

Univerzita Karlova

Přírodovědecká fakulta

Katedra antropologie a genetiky člověka

Studijní program: Biologie

Studijní obor: Antropologie a genetika člověka



Bc. Alžběta Darášová

Zapojení proteinu vinkulinu do savčí gametogeneze

Involvement of protein vinculin in mammalian gametogenesis

Diplomová práce

Vedoucí práce: prof. RNDr. Pavel Hozák, DrSc.

Praha, 2019

Prohlášení:

Prohlašuji, že jsem závěrečnou práci zpracovala samostatně a že jsem uvedla všechny použité informační zdroje a literaturu. Tato práce ani její podstatná část nebyla předložena k získání jiného nebo stejného akademického titulu.

V Praze dne 30.7. 2019

.....
Alžběta Darášová

Poděkování:

Ráda bych touto cestou poděkovala vedoucímu mé diplomové práce a laboratoře prof. RNDr. Pavlu Hozákovi, DrSc. za trpělivost, připomínky a cenné rady při mé práci.

Dále bych ráda poděkovala zástupci vedoucího laboratoře Petru Flachsovi Ph.D. za čas, trpělivost, konzultace a za všechny rady a zkušenosti z vědecké oblasti. Mým bývalým kolegům Ing. Robertu Havaldovi a Jance Rohožkové Ph.D. za uvedení do chodu laboratoře a naučení metodiky. Veliké díky patří také mé kolegyni Ing. Lence Hůlkové, za každodenní přínosné vědecké i nevědecké debaty.

V neposlední řadě chci poděkovat mé rodině a partnerovi za oporu a pochopení během psaní této práce i během celého studia.

Obsah

Obsah	4
Abstrakt.....	6
Abstract.....	7
Seznam zkratek	8
Úvod.....	11
1. Neplodnost	13
2. Buněčný cyklus	15
2.1 Mitóza.....	16
2.2 Meióza	17
2.2.1 Profáze I.....	18
3. Gametogeneze	21
3.1 Spermatogeneze.....	21
3.1.1 Spermatogeneze u člověka	22
3.1.2 Spermatogeneze u myši.....	23
3.2 Oogeneze a folikulogeneze.....	23
3.2.1 Oogeneze u člověka	23
3.2.2 Oogeneze u myši	25
3.3 Myš jako modelový organizmus pro studium chyb v meióze a gametogenezi	26
4. Vinkulin.....	27
4.1 Cytoplazmatický vinkulin	27
4.2 Vinkulin v jádře pohlavních buněk	30
5. Cíle	34
6. Materiály a metody	35
6.1 Materiál.....	35
6.1.1 Laboratorní myš	35

6.2	Metody.....	36
6.2.1	Připouštění myši a odběr embryí.....	36
6.2.2	Izolace embryonálních ovárií a následná imunofluorescence.....	36
6.2.3	Izolace ovárií z dospělých samic a následné barvení vzorků.....	38
6.2.4	Odběr tkáně pro izolaci DNA a genotypizaci	39
6.2.5	Statistické zpracování výsledků grafů.....	40
7.	Výsledky	41
7.1	Struktura experimentů	41
7.2	Křížení myši a ověřování genotypů cKO a WT	41
7.3	Sada experimentů na myších embryích	43
7.3.1	Lokalizace vinkulinu v jádře embryonálního profázního oocyty u WT myši.....	43
7.3.2	Mikroskopická kontrola poklesu signálu vinkulinu v jádře embryonálního profázního oocyty u cKO myši.....	45
7.4	Sada experimentů na dospělých myších.....	46
7.4.1	Sledování fertility a počtu potomků u cKO samic	46
7.5	Sledování dalších fenotypů delece vinkulinu	49
7.6	Morfologická studie na 20-26 dpp myších ováriích.....	50
8.	Diskuze.....	53
9.	Závěr	60
10.	Seznam použité literatury.....	61

Abstrakt

Jednou ze základních vlastností živých soustav je pohlavní rozmnožování, při kterém dochází ke splynutí pohlavních buněk, spermií a vajíčka. Klíčovým procesem, při tvorbě pohlavních buněk, je meióza.

Při meiotickém dělení dochází k dramatickým změnám v jádře, při kterých se mohou vyskytnout chyby, které mohou zapříčinit různé chromozomové aberace a nondisjunkce vedoucí ke genetickým onemocněním a v neposlední řadě k neplodnosti. Příčiny neplodnosti jsou velmi různorodé, avšak velká část pochází právě z chyb při meióze. Pro správné fungování tohoto procesu je velmi důležitá první fáze meiózy I, profáze I, kde dochází k párování homologních chromozomů za pomoci bílkovinné struktury synaptonemálního komplexu (SC) a následně dochází ke genetické rekombinaci, tzv. crossing-overu.

Vinkulin (VCL) je cytoplazmatický protein vázající aktin ve fokálních adhezích a adherentních spojích a je jejich esenciálním regulátorem. Tento protein byl však objeven i v jádře pohlavních buněk u některých organismů. Jaderné funkce vinkulinu však dosud nebyly popsány.

Tato diplomová práce se zaměřuje na studium dynamiky chromozomů v gametogenezi na myším modelu s důrazem na zapojení jaderného vinkulinu (VCL) do těchto procesů. Naším cílem bylo lokalizovat VCL v jádře embryonálních profázních oocytů pomocí fluorescenční mikroskopie. Dále vytvořit kondicionální knock-out myši pro vinkulin (VCL cKO) a pozorovat následné změny v reprodukci těchto myší v závislosti na poklesu exprese vinkulinu v ováriích. Také jsme porovnávali morfologické změny ovárií se sníženou expresí VCL s ovárií u kontrolních myší.

Dle našich výsledků se VCL lokalizuje do jádra embryonálních profázních oocytů a u VCL cKO myší je jeho exprese snížena. U těchto myší jsme zaznamenali zvýšený počet nedovyvinutých mláďat, časté potraty a snížený počet potomků, což naznačuje, že VCL má významný vliv na myší samičí fertilitu.

