Avšak v tomto prípade je pravdepodobne Podobný efekt je možné pozorovať u mutantov *cdc13* kvasinky *S. cerevisiae*, u ktorých za štandardných okolností dochádza po poškodení DNA k zablokovaniu bunkového cyklu v S/G2 fáze (Weinert a Hartwell, 1993). Avšak k tomuto zablokovaniu nedochádza v prípade dvojitéch mutantov *cdc13 rad9*, u ktorých sa kombinuje mutácia *cdc13* s mutáciou v DDC. Takéto dvojité mutanty podstupujú niekoľko delení aj v prítomnosti poškodenej DNA. Toto poškodenie je síce schopné indukovať zastavenie bunkového cyklu, ale samé o sebe letálne nie je, takže keď k zastaveniu nedôjde, bunky sú schopné prežiť (Weinert a Hartwell, 1993). Podobne aj cicavčie bunky s mutovaným proteínom p53 vykazujú vyššiu rezistenciu k UV žiareniu, čo je však dané ich neschopnosťou zastaviť bunkový cyklus v prítomnosti poškodenej DNA Bunky sa v takomto prípade delia aj napriek tomu, že replikácia poškodenej DNA vedie k akumulácii mutácií a k vysokej genómovej nestabilite (Hanawalt, 1996).

Regulátory bunkového cyklu, ktoré sme sledovali v tejto práci u riasy *S. quadricauda*, vykazujú odlišné chovanie v prítomnosti činidiel indukujúcich poškodenie DNA. V prítomnosti FdUrd alebo zeocínu sa množstvo proteínov CdkA a CdkB udržiavalo počas celého bunkového cyklu na približne rovnakej hladine (Obr. 33 A, B, 34), s čím súvisela aj

dlhodobo vysoká kinázová aktivita oboch proteínov v týchto bunkách (Obr. 37, 38). Podobný účinok FdUrd na udržanie vysokej kinázovej aktivity oboch mitotických kináz a tiež cyklínu B bol už u tohoto modelového organizmu publikovaný Vítovou a kol. v roku 2008 (Vítová et al., 2008). Toto naznačuje, že u *S. quadricauda* sú CDK aktivované nezávisle na priebehu bunkového cyklu. Priebeh bunkového cyklu bol v takto ovplyvnených (FdUrd, zeocín) bunkách zablokovaný, čo znamená, že aktívnym CDK bolo zrejme nejakým spôsobom zabránené vo fosforylácii substrátov. Prekvapivo však kinázová aktivita CdkA (Obr. 37 a 38 A) dosiahla svoj vrchol ešte pred tým, než ho dosiahla hladina (Obr. 33 a 34 A) tohto proteínu. Toto bolo asi spôsobené prítomnosťou aktívneho CdkB v imunoprecipitáte. Množstvo proteínu Wee1 zostávalo na vysokej úrovni v prítomnosti kofeínu, zeocínu aj FdUrd (Obr. 33 a 34 C), avšak nie je jasné či bol tento proteín aj enzymaticky aktívny, pretože jeho cieľové CDK si udržiavali vysokú kinázovú aktivitu aj v jeho prítomnosti. To je v rozpore s očakávaním, že kinázová aktivita CDK klesne v prítomnosti proteínu Wee1. Stanovenie tyrozínovej fosforylácie CDK by túto otázku objasnilo, bohužiaľ sme toto stanovenie nemohli spraviť, pretože špecifická protilátka proti fosfotyrozínu, ktorá bola použitá pre podobnú analýzu u *C. reinhardtii*, vykazovala nešpecifické reakcie. Vysoká kinázová aktivita CDK a absencia jej tyrozínovej fosforylácie naznačuje **existenciu nového mechanizmu, ktorý v bunkách *S. quadricauda* zabezpečí zastavenie bunkového cyklu v prítomnosti poškodenej DNA**. Toto by vôbec nebolo prekvapivé vzhľadom k špecifickému spôsobu delenia, tzv. násobnému deleniu, u tohto modelového organizmu.

Výsledky prezentované v tejto práci naznačujú, že **zelená riasa *S. quadricauda* nereaguje na prítomnosť mutagénov aplikovaných v G2 fáze zastavením bunkového cyklu, zatiaľ čo pri aplikácii rovnakých mutagénov ešte pred S fázou k tomuto zastaveniu dochádza**. Pokračovanie bunkového cyklu v prítomnosti poškodenej DNA a v absencii reparácie DNA vedie k deleniu buniek s poškodenou DNA. Počas jedného bunkového cyklu *S. quadricauda* prebehne niekoľko za sebou nasledujúcich reprodukčných sekvencií, ktoré sa navzájom čiastočne prekrývajú. Tieto sekvencie sú v iných fázach bunkového cyklu ako je G2 fáza a teda môžu reagovať na poškodenie DNA oddialením S fázy a zastavením bunkového cyklu v G2 fáze, podobne ako sa to deje pri aplikácii činidiel na začiatku bunkového cyklu. Toto znamená, že deliace sa bunky sú v určitej chvíli diploidné, a teda pri reparácii DNA sa jednak môže využiť mechanizmus nešpecifickej opravy NHEJ ako aj špecifickej HR. Nie je známe či a v akej miere je HR používaná bunkami riasy *S. quadricauda* na opravu dvoj-reťazcových zlomov v DNA, avšak u príbuznej zelenej riasy *C. reinhardtii* to nie je preferovaný mechanizmus reparácie tohto typu poškodenia DNA

(Rohr et al., 2004). Naopak, u iných jednobunkových organizmov ako sú kvasinky (Siede et al., 1996) a tiež v myších embryách (Essers et al., 2000) je hlavným reparačným mechanizmom HR. Ako už bolo vyššie spomenuté, proteín p53 je v cicavčích bunkách nevyhnutný pre zastavenie bunkového cyklu v súvislosti s DDRP a jeho delécia vedie k bunkovému deleniu aj napriek prítomnosti poškodenej DNA. Zaujímavé je, že táto delécia čiastočne indukuje tvorbu pluripotentných buniek z myších embryonálnych fibroblastov a aj z ľudských kožných fibroblastov (Hong et al., 2009). To naznačuje, že existuje prepojenie medzi neschopnosťou buniek zastaviť bunkový cyklus počas DDRP a zároveň ich schopnosťou dediferencovať a deliť sa. Tento predpoklad je podporený skutočnosťou, že počas prvých veľmi rýchlych embryonálnych delení *Xenopus laevis*, ktoré zahŕňajú len S a M fázy bunkového cyklu, chýba DDC (Anderson et al., 1997; Finkielstein et al., 2001; Peng et al., 2007).

Výsledky tejto práce naznačujú zaujímavú skutočnosť, že zelená riasa *S. quadricauda* nereaguje na prítomnosť mutagénov aplikovaných v G2 fáze zastavením bunkového cyklu, zatiaľ čo pri aplikácii rovnakých mutagénov ešte pred S fázou k tomuto zastaveniu dochádza.

Ďalším poznatkom je odlišný účinok kofeínu na vybrané modelové organizmy. Bunky *C. reinhardtii* sú hypersenzitívne k poškodeniu DNA pri kombinácii zeocínu s kofeínom, zatiaľ čo v prípade druhého modelového organizmu *S. quadricauda* kofeín zvyšoval prežívanie buniek ovplyvnených zeocínom. U *C. reinhardtii* má kofeín pravdepodobne za následok inaktiváciu Wee1 po poškodení DNA, čo vedie k urýchleniu aktivácie mitotických kináz a k aberantnej mitóze. Podobne aj u *S. quadricauda* vykazujú bunky vysokú mitotickú CDK kinázovú aktivitu a zároveň absenciu tyrozínovej fosforylácie, ktorá je sprostredkovaná kinázou Wee1. Avšak v tomto prípade je pravdepodobne pokračovanie bunkového cyklu, napriek prítomnosti poškodenej DNA, pre bunky menej letálne ako jeho trvalé zastavenie.

Okrem toho naše modelové organizmy odlišne regulujú DDRP v prítomnosti kofeínu. U oboch dokáže kofeín prekonať DDC, avšak len u *C. reinhardtii* čiastočne prekoná aj DRC. Reakcia *S. quadricauda* na poškodenie DNA je teda viac podobná vyšším rastlinám v porovnaní s *C. reinhardtii*. U oboch modelových organizmov predpokladáme existenciu špecifických mechanizmov zodpovedných za zastavenie bunkového cyklu po poškodení DNA, avšak ich potvrdenie a podrobnejšia charakteristika sú otázkou ďalšieho výskumu.

6. ZÁVERY

- Účinok zeocínu na **rast** buniek *C. reinhardtii* a *S. quadricauda* je závislý od času jeho aplikácie. U oboch modelových organizmov aplikácia zeocínu v 8. hodine bunkového cyklu nemá vplyv na rast buniek. V prípade *S. quadricauda* však aplikácia zeocínu na začiatku bunkového cyklu rast ovplyvní.
- Poškodenie DNA spôsobené účinkom zeocínu aplikovaného na začiatku bunkového cyklu u *S. quadricauda* a tiež v 8. hodine cyklu v prípade *C. reinhardtii* vedie k **oddialeniu replikácie a zastaveniu bunkového cyklu** v G2 fáze.
- Aplikácia zeocínu v 8. hodine bunkového cyklu *S. quadricauda* nemá vplyv na okamžité **zastavenie bunkového cyklu**, toto sa stane až v **G2 fáze d'álšej postupnosti reprodukčných procesov**.
- **Kofeín** dokáže u *C. reinhardtii* aj *S. quadricauda* čiastočne prekonať zablokovanie bunkového cyklu, ktoré je indukované zeocínom.
- Kináza **CdkA** z *C. reinhardtii* môže zohrávať úlohu nie len v regulácii mitózy ale aj v skorých fázach bunkového cyklu pri regulácii CP. **CdkB1** je mitotická kináza *C. reinhardtii* a spolu s kinázou **Wee1** je zapojená do DDRP. Transkripcia CdkB1 aj Wee1 je indukovaná okamžite po poškodení DNA.
- **CdkA** aj **CdkB** v bunkách *S. quadricauda* regulujú priebeh mitózy. Ich proteínová hladina a kinázová aktivita sa udržiava na vysokej úrovni v prítomnosti poškodenej DNA. Proteínová hladina kinázy **Wee1** v bunkách *S. quadricauda* nebola ovplyvnená prítomnosťou zeocínu a FdUrd. Zdá sa, že tento proteín nie je zapojený do DDRP u tejto zelenej riasy.
- Na rozdiel od vyšších rastlín, dokáže **kofeín** v bunkovom cykle *C. reinhardtii* **prekonať DDC a čiastočne aj DRC**. U *C. reinhardtii* teda predpokladáme existenciu dvoch samostatných mechanizmov **odpovede na poškodenie DNA**, ktoré sú rôzne citlivé k prítomnosti kofeínu - 1; na kofeín čiastočne citlivé oddialenie replikácie DNA a 2; odpoveď citlivá na kofeín, ktorá vedie k aberantnému bunkovému deleniu.
- Podobne ako u vyšších rastlín, **kofeín** v bunkovom cykle *S. quadricauda* dokáže **prekonať DDC** ale nie DRC. V bunkách *S. quadricauda* predpokladáme existenciu

nového **mechanizmu zodpovedného za zastavenie bunkového cyklu** v prítomnosti poškodenej DNA, ktorý je spojený s vysokou kinázovou aktivitou CDK a absenciou tyrozínovej fosforylácie sprostredkovanej kinázou Wee1.

