



evropský  
sociální  
fond v ČR



EVROPSKÁ UNIE



MINISTERSTVO ŠKOLSTVÍ,  
MLÁDEŽE A TĚLOVÝCHOVY



OP Vzdělávání  
pro konkurenceschopnost

INVESTICE  
DO ROZVOJE  
VZDĚLÁVÁNÍ

# Enhancement of the spectrum of investigated mutations within predictive diagnostic of GISTs

Romana Vaňková

Propojení výuky oborů Molekulární a buněčné biologie a Ochrany a tvorby životního prostředí OPVK  
(CZ.1.07/2.2.00/28.0032)



evropský  
sociální  
fond v ČR



EVROPSKÁ UNIE



MINISTERSTVO ŠKOLSTVÍ,  
MLÁDEŽE A TĚLOVÝCHOVY



OP Vzdělávání  
pro konkurenceschopnost

INVESTICE  
DO ROZVOJE  
VZDĚLÁVÁNÍ

# Gastrointestinal stromal tumors (GISTs)

- primary mesenchymal stromal tumor
- originate from the interstitial cells of Cayall or MSC
- develop anywhere along the gastrointestinal (GI) tract (mostly stomach, small intestine)
- highly resistant to both chemotherapy and radiotherapy
- common activating mutation of KIT and PDGFRA (<90%) , less BRAF





evropský  
sociální  
fond v ČR



EVROPSKÁ UNIE



MINISTERSTVO ŠKOLSTVÍ,  
MLÁDEŽE A TĚLOVÝCHOVY

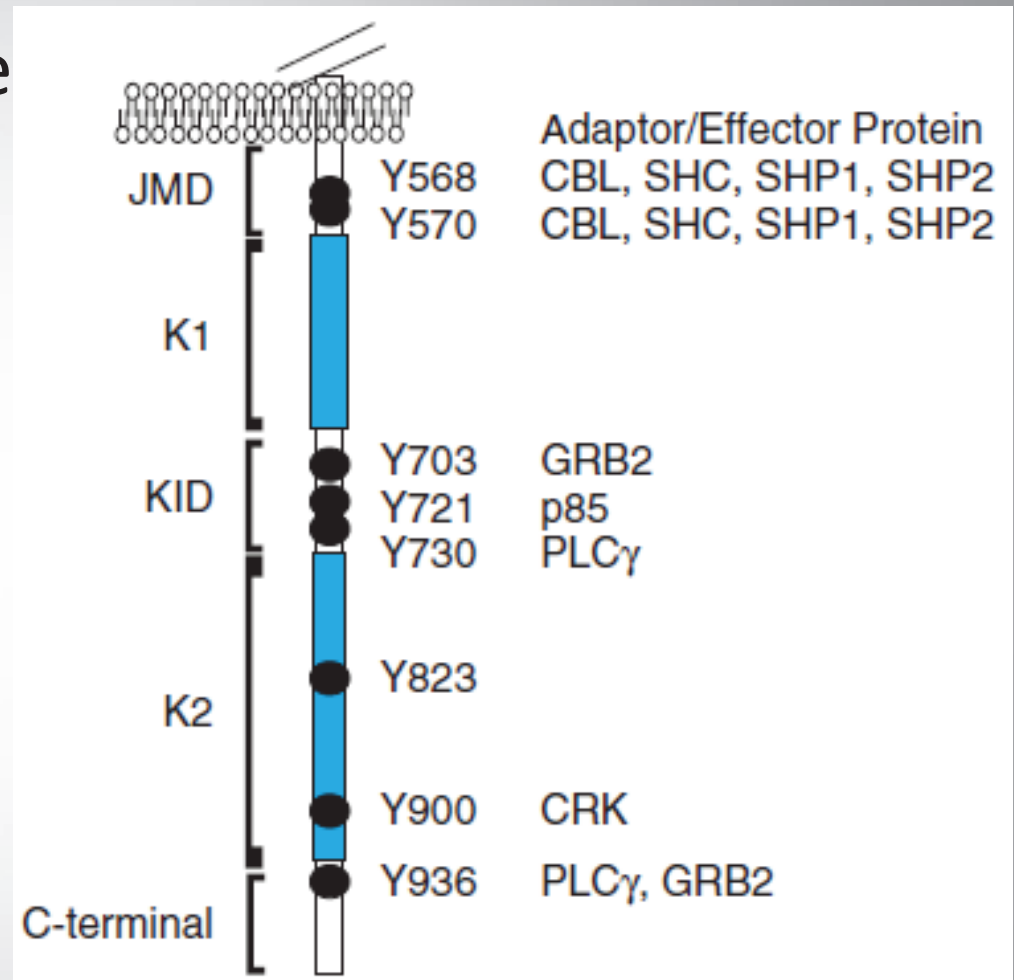


OP Vzdělávání  
pro konkurenceschopnost

INVESTICE  
DO ROZVOJE  
VZDĚLÁVÁNÍ

# C-KIT

- receptor tyrosine kinase (CD117)
- chromosome 4
- 21 exons
- 976 AK, 110 kDa
- cell growth
- proliferacion
- disruption of communication pathways



JMD – juxtamembrane domain,  
K1 and K2 - the split kinase domains,  
KID - the kinase insert domain.



evropský  
sociální  
fond v ČR



EVROPSKÁ UNIE



MINISTERSTVO ŠKOLSTVÍ,  
MLÁDEŽE A TĚLOVÝCHOVY

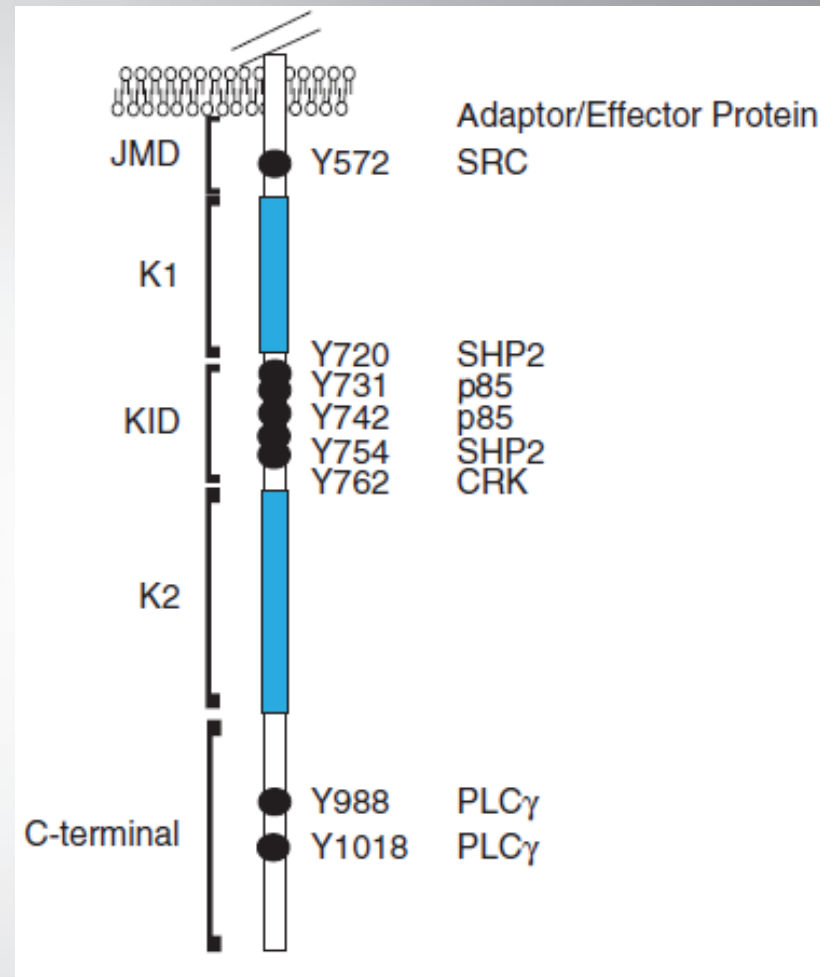


OP Vzdělávání  
pro konkurenceschopnost

INVESTICE  
DO ROZVOJE  
VZDĚLÁVÁNÍ

# PDGFR $\alpha$

- tyrosine kinase
- platelet-derived growth factor receptor  $\alpha$
- chromosome 4
- 23 exons
- 1089 AA, 123 kDa
- cell growth
- cell division
- angiogenesis
- proliferation