Klíčová slova: vinkulin, meióza, profáze I, gametogeneze, ovária, myš

Abstract

One of the basic characteristics of living systems is a sexual reproduction, when the germ cells, sperm and egg, fuse. The key process in the germ cells development is meiosis.

During meiotic division, several dramatic changes happen in the nucleus and different errors might appear, which may then result in various chromosomal aberrations and nondisjunctions leading to genetic diseases and infertility. The causes of infertility are very diverse, but many of them obviously come from the meiotic errors. One of the most critical parts for the successful meiotic progress is a prophase I, where the homologous chromosomes are paired by the protein structure of the synaptonemal complex (SC) and subsequent genetic recombinations by crossing-over accurate.

Vinculin (VCL) is a cytoplasmic actin binding protein in the focal adhesions and adherent junctions and VCL acts as their essential regulator. Recently, this protein was also found in the nucleus of germ cells of certain organisms. However, the nuclear functions of vinculin have not been described yet.

This diploma thesis focuses on the study of chromosomal dynamics in the gametogenesis of our mouse model, regarding the involvement of the nuclear vinculin in these processes. Our aim was to localize VCL in the nucleus of embryonic prophase oocytes using fluorescence microscopy. Next aim was to create VCL a conditional knock-out mouse (VCL cKO) and observe subsequent changes in the reproduction of these VCL cKO mice depending on the decreased expression of vinculin in the ovaries. We also compared morphological changes of the VCL depleted ovaries with the ovaries of the control mice.

According to our results, VCL localizes to the nucleus of embryonic prophase oocytes and its expression is dramatically reduced in the VCL cKO mice. These mice also showed an increased number of underdeveloped embryos, frequent abortions and reduced number of newborns, suggesting that VCL has an significant effect on the mouse female fertility.

Keywords: vinculin, meiosis, prophase I, gametogenesis, ovaries, mouse

Seznam zkratek

AJ	Adherentní spoj (Adherent junction)
AE	Axiální element (Axial element)
Arp2/3	Aktinu příbuzný protein 2/3 (actin-related protein 2/3)
BSA	Hovězí sérový albumin (Bovine serum albumine)
CE	Centrální element (Central element)
CO	Výměna části genetického materiálu (Crossing over)
Cre	Rekombináza (Causes Recombination)
CREST	Protilátka proti centromerám
cKO	Kondicionální knock-out (Conditional knock-out)
DAPI	Fluorescenční barva (4',6-Diamidine-2'-phenylindole dihydrochloride)
DEB-1	Homolog vinkulinu u <i>C. elegans</i> (Dense body)
dH ₂ O	Destilovaná voda (Distilled water)
DNA	Deoxyribonukleotidová kyselina (Deoxyribonucleic acid)
dpc	Den po oplození (<i>Day post coitum</i>)
dpp	Den po narození (<i>Day post partum</i>)
ED	Embryonální den (Embryonal day)
E	Embryo
FA	Fokální adheze (Focal adhesion)
<i>Vcl</i> Flx/Flx	Genotyp s onzačenými FloxP místy okolo genu pro vinkulin
GDF9	Růstový diferenciační faktor-9 (Growth differentiation factor-9)
GV	Germinální váček (Germinal vesicle)
iCre GDF9 F	Primery pro zjištění přítomnosti rekombinázy pro přímé vlákno
iCre GDF9 R	Primery pro zjištění přítomnosti rekombinázy pro zpětné vlákno

IpaA	invazní plazmid A z organismu <i>Shigella flexneri</i> (Invasion plasmid antigen A from <i>Shigella flexneri</i>)
IPC F	Interní pozitivní kontrola pro přímé vlákno (Internal positive control forward)
IPC R	Interní pozitivní kontrola pro zpětné vlákno (Internal positive control reverse)
IVM	Zrání <i>in vitro</i> (<i>in vitro</i> maturation)
IVF	<i>in vitro</i> fertilizace (<i>in vitro</i> fertilization)
KO	knock-out
LE	Laterální element (Lateral element)
LoxP	Označené místo kolem genu Locus of chromosomal crossover (x) in the bacteriophage P1
NLS	Jaderný lokalizační signál (Nuclear localization signal/sequence)
PBST	Fosfátový pufr s Tween (Phosphate Buffered Saline with Tween)
PCR	Polymerázová řetězová reakce (Polymerase chain reaction)
PGC	Primární zárodečná buňka (Primordial germ cell)
R	Restrikční bod (Restriction point)
TF	Transverzální vlákno (Transversal filament)
PBS	Fosfátový pufr (Phosphate Buffered Saline)
PFA	Paraformaldehyd
PKC α	proteinkináza C α (Proteinkinase C α)
PIP2	Phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate
SC	Synaptonemální komplex (Synaptonemal complex)
SIM	Superrezoluční mikroskopie (Structured Illumination Microscopy)

SMC1b	Pro meiózu specifický kohezin (Structural maintenance of chromosomes protein 1B)
SCP3	Protein synaptonemálního komplexu (Protein axiálního elementu) (Synaptonemal complex protein 3)
SCP1	Protein synaptonemálního komplexu (Protein transverzálního vlákna) Synaptonemal complex protein 1
TK H2O	Voda pro tkáňové kultury
VAD	Mechanická podpora oběhu srdce (Ventricular assist device)
VASP	Vazodilatačně stimulovaný fosfoprotein (Vasodilator-stimulated phosphoprotein)
VCL	Vinkulin (Vinculin)
WHO	Světová zdravotnická organizace (World health organisation)
WT	Kontrolní kmen myši (Wild-type)

Úvod

Pohlavní rozmnožování je jednou ze základních vlastností živých soustav, při kterém vzniká jedinec splynutím pohlavních buněk, spermií a vajíčka. Základem pohlavního rozmnožování je meiotické dělení. Meióza se skládá ze dvou odlišně koncipovaných buněčných dělení: heterotypického (redukčního) a homotypického (shodného s mitózou). Jejím výsledkem jsou 4 haploidní buňky, odlišné od rodičovských. Klíčové je první meiotické dělení a v něm nejdelší profáze, při které se tvoří složitá bílkovinná struktura synaptonemální komplex (SC), díky kterému se homologní chromozomy párují, tvoří bivalenty a dochází mezi nimi k rekombinaci, tedy výměně genetického materiálu tzv. crossing-overu (CO). Tento proces je důležitý pro následnou správnou segregaci chromozomů.