7. ZOZNAM LITERATÚRY

- Abraham RT** (2001) Cell cycle checkpoint signaling through the ATM and ATR kinases. *Genes and Development* **15**: 2177-2196
- Amino S, Nagata T** (1996) Caffeine-induced uncoupling of mitosis from DNA replication in tobacco BY-2 cells. *Journal of Plant Research* **109**: 219-222
- Anderson JA, Lewellyn AL, Maller JL** (1997) Ionizing radiation induces apoptosis and elevates cyclin A1-Cdk2 activity before but not after the midblastula transition in *Xenopus*. *Molecular Biology of Cell* **8**: 1195-1206
- Baber-Furnari BA, Rhind N, Boddy MN, Shanahan P, Lopez-Girona A, Russell P** (2000) Regulation of mitotic inhibitor Mik1 helps to enforce the DNA damage checkpoint. *Molecular Biology of Cell* **11**: 1-11
- Barroco RM, De Veylder L, Magyar Z, Engler G, Inze D, Mironov V** (2003) Novel complexes of cyclin-dependent kinases and a cyclin-like protein from *Arabidopsis thaliana* with a function unrelated to cell division. *Cellular and Molecular Life Sciences* **60**: 401-412
- Bartek J, Lukas C, Lukas J** (2004) Checking on DNA damage in S phase. *Nature Reviews Molecular Cell Biology* **5**: 792-804
- Bartek J, Lukas J** (2007) DNA damage checkpoints: from initiation to recovery or adaptation. *Current Opinion in Cell Biology* **19**: 238-245
- Bennett CB, Lewis AL, Baldwin KK, Resnick MA** (1993) Lethality induced by a single site-specific double-strand break in a dispensable yeast plasmid. *Proceedings of National Academy of Sciences of United States of America* **90**: 5613-5617
- Bennett RA, Gu XY, Povirk LF** (1996) Construction of a vector containing a site-specific DNA double-strand break with 3'-phosphoglycolate termini and analysis of the products of end-joining in CV-1 cells. *International Journal of Radiation Biology* **70**: 623-636
- Bisova K, Krylov DM, Umen JG** (2005) Genome-wide annotation and expression profiling of cell cycle regulatory genes in *Chlamydomonas reinhardtii*. *Plant Physiology* **137**: 475-491
- Bišová K, Hendrychová J, Cepák V, Zachleder V** (2003) Cell growth and division processes are differentially sensitive to cadmium in *Scenedesmus quadricauda*. *Folia Microbiologica* **48**: 805-816
- Bišová K, Vítová M, Zachleder V** (2000) The activity of total histone H1 kinases is related to growth and commitment points while the p13^(suc1)-bound kinase activity relates to mitoses in the alga *Scenedesmus quadricauda*. *Plant Physiology and Biochemistry* **38**: 755-764
- Blasina A, Price BD, Turenne GA, McGowan CH** (1999) Caffeine inhibits the checkpoint kinase ATM. *Current Biology* **9**: 1135-1138
- Booher RN, Deshaies RJ, Kirschner MW** (1993) Properties of *Saccharomyces cerevisiae* wee1 and its differential regulation of p34^{CDC28} in response to G1 and G2 cyclins. *EMBO Journal* **12**: 3417-3426
- Booher RN, Holman PS, Fattaey A** (1997) Human Myt1 is a cell cycle-regulated kinase that inhibits Cdc2 but not Cdk2 activity. *Journal of Biological Chemistry* **272**: 22300-22306
- Boudolf V, Barroco R, Engler JdA, Verkest A, Beeckman T, Naudts M, Inze D, De Veylder L** (2004) B1-type cyclin-dependent kinases are essential for the formation of stomatal complexes in *Arabidopsis thaliana*. *Plant Cell* **16**: 945-955

- Boudolf V, Inze D, De Veylder L** (2006) What if higher plants lack a CDC25 phosphatase? *Trends in Plant Science* **11**: 474-479
- Boudolf V, Rombauts S, Naudts M, Inze D, De Veylder L** (2001) Identification of novel cyclin-dependent kinases interacting with the CKS1 protein of *Arabidopsis*. *Journal of Experimental Botany* **52**: 1381-1382
- Boudolf V, Vlieghe K, Beemster GTS, Magyar Z, Acosta JAT, Maes S, Van Der Schueren E, Inze D, De Veylder L** (2004) The plant-specific cyclin-dependent kinase CDKB1;1 and transcription factor E2Fa-DPa control the balance of mitotically dividing and endoreduplicating cells in *Arabidopsis*. *Plant Cell* **16**: 2683-2692
- Boutros R, Dozier C, Ducommun B** (2006) The when and wheres of CDC25 phosphatases. *Current Opinion in Cell Biology* **18**: 185-191
- Boynton J, Gillham N, Harris E, Hosler J, Johnson A, Jones A, Randolph-Anderson B, Robertson D, Klein T, Shark K, et al** (1988) Chloroplast transformation in *Chlamydomonas* with high velocity microprojectiles. *Science* **240**: 1534-1538
- Breyne P, Zabeau M** (2001) Genome-wide expression analysis of plant cell cycle modulated genes. *Current Opinion in Plant Biology* **4**: 136-142
- Brizuela L, Draetta G, Beach D** (1987) p13^{sup1} acts in the fission yeast cell division cycle as a component of the p34^{cdc2} protein kinase. *EMBO Journal* **6**: 3507-3513
- Brown RC, Lemmon BE** (1991) Pollen development in orchids 1. cytoskeleton and the control of division plane in irregular patterns of cytokinesis. *Protoplasma* **163**: 9-18
- Campbell SD, Sprenger F, Edgar BA, Ofarrell PH** (1995) *Drosophila* Wee1 kinase rescues fission yeast from mitotic catastrophe and phosphorylates *Drosophila* Cdc2 in-vitro. *Molecular Biology of Cell* **6**: 1333-1347
- Clarke AR, Purdie CA, Harrison DJ, Morris RG, Bird CC, Hooper ML, Wyllie AH** (1993) Thymocyte apoptosis induced by p53-dependent and independent pathways. *Nature* **362**: 849-852
- Coelho CM, Dante RA, Sabelli PA, Sun Y, Dilkes BP, Gordon-Kamm WJ, Larkins BA** (2005) Cyclin-dependent kinase inhibitors in maize endosperm and their potential role in endoreduplication. *Plant Physiology* **138**: 2323-2336
- Colasanti J, Tyers M, Sundaresan V** (1991) Isolation and characterization of cDNA clones encoding a functional p34^{cdc2} homologue from *Zea mays*. *Proceedings of National Academy of Sciences of United States of America* **88**: 3377-3381
- Coleman AW** (1982) The nuclear-cell cycle in *Chlamydomonas* (Chlorophyceae). *Journal of Phycology* **18**: 192-195
- Coleman TR, Dunphy WG** (1994) Cdc2 regulatory factors. *Current Opinion in Cell Biology* **6**: 877-882.
- Corellou F, Camasses A, Ligat L, Peaucellier G, Bouget FY** (2005) Atypical regulation of a green lineage-specific B-type cyclin-dependent kinase. *Plant Physiology* **138**: 1627-1636
- Cortez D** (2003) Caffeine inhibits checkpoint responses without inhibiting the ataxia-telangiectasia-mutated (ATM) and ATM- and Rad3-related (ATR) protein kinases. *Journal of Biological Chemistry* **278**: 37139-37145
- Criqui MC, Weingartner M, Capron A, Parmentier Y, Shen WH, Heberle-Bors E, Bogre L, Genschik P** (2001) Sub-cellular localisation of GFP-tagged tobacco mitotic cyclins during the cell cycle and after spindle checkpoint activation. *Plant Journal* **28**: 569-581
- Culligan K, Tissier A, Britt A** (2004) ATR regulates a G2-phase cell-cycle checkpoint in *Arabidopsis thaliana*. *Plant Cell* **16**: 1091-1104

- Culligan KM, Robertson CE, Foreman J, Doerner P, Britt AB** (2006) ATR and ATM play both distinct and additive roles in response to ionizing radiation. *Plant Journal* **48**: 947-961
- Čížková M, Pichová A, Vítová M, Hlavová M, Hendrychová J, Umysová D, Gálová E, Ševčovičová A, Zachleder V, Bišová K** (2008) CDKA and CDKB kinases from *Chlamydomonas reinhardtii* are able to complement *cdc28* temperature-sensitive mutants of *Saccharomyces cerevisiae*. *Protoplasma* **232**: 183-191
- Damagnez V, Makela TP, Cottarel G** (1995) *Schizosaccharomyces pombe* Mop1-Mcs2 is related to mammalian CAK. *EMBO Journal* **14**: 6164-6172
- Dasso M, Newport JW** (1990) Completion of DNA replication is monitored by a feedback system that controls the initiation of mitosis invitro - studies in *Xenopus*. *Cell* **61**: 811-823
- De Bondt HL, Rosenblatt J, Jancarik J, Jones HD, Morgan DO, Kim SH** (1993) Crystal structure of cyclin-dependent kinase 2. *Nature* **363**: 595-602
- De Cambiaire JC, Otis C, Lemieux C, Turmel M** (2006) The complete chloroplast genome sequence of the chlorophycean green alga *Scenedesmus obliquus* reveals a compact gene organization and a biased distribution of genes on the two DNA strands. *BMC Evolutionary Biology* **6**: 37
- De Schamphelaere KA, Janssen CR** (2006) Bioavailability models for predicting copper toxicity to freshwater green microalgae as a function of water chemistry. *Environmental Science and Technology* **40**: 4514-4522
- De Schutter K, Joubes J, Cools T, Verkest A, Corellou F, Babiychuk E, Van Der Schueren E, Beckman T, Kushnir S, Inze D, De Veylder L** (2007) *Arabidopsis* WEE1 kinase controls cell cycle arrest in response to activation of the DNA integrity checkpoint. *Plant Cell* **19**: 211-225
- De Veylder L, Beckman T, Beemster GTS, Krols L, Terras P, Landrieu I, Van der Schueren E, Maes S, Naudts M, Inze D** (2001) Functional analysis of cyclin-dependent kinase inhibitors of *Arabidopsis*. *Plant Cell* **13**: 1653-1667
- De Veylder L, Joubes J, Inze D** (2003) Plant cell cycle transitions. *Current Opinion in Plant Biology* **6**: 536-543
- De Veylder L, Segers G, Glab N, Casteels P, Van Montagu M, Inze D** (1997) The *Arabidopsis* Cks1At protein binds the cyclin-dependent kinases Cdc2aAt and Cdc2bAt. *FEBS Letters* **412**: 446-452
- Den Haese GJ, Walworth N, Carr AM, Gould KL** (1995) The Wee1 protein-kinase regulates T14 phosphorylation of fission yeast Cdc2. *Molecular Biology of Cell* **6**: 371-385
- Denu JM, Dixon JE** (1995) A catalytic mechanism for the dual-specific phosphatases. *Proceedings of National Academy of Sciences of United States of America* **92**: 5910-5914
- Dewitte W, Murray JAH** (2003) The plant cell cycle. *Annual Review of Plant Biology* **54**: 235-264
- Dissmeyer N, Weimer AK, Pusch S, De Schutter K, Kamei CL, Nowack MK, Novak B, Duan GL, Zhu YG, De Veylder L, Schnittger A** (2009) Control of cell proliferation, organ growth, and DNA damage response operate independently of dephosphorylation of the *Arabidopsis* Cdk1 homolog CDKA;1. *Plant Cell* **21**: 3641-3654
- Doonan J, Fobert P** (1997) Conserved and novel regulators of the plant cell cycle. *Current Opinion in Cell Biology* **9**: 824-830
- Draetta G, Brizuela L, Potashkin J, Beach D** (1987) Identification of p34 and p13, human homologs of the cell cycle regulators of fission yeast encoded by *cdc2⁺* and *suc1⁺*. *Cell* **50**: 319-325