JMD – juxtamembrane domain,  
K1 and K2 - the split kinase domains,  
KID - the kinase insert domain.



evropský  
sociální  
fond v ČR



EVROPSKÁ UNIE

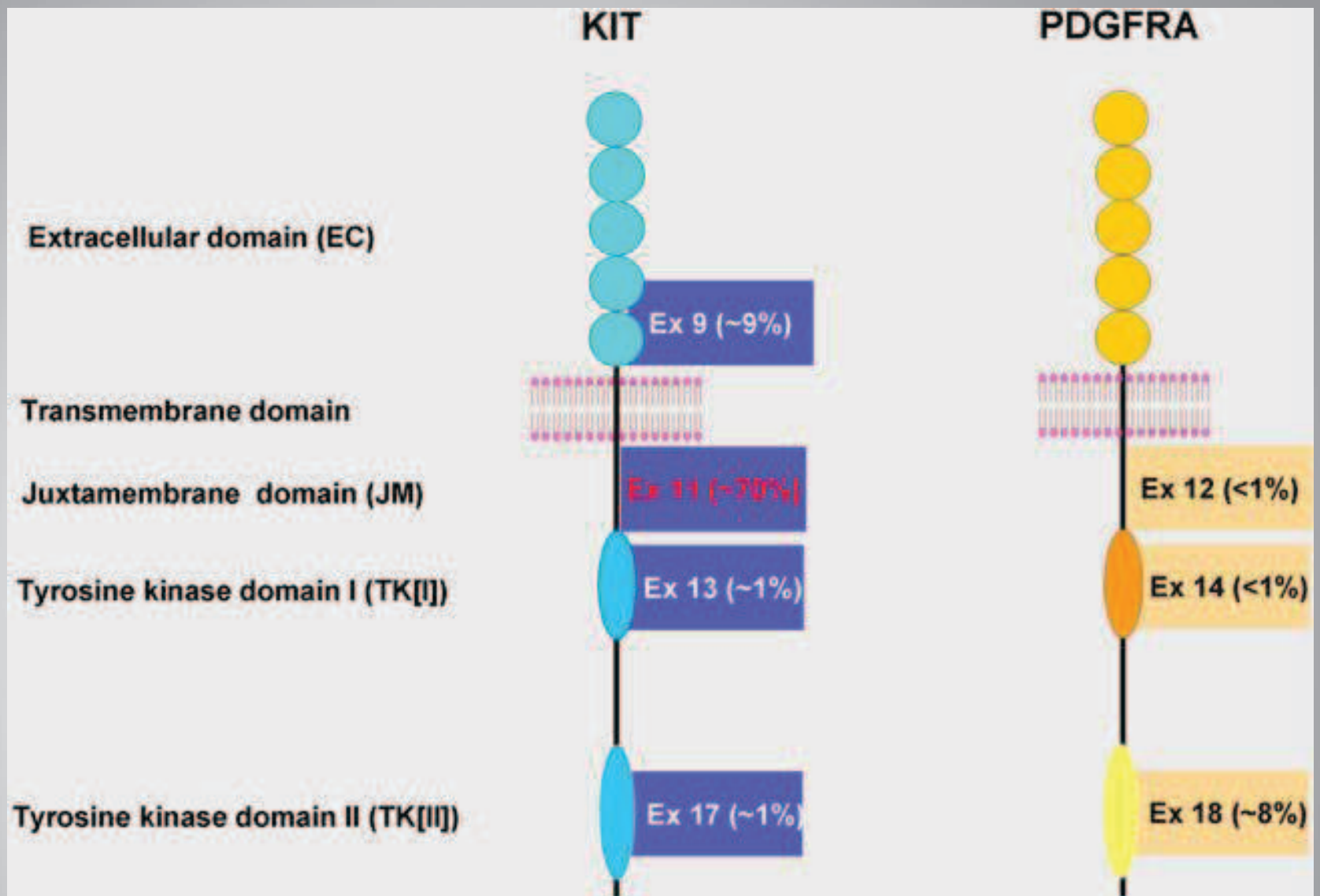


MINISTERSTVO ŠKOLSTVÍ,  
MLÁDEŽE A TĚLOVÝCHOVY



OP Vzdělávání  
pro konkurenceschopnost

INVESTICE  
DO ROZVOJE  
VZDĚLÁVÁNÍ



Schematic structure of KIT and PDGFRA receptor tyrosine kinases and distribution of most common mutations in GIST





evropský  
sociální  
fond v ČR



EVROPSKÁ UNIE



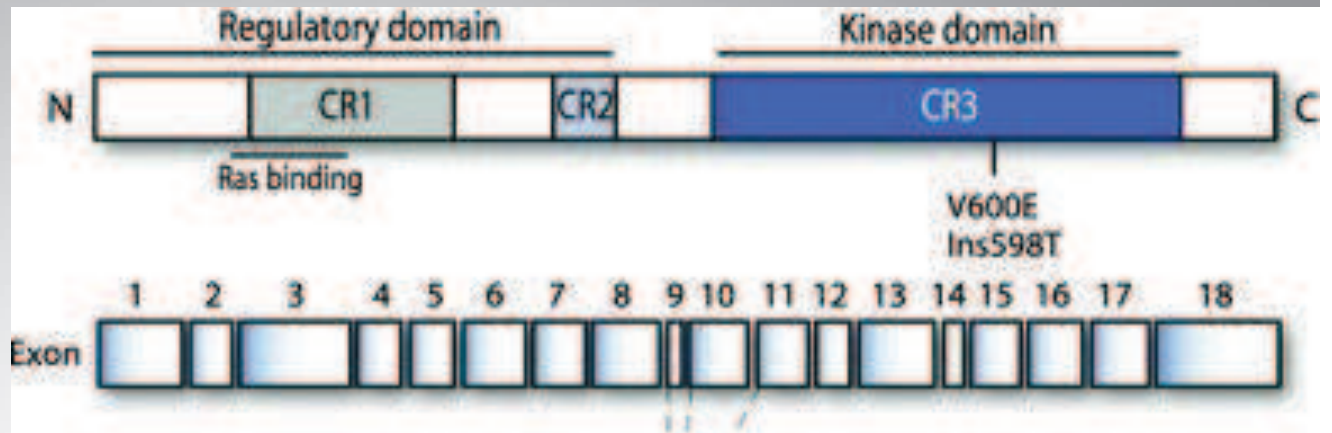
MINISTERSTVO ŠKOLSTVÍ,  
MLÁDEŽE A TĚLOVÝCHOVY



OP Vzdělávání  
pro konkurenceschopnost

INVESTICE  
DO ROZVOJE  
VZDĚLÁVÁNÍ

# BRAF



- serine/threonine-protein kinase B-Raf (Rapidly Accelerated Fibrosarcoma)
- chromosome 7
- 18 exons
- member of the RAS–RAF–MEK–ERK pathway
- commonly detected in diverse benign and malignant tumours
- mutation in exon 15