V posledních letech se výrazně zvyšuje četnost problémů spojených s plodností či úplnou neplodností mužů a žen. Neplodnost je celosvětovým problémem postihujícím až 15 % lidí. Původ neplodnosti je velice různorodý, avšak velká část příčin pochází právě z chyb při meióze, párování chromozomů a jejich segregaci. Výsledkem může být vznik různých genetických poruch, chromozomových aberací a nondisjunkcí (Agarwal *et al.*, 2015).

Odhalení nových komponent meiotického procesu a jejich rolí, by proto významně přispělo k našemu porozumění molekulárních mechanismů a dynamiky meiotických událostí a mohlo by také případně pomoci vysvětlit některé nedostatky v informacích o příčinách neplodnosti. Nepřesnosti během meiotických fází jsou spojeny s chromozomálními aberacemi vedoucími k několika genetickým poruchám (např. Downův syndrom, Klinefelterův syndrom, Turnerův syndrom), stejně jako s neplodností u mužů.

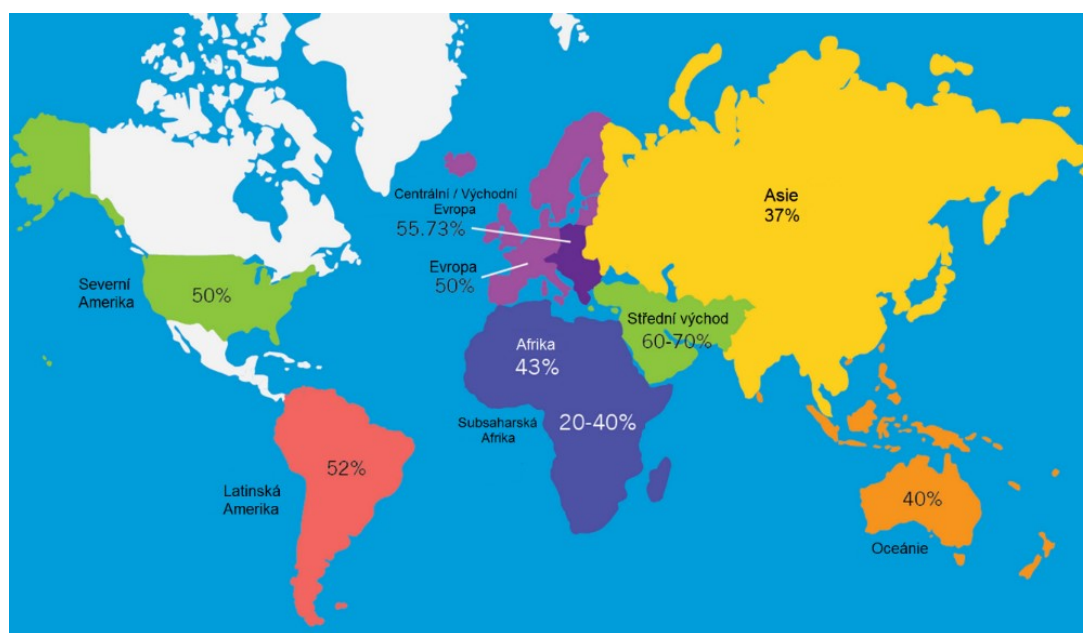
Tento výzkum se zaměřuje na dynamiku chromozomů během gametogeneze na eukaryotickém modelu myši *M. musculus*, kde se zabývá bílkovinou vinkulinem. Nejnovější poznatky o vinkulinu naznačují, že se kromě již dobře popsanych funkcí v cytoplasmě a na buněčných spojích, také zřejmě významně podílí v buněčném jádře během časných meiotických fází na párování a synapsi homologních chromozomů a může být novým faktorem důležitým pro správné fungování těchto procesů.

Identifikování nového účastníka ovlivňujícího meiózu a gametogenezi, by mohlo přispět k pochopení některých možných komplikací během tohoto dělení buňky, které by mohly mít vliv na celosvětovém trendu snižování plodnosti.

1. Neplodnost

Neplodnost postihuje celosvětově zhruba 15 % párů, což odpovídá číslu až 48,5 miliónu párů (Martinez *et al.*, 2006). Předpokládá se, že 50 % všech případů neplodnosti je způsobeno ženskými faktory, 20-30 % je způsobeno mužskými faktory a zbývajících 20-30 % kombinací mužských a ženských faktorů (Thomas *et al.*, 2002). Vypočtené údaje ukázaly, že distribuce neplodnosti v důsledku mužského faktoru se pohybuje od 20 % do 70 % a že procento neplodných mužů se pohybuje od 2,5 % do 12 %. Míra neplodnosti je zatím nejvyšší v Africe a ve střední a východní Evropě (Martinez *et al.*, 2012).

Tato statistika však jasně neurčuje neplodnost podle zeměpisné oblasti. Je nutné si uvědomit, že podle Světové zdravotnické organizace (WHO) mnoho klinických studií nezkoumá neplodnost, dokud se pár nepokusí o otěhotnění nejméně po dobu jednoho roku (Mascarenhas *et al.*, 2012).



Obr. 1. Mapa světa ukazující regionální procento případů neplodnosti, které jsou způsobeny mužským faktorem, vypočítané na základě přehledu současné literatury. Mapa ukazuje míru případů neplodnosti v každém studovaném regionu (Agarwal *et al.*, 2015).