- Dunphy WG** (1994) The decision to enter mitosis. *Trends in Cell Biology* **4**: 202-207
- Dunphy WG, Kumagai A** (1991) The cdc25 protein contains an intrinsic phosphatase activity. *Cell* **67**: 189-196
- Dustin P** (1978) *Microtubules*. Springer-Verlag, New York
- Dutcher SK** (2000) *Chlamydomonas reinhardtii*: biological rationale for genomics. *Journal of Eukaryotic Microbiology* **47**: 340-349
- Egan EA, Solomon MJ** (1998) Cyclin-Stimulated Binding of Cks Proteins to Cyclin-Dependent Kinases. *Molecular Cell Biology* **18**: 3659-3667
- Ehrenfeld GM, Shipley JB, Heimbrook DC, Sugiyama H, Long EC, van Boom JH, van der Marel GA, Oppenheimer NJ, Hecht SM** (1987) Copper-dependent cleavage of DNA by bleomycin. *Biochemistry* **26**: 931-942
- Endicott JA, Nurse P** (1995) The cell cycle and *sucl*: from structure to function? *Structure* **3**: 321-325
- Espinoza FH, Farrell A, Erdjument-Bromage H, Tempst P, Morgan DO** (1996) A cyclin-dependent kinase-activating kinase (CAK) in budding yeast unrelated to vertebrate CAK. *Science* **273**: 1714-1717
- Essers J, van Steeg H, de Wit J, Swagemakers SMA, Vermeij M, Hoeijmakers JHJ, Kanaar R** (2000) Homologous and non-homologous recombination differentially affect DNA damage repair in mice. *EMBO Journal* **19**: 1703-1710
- Evans T, Rosenthal ET, Youngbom J, Distel D, Hunt T** (1983) Cyclin: a protein specified by maternal mRNA in sea urchin eggs that is destroyed at each cleavage division. *Cell* **33**: 389-396
- Fabian-Marwedel T, Umeda M, Sauter M** (2002) The rice cyclin-dependent kinase-activating kinase R2 regulates S-phase progression. *Plant Cell* **14**: 197-210
- Fang F, Newport JW** (1991) Evidence that the G1-S and G2-M transitions are controlled by different cdc2 proteins in higher eukaryotes. *Cell* **66**: 731-742
- Fang SC, de los Reyes C, Umen JG** (2006) Cell size checkpoint control by the retinoblastoma tumor suppressor pathway. *PLoS Genetics* **2**: 1565-1579
- Fauman EB, Saper MA** (1996) Structure and function of the protein tyrosine phosphatases. *Trends in Biochemical Sciences* **21**: 413-417
- Featherstone C, Russell P** (1991) Fission yeast *p107^{Weel}* mitotic inhibitor is a tyrosine serine kinase. *Nature* **349**: 808-811
- Feaver WJ, Svejstrup JQ, Henry NL, Kornberg RD** (1994) Relationship of CDK-activating kinase and RNA polymerase II CTD kinase TFIIF/TFIIK. *Cell* **79**: 1103-1109
- Ferreira PCG, Hemerly AS, Villarreal R, Van Montagu M, Inze D** (1991) The *Arabidopsis* functional homolog of the *p34^{cdc2}* protein kinase. *Plant Cell* **3**: 531-540
- Finkielstein CV, Lewellyn AL, Maller JL** (2001) The midblastula transition in *Xenopus* embryos activates multiple pathways to prevent apoptosis in response to DNA damage. *Proceedings of National Academy of Sciences of United States of America* **98**: 1006-1011
- Fisher RP, Morgan DO** (1994) A novel cyclin associates with MO15/CDK7 to form the CDK-activating kinase. *Cell* **78**: 713-724
- Flavin M, Slaughter C** (1974) Microtubule assembly and function in *Chlamydomonas*: inhibition of growth and flagellar regeneration by antitubulins and other drugs and isolation of resistant mutants. *Journal of Bacteriology* **118**: 59-69
- Fobert PR, Gaudin V, Lunness P, Coen ES, Doonan JH** (1996) Distinct classes of cdc2-related genes are differentially expressed during the cell division cycle in plants. *Plant Cell* **8**: 1465-1476
- Fott B** (1967) *Sinice a rasy*. Academia, Praha

- Francis D** (2007) The plant cell cycle - 15 years on. *New Phytologist* **174**: 261-278
- Fuerst RA, Soni R, Murray JA, Lindsey K** (1996) Modulation of cyclin transcript levels in cultured cells of *Arabidopsis thaliana*. *Plant Physiology* **112**: 1023-1033
- Fulop K, Pettko-Szandtner A, Magyar Z, Miskolczi P, Kondorosi E, Dudits D, Bako L** (2005) The *Medicago* CDKC;1-CYCLINT;1 kinase complex phosphorylates the carboxy-terminal domain of RNA polymerase II and promotes transcription. *Plant Journal* **42**: 810-820
- Gaillard AR, Fox LA, Rhea JM, Craige B, Sale WS** (2006) Disruption of the A-kinase anchoring domain in flagellar radial spoke protein 3 results in unregulated axonemal cAMP-dependent protein kinase activity and abnormal flagellar motility. *Molecular Biology of Cell* **17**: 2626-2635
- Garcia V, Bruchet H, Comesce D, Granier F, Bouchez D, Tissier A** (2003) AtATM is essential for meiosis and the somatic response to DNA damage in plants. *Plant Cell* **15**: 119-132
- Gatignol A, Durand H, Tiraby G** (1988) Bleomycin resistance conferred by a drug-binding protein. *FEBS Letters* **230**: 171-175
- Gautier J, Solomon MJ, Booher RN, Bazan JF, Kirschner MW** (1991) cdc25 is a specific tyrosine phosphatase that directly activates p34^{cdc2}. *Cell* **67**: 197-211
- Genschik P, Criqui MC, Parmentier Y, Derevier A, Fleck J** (1998) Cell cycle-dependent proteolysis in plants: Identification of the destruction box pathway and metaphase arrest produced by the proteasome inhibitor MG132. *Plant Cell* **10**: 2063-2075
- George J, Castellazzi M, Buttin G** (1975) Prophage induction and cell division in *E. coli*. III. Mutations sfiA and sfiB restore division in tif and lon strains and permit the expression of mutator properties of tif. *Molecular and General Genetics* **140**: 309-332
- Ghirardi ML, Posewitz MC, Maness PC, Dubini A, Yu J, Seibert M** (2007) Hydrogenases and hydrogen photoproduction in oxygenic photosynthetic organisms. *Annual Review of Plant Biology* **58**: 71-91
- Glotzer M, Murray AW, Kirschner MW** (1991) Cyclin is degraded by the ubiquitin pathway. *Nature* **349**: 132-138
- Gonzalez N, Hernould M, Delmas F, Gevaudant F, Duffe P, Causse M, Mouras A, Chevalier C** (2004) Molecular characterization of a WEE1 gene homologue in tomato (*Lycopersicon esculentum* Mill.). *Plant Molecular Biology* **56**: 849-861
- Gould KL, Nurse P** (1989) Tyrosine phosphorylation of the fission yeast cdc2⁺ protein kinase regulates entry into mitosis. *Nature* **342**: 39-45
- Gray MW, Boer PH** (1988) Organization and expression of algal (*Chlamydomonas reinhardtii*) mitochondrial DNA. *Philosophical Transactions of Royal Society of London, Series B: Biological Sciences* **319**: 135-147
- Hanawalt PC** (1996) Role of transcription-coupled DNA repair in susceptibility to environmental carcinogenesis. *Environmental Health Perspectives* **104 Suppl 3**: 547-551
- Hanks SK, Hunter T** (1995) The eukaryotic protein kinase superfamily: kinase (catalytic) domain structure and classification. *FASEB Journal* **9**: 576-596
- Harper JW, Elledge SJ** (2007) The DNA damage response: ten years after. *Molecular Cell* **28**: 739-745
- Harris EH** (1989) *The Chlamydomonas Sourcebook. A comprehensive Guide to Biology and Laboratory Use.* Academic Press, Inc., San Diego, California
- Harris EH** (2001) *Chlamydomonas* as a model organism. *Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology* **52**: 363-406
- Hata S, Kouchi H, Suzuka I, Ishii T** (1991) Isolation and characterization of cDNA clones for plant cyclins. *EMBO Journal* **10**: 2681-2688