MINISTERSTVO ŠKOLSTVÍ,  
MLÁDEŽE A TĚLOVÝCHOVY



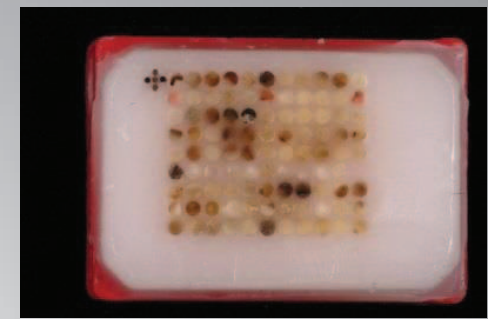
**OP Vzdělávání  
pro konkurenceschopnost**

INVESTICE  
DO ROZVOJE  
VZDĚLÁVÁNÍ

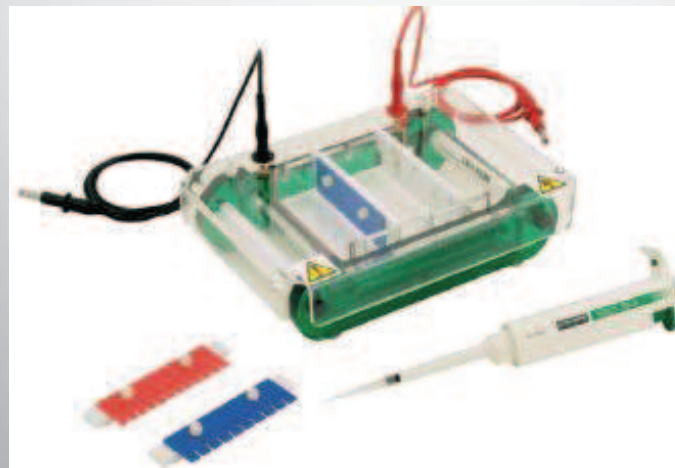
# AIM ?

- detect the presence of mutations (c-KIT, PDGFRA, BRAF) in patients with GIST

# Methods I.



- isolation of DNA from FFPE (formalin-fixed paraffin embedded)
- PCR amplification of exons:
  - C-kit- 8, 9, 11, 13 and 17
  - PDGFRA- 14
  - BRAF - 15
- electrophoretic separation of PCR products







evropský  
sociální  
fond v ČR



EVROPSKÁ UNIE



MINISTERSTVO ŠKOLSTVÍ,  
MLÁDEŽE A TĚLOVÝCHOVY



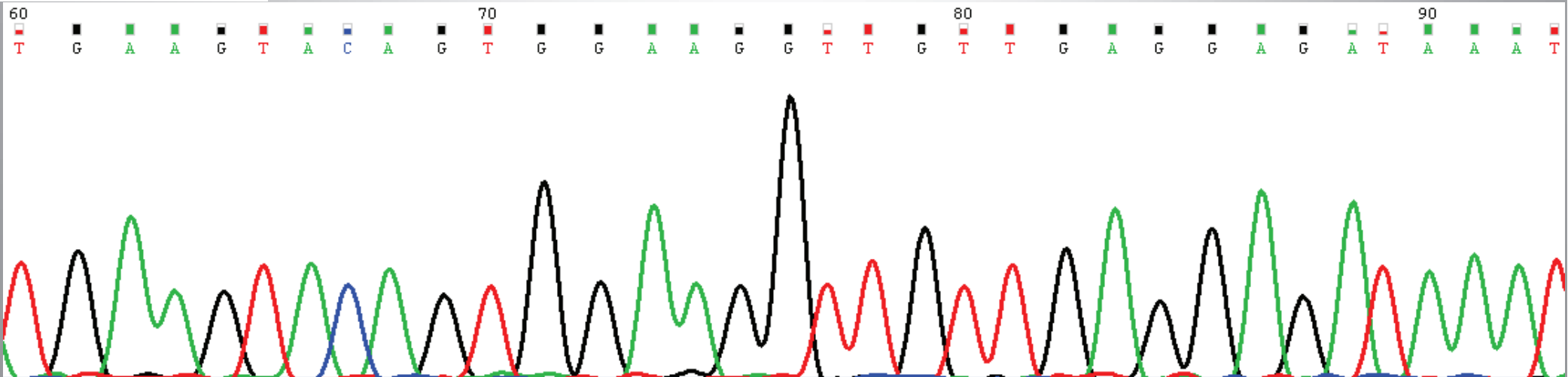
OP Vzdělávání  
pro konkurenceschopnost

INVESTICE  
DO ROZVOJE  
VZDĚLÁVÁNÍ

# Methods II.



- purification of PCR products
- sequencing
- evaluation of sequencing





evropský  
sociální  
fond v ČR



EVROPSKÁ UNIE



MINISTERSTVO ŠKOLSTVÍ,  
MLÁDEŽE A TĚLOVÝCHOVY



**OP Vzdelávání  
pro konkurenceschopnost**

INVESTICE  
DO ROZVOJE  
VZDĚLÁVÁNÍ

# Thank you for your attention !





evropský  
sociální  
fond v ČR



EVROPSKÁ UNIE



MINISTERSTVO ŠKOLSTVÍ,  
MLÁDEŽE A TĚLOVÝCHOVY



**OP Vzdelávání  
pro konkurenceschopnost**

INVESTICE  
DO ROZVOJE  
VZDĚLÁVÁNÍ

# Analysis and cytogenetic mapping of tandemly organized repeats in the genomes of *Festuca* spp. and *Lolium* spp.

Jana Zwyrtková



## Where...?

- The Institute of Experimental Botany AS CR
- Centre of Plant Structural and Functional Genomics



OP Vzdělávání  
pro konkurenceschopnost

INVESTICE  
DO ROZVOJE  
VZDĚLÁVÁNÍ

# What...?

- *Festuca* spp.
- *Lolium* spp.
- localization of repetitive DNA in genomes
- methods of cytogenetic mapping





evropský  
sociální  
fond v ČR



EVROPSKÁ UNIE



MINISTERSTVO ŠKOLSTVÍ,  
MLÁDEŽE A TĚLOVÝCHOVY



OP Vzdělávání  
pro konkurenceschopnost

INVESTICE  
DO ROZVOJE  
VZDĚLÁVÁNÍ

- *Festuca* spp.



ck and horses



<http://newfs.s3.amazonaws.com/taxon-images-1000s1000/Poaceae/festuca-rubra-si-gmittelhauser-b.jpg>

[http://www.plantes-et-design.com/photos/grand\\_plantes\\_design\\_festuca\\_gautieri\\_scoparia.jpg](http://www.plantes-et-design.com/photos/grand_plantes_design_festuca_gautieri_scoparia.jpg)



evropský  
sociální  
fond v ČR



EVROPSKÁ UNIE



MINISTERSTVO ŠKOLSTVÍ,  
MLÁDEŽE A TĚLOVÝCHOVY



OP Vzdělávání  
pro konkurenceschopnost

INVESTICE  
DO ROZVOJE  
VZDĚLÁVÁNÍ

- *Lolium* spp.