Jedním z hlavních omezení těchto studií o neplodnosti je počet neplodných párů, které se nikdy nezúčastnily studií kvality spermatu a vajíček (Wilson, 2011). Je však jasné, že neplodnost je globální zdravotní problém, který nebyl plně studován a je potřeba, aby byly skutečně pochopeny jeho příčiny a prevalence.

Závažným problémem spojeným s plodností a ovlivňující reprodukcí jsou mutace na genové úrovni, numerické změny chromozomů nebo strukturní změny chromozomů (chromozomální aberace), které mají často za následek samovolné potraty nebo způsobují abnormální vývoj embrya.

Aneuploidie je jednou z hlavních známých příčin vrozených vývojových vad a potratů a bylo prokázáno, že většina aneuploidních embryí zahyne *in utero* (Nagaoka and Hassold, 2013).

Trisomická a monosomická (aneuploidní) embrya se vyskytují u žen nejméně v 10 % těhotenství, kde aneuploidie způsobují spontánní potraty a vrozené vady. U starších žen může incidence přesáhnout 50 %. Chyby, které vedou k aneuploidii, se téměř vždy vyskytují v oocyту, ale navzdory intenzivnímu zkoumání v poslední době zůstává větší část molekulárních příčin dosud neobjasněna. Nedávné studie u lidí a zvířecích modelových organismů vrhají nové světlo na složitost meiotických defektů a poskytují důkazy o tom, že nárůst chyb v meiotických procesech u žen související s věkem, není přičítán jedinému faktoru, nýbrž jde o souhru mezi jedinečnými rysy oogeneze a řadou endogenních a exogenních faktorů (Nagaoka and Hassold, 2013).

Výsledky ze studií za poslední roky ukázaly, že většina aneuploidií u žen je způsobena chybami, které se vyskytly při nástupu meiózy v embryonálním vaječniku (lat. *ovarium*) a při prodlouženém arestu ve fázi dyktiatene (Hassold *et al.*, 2007). Již více než deset let je známo, že meióza u žen je velmi náchylná zejména k chybám v segregaci chromozomů (Hassold and Hunt, 2001; Hassold *et al.*, 2007).

V lidských spermiích se aneuploidie vyskytují přibližně v 1-4 % a v oocytech v 10-15 % případů. Strukturní chromozomální aberace se vyskytují asi v 3 - 6 % oocytů. (Daina *et al.*, 2014; Pellestor, 2002).

Jedním z faktorů neplodnosti a problémů při reprodukci jsou chyby v buněčném cyklu.

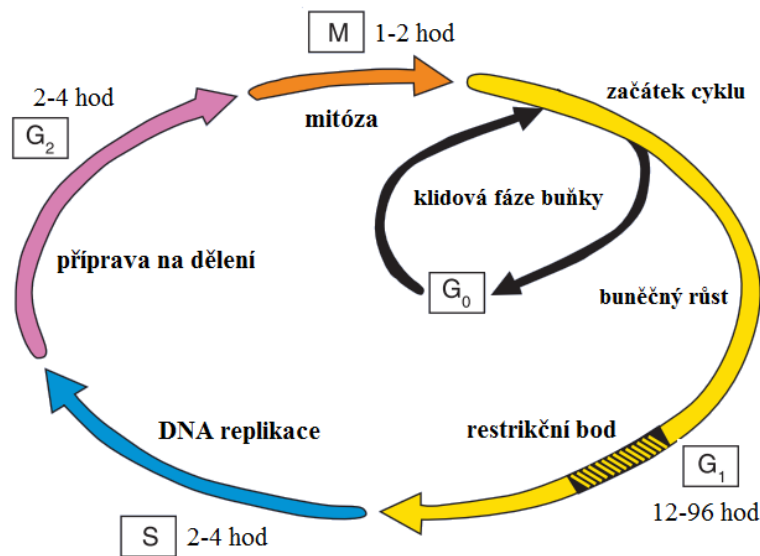
2. Buněčný cyklus

Chromozomy v proliferaujících buňkách podléhají dramatickým strukturním změnám v každém buněčném cyklu. Chromozomy se střídají mezi vysoce kondenzovanými mitotickými strukturami usnadňujícími jejich segregaci a dekonzenzovanými mezifázovými strukturami, které umožňují transkripci, umlčení genů a replikaci DNA (Nagano *et al.*, 2017).

Buněčný cyklus zahajuje eukaryotická buňka při svém vzniku a prochází několika fázemi zahrnujícími regulační signály (řadu změn a kritických momentů), díky nimž je rozhodnuto o jejím dalším osudu. Jestliže je v buňce vše v pořádku, buňka dokončuje cyklus mitózou, tedy rozdělením (Schafer, 1998). Pokud se vyskytne chyba, buňka zahájí proces apoptózy. Buněčné dělení je tedy přísně řízeným procesem, kdy musí být DNA přesně zreplikována a identické chromozomální kopie musí být rovnoměrně distribuovány do dvou dceřiných buněk. Buněčný cyklus dělíme do pěti různých fází: G1, S, G2 a M, případně klidová G0 fáze (Bower *et al.*, 2017), schématicky znázorněné na obr. 2. Celý proces obsahuje tzv. kontrolní body, ve kterých je buňka schopná pozastavit cyklus, dokud nejsou dokončeny klíčové úlohy předešlých fází (Hartwell and Weinert, 1989). Během fáze G1 je buňka stimulována extracelulárními mitogeny a růstovými faktory a zvětšuje svůj objem.