- Heald R, McLoughlin M, McKeon F** (1993) Human wee1 maintains mitotic timing by protecting the nucleus from cytoplasmically activated Cdc2 kinase. *Cell* **74**: 463-474
- Hemerly A, Engler JdA, Bergounioux C, Van Montagu M, Engler G, Inze D, Ferreira P** (1995) Dominant negative mutants of the Cdc2 kinase uncouple cell division from iterative plant development. *EMBO Journal* **14**: 3925-3936
- Hindley J, Phear G, Stein M, Beach D** (1987) Suc1⁺ encodes a predicted 13-kilodalton protein that is essential for cell viability and is directly involved in the division cycle of *Schizosaccharomyces pombe*. *Molecular and Cellular Biology* **7**: 504-511
- Hindley J, Phear GA** (1984) Sequence of the cell division gene CDC2 from *Schizosaccharomyces pombe*: patterns of splicing and homology to protein kinases. *Gene* **31**: 129-134
- Hirt H, Mink M, Pfosser M, Bögre L, Gyorgyey J, Jonak C, Gartner A, Dudits D, Heberleborgs E** (1992) Alfalfa cyclins - differential expression during the cell-cycle and in plant organs. *Plant Cell* **4**: 1531-1538
- Hirt H, Pay A, Bogre L, Meskiene I, Heberle-Bors E** (1993) cdc2MsB, a cognate cdc2 gene from alfalfa, complements the G1/S but not the G2/M transition of budding yeast cdc28 mutants. *Plant Journal* **4**: 61-69
- Hirt H, Pay A, Györgyey J, Bakó L, Neméth K, Bögre L, Schweyen RJ, Heberle-Bors E, Dudits D** (1991) Complementation of a yeast cell cycle mutant by an alfalfa cDNA encoding a protein kinase homologous to p34^{cdc2}. *Proceedings of National Academy of Sciences of United States of America* **88**: 1636-1640
- Hlavová M, Čížková M, Vítová M, Bišová K, Zachleder V** (2011) DNA damage during G2 phase does not affect cell cycle progression of the green alga *Scenedesmus quadricauda*. *PLoS ONE* **6**: e19626
- Hoek Cvd, Mann DG, Jahns HM** (1995) *Algae, an introduction to phycology*. Cambridge University Press, Cambridge
- Hoffmann I, Draetta G, Karsenti E** (1994) Activation of the phosphatase activity of human Cdc25a by a Cdk2 cyclin-E dependent phosphorylation at the G1/S transition. *EMBO Journal* **13**: 4302-4310
- Honda R, Tanaka H, Ohba Y, Yasuda H** (1995) Mouse p87^{wee1} kinase is regulated by M-phase specific phosphorylation. *Chromosome Research* **3**: 300-308.
- Hong H, Takahashi K, Ichisaka T, Aoi T, Kanagawa O, Nakagawa M, Okita K, Yamanaka S** (2009) Suppression of induced pluripotent stem cell generation by the p53-p21 pathway. *Nature* **460**: 1132-1135
- Hunter T, Plowman GD** (1997) The protein kinases of budding yeast: Six score and more. *Trends in Biochemical Sciences* **22**: 18-22
- Huntley R, Healy S, Freeman D, Lavender P, de Jager S, Greenwood J, Makker J, Walker E, Jackman M, Xie Q, Bannister AJ, Kouzarides T, Gutierrez C, Doonan JH, Murray JAH** (1998) The maize retinoblastoma protein homologue ZmRb-1 is regulated during leaf development and displays conserved interactions with G1/S regulators and plant cyclin D (CycD) proteins. *Plant Molecular Biology* **37**: 155-169
- Hurley PJ, Bunz F** (2007) ATM and ATR: components of an integrated circuit. *Cell Cycle* **6**: 414-417
- Chankova SG, Dimova E, Dimitrova M, Bryant PE** (2007) Induction of DNA double-strand breaks by zeocin in *Chlamydomonas reinhardtii* and the role of increased DNA double-strand breaks rejoining in the formation of an adaptive response. *Radiation and Environmental Biophysics* **46**: 409-416
- Chaturvedi P, Eng WK, Zhu Y, Mattern MR, Mishra R, Hurle MR, Zhang X, Annan RS, Lu Q, Faucette LF, Scott GF, Li X, Carr SA, Johnson RK, Winkler JD, Zhou**

- BB** (1999) Mammalian Chk2 is a downstream effector of the ATM-dependent DNA damage checkpoint pathway. *Oncogene* **18**: 4047-4054
- Chiu SM, Hastings PJ** (1972) Pre meiotic DNA synthesis and recombination in *Chlamydomonas reinhardtii*. *Genetics* **73**: 29-43
- Igarashi M, Nagata A, Jinno S, Suto K, Okayama H** (1991) Wee1(+)-like gene in human cells. *Nature* **353**: 80-83.
- Inze D, De Veylder L** (2006) Cell cycle regulation in plant development. *Annual Review of Genetics* **40**: 77-105
- Ito M, Marie-Claire C, Sakabe M, Ohno T, Hata S, Kouchi H, Hashimoto J, Fukuda H, Komamine A, Watanabe A** (1997) Cell-cycle-regulated transcription of A- and B-type plant cyclin genes in synchronous cultures. *Plant Journal* **11**: 983-992
- Izumi T, Walker DH, Maller JL** (1992) Periodic changes in phosphorylation of the *Xenopus* Cdc25 phosphatase regulate its activity. *Molecular Biology of Cell* **3**: 927-939
- Jacobs TW** (1995) Cell-Cycle Control. *Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology* **46**: 317-339
- Jasinski S, Riou-Khamlichi C, Roche O, Perennes C, Bergounioux C, Glab N** (2002) The CDK inhibitor NtKIS1a is involved in plant development, endoreduplication and restores normal development of cyclin D3;1-overexpressing plants. *Journal of Cell Science* **115**: 973-982
- Jazayeri A, Falck J, Lukas C, Bartek J, Smith GCM, Lukas J, Jackson SP** (2006) ATM- and cell cycle-dependent regulation of ATR in response to DNA double-strand breaks. *Nature Cell Biology* **8**: 37-45
- Jeffrey PD, Ruso AA, Polyak K, Gibbs E, Hurwitz J, Massague J, Pavletich NP** (1995) Mechanism of CDK activation revealed by the structure of a cyclinA-CDK2 complex. *Nature* **376**: 313-320
- John PCL** (1984) Control of the cell division cycle in *Chlamydomonas*. *Microbiological Sciences* **1**: 96-101
- John PCL** (1987) Control points in the *Chlamydomonas* cell cycle. In W Wiesnar, DG Robinson, RC Starr, eds, *Algal Development. Molecular and Cellular Aspects*. Springer-Verlag, Berlin, Heidelberg, New York, London, Paris, Tokyo, pp 9-16
- John PCL, Qi R** (2008) Cell division and endoreduplication: doubtful engines of vegetative growth. *Trends in Plant Science* **13**: 121-127
- John PCL, Sek FJ, Lee MG** (1989) A homolog of the cell cycle control protein p34^{cdc2} participates in the division cycle of *Chlamydomonas*, and a similar protein is detectable in higher plants and remote taxa. *Plant Cell* **1**: 1185-1193
- Joubes J, Chevalier C** (2000) Endoreduplication in higher plants. *Plant Molecular Biology* **43**: 735-745
- Joubes J, Chevalier C, Dudits D, Heberle-Bors E, Inze D, Umeda M, Renaudin J-P** (2000) CDK-related protein kinases in plants. *Plant Molecular Biology* **43**: 607-620
- Kaldis P** (1999) The cdk-activating kinase (CAK): From yeast to mammals. *Cellular and Molecular Life Sciences* **55**: 284-296
- Karlsson C, Katich S, Hagting A, Hoffmann I, Pines J** (1999) Cdc25B and Cdc25C differ markedly in their properties as initiators of mitosis. *Journal of Cell Biology* **146**: 573-584
- Kastan MB, Bartek J** (2004) Cell-cycle checkpoints and cancer. *Nature* **432**: 316-323
- Khadaroo B, Robbens S, Ferraz C, Derelle E, Eychenie S, Cooke R, Peaucellier G, Delseny M, Demaille J, Van de Peer Y, Picard A, Moreau H** (2004) The first green lineage cdc25 dual-specificity phosphatase. *Cell Cycle* **3**: 513-518
- Kindle KL** (1990) High-frequency nuclear transformation of *Chlamydomonas reinhardtii*. *Genetics* **87**: 1228-1232

- King RW, Deshaies RJ, Peters J-M, Kirschner MW** (1996) How proteolysis drives the cell cycle. *Science* **274**: 1652-1659
- Kong M, Barnes EA, Ollendorff V, Donoghue DJ** (2000) Cyclin F regulates the nuclear localization of cyclin B1 through a cyclin-cyclin interaction. *EMBO Journal* **19**: 1378-1388
- Kostrub CF, al-Khodairy F, Ghazizadeh H, Carr AM, Enoch T** (1997) Molecular analysis of *hus1⁺*, a fission yeast gene required for S-M and DNA damage checkpoints. *Molecular and General Genetics* **254**: 389-399
- Kumagai A, Dunphy WG** (1995) Control of the Cdc2/cyclin-B complex in *Xenopus* egg extracts arrested at a G2/M checkpoint with DNA synthesis inhibitors. *Molecular Biology of Cell* **6**: 199-213
- Kumagai A, Guo Z, Emami KH, Wang SX, Dunphy WG** (1998a) The *Xenopus* Chk1 protein kinase mediates a caffeine-sensitive pathway of checkpoint control in cell-free extracts. *Journal of Cell Biology* **142**: 1559-1569
- Kumagai A, Yakowec PS, Dunphy WG** (1998b) 14-3-3 proteins act as negative regulators of the inducer Cdc25 in *Xenopus* egg extracts. *Molecular Biology of Cell* **9**: 345-354
- Kurz EU, Lees-Miller SP** (2004) DNA damage-induced activation of ATM and ATM-dependent signaling pathways. *DNA Repair* **3**: 889-900
- Laemmli UK** (1970) Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* **227**: 680-685
- Lam MH, Rosen JM** (2004) Chk1 versus Cdc25. *Cell Cycle* **11**: e35-e37,
- Landrieu I, da Costa M, De Veylder L, Dewitte F, Vandepoele K, Hassan S, Wieruszkeski J-M, Faure J-D, Van Montagu M, Inze D, Lippens G** (2004) A small CDC25 dual-specificity tyrosine-phosphatase isoform in *Arabidopsis thaliana*. *Proceedings of National Academy of Sciences of United States of America* **101**: 13380-13385
- Larkins BA, Dilkes BP, Dante RA, Coelho CM, Woo YM, Liu Y** (2001) Investigating the hows and whys of DNA endoreduplication. *Journal of Experimental Botany* **52**: 183-192
- Lau CC, Pardee AB** (1982) Mechanism by which caffeine potentiates lethality of nitrogen mustard. *Proceedings of National Academy of Sciences of United States of America* **79**: 2942-2946
- Lee J, Kumagai A, Dunphy WG** (2001) Positive regulation of Wee1 by Chk1 and 14-3-3 proteins. *Molecular Biology of Cell* **12**: 551-563
- Lieber MR, Ma Y, Pannicke U, Schwarz K** (2004) The mechanism of vertebrate nonhomologous DNA end joining and its role in V(D)J recombination. *DNA Repair* **3**: 817-826
- Lien T, Knutsen G** (1979) Synchronous growth of *Chlamydomonas reinhardtii* (Chlorophyceae): a review of optimal conditions. *Journal of Phycology* **15**: 191-200
- Lilly JW, Maul JE, Stern DB** (2002) The *Chlamydomonas reinhardtii* organellar genomes respond transcriptionally and post-transcriptionally to abiotic stimuli. *Plant Cell* **14**: 2681-2706
- Lodish H, Berk A, Zipursky SL, Matsudaira P, Baltimore D, Darnell J** (1999) *Molecular cell biology*, Ed 4-th. W. H. Freeman and Company, New York
- Lörincz AT, Reed SI** (1984) Primary structure homology between the product of yeast cell division control gene CDC28 and vertebrate oncogenes. *Nature* **307**: 183-185
- Lundgren K, Walworth N, Booher R, Dembski M, Kirschner M, Beach D** (1991) *mik1* and *wee1* cooperate in the inhibitory tyrosine phosphorylation of *cdc2*. *Cell* **64**: 1111-1122
- Magyar Z, Meszaros T, Miskolczi P, Deak M, Feher A, Brown S, Kondorosi E, Athanasiadis A, Pongor S, Bilgin M, Bako L, Koncz C, Dudits D** (1997) Cell cycle