[http://botanika.wendys.cz/foto/O711\\_1.jpg](http://botanika.wendys.cz/foto/O711_1.jpg)



<http://www.heritage seeds.com.au/assets/product/Images/Lolium-perenne-pot-perennial-ryegrass.jpg>





<http://www.eaglemt.com/golf-en.html>





<http://www.rockliffehall.com/resort/gallery/golf-course-gallery/>





**OP Vzdělávání  
pro konkurenceschopnost**

INVESTICE  
DO ROZVOJE  
VZDĚLÁVÁNÍ

## How...?

- Isolation of genomic DNA
- PCR
- Electrophoresis
- Southern blotting
- FISH





**OP Vzdělávání  
pro konkurenceschopnost**

INVESTICE  
DO ROZVOJE  
VZDĚLÁVÁNÍ

# When...?

- Start: 2014
- Finish: 2016



MINISTERSTVO ŠKOLSTVÍ,  
MLÁDEŽE A TĚLOVÝCHOVY



**OP Vzdělávání  
pro konkurenceschopnost**

INVESTICE  
DO ROZVOJE  
VZDĚLÁVÁNÍ

**... thank you for your attention.**



evropský  
sociální  
fond v ČR



EVROPSKÁ UNIE



MINISTERSTVO ŠKOLSTVÍ,  
MLÁDEŽE A TĚLOVÝCHOVY



OP Vzdělávání  
pro konkurenceschopnost

INVESTICE  
DO ROZVOJE  
VZDĚLÁVÁNÍ

# Involvement of selected mitogen-activated protein kinases kinases (MAPKK) and mitogen-activated protein kinases (MAPK) in plant stress reactions

Lenka Vaškebová



# AIMS

- Optimization of *in vivo* and *in vitro* culture conditions for the controlled application of stress factors and evaluation of plant responses.
- Characteristics of phenotypic changes in plants grown under stressful conditions, qualitative and quantitative evaluation of root growth parameters.
- Microscopic study of changes of dynamic processes in living cells, root focusing on cytoskeleton and vesicular transport.
- Qualitative and quantitative determination of changes in representation MAPK activity in GMO plants with overproduction or suppression expression of selected MAPK.



evropský  
sociální  
fond v ČR



EVROPSKÁ UNIE



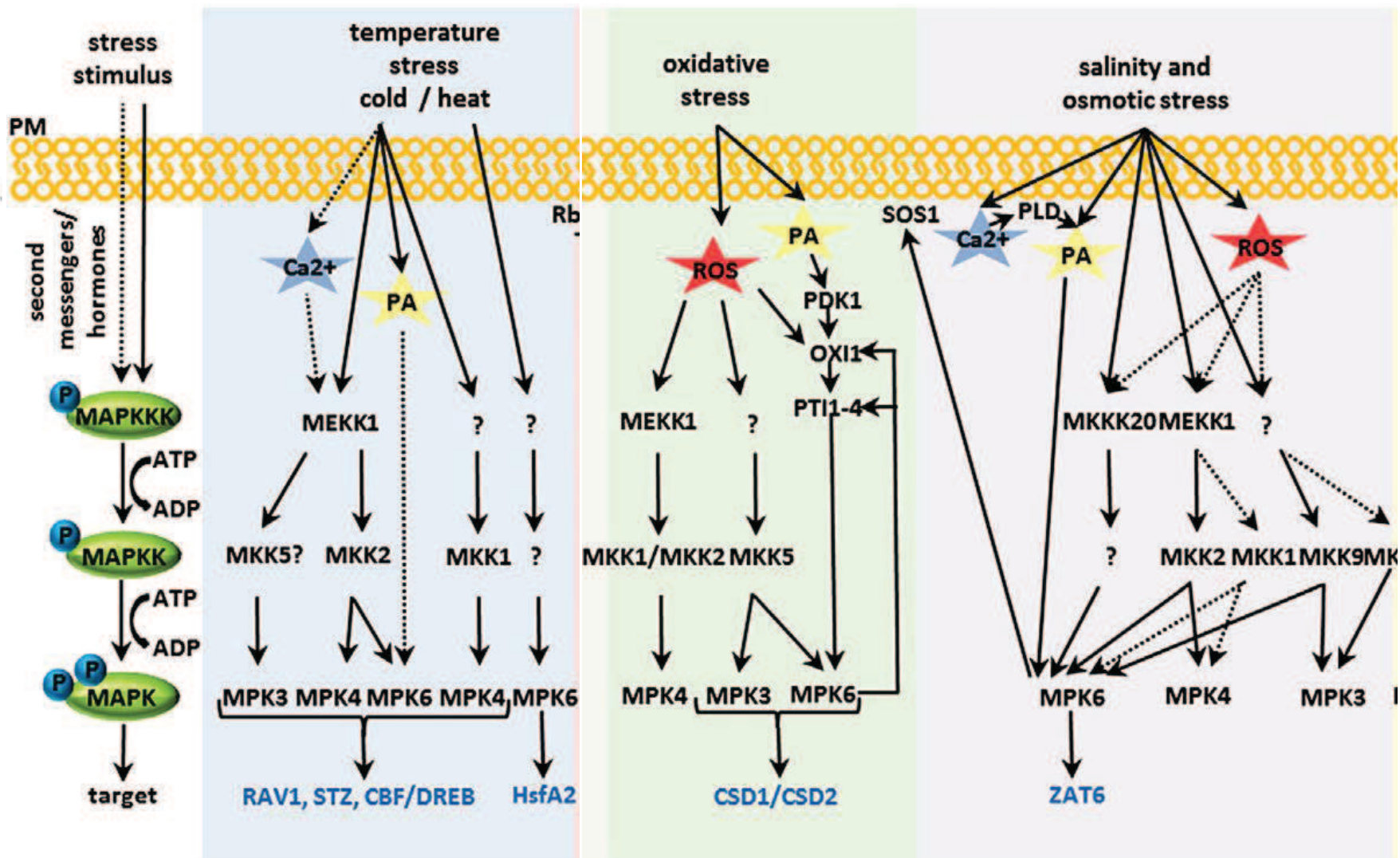
MINISTERSTVO ŠKOLSTVÍ,  
MLÁDEŽE A TĚLOVÝCHOVY



OP Vzdělávání  
pro konkurenceschopnost

INVESTICE  
DO ROZVOJE  
VZDĚLÁVÁNÍ

# What are the MAPK?





# MAPK and cytoskeleton



evropský  
sociální  
fond v ČR



EVROPSKÁ UNIE



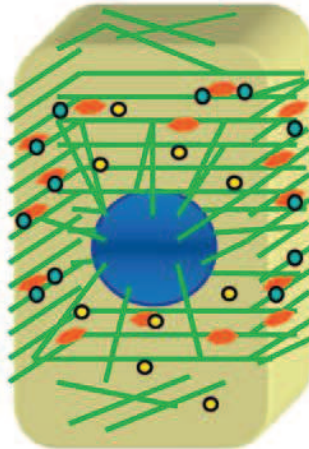
MINISTERSTVO ŠKOLSTVÍ,  
MLÁDEŽE A TĚLOVÝCHOVY