G0 fáze označuje klidové buňky (dočasně nebo trvale mimo cyklus). Normální buňka je závislá na vnějších podnětech, a pokud jsou podmínky příznivé (dostatek mitogenů a růstových faktorů) pokračuje z G0 přes časnou G1 fázi. Regulací buněčného cyklu se musí zajistit, aby události v každé fázi byly kompletní před přechodem do další. Další kontrolní body pro sledování integrity DNA jsou tedy strategicky umístěny do pozdní G1 fáze, označovaný jako restriční bod (R) a dále na rozhraní G2/M fáze. Restriční bod je nejlépe pochopeným a pravděpodobně nejdůležitějším regulačním místem, jelikož zde buňka může případně zablokovat vstup do S fáze. V kontrolním bodu na rozhraní G2/M fáze, se v závislosti na stupni poškození vada buď odstraní, nebo je potlačena mitóza, aby se zabránilo progresi a šíření mutovaných nebo poškozených buněk (Israels and Israels, 2001).

V S fázi buněčného cyklu nastává syntéza a buňka replikuje DNA. Je to nejdůležitější a zároveň nejkritičtější fáze celého cyklu. Postsyntetická fáze neboli G2 fáze bývá kratší a buňka v ní dále roste. V mitotické fázi (M) buňka zahájí dělení chromozomů následované cytokinezí. Zde se nachází další kontrolní bod, který kontroluje, aby buňka nepřešla do anafáze, dokud nejsou všechny chromozomy správně napojené na dělicí vřetenko. Po správném průběhu této fáze jsou výsledkem dvě dceřiné buňky s identickou genetickou informací (Israels and Israels, 2001).



Obr. 2. Schéma buněčného dělení. Na obrázku jsou vidět fáze buněčného cyklu G₀, G₁, S, G₂, M fáze a jejich funkce. Časová období znázorněná jsou pouze orientační a ukazují relativní čas každé fáze. Upraveno (Israels and Israels, 2001).

2.1 Mitóza

Mitóza je nejčastějším typem buněčného dělení somatických buněk, při kterém se neredukuje počet chromozomů a dochází k rovnoměrnému rozdělení genetické informace do dceřiných buněk, které jsou zcela identické s mateřskou buňkou. Zahrnuje dělení jádra (karyokinezi) a cytoplazmy (cytokinezi). Skládá se ze čtyř fází: profáze, metafáze, anafáze, telofáze. V profázi dochází ke spiralizaci chromozomů a rozrušuje se jaderná membrána. V metafázi se chromozomy řadí do ekvatoriální roviny a v následné anafázi se k centromerám chromozomů připojuje dělicí vřetenko a chromozomy putují k opačným pólům. V konečné telofázi dochází k zaškrcení a vzniku dvou diploidních dceřiných buněk.

2.2 Meióza

Meióza je na rozdíl od mitózy speciální buněčné dělení, při kterém se redukuje počet chromozomů na polovinu, a tím vznikají haploidní buňky. Toto buněčné dělení je klíčové a zásadní pro pohlavní rozmnožování, protože tímto procesem vznikají pohlavní buňky. Rozdíly mezi mitózou a meiózou jsou znázorněny na obr. 3.

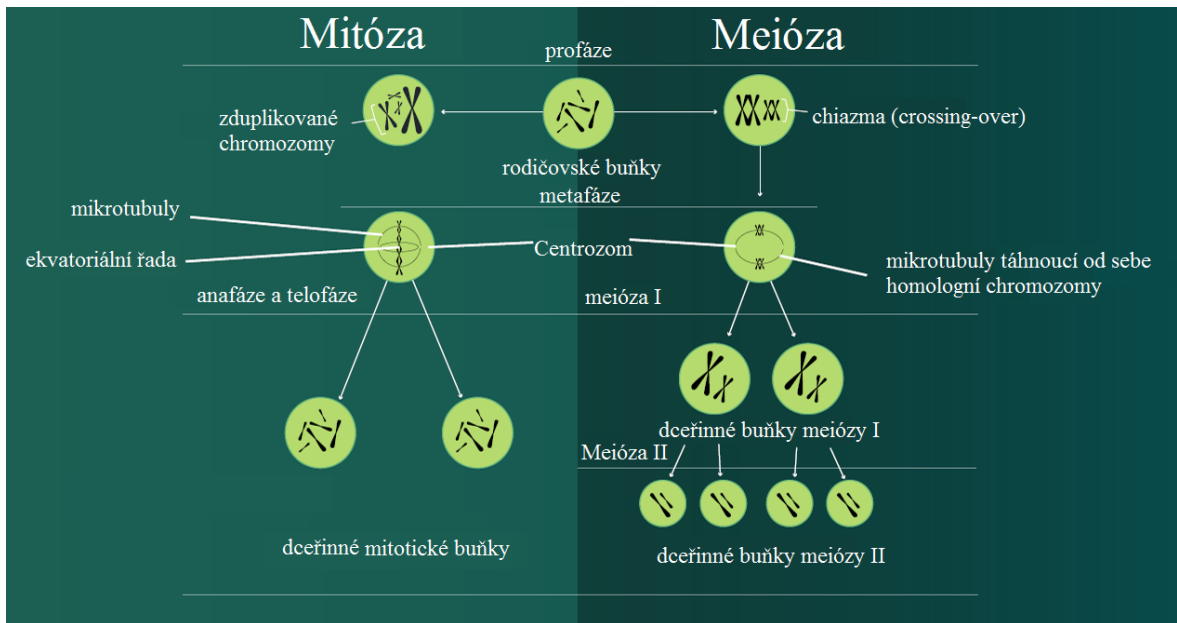
Meióza je proces skládající se ze dvou po sobě následujících dělení, meiózy I a II, obsahují čtyři fáze: profázi, metafázi, anafázi a telofázi. Do meiózy vstupuje diploidní buňka po S fázi buněčného cyklu, kdy se replikuje DNA. Každý chromozom je při vstupu do meiózy tvořen dvěma sesterskými chromatidami, které jsou spojeny centromerami.