- phase specificity of putative cyclin-dependent kinase variants in synchronized alfalfa cells. *Plant Cell* **9**: 223-235
- Makela TP, Tassan JP, Nigg EA, Frutiger S, Hughes GJ, Weinberg RA** (1994) A cyclin associated with the CDK-activating kinase MO15. *Nature* **371**: 254-257
- Martin NC, Goodenough UW** (1975) Gametic differentiation in *Chlamydomonas reinhardtii*. I. Production of gametes and their fine structure. *Journal of Cell Biology* **67**: 587-605
- Matsuoka S, Huang M, Elledge SJ** (1998) Linkage of ATM to cell cycle regulation by the Chk2 protein kinase. *Science* **282**: 1893-1897
- Maul JE, Lilly JW, Cui L, dePamphilis CW, Miller W, Harris EH, Stern DB** (2002) The *Chlamydomonas reinhardtii* plastid chromosome: islands of genes in a sea of repeats. *Plant Cell* **14**: 2659-2679
- McGowan CH, Russell P** (1995) Cell cycle regulation of human WEE1. *EMBO Journal* **14**: 2166-2175.
- Mendenhall MD** (1998) Cyclin-dependent kinase inhibitors of *Saccharomyces cerevisiae* and *Schizosaccharomyces pombe*. *Current Topics in Microbiology and Immunology* **227**: 1-24
- Mendenhall MD, Hodge AE** (1998) Regulation of Cdc28 cyclin-dependent protein kinase activity during the cell cycle of the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Microbiology and Molecular Biology Reviews* **62**: 1191-1243
- Menges M, de Jager SM, Gruissem W, Murray JAH** (2005) Global analysis of the core cell cycle regulators of *Arabidopsis* identifies novel genes, reveals multiple and highly specific profiles of expression and provides a coherent model for plant cell cycle control. *Plant Journal* **41**: 546-566
- Menges M, Hennig L, Gruissem W, Murray JAH** (2003) Genome-wide gene expression in an *Arabidopsis* cell suspension. *Plant Molecular Biology* **53**: 423-442
- Menges M, Murray JAH** (2002) Synchronous *Arabidopsis* suspension cultures for analysis of cell-cycle gene activity. *Plant Journal* **30**: 203-212
- Merchant SS, Prochnik SE, Vallon O, Harris EH, Karpowicz SJ, Witman GB, Terry A, Salamov A, Fritz-Laylin LK, Marechal-Drouard L, Marshall WF, Qu L-H, Nelson DR, Sanderfoot AA, Spalding MH, Kapitonov VV, Ren Q, Ferris P, Lindquist E, Shapiro H, Lucas SM, Grimwood J, Schmutz J, Cardol P, Cerutti H, Chanfreau G, Chen C-L, Cognat V, Croft MT, Dent R, Dutcher S, Fernandez E, Fukuzawa H, Gonzalez-Ballester D, Gonzalez-Halphen D, Hallmann A, Hanikenne M, Hippler M, Inwood W, Jabbari K, Kalanon M, Kuras R, Lefebvre PA, Lemaire SD, Lobanov AV, Lohr M, Manuell A, Meier I, Mets L, Mittag M, Mittelmeier T, Moroney JV, Moseley J, Napoli C, Nedelcu AM, Niyogi K, Novoselov SV, Paulsen IT, Pazour G, Purton S, Ral J-P, Riano-Pachon DM, Riekhof W, Rymarquis L, Schroda M, Stern D, Umen J, Willows R, Wilson N, Zimmer SL, Allmer J, Balk J, Bisova K, Chen C-J, Elias M, Gendler K, Hauser C, Lamb MR, Ledford H, Long JC, Minagawa J, Page MD, Pan J, Pootakham W, Roje S, Rose A, Stahlberg E, Terauchi AM, Yang P, Ball S, Bowler C, Dieckmann CL, Gladyshev VN, Green P, Jorgensen R, Mayfield S, Mueller-Roeber B, Rajamani S, Sayre RT, Brokstein P, Dubchak I, Goodstein D, Hornick L, Huang YW, Jhaveri J, Luo Y, Martinez D, Ngau WCA, Otilar B, Poliakov A, Porter A, Szajkowski L, Werner G, Zhou K, Grigoriev IV, Rokhsar DS, Grossman AR** (2007) The *Chlamydomonas* genome reveals the evolution of key animal and plant functions. *Science* **318**: 245-250

- Meskiene I, Bogre L, Dahl M, Pirck M, Ha DT, Swoboda I, Heberle-Bors E, Ammerer G, Hirt H** (1995) CycMs3, a novel B-type alfalfa cyclin gene, is induced in the G0-to-G1 transition of the cell cycle. *Plant Cell* **7**: 759-771
- Meszaros T, Miskolczi P, Ayaydin F, Pettko-Szandtner A, Peres A, Magyar Z., Horvath GV, Bako L, Feher A, Dudits D** (2000) Multiple cyclin-dependent kinase complexes and phosphatases control G2/M progression in alfalfa cells. *Plant Molecular Biology* **43**: 595-605
- Michael WM, Newport J** (1998) Coupling of mitosis to the completion of S phase through Cdc34-mediated degradation of Wee 1. *Science* **282**: 1886-1889
- Michaelis G, Vahrenholz C, Pratje E** (1990) Mitochondrial DNA of *Chlamydomonas reinhardtii*: the gene for apocytochrome b and the complete functional map of the 15.8 kb DNA. *Molecular and General Genetics* **223**: 211-216
- Mironov V, De Veylder L, Van Montagu M, Inze D** (1999) Cyclin-dependent kinases and cell division in plants - the nexus. *Plant Cell* **11**: 509-529
- Mitchell BF, Graziano MR** (2006) From organelle to protein gel: a 6-wk laboratory project on flagellar proteins. *CBE - Life Sciences Education* **5**: 239-246
- Mizunuma M, Hirata D, Miyahara K, Tsuchiya E, Miyakawa T** (1998) Role of calcineurin and Mpk1 in regulating the onset of mitosis in budding yeast. *Nature* **392**: 303-306
- Moreno S, Hayles J, Nurse P** (1989) Regulation of the cell cycle timing of mitosis. *Journal of Cell Science. Supplement* **12**: 1-8.
- Moreno S, Nurse P** (1994) Regulation of progression through the G1 phase of the cell cycle by the rum1⁺ gene. *Nature* **367**: 236-242
- Morgan DO** (1995) Principles of CDK regulation. *Nature* **374**: 131-134
- Morgan DO** (1997) Cyclin-dependent kinases: engines, clocks, and microprocessors. *Annual Review of Cell and Developmental Biology* **13**: 261-291
- Morris MC, Kaiser P, Rudyak S, Baskerville C, Watson MH, Reed SI** (2003) Cks1-dependent proteasome recruitment and activation of CDC20 transcription in budding yeast. *Nature* **423**: 1009-1013
- Moser BA, Brondello JM, Baber-Furnari B, Russell P** (2000) Mechanism of caffeine-induced checkpoint override in fission yeast. *Molecular Cell Biology* **20**: 4288-4294
- Mueller PR, Coleman TR, Dunphy WG** (1995) Cell cycle regulation of a *Xenopus* Wee1-like kinase. *Molecular Biology of Cell* **6**: 119-134
- Mueller PR, Coleman TR, Kumagai A, Dunphy WG** (1995) Myt1 - a membrane-associated inhibitory kinase that phosphorylates Cdc2 on both threonine-14 and tyrosine-15. *Science* **270**: 86-90
- Muller FW, Igloi GL, Beck CF** (1992) Structure of a gene encoding heat-shock protein HSP70 from the unicellular alga *Chlamydomonas reinhardtii*. *Gene*, **111**: 165-173
- Murray AW** (2004) Recycling the cell cycle: cyclins revisited. *Cell* **116**: 221-234
- Nakagami H, Kawamura K, Sugisaka K, Sekine M, Shinmyo A** (2002) Phosphorylation of retinoblastoma-related protein by the cyclin D/cyclin-dependent kinase complex is activated at the G1/S-phase transition in tobacco. *Plant Cell* **14**: 1847-1857
- Nakayama K, Nakayama K** (1998) Cip/Kip cyclin-dependent kinase inhibitors: brakes of the cell cycle engine during development. *BioEssays* **20**: 1020-1029.
- Nasmyth K** (1995) The yeast cell cycle. I.M.P. Scientific Report: 39-42
- Nasmyth K** (1996) At the heart of the budding yeast cell cycle. *Trends in Genetics* **12**: 405-412
- Nedelcu AM, Lee RW, Lemieux C, Gray MW, Burger G** (2000) The complete mitochondrial DNA sequence of *Scenedesmus obliquus* reflects an intermediate stage