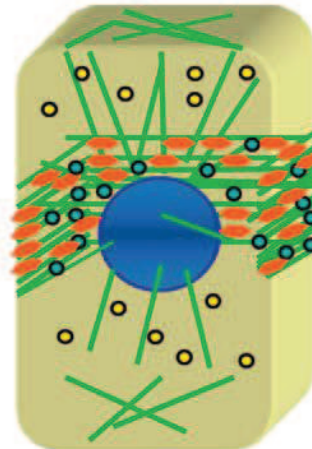
OP Vzdělávání  
pro konkurenceschopnost

INVESTICE  
DO ROZVOJE  
VZDĚLÁVÁNÍ

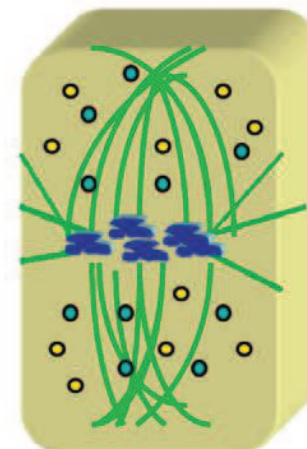
Interphase



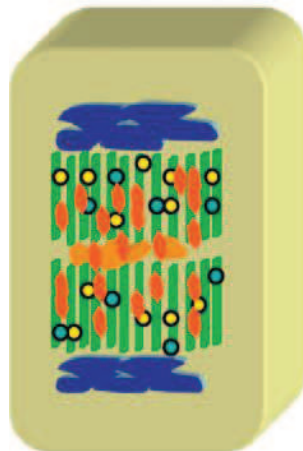
Pre-prophase  
pre-prophase band



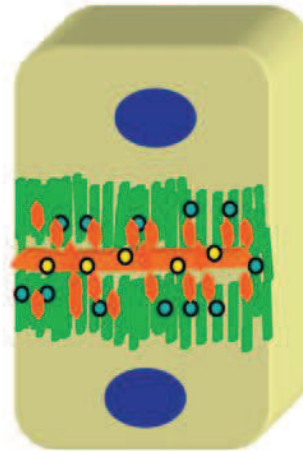
Mataphase  
Spindle



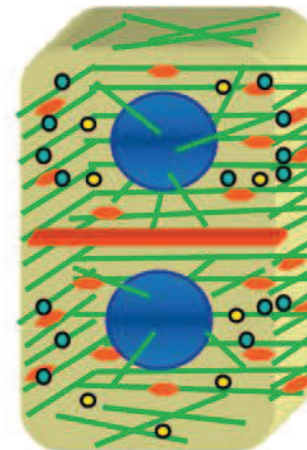
Telophase  
Early phragmoplast



Cytokinesis  
Late phragmoplast



Interphase



— Mikrotubules  
● Nukleus/  
chromosomes

— Cell plate  
— Primary cell wall

● MAP64  
● MAP4  
● MAP6

# Some results I.



evropský  
sociální  
fond v ČR



EVROPSKÁ UNIE

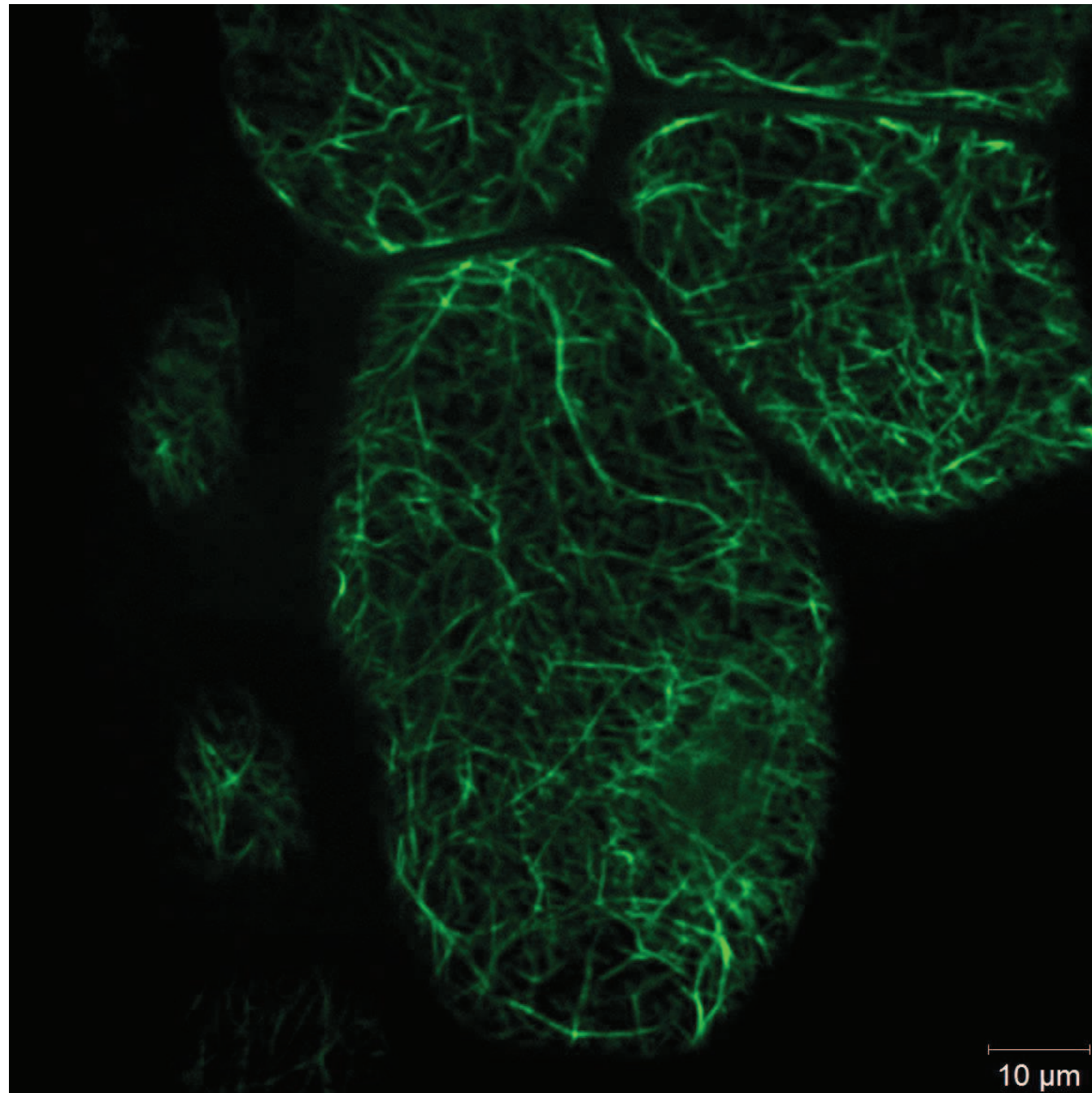


MINISTERSTVO ŠKOLSTVÍ,  
MLÁDEŽE A TĚLOVÝCHOVY



**OP Vzdělávání  
pro konkurenceschopnost**

INVESTICE  
DO ROZVOJE  
VZDĚLÁVÁNÍ





# Some results II.



evropský  
sociální  
fond v ČR



EVROPSKÁ UNIE

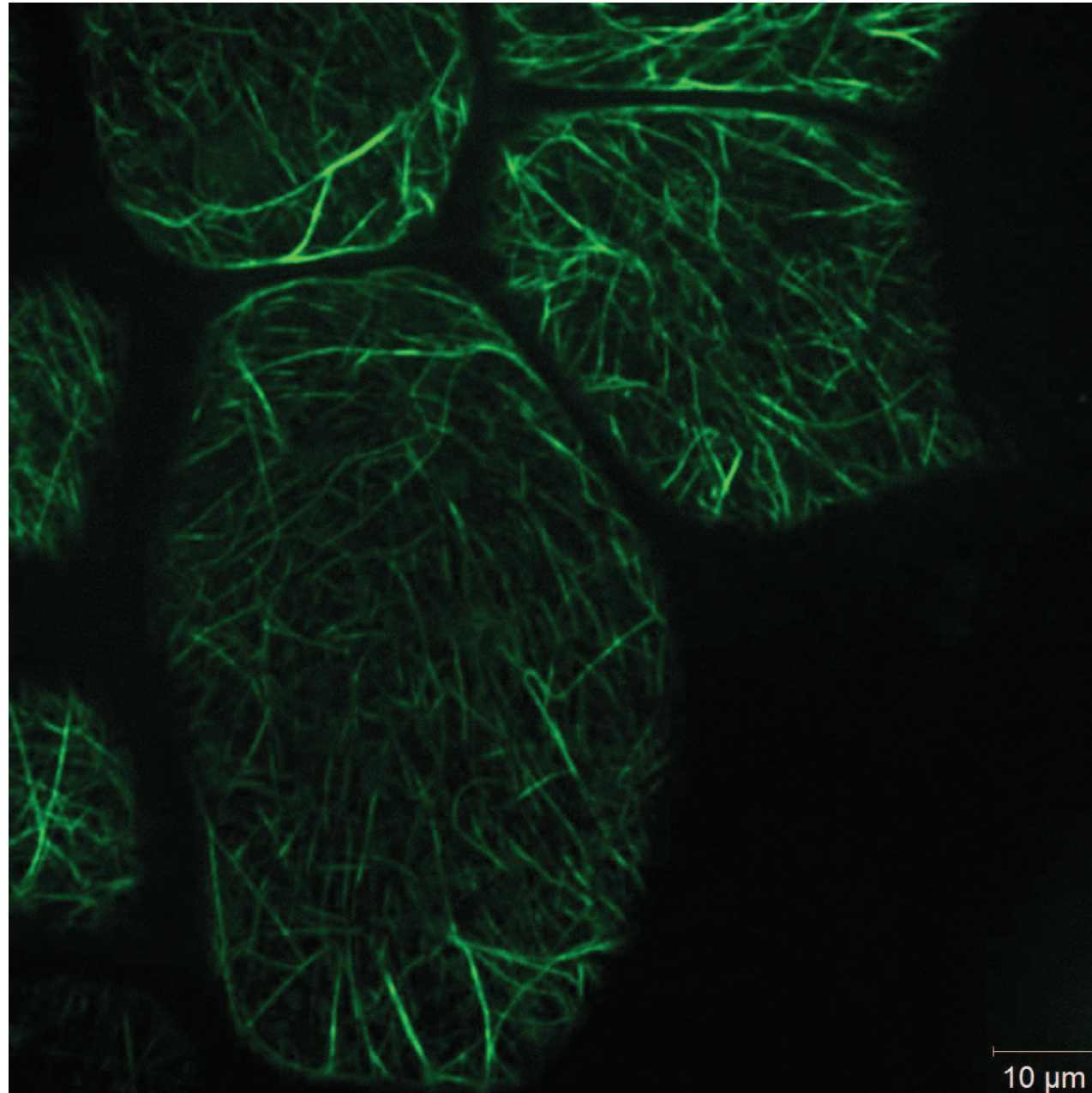


MINISTERSTVO ŠKOLSTVÍ,  
MLÁDEŽE A TĚLOVÝCHOVY



**OP Vzdělávání  
pro konkurenceschopnost**

INVESTICE  
DO ROZVOJE  
VZDĚLÁVÁNÍ





evropský  
sociální  
fond v ČR



EVROPSKÁ UNIE

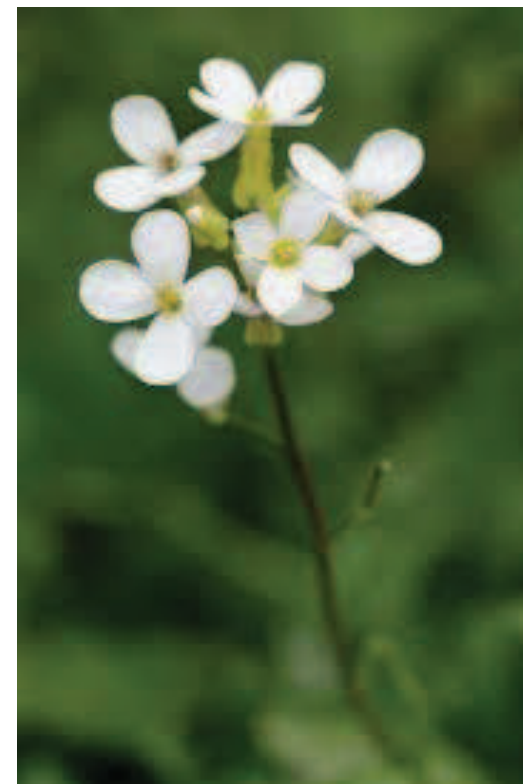


MINISTERSTVO ŠKOLSTVÍ,  