Typický znak meiózy I je charakteristické prodloužení profáze I, která se dále dělí na leptotene, zygotene, pachytene, diplotene a diakinezi (Handel and Schimenti, 2010). Snížení ploidie, které nastává během tohoto prvního meiotického dělení, je nezbytné pro správnou fertilizaci a obsahuje několik klíčových kroků.

Prvním důležitým krokem meiózy I je vytvoření axiálního elementu (AE). AE je proteinová struktura, mezi sesterskými chromatidami, která tyto chromatidy drží pohromadě až do meiózy II. V zygotene dochází k částečné synapsi – párování homologických chromozomů a tvorbě synaptonemálního komplexu (SC), kdy se vytvoří jeden centrální element mezi dvěma axiálními, nyní laterálními elementy. Úplná synapse chromozomů nastává v pachytene, kdy dochází k synapsi po celé délce chromozomů, tvoří se bivalenty a nastává křížení vláken tzv. crossing over (CO). Zkřížená místa podstupující homologní rekombinaci se nazývají chiazmata a zůstávají spojená i po proběhlém CO až do diplotene (Zickler and Kleckner 1998; Dobson *et al.*, 1994).

CO je rozsáhlá výměna genetického materiálu mezi dvěma homologními chromozomy. Meióza je díky tomu velmi důležitým zdrojem genetické variability především proto, že CO reorganizují alelickou kombinaci uvnitř chromozomů (Ohkura, 2015; Grelon, 2016). V diakinezi se díky mikrotubulům dělicího vřeténka chromozomy stavějí do centrální roviny a v následné metafázi I se orientují do ekvatoriální roviny. Separace homologních chromozomů začíná během anafáze I. V telofázi I je dělicí aparát rozložen, dekonduzují se chromozomy a znovu se utváří jaderná membrána (Bolcun-Filas and Schimenti, 2012). Druhé meiotické dělení je již v principu shodné s mitózou.

Defekty v synapsi během meiotické profáze I byly rozsáhle studovány u myši (Hunt and Hassold 2002). U samců téměř vždy vedou ke smrti spermatocytů, a to buď v pachytene nebo v metafázi I. Naopak u žen je fertilita zachována, ale gamety obsahují mnoho mutací, které způsobují i úplné meiotické zastavení a jejich reprodukční délka života může být podstatně zkrácena. (Hunt and Hassold 2002).



Obr. 3. Znázornění rozdílů mezi mitózou a meiózou. Na obrázku jsou znázorněné rozdíly mezi kratší mitózou a delší meiózou. Konečným produktem mitózy jsou dvě dceřinné buňky s plným počtem chromozomů (tedy $2n = 46$ – u člověka). U meiózy jsou konečným produktem čtyři haploidní buňky, tedy buňky s redukovaným počtem chromozomů ($1n = 23$) (zdroj: <http://www.technologynetworks.com>, upraveno).

Tento výzkum se zaměřuje na období profáze meiózy I a v ní probíhající události. Proto je důležité vysvětlit základní principy a mechanismy profáze I.

2.2.1 Profáze I

Profáze I představuje v oogenezi více než 90 % časového průběhu meiózy, u lidí trvá přibližně 2-3 týdny. U myši probíhá zhruba od 14. do 19. dpc (*day post coitum* – den po oplození) a dokončuje se těsně po narození, zhruba do 3 dpp (*day post partum* – den po narození).

Profáze I je rozdělena do dalších pěti období: leptotene, zygotene, pachytene, diplotene a diakineze, které jsou definovány asociací mezi homologními páry chromozomů a

rekombinací (Obr. 4). Následkem selhání správného průběhu profáze I je nesprávný rozchod chromozomů a aneuploidie (Cobb and Handel 1998).

Fáze leptotene

Během leptotene chromozomy kondenzují a přibližují se k sobě. Každý chromozom musí najít a rozpoznat své homologní partnery, tedy chromozomy jednoho páru, získané od matky a otce. Tento pohyb chromozomů je velice důležitý, homology musí být tříděny, zarovnány a spárovány vysoce organizovaným způsobem, aby se zabránilo zamotání nebo propletení. Z toho důvodu se začíná tvořit tzv. kytice (bouquet stage), která je formována tak, že se konce chromozomů, za pomoci telomer, přichytávají k vnitřní jaderné membráně. Toto uspořádání usnadňuje hledání homologních partnerů a tím jejich párování, následnou synapsi a homologní rekombinaci (Harper, 2004). Po spárování dochází ke stabilizaci pomocí komplikované bílkovinné struktury SC. Osové vlákno synaptonemálního komplexu, AE, se začíná formovat v této fázi na obou párech sesterských chromatid, nejprve na více místech a poté se spojí v podélný element (Link and Jantsch 2019; Bolcun-Filas and Schimenti 2012).

Fáze zygotene

V této fázi se homologní chromozomy párují do těsné blízkosti podél celé jejich délky a dochází k synapsi za pomoci SC. AE jsou již plně zformované. LE jsou rovnoběžné struktury, které vznikly jako AE. Jejich složkou je mimo jiné protein SCP3 (synaptonemal complex protein 3) (Dobson *et al.*, 1994; Zickler and Kleckner 1998).

Mezi dvěma LE se začíná utvářet centrální element (CE) a příčná transversální vlákna (TF), složená mimo jiné z proteinu SCP1 (synaptonemal complex protein 1), propojují axiální prvky a tím dochází k synapsi. Tento proces připomíná zavírání zipu (Schmekel and Daneholt 1998).