- in the evolution of the green algal mitochondrial genome. *Genome Research* **10**: 819-831
- Nigg EA** (1996) Cyclin-dependent kinase 7: at the cross-roads of transcription, DNA repair and cell cycle control? *Current Opinion in Cell Biology* **8**: 312-317.
- Nishizawa M, Kawasumi M, Fujino M, Toh-e A** (1998) Phosphorylation of sic1, a cyclin-dependent kinase (Cdk) inhibitor, by Cdk including Pho85 kinase is required for its prompt degradation. *Molecular Biology of Cell* **9**: 2393-2405
- Noble MEM, Endicott JA, Brown NR, Johnson LN** (1997) The cyclin box fold: protein recognition in cell-cycle and transcription control. *Trends in Biochemical Sciences* **22**: 482-487
- Nurse P, Bissett Y** (1981) Gene required in G1 for commitment to cell cycle and in G2 control of mitosis in fission yeast. *Nature* **292**: 558-560
- Nurse P, Thuriaux P** (1980) Regulatory genes controlling mitosis in the fission yeast *Schizosaccharomyces pombe*. *Genetics* **96**: 627-637
- O'Connell MJ, Raleigh JM, Verkade HM, Nurse P** (1997) Chk1 is a wee1 kinase in the G2 DNA damage checkpoint inhibiting cdc2 by Y15 phosphorylation. *EMBO Journal* **16**: 545-554
- O'Connell MJ, Walworth NC, Carr AM** (2000) The G2-phase DNA-damage checkpoint. *Trends in Cell Biology* **10**: 296-303
- Oakenfull EA, Riou-Khamlichi C, Murray JA** (2002) Plant D-type cyclins and the control of G1 progression. *Philosophical Transaction of Royal Society of London, Section B: Biological Sciences* **357**: 749-760
- Oldenhof H, Bišová K, van den Ende H, Zachleder V** (2004) Effect of red and blue light on the timing of cyclin-dependent kinase activity and the timing of cell division in *Chlamydomonas reinhardtii*. *Plant Physiology and Biochemistry* **42**: 341-348
- Painter RB, Young BR** (1980) Radiosensitivity in ataxia-telangiectasia: a new explanation. *Proceedings of National Academy of Sciences of United States of America* **77**: 7315-7317
- Pal G, Paraz MTZ, Kellogg DR** (2008) Regulation of Mih1/Cdc25 by protein phosphatase 2A and casein kinase 1. *Journal of Cell Biology* **180**: 931-945
- Palenik B, Grimwood J, Aerts A, Rouze P, Salamov A, Putnam N, Dupont C, Jorgensen R, Derelle E, Rombauts S, Zhou K, Otilar R, Merchant SS, Podell S, Gaasterland T, Napoli C, Gendler K, Manuell A, Tai V, Vallon O, Piganeau G, Jancek S, Heijde M, Jabbari K, Bowler C, Lohr M, Robbens S, Werner G, Dubchak I, Pazour GJ, Ren Q, Paulsen I, Delwiche C, Schmutz J, Rokhsar D, Van de Peer Y, Moreau H, Grigoriev IV** (2007) The tiny eukaryote *Ostreococcus* provides genomic insights into the paradox of plankton speciation. *Proceedings of National Academy of Sciences of United States of America* **104**: 7705-7710
- Parker LL, Piwnica-Worms H** (1992) Inactivation of the p34(Cdc2)-cyclin-B complex by the human Wee1 tyrosine kinase. *Science* **257**: 1955-1957
- Parker LL, Sylvestre PJ, Byrnes MJ, 3rd, Liu F, Piwnica-Worms H** (1995) Identification of a 95-kDa WEE1-like tyrosine kinase in HeLa cells. *Proceedings of National Academy of Sciences of United States of America* **92**: 9638-9642.
- Pasquale SM, Goodenough UW** (1987) Cyclic AMP functions as a primary sexual signal in gametes of *Chlamydomonas reinhardtii*. *Journal of Cell Biology* **105**: 2279-2292
- Paules RS, Levedakou EN, Wilson SJ, Innes CL, Rhodes N, Tlsty TD, Galloway DA, Donehower LA, Tainsky MA, Kaufmann WK** (1995) Defective G2 checkpoint function in cells from individuals with familial cancer syndromes. *Cancer Research* **55**: 1763-1773

- Pazour GJ, Agrin N, Walker BL, Witman GB** (2006) Identification of predicted human outer dynein arm genes: candidates for primary ciliary dyskinesia genes. *Journal of Medical Genetics* **43**: 62-73
- Pelayo HR, Lastres P, De la Torre C** (2001) Replication and G2 checkpoints: their response to caffeine. *Planta* **212**: 444-453
- Peng A, Lewellyn AL, Maller JL** (2007) Undamaged DNA transmits and enhances DNA damage checkpoint signals in early embryos. *Molecular Cell Biology* **27**: 6852-6862
- Pines J** (1991) Cyclins - wheels within wheels. *Cell Growth and Differentiation* **2**: 305-310
- Pines J** (1993) Cyclins and cyclin-dependent kinases - take your partners. *Trends in Biochemical Sciences* **18**: 195-197
- Pines J** (1995) Cyclins and cyclin-dependent kinases: a biochemical view. *Biochemical Journal* **308**: 697-711
- Pines J** (1995) Cyclins and cyclin-dependent kinases: theme and variations. *Advances in Cancer Research* **66**: 181-212
- Pines J** (1995) Cyclins, CDKs and cancer. *Seminars in Cancer Biology* **6**: 63-72
- Pombert JF, Beauchamp P, Otis C, Lemieux C, Turmel M** (2006) The complete mitochondrial DNA sequence of the green alga *Oltmannsiellopsis viridis*: evolutionary trends of the mitochondrial genome in the Ulvophyceae. *Current Genetics* **50**: 137-147
- Poon RYC, Chau MS, Yamashita K, Hunter T** (1997) The role of Cdc2 feedback loop control in the DNA damage checkpoint in mammalian cells. *Cancer Research* **57**: 5168-5178
- Porceddu A, Stals H, Reichheldt JP, Segers G, De Veylder L, Barroco RD, Casteels P, Van Montagu M, Inze D, Mironov V** (2001) A plant-specific cyclin-dependent kinase is involved in the control of G2/M progression in plants. *Journal of Biological Chemistry* **276**: 36354-36360
- Procházka S, Macháčková I, Křekule J, Šebánek J, kol.** (1998) *Fyziologie rostlin*. Academia, Praha
- Raleigh JM, O'Connell MJ** (2000) The G2 DNA damage checkpoint targets both Wee1 and Cdc25. *Journal of Cell Science* **113**: 1727-1736
- Randolphanderson BL, Boynton JE, Gillham NW, Harris EH, Johnson AM, Dorthu MP, Matagne RF** (1993) Further characterization of the respiratory deficient dum-1 mutation of *Chlamydomonas reinhardtii* and its use as a recipient for mitochondrial transformation. *Molecular and General Genetics* **236**: 235-244
- Reichheldt JP, Chaubet N, Shen WH, Renaudin JP, Gigot C** (1996) Multiple A-type cyclins express sequentially during the cell cycle in *Nicotiana tabacum* BY2 cells. *Proceedings of National Academy of Sciences of United States of America* **93**: 13819-13824
- Reichheldt JP, Vernoux T, Lardon F, Van Montagu M, Inze D** (1999) Specific checkpoints regulate plant cell cycle progression in response to oxidative stress. *Plant Journal* **17**: 647-656
- Renaudin JP, Doonan JH, Freeman D, Hashimoto J, Hirt H, Inze D, Jacobs T, Kouchi H, Rouze P, Sauter M, Savoure A, Sorrell DA, Sundaresan V, Murray JA** (1996) Plant cyclins: a unified nomenclature for plant A-, B- and D-type cyclins based on sequence organization. *Plant Molecular Biology* **32**: 1003-1018
- Rhind N** (2009) Changing of the guard: how ATM hands off DNA double-strand break signaling to ATR. *Molecular Cell* **33**: 672-674
- Rhind N, Russell P** (2001) Roles of the mitotic inhibitors Wee1 and Mik1 in the G(2) DNA damage and replication checkpoints. *Molecular and Cellular Biology* **21**: 1499-1508
- Riou-Khamlichi C, Huntley R, Jacquemard A, Murray JA** (1999) Cytokinin activation of *Arabidopsis* cell division through a D-type cyclin. *Science* **283**: 1541-1544

- Rohr J, Sarkar N, Balenger S, Jeong BR, Cerutti H** (2004) Tandem inverted repeat system for selection of effective transgenic RNAi strains in *Chlamydomonas*. *Plant Journal* **40**: 611-621
- Rupes I** (2002) Checking cell size in yeast. *Trends in Genetics* **18**: 479-485
- Russell P, Nurse P** (1986) Cdc25⁺ functions as an inducer in the mitotic control of fission yeast. *Cell* **45**: 145-153
- Russell P, Nurse P** (1987) Negative regulation of mitosis by wee1⁺, a gene encoding a protein kinase homolog. *Cell* **49**: 559-567.
- Sanchez Y, Wong C, Thoma RS, Richman R, Wu Z, Piwnica-Worms H, Elledge SJ** (1997) Conservation of the Chk1 checkpoint pathway in mammals: linkage of DNA damage to Cdk regulation through Cdc25. *Science* **277**: 1497-1501
- Sarkaria JN, Busby EC, Tibbetts RS, Roos P, Taya Y, Karnitz LM, Abraham RT** (1999) Inhibition of ATM and ATR kinase activities by the radiosensitizing agent, caffeine. *Cancer Research* **59**: 4375-4382
- Segers G, Gadisseur I, Bergounioux C, de Almeida Engler J, Jacquard A, Van Montagu M, Inze D** (1996) The *Arabidopsis* cyclin-dependent kinase gene cdc2bAt is preferentially expressed during S and G2 phases of the cell cycle. *Plant Journal* **10**: 601-612
- Shiekhatar R, Mermelstein F, Fisher RP, Drapkin R, Dynlacht B, Wessling HC, Morgan DO, Reinberg D** (1995) Cdk-activating kinase complex is a component of human transcription factor TFIIH. *Nature* **374**: 283-287
- Shiloh Y** (2006) The ATM-mediated DNA-damage response: taking shape. *Trends in Biochemical Sciences* **31**: 402-410
- Shimotohno A, Umeda-Hara C, Bisova K, Uchimiya H, Umeda M** (2004) The plant-specific kinase CDKF;1 is involved in activating phosphorylation of cyclin-dependent kinase-activating kinases in *Arabidopsis*. *Plant Cell* **16**: 2954-2966
- Shiotani B, Zou L** (2009) Single-stranded DNA orchestrates an ATM-to-ATR switch at DNA breaks. *Molecular Cell* **33**: 547-558
- Shiozaki K, Russell P** (1995) Cell-cycle control linked to extracellular environment by MAP kinase pathway in fission yeast. *Nature* **378**: 739-743
- Schlegel R, Pardee AB** (1986) Caffeine-induced uncoupling of mitosis from the completion of DNA replication in mammalian cells. *Science* **232**: 1264-1266
- Schnittger A, Schobinger U, Bouyer D, Weini C, Stierhof Y-D, Hulskamp M** (2002) Ectopic D-type cyclin expression induces not only DNA replication but also cell division in *Arabidopsis* trichomes. *Proceedings of National Academy of Sciences of United States of America* **99**: 6410-6415
- Siede W, Friedl AA, Dianova I, Eckardt-Schupp F, Friedberg EC** (1996) The *Saccharomyces cerevisiae* Ku autoantigen homologue affects radiosensitivity only in the absence of homologous recombination. *Genetics* **142**: 91-102
- Simanis V, Nurse P** (1986) The cell-cycle control gene Cdc2⁺ of fission yeast encodes a protein-kinase potentially regulated by phosphorylation. *Cell* **45**: 261-268
- Slaninová M, Nagyová B, Gálová E, Hendrychová J, Bišová K, Zachleder V, Vlček D** (2003) The alga *Chlamydomonas reinhardtii* UVS11 gene is responsible for cell division delay and temporal decrease in histone H1 kinase activity caused by UV irradiation. *DNA Repair* **2**: 737-750
- Smith DR, Lee RW** (2008) Nucleotide diversity in the mitochondrial and nuclear compartments of *Chlamydomonas reinhardtii*: investigating the origins of genome architecture. *BMC Evolutionary Biology* **8**: 156
- Sorensen CS, Syljuasen RG, Falck J, Schroeder T, Ronnstrand L, Khanna KK, Zhou BB, Bartek J, Lukas J** (2003) Chk1 regulates the S phase checkpoint by coupling the