MLÁDEŽE A TĚLOVÝCHOVY



**OP Vzdělávání  
pro konkurenceschopnost**

INVESTICE  
DO ROZVOJE  
VZDĚLÁVÁNÍ



**Thank you for your attention**



MINISTERSTVO ŠKOLSTVÍ,  
MLÁDEŽE A TĚLOVÝCHOVY



**OP Vzdělávání  
pro konkurenceschopnost**

INVESTICE  
DO ROZVOJE  
VZDĚLÁVÁNÍ

# Novel putative roles of Aurora A kinase in the regulation of DNA damage response

Kamila Jahodíková





MINISTERSTVO ŠKOLSTVÍ,  
MLÁDEŽE A TĚLOVÝCHOVY



OP Vzdělávání  
pro konkurenceschopnost

INVESTICE  
DO ROZVOJE  
VZDĚLÁVÁNÍ

## Aims of the thesis

- To make well-known mutant S155R of Aurora A enzyme
- Address the role of Aurora A kinase in regulation of DDR\*
- Elucidation of Aurora A role in the FANCD1 complex driven crosslink repair

\*DDR – DNA damage response



evropský  
sociální  
fond v ČR



EVROPSKÁ UNIE



MINISTERSTVO ŠKOLSTVÍ,  
MLÁDEŽE A TĚLOVÝCHOVY

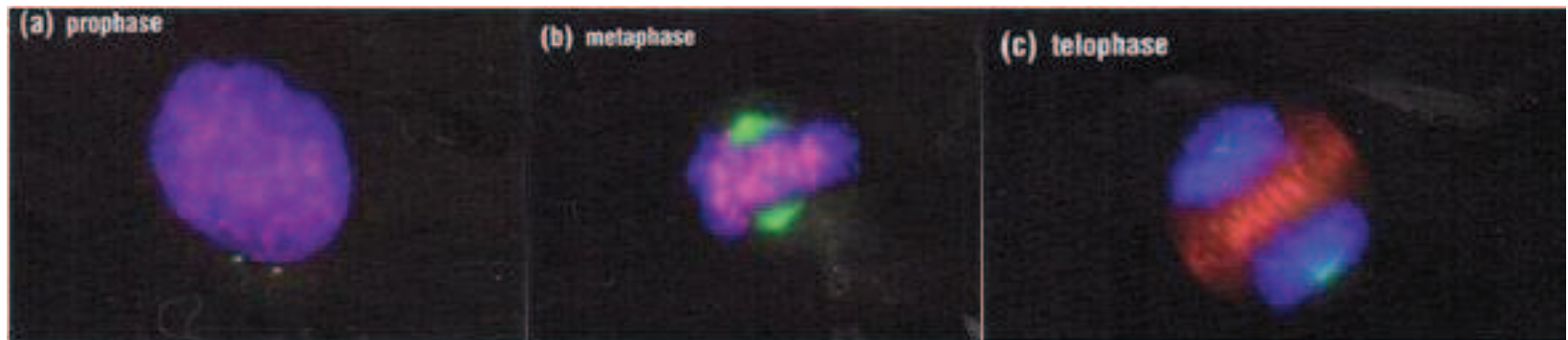


OP Vzdělávání  
pro konkurenceschopnost

INVESTICE  
DO ROZVOJE  
VZDĚLÁVÁNÍ

# Aurora A kinase

- Enzyme which activity increase in mitosis
- Found at the centrosome and on spindle
- Helps control bipolar spindle assembly and stability