Fáze pachytene

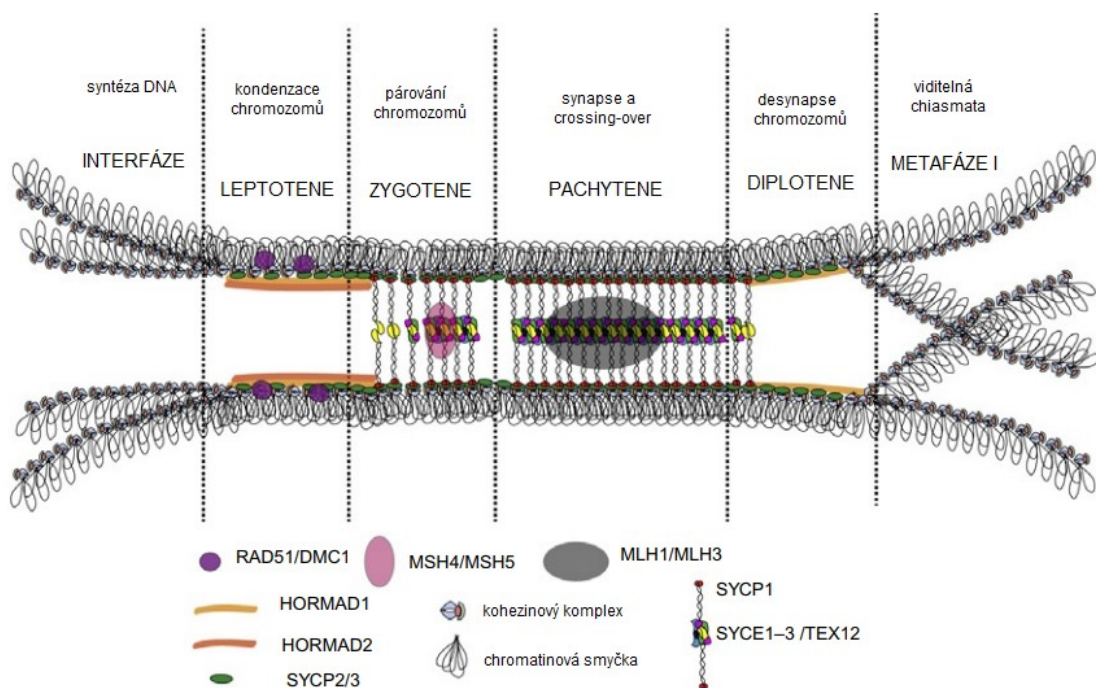
V pachytene jsou chromozomy v úplné synapsi. Spárované homology tvoří bivalenty a může tak dojít k homologní rekombinaci, CO. Při CO dochází k reciproční výměně genetického materiálu mezi dvěma nesesterskými chromatidami. Vznikající místa po CO se nazývají chiazmata (Szostak and Orr-Weaver, 1983; Ohkura, 2015; Grelon, 2016).

Fáze diplotene

Nástupem diplotene se SC rozpadá a homologní chromozomy se částečně oddělují a zůstávají spojeny pouze na centromerách a v místě chiazmat a definitivně se rozdělí až v anafázi I. Chiazmata a napojení centromer k dělicímu vřeténku jsou tedy nezbytné pro správnou segregaci homologů v metafázi I (Handel and Schimenti 2010; Bolcun-Filas and Schimenti 2012; Welburn *et al.*, 2009).

Fáze diakineze

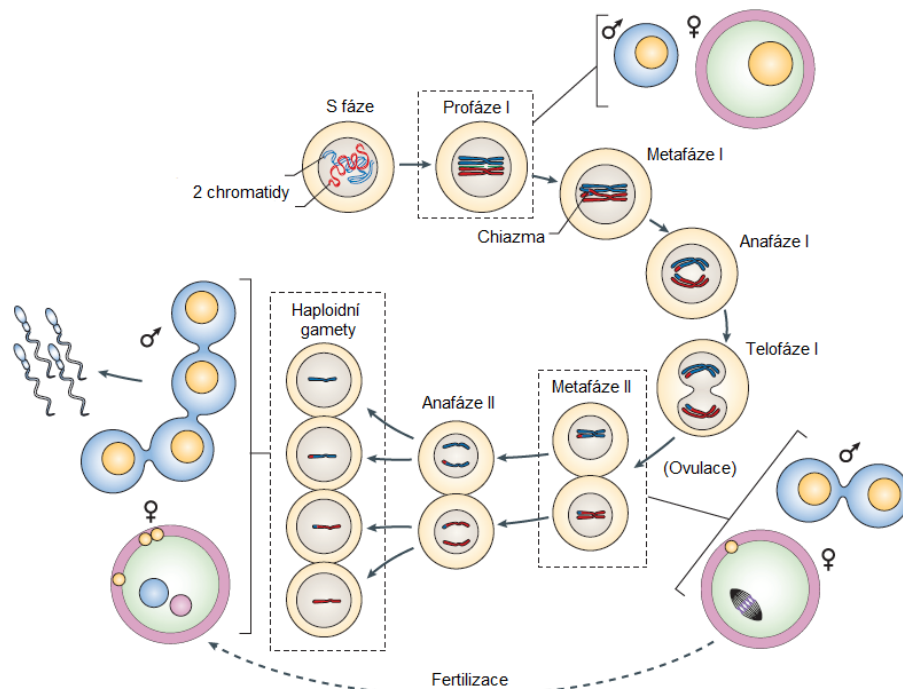
V této fázi se bivalenty dostávají do středu jádra za pomoci dělicího vřeténka, které se přichycuje pomocí mikrotubulů na vnější kinetochor, který je součástí centromery chromozomu a jaderná membrána se rozpadá (Snustad and Simmons, 2009; Welburn *et al.*, 2009).



Obr. 4. Schématické znázornění dějů během profáze I mezi homologními chromozomy a jednotlivé fáze profáze I. Upraveno (Bolcun-Filas and Schimenti 2012).

3. Gametogeneze

Esenciálním znakem života všech eukaryot je pohlavní rozmnožování (Welch and Meselson 2000), tedy splnutí dvou zralých haploidních pohlavních buněk, gamet, které vznikají procesem gametogeneze. Gametogeneze začíná tvorbou primárních zárodečných buněk (primordial germ cell – PGC) v embryích a probíhá odlišně v závislosti na pohlaví (Ishii and Saitou 2017) (Obr. 5). Samičí vajíčka vznikají oogenezí v ovariálních folikulech vaječníků, samčí spermie spermatogenezí v semenotvorných kanálcích varlat (Johnson, 2007).