- physiological turnover and ionizing radiation-induced accelerated proteolysis of Cdc25A. *Cancer Cell* **3**: 247-258
- Sorrell DA, Marchbank A, McMahon K, Dickinson JR, Rogers HJ, Francis D** (2002) A WEE1 homologue from *Arabidopsis thaliana*. *Planta* **215**: 518-522
- Sorrell DA, Menges M, Healy JMS, Deveaux Y, Amano C, Su Y, Nakagami H, Shinmyo A, Doonan JH, Sekine M, Murray JAH** (2001) Cell cycle regulation of cyclin-dependent kinases in tobacco cultivar bright yellow-2 cells. *Plant Physiology* **126**: 1214-1223
- Stals H, Casteels P, van Montagu M, Inzé D** (2000) Regulation of cyclin-dependent kinases in *Arabidopsis thaliana*. *Plant Molecular Biology* **43**: 583-593
- Stanford JS, Ruderman JV** (2005) Changes in regulatory phosphorylation of Cdc25C Ser287 and Wee1 Ser549 during normal cell cycle progression and checkpoint arrests. *Molecular Biology of Cell* **16**: 5749-5760
- Steinborn K, Maulbetsch C, Priester B, Trautmann S, Pacher T, Geiges B, Kuttner F, Lepiniec L, Stierhof YD, Schwarz H, Jurgens G, Mayer U** (2002) The *Arabidopsis* PILZ group genes encode tubulin-folding cofactor orthologs required for cell division but not cell growth. *Genes and Development* **16**: 959-971
- Strausfeld U, Fernandez A, Capony JP, Girard F, Lautredou N, Derancourt J, Labbe JC, Lamb NJ** (1994) Activation of p34^{cdc2} protein kinase by microinjection of human cdc25C into mammalian cells. Requirement for prior phosphorylation of cdc25C by p34^{cdc2} on sites phosphorylated at mitosis. *Journal of Biological Chemistry* **269**: 5989-6000
- Sueoka N** (1960) Mitotic replication of deoxyribonucleic acid in *Chlamydomonas reinhardtii*. *Proceedings of National Academy of Sciences of United States of America* **46**: 83-91
- Sun YJ, Dilkes BP, Zhang CS, Dante RA, Carneiro NP, Lowe KS, Jung R, Gordon-Kamm WJ, Larkins BA** (1999) Characterization of maize (*Zea mays* L.) Wee1 and its activity in developing endosperm. *Proceedings of National Academy of Sciences of United States of America* **96**: 4180-4185
- Sun YJ, Flannigan BA, Setter TL** (1999) Regulation of endoreduplication in maize (*Zea mays* L.) endosperm. Isolation of a novel B1-type cyclin and its quantitative analysis. *Plant Molecular Biology* **41**: 245-258
- Šetlík I, Berková E, Doucha J, Kubín S, Vendlová J, Zachleder V** (1972) The coupling of synthetic and reproduction processes in *Scenedesmus quadricauda*. *Archives of Hydrobiology, Algological Studies* **7**: 172-217
- Šetlík I, Zachleder V** (1984) The multiple fission cell reproductive patterns in algae. In P Nurse, E Streblová, eds, *The Microbial Cell Cycle*. CRC Press Inc., Boca Raton, Florida USA., pp 253-279
- Tassan JP, Jaquenoud M, Fry AM, Frutiger S, Hughes GJ, Nigg EA** (1995) In vitro assembly of a functional human CDK7-cyclin H complex requires MAT1, a novel 36 kDa RING finger protein. *EMBO Journal* **14**: 5608-5617
- Taylor EW** (1965) The mechanism of colchicine inhibition of mitosis. I. Kinetics of inhibition and the binding of H3-colchicine. *Journal of Cell Biology* **25**: 267-275
- Tibbetts RS, Cortez D, Brumbaugh KM, Scully R, Livingston D, Elledge SJ, Abraham RT** (2000) Functional interactions between BRCA1 and the checkpoint kinase ATR during genotoxic stress. *Genes and Development* **14**: 2989-3002
- Towbin H, Staehelin T, Gordon J** (1979) Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: Procedure and some applications. *Proceedings of National Academy of Sciences of United States of America* **76**: 4350-4354

- Umeda M, Bhalerao RP, Schell J, Uchimiya H, Koncz C** (1998) A distinct cyclin-dependent kinase-activating kinase of *Arabidopsis thaliana*. Proceedings of National Academy of Sciences of United States of America **95**: 5021-5026
- Umeda M, Iwamoto N, Umeda-Hara C, Yamaguchi M, Hashimoto J, Uchimiya H** (1999) Molecular characterization of mitotic cyclins in rice plants. Molecular and General Genetics **262**: 230-238
- Umeda M, Shimotohno A, Yamaguchi M** (2005) Control of cell division and transcription by cyclin-dependent kinase-activating kinases in plants. Plant and Cell Physiology **46**: 1437-1442
- Umeda M, Umeda-Hara C, Uchimiya H** (2000) A cyclin-dependent kinase-activating kinase regulates differentiation of root initial cells in *Arabidopsis*. Proceedings of National Academy of Sciences of United States of America **97**: 13396-13400
- Umeda M, Umeda-Hara C, Yamaguchi M, Hashimoto J, Uchimiya H** (1999) Differential expression of genes for cyclin-dependent protein kinases in rice plants. Plant Physiology **119**: 31-40
- Vandepoele K, Raes J, De Veylder L, Rouze P, Rombauts S, Inze D** (2002) Genome-wide analysis of core cell cycle genes in *Arabidopsis*. Plant Cell **14**: 903-916
- Vandepoele K, Vlieghe K, Florquin K, Hennig L, Beemster GTS, Gruijssem W, Van de Peer Y, Inze D, De Veylder L** (2005) Genome-wide identification of potential plant E2F target genes. Plant Physiology **139**: 316-328
- Verkest A, de O. Manes C-L-, Vercruyssen S, Maes S, van der Schueren E, Beeckman T, Genschik P, Kuiper M, Inze D, De Veylder L** (2005) The cyclin-dependent kinase inhibitor KRP2 controls the onset of the endoreduplication cycle during *Arabidopsis* leaf development through inhibition of mitotic CDKA;1 kinase complexes. Plant Cell **17**: 1723-1736
- Vermeulen K, Van Bockstaele DR, Berneman ZN** (2003) The cell cycle: a review of regulation, deregulation and therapeutic targets in cancer. Cell Proliferation **36**: 131-149
- Vilchez C, Garbayo I, Markvicheva E, Galvan F, Leon R** (2001) Studies on the suitability of alginate-entrapped *Chlamydomonas reinhardtii* cells for sustaining nitrate consumption processes. Bioresource Technology **78**: 55-61
- Vítová M, Hendrychová J, Čížková M, Cepák V, Umen JG, Zachleder V, Bišová K** (2008) Accumulation, activity and localization of cell cycle regulatory proteins and the chloroplast division protein FtsZ in the alga *Scenedesmus quadricauda* under inhibition of nuclear DNA replication. Plant and Cell Physiology **49**: 1805-1817
- Vlach J, Hennecke S, Amati B** (1997) Phosphorylation-dependent degradation of the cyclin-dependent kinase inhibitor p27Kip1. EMBO Journal **16**: 5334-5344
- Vlček D, Ševčovičová A, Sviežená B, Gálová E, Miadoková E** (2008) *Chlamydomonas reinhardtii*: a convenient model system for the study of DNA repair in photoautotrophic eukaryotes. Current Genetics **53**: 1-22
- Wang G, Kong H, Sun Y, Zhang X, Zhang W, Altman N, dePamphilis CW, Ma H** (2004) Genome-wide analysis of the cyclin family in *Arabidopsis* and comparative phylogenetic analysis of plant cyclin-like proteins. Plant Physiology **135**: 1084-1099
- Wang G, Miskimins R, Miskimins WK** (1999) The cyclin-dependent kinase inhibitor p27(Kip1) is localized to the cytosol in Swiss/3T3 cells. Oncogene **18**: 5204-5210
- Wang H, Fowke LC, Crosby WL** (1997) A plant cyclin-dependent kinase inhibitor gene. Nature **386**: 451-452
- Wang H, Qi Q, Schorr P, Cutler A, Crosby W, Fowke L** (1998) ICK1, a cyclin-dependent protein kinase inhibitor from *Arabidopsis thaliana* interacts with both Cdc2a and CycD3, and its expression is induced by abscisic acid. Plant Journal **15**: 501-510