evropský  
sociální  
fond v ČR



EVROPSKÁ UNIE



MINISTERSTVO ŠKOLSTVÍ,  
MLÁDEŽE A TĚLOVÝCHOVY

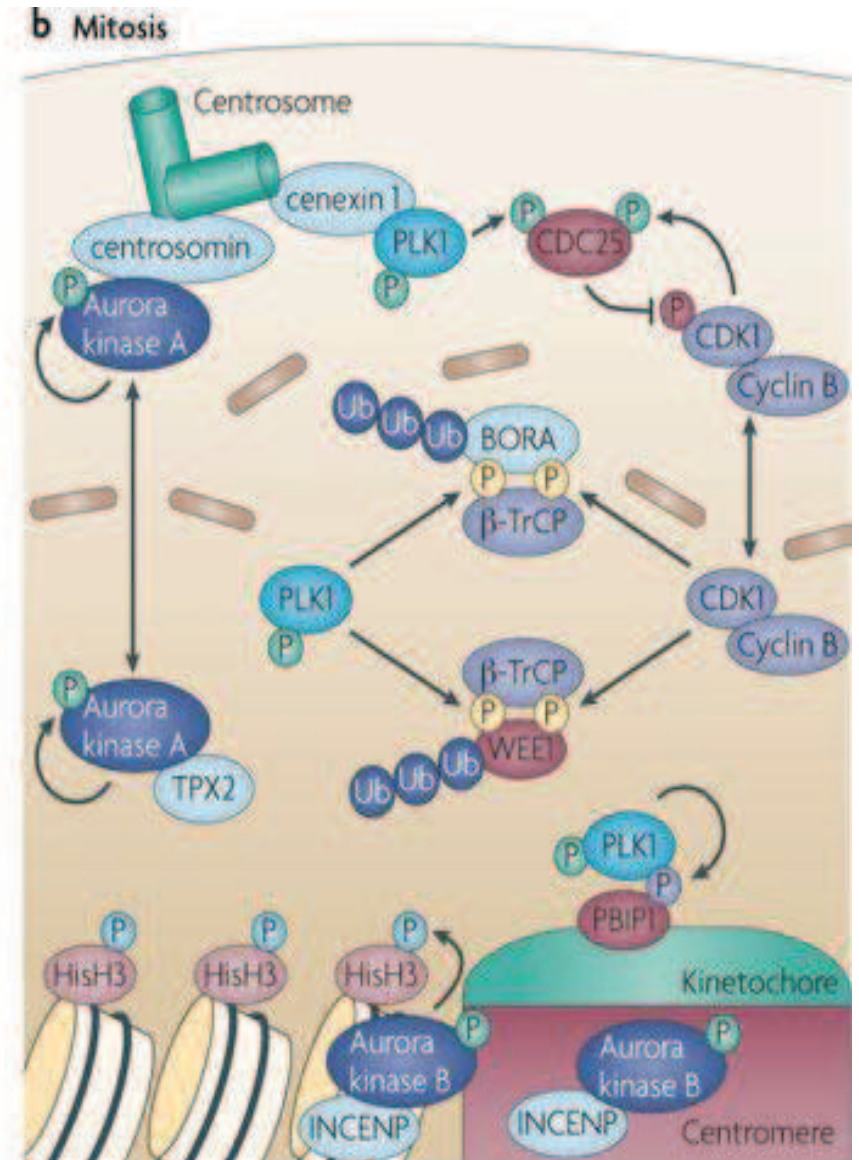
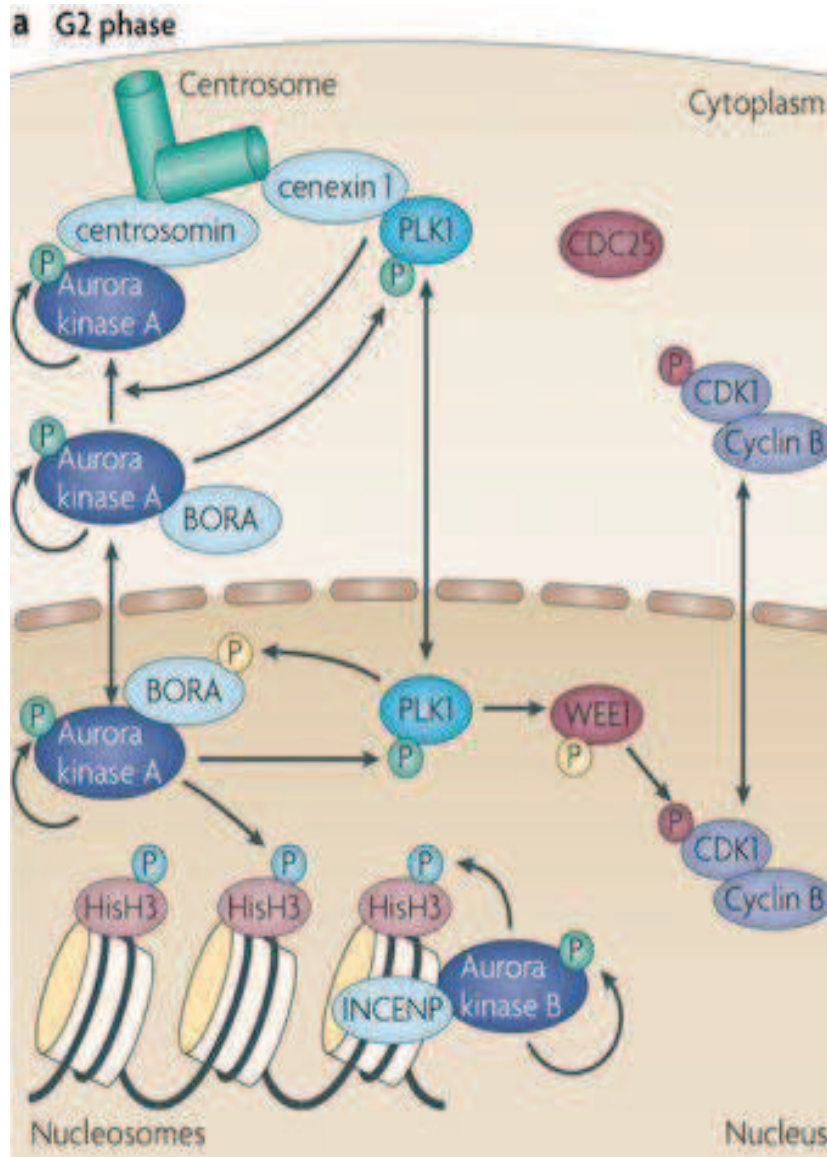


OP Vzdělávání  
pro konkurenceschopnost

INVESTICE  
DO ROZVOJE  
VZDĚLÁVÁNÍ

# Aurora A kinase

- Activator of Aurora A is TPX2 protein
- Catalytic activity is activated by phosphorylation on Thr 288 -> deactivated by dephosphorylation
- Both are degraded by proteasome
- Mutation or inhibition leads to instability of spindle
- Changes to protein expression leads to development of cancer







MINISTERSTVO ŠKOLSTVÍ,  
MLÁDEŽE A TĚLOVÝCHOVY



OP Vzdělávání  
pro konkurenceschopnost

INVESTICE  
DO ROZVOJE  
VZDĚLÁVÁNÍ

## S155R mutant

- Somatic cancer-associated mutation
- Activity of Aurora A decrease due to misregulation
- Loss of interaction with TPX2 protein
- Overexpression of Aurora A leading to prolonged mitosis

Human Aurora A

Aurora A mutant

```
gcgcatctctttgcaagcacaaaagcttgtctccagtca  
GCGCATTCTTTGCAAGCACAAAAGCTTGTCTCCAGTCA  
gcgcatctctttgcaagcacaaaagcttgtctccagtca
```





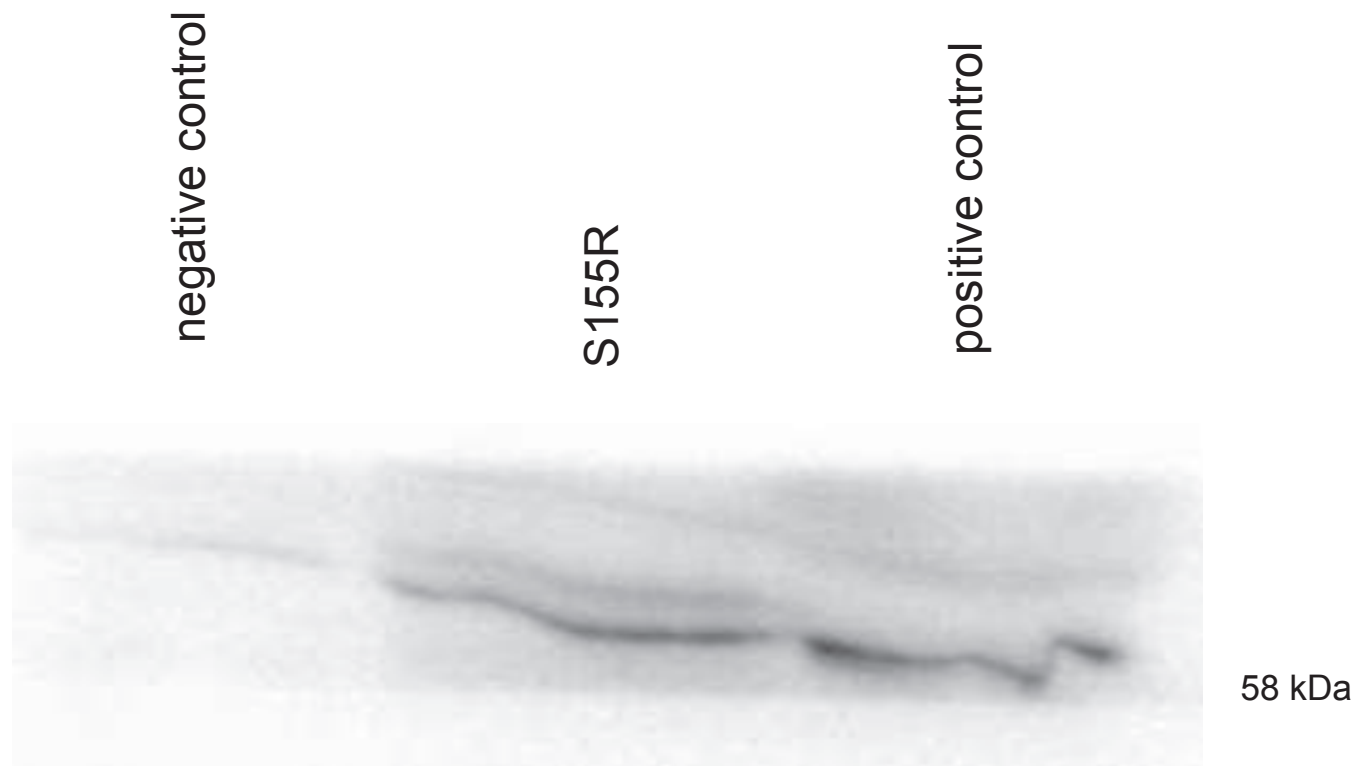
MINISTERSTVO ŠKOLSTVÍ,  
MLÁDEŽE A TĚLOVÝCHOVY



**OP Vzdělávání  
pro konkurenceschopnost**

INVESTICE  
DO ROZVOJE  
VZDĚLÁVÁNÍ

# Result from Western blotting





evropský  
sociální  
fond v ČR



EVROPSKÁ UNIE



MINISTERSTVO ŠKOLSTVÍ,  
MLÁDEŽE A TĚLOVÝCHOVY



OP Vzdělávání  
pro konkurenceschopnost

INVESTICE  
DO ROZVOJE  
VZDĚLÁVÁNÍ

## Sources

- 1. Bibby, R.A., et al., *A cancer-associated aurora A mutant is mislocalized and misregulated due to loss of interaction with TPX2*. J Biol Chem, 2009. **284**(48): p. 33177-84.
- 2. Oestergaard, V.H., et al., *Deubiquitination of FANCD2 is required for DNA crosslink repair*. Mol Cell, 2007. **28**(5): p. 798-809.
- 3. Sourisseau, T., et al., *Aurora-A expressing tumour cells are deficient for homology-directed DNA double strand-break repair and sensitive to PARP inhibition*. EMBO Mol Med, 2010. **2**(4): p. 130-42.
- 4. Morgan, D.O., *The cell cycle: Principles of control*. New science press, 2007



evropský  
sociální  
fond v ČR



EVROPSKÁ UNIE



MINISTERSTVO ŠKOLSTVÍ,  
MLÁDEŽE A TĚLOVÝCHOVY



**OP Vzdělávání  
pro konkurenceschopnost**

INVESTICE  
DO ROZVOJE  
VZDĚLÁVÁNÍ

Thank you for your attention !!!



MINISTERSTVO ŠKOLSTVÍ,  
MLÁDEŽE A TĚLOVÝCHOVY



**OP Vzdělávání  
pro konkurenceschopnost**

INVESTICE  
DO ROZVOJE  
VZDĚLÁVÁNÍ

# Monitoring of cytogenetic abnormalities of chromosome 18 in colorectal cancer

Zuzana Loubalová

Propojení výuky oborů Molekulární a buněčné biologie a Ochrany a tvorby životního prostředí OPVK  
(CZ.1.07/2.2.00/28.0032)



INVESTICE  
DO ROZVOJE  
VZDĚLÁVÁNÍ

# Colorectal cancer (CRC)

- One of the most frequent disease
- Chromosomal instability (CIN)



Intratumour heterogeneity



Poor prognosis and drug resistance



MINISTERSTVO ŠKOLSTVÍ,  
MLÁDEŽE A TĚLOVÝCHOVY



OP Vzdělávání  
pro konkurenceschopnost

INVESTICE  
DO ROZVOJE  
VZDĚLÁVÁNÍ

# PIGN, MEX3C and ZNF516

- Chromosome 18q
- Suppressors of replication stress
- 85 % CRC
- Loss of these suppressors



Destabilizes chromosome





MINISTERSTVO ŠKOLSTVÍ,  
MLÁDEŽE A TĚLOVÝCHOVY



OP Vzdělávání  
pro konkurenceschopnost

INVESTICE  
DO ROZVOJE  
VZDĚLÁVÁNÍ

# PIGN, MEX3C and ZNF516

- PIGN: glycosylphosphatidylinositol (GPI)-anchor biosynthesis
- MEX3C: RNA binding and ligase activity, hypertension
- ZNF516: transcriptional regulator



brown adipose tissue  
differentiation



INVESTICE  
DO ROZVOJE  
VZDĚLÁVÁNÍ

# DCC

- Deletion in CRC
- Tumor suppressor gene
- Response to netrin-1
- Located on 18q chromosome
- Marker for prognosis – not conclusive



INVESTICE  
DO ROZVOJE  
VZDĚLÁVÁNÍ

# AIMS

- Range of 18q deletion
- Involvement of PIGN, MEX3C and ZNF516



Is more critical than  
18q or DCC gene  
deletions?



Lead to DCC deletions?



**OP Vzdělávání  
pro konkurenceschopnost**

INVESTICE  
DO ROZVOJE  
VZDĚLÁVÁNÍ

# Methods

- Plasmids isolation
- Probes preparation
- FISH



MINISTERSTVO ŠKOLSTVÍ,  
MLÁDEŽE A TĚLOVÝCHOVY



OP Vzdělávání  
pro konkurenceschopnost

INVESTICE  
DO ROZVOJE  
VZDĚLÁVÁNÍ

# Sources

- Swiderska, M., et al., The diagnostics of colorectal cancer. *Contemp Oncol*, 2014. 18:1–6
- Burrell, R.A., et al., Replication stress links structural and numerical cancer chromosomal instability. *Nature*, 2013. 494(7438): p. 492-6.
- Mehlen, P. and Fearon, E.R., Role of the dependence receptor DCC in colorectal cancer pathogenesis. *J Clin Oncol*, 2004. 22(16): p. 3420-8.
- Popat, S. and Houlston, R.S., A systematic review and meta-analysis of the relationship between chromosome 18q genotype, DCC status and colorectal cancer prognosis. *Eur J Cancer*, 2005. 41(14): p. 2060-70.





MINISTERSTVO ŠKOLSTVÍ,  
MLÁDEŽE A TĚLOVÝCHOVY



**OP Vzdělávání  
pro konkurenceschopnost**

INVESTICE  
DO ROZVOJE  
VZDĚLÁVÁNÍ

Thank you for your attention.