- Wang W, Chen X** (2004) HUA enhancer3 reveals a role for a cyclin-dependent protein kinase in the specification of floral organ identity in *Arabidopsis*. *Development* **131**: 3147-3156
- Watanabe N, Broome M, Hunter T** (1995) Regulation of the human WEE1Hu CDK tyrosine 15-kinase during the cell cycle. *EMBO Journal* **14**: 1878-1891.
- Weinert TA, Hartwell LH** (1988) The RAD9 gene controls the cell cycle response to DNA damage in *Saccharomyces cerevisiae*. *Science* **241**: 317-322
- Weinert TA, Hartwell LH** (1993) Cell cycle arrest of cdc mutants and specificity of the RAD9 checkpoint. *Genetics* **134**: 63-80
- Weingartner M, Binarova P, Drykova D, Schweighofer A, David JP, Heberle-Bors E, Doonan J, Bogre L** (2001) Dynamic recruitment of Cdc2 to specific microtubule structures during mitosis. *Plant Cell* **13**: 1929-1943
- Weingartner M, Pelayo HR, Binarova P, Zwerger K, Melikant B, de la Torre C, Heberle-Bors E, Bogre L** (2003) A plant cyclin B2 is degraded early in mitosis and its ectopic expression shortens G2-phase and alleviates the DNA-damage checkpoint. *Journal of Cell Science* **116**: 487-498
- Weinl C, Marquardt S, Kuijt SJH, Nowack MK, Jakoby MJ, Hulskamp M, Schnittger A** (2005) Novel functions of plant cyclin-dependent kinase inhibitors, ICK1/KRP1, can act non-cell-autonomously and inhibit entry into mitosis. *Plant Cell* **17**: 1704-1722
- Weissig H, Beck CF** (1991) Action spectrum for the light-dependent step in gametic differentiation of *Chlamydomonas reinhardtii*. *Plant Physiology* **97**: 118-121
- Wurtz EA, Boynton JE, Gillham NW** (1977) Perturbation of chloroplast DNA amounts and chloroplast gene transmission in *Chlamydomonas reinhardtii* by 5-fluorodeoxyuridine. *Proceedings of National Academy of Sciences of United States of America* **74**: 4552-4556
- Wurtz EA, Sears BB, Rabert DK, Shepherd HS, Gillham NW, Boynton JE** (1979) A specific increase in chloroplast gene mutations following growth of *Chlamydomonas* in 5-fluorodeoxyuridine. *Molecular and General Genetics* **170**: 235-242
- Wyman C, Ristic D, Kanaar R** (2004) Homologous recombination-mediated double-strand break repair. *DNA Repair* **3**: 827-833
- Yamaguchi M, Fabian T, Sauter M, Bhalerao RP, Schrader J, Sandberg G, Umeda M, Uchimiya H** (2000) Activation of CDK-activating kinase is dependent on interaction with H-type cyclins in plants. *Plant Journal* **24**: 11-20
- Yamaguchi M, Kato H, Yoshida S, Yamamura S, Uchimiya H, Umeda M** (2003) Control of in vitro organogenesis by cyclin-dependent kinase activities in plants. *Proceedings of National Academy of Sciences of United States of America* **100**: 8019-8023
- Yoo HY, Kumagai A, Shevchenko A, Dunphy WG** (2004) Adaptation of a DNA replication checkpoint response depends upon inactivation of Claspin by the Polo-like kinase. *Cell* **117**: 575-588
- Zachleder V** (1983) Timing of cell cycle events under different irradiances in *Scenedesmus quadricauda*. *Progress in Cell Cycle Controls*: 219-222
- Zachleder V** (1994) The effect of hydroxyurea and fluorodeoxyuridine on cell cycle events in the chlorococcal alga *Scenedesmus quadricauda* (Chlorophyta). *Journal of Phycology* **30**: 274-279
- Zachleder V** (1995) Regulation of growth processes during the cell cycle of the chlorococcal alga *Scenedesmus quadricauda* under a DNA replication block. *Journal of Phycology* **30**: 941-947
- Zachleder V** (1997) The course of reproductive events in the chloroplast cycle of the chlorococcal alga *Scenedesmus quadricauda* as revealed by using inhibitors of DNA replication. *Plant and Cell Physiology* **38**: 56

- Zachleder V, Bišová K, Vítová M, Kubín S, Hendrychová J** (2002) Variety of cell cycle patterns in the alga *Scenedesmus quadricauda* (Chlorophyta) as revealed by application of illumination regimes and inhibitors. *European Journal of Phycology* **37**: 361-371
- Zachleder V, Kawano S, Kuroiwa T** (1996) Uncoupling of chloroplast reproductive events from cell cycle division processes by 5-fluorodeoxyuridine in the alga *Scenedesmus quadricauda*. *Protoplasma* **192**: 228-234
- Zachleder V, Schäfli O, Boschetti A** (1997) Growth-controlled oscillation in activity of histone H1 kinase during the cell cycle of *Chlamydomonas reinhardtii* (Chlorophyta). *Journal of Phycology* **33**: 673-681
- Zachleder V, Šetlík I** (1982) Effect of irradiance on the course of RNA synthesis in the cell cycle of *Scenedesmus quadricauda*. *Biologia Plantarum* **24**: 341-353
- Zachleder V, Šetlík I** (1990) Timing of events in overlapping cell reproductive sequences and their mutual interactions in the alga *Scenedesmus quadricauda*. *Journal of Cell Science* **97**: 631-638
- Zachleder V, van den Ende H** (1992) Cell-cycle events in the green-alga *Chlamydomonas-eugametos* and their control by environmental-factors. *Journal of Cell Science* **102**: 469-474
- Zhang K, Letham DS, John PCL** (1996) Cytokinin controls the cell cycle at mitosis by stimulating the tyrosine dephosphorylation and activation of p34^{cdc2}-like H1 histone kinase. *Planta* **200**: 2-12
- Zhao H, Watkins JL, Piwnica-Worms H** (2002) Disruption of the checkpoint kinase 1/cell division cycle 25A pathway abrogates ionizing radiation-induced S and G2 checkpoints. *Proceedings of National Academy of Sciences of United States of America* **99**: 14795-14800
- Zhou BB, Elledge SJ** (2000) The DNA damage response: putting checkpoints in perspective. *Nature* **408**: 433-439
- Zhou BB, Chaturvedi P, Spring K, Scott SP, Johanson RA, Mishra R, Mattern MR, Winkler JD, Khanna KK** (2000) Caffeine abolishes the mammalian G2/M DNA damage checkpoint by inhibiting ataxia-telangiectasia-mutated kinase activity. *Journal of Biological Chemistry* **275**: 10342-10348
- Zhou Y, Fowke LC, Wang H** (2002) Plant CDK inhibitors: studies of interactions with cell cycle regulators in the yeast two-hybrid system and functional comparisons in transgenic *Arabidopsis* plants. *Plant Cell Reports* **20**: 967-975
- Zhou Y, Wang H, Gilmer S, Whitwill S, Fowke LC** (2003) Effects of co-expressing the plant CDK inhibitor ICK1 and D-type cyclin genes on plant growth, cell size and ploidy in *Arabidopsis thaliana*. *Planta* **216**: 604-613

DNA Damage during G2 Phase Does Not Affect Cell Cycle Progression of the Green Alga *Scenedesmus quadricauda*

Monika Hlavová ^{1,2*}, Mária Čížková ^{1*}, Milada Vítová ¹, Kateřina Bišová ^{1*}, Vilém Zachleder ¹

1 Laboratory of Cell Cycles of Algae, Institute of Microbiology, ASCR, Třeboň, Czech Republic, **2** Faculty of Science, University of South Bohemia, České Budějovice, Czech Republic

Abstract

DNA damage is a threat to genomic integrity in all living organisms. Plants and green algae are particularly susceptible to DNA damage especially that caused by UV light, due to their light dependency for photosynthesis. For survival of a plant, and other eukaryotic cells, it is essential for an organism to continuously check the integrity of its genetic material and, when damaged, to repair it immediately. Cells therefore utilize a DNA damage response pathway that is responsible for sensing, reacting to and repairing damaged DNA. We have studied the effect of 5-fluorodeoxyuridine, zeocin, caffeine and combinations of these on the cell cycle of the green alga *Scenedesmus quadricauda*. The cells delayed S phase and underwent a permanent G2 phase block if DNA metabolism was affected prior to S phase; the G2 phase block imposed by zeocin was partially abolished by caffeine. No cell cycle block was observed if the treatment with zeocin occurred in G2 phase and the cells divided normally. CDKA and CDKB kinases regulate mitosis in *S. quadricauda*; their kinase activities were inhibited by Wee1. CDKA, CDKB protein levels were stabilized in the presence of zeocin. In contrast, the protein level of Wee1 was unaffected by DNA perturbing treatments. Wee1 therefore does not appear to be involved in the DNA damage response in *S. quadricauda*. Our results imply a specific reaction to DNA damage in *S. quadricauda*, with no cell cycle arrest, after experiencing DNA damage during G2 phase.

citation: Hlavová M, Čížková M, Vítová M, Bišová K, Zachleder V (2011) DNA Damage during G2 Phase Does Not Affect Cell Cycle Progression of the Green Alga *Scenedesmus quadricauda*. PLoS ONE 6(5): e19626. doi:10.1371/journal.pone.0019626

Editor: Arthur J. Lustig, Tulane University Health Sciences Center, United States of America

Received November 10, 2010; **Accepted** April 11, 2011; **Published** May 16, 2011

Copyright: © 2011 Hlavová et al. This is an open-access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License, which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original author and source are credited.

Funding: This work was financially supported by the Grant Agency of the Academy of Sciences of the Czech Republic (grant numbers A500200614, M200200904); the Grant Agency of the Czech Republic (grant numbers 204/09/0111, and 525/09/0102), and the Institutional Research Concept (number AV0Z50200510) funded by the Academy of Sciences of the Czech Republic. The funders had no role in study design, data collection and analysis, decision to publish, or preparation of the manuscript.

Competing Interests: The authors have declared that no competing interests exist.

* E-mail: bisova@alga.cz

♦ These authors contributed equally to this work.

Abstrakt:

Pre všetky živé organizmy predstavuje poškodenie DNA ohrozenie ich genómovej integrity. Predovšetkým rastliny a zelené riasy sú náchylné k poškodeniu DNA hlavne v dôsledku UV žiarenia, čo súvisí s ich závislosťou na fotosyntéze. Pre prežitie rastlín ako aj ďalších eukaryotických buniek je esenciálna neustála kontrola integrity ich genetického materiálu a okamžitá oprava v prípade jeho poškodenia. Preto majú bunky vyvinutú dráhu odpovede na poškodenie DNA, ktorá je zodpovedná za rozpoznanie, reakciu a reparáciu poškodenej DNA. V našej štúdii sme sledovali efekt 5-fluorodeoxyuridínu, zeocínu, kofeínu a ich kombinácie na bunkový cyklus zelenej riasy *Scenedesmus quadricauda*. Ak bol metabolizmus DNA ovplyvnený pred S fázou bunkového cyklu došlo v bunkách k oneskoreniu S fázy a zablokovaniu v G2 fáze. Zablokovanie v G2 fáze spôsobené zeocínom bolo čiastočne prekonané účinkom kofeínu. Ak boli bunky ovplyvnené zeocínom v G2 fáze nebolo nepozorované žiadne zastavenie bunkového cyklu, delenie buniek prebehlo normálne. Aktivita kináz CdkA a CdkB, ktoré regulujú mitózu v bunkách *S. quadricauda*, bola inhibovaná Wee1. Hladina proteínov CdkA a CdkB bola stabilizovaná v prítomnosti zeocínu. Naopak, hladina proteínu Wee1 nebola ovplyvnená prítomnosťou činidla poškodzujúceho DNA. Zdá sa, že Wee1 nie je zahrnutá v odpovedi na DNA poškodenie u *S. quadricauda*. Naše výsledky naznačujú existenciu špecifickej reakcie buniek *S. quadricauda* na poškodenie DNA, počas ktorej nedochádza k zastaveniu bunkového cyklu po poškodení DNA počas G2 fázy.