Obr. 5. Průběh samčí i samičí gametogeneze s naznačenými fázemi meiózy. Výsledkem spermatogeneze jsou čtyři haploidní spermie, výsledkem oogeneze je jedno haploidní vajíčko a dvě pólová tělíska. Upraveno (Handel and Schimenti, 2010).

3.1 Spermatogeneze

Spermatogeneze je komplexní biologický proces buněčné transformace, který produkuje samčí haploidní zárodečné buňky, spermie, z diploidních spermatogoniálních kmenových buněk. Spermatogeneze je kontinuální proces.

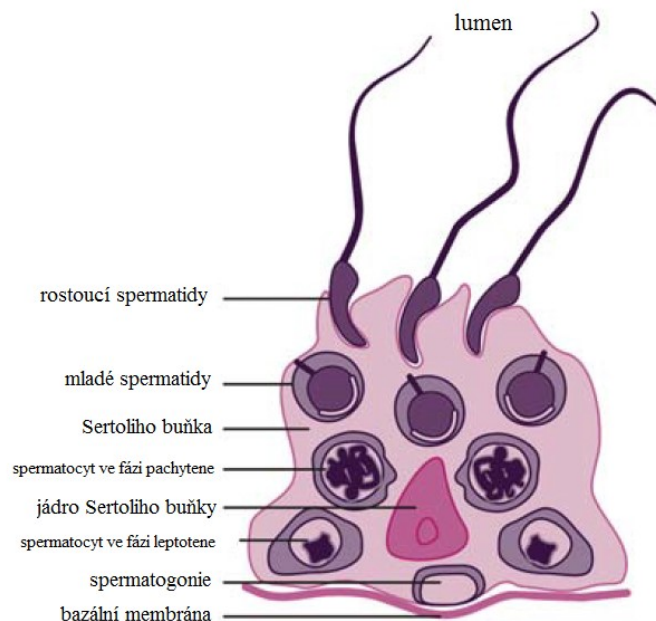
3.1.1 Spermatogeneze u člověka

U lidí je mužská fertilita dokončena až v pubertě. Vznik a vývoj mužských pohlavních buněk je komplexní proces, který je místně i časově specifický. Odlišujeme tři hlavní fáze spermatogeneze: spermatogoniální obnovu a proliferaci, meiózu a spermiogenezi (Bellve *et al.*, 1977).

Semenotvorný epitel se skládá ze zárodečných buněk, které tvoří četné koncentrické vrstvy obklopené jediným typem somatických buněk – Sertoliho buňky, znázorněné na obr. 6. Tyto buňky byly poprvé popsány Enricem Sertoli v roce 1865 (Sertoli, 1865; Lingala and Ghany, 2016). Cytoplazma Sertoliho buněk se šíří jako tenký výběžek kolem všech zárodečných buněk, aby zachovávala a udržovala jejich buněčné asociace během procesu spermatogeneze (Hess and Franca, 2008).

Zárodečné (kmenové) pohlavní buňky varlat tzv. spermatogonie jsou základem spermií a nacházejí se v bazální části semenotvorných kanálek mezi Sertoliho buňkami a mitoticky se dělí bazální membránou (Nagano *et al.*, 2000). Tyto diploidní buňky jsou klasifikovány jako spermatogonie typu A a po několika vývojových fázích se z nich stávají spermatogonie typu B, ze kterých vznikají mitotickým dělením primární spermatocyty. Následně tyto primární spermatocyty procházejí meiotickým dělením a vznikají spermatidy, které jsou haploidní a přemísťují se do lumenu semenotvorných kanálek. Spermie vznikají spermiogenezí v poslední fázi spermatogeneze. Ze spermatid a z lumenu kanálek se dostávají tzv. spermiací vývody semenotvorných kanálek do nadvarlete (lat. *epididymis*), kde jsou v *cauda epididymis*, v poslední části nadvarlete, uskladněny až do ejakulace (Borg *et al.*, 2009).

U lidí celý tento proces, od kmenových spermatogonií až po zralou spermii, trvá přibližně 70 dní. A každá fáze spermatogeneze (spermatogonie, spermatocyty a spermatidy) trvá přibližně jednu třetinu celého procesu. Odhadovaná denní produkce spermií na člověka se pohybuje od 150 do 275 milionů spermií (Amann 2008; Hess and Franca, 2008).



Obr. 6. Znázornění semenotvorného kanálku varlat a Sertoliho buňky. Vývoj spermií jde směrem od bazální membrány přes spermatogonie (typ A, B), spermatocyty podstupující meiózu až po rostoucí spermatidy. Upraveno (Borg et al. 2009).

3.1.2 Spermatogeneze u myši

U myši (*Mus musculus*) může být plná plodnost pozorována ve věku 6-7 týdnů a celý proces spermatogeneze u nich probíhá ve varlatech (lat. *testes*). U myši probíhá spermatogeneze mezi 30. a 40. dnem a z jedné spermatogonie vzniká přibližně 256 spermií. (Oakberg 1956; Borg *et al.*, 2009). Zahajuje se krátce kolem 6. dne po narození. Probíhá v semenotvorných kanálcích varlat, v seminiferním epitelu, který je vrstevnatý a obsahuje vyvíjející se zárodečné buňky, které jsou obklopeny populací somatických Sertoliho buněk, tak jako je tomu u člověka (Borg *et al.*, 2009; Nagano *et al.*, 2000).

3.2 Oogeneze a folikulogeneze

Oogeneze je velice specializovaný proces, při kterém se tvoří a vyvíjí samičí pohlavní buňky – oocyty. Na rozdíl od muže je počet buněk zárodečného epitelu konečný. Během reprodukčního života ženy se uvolní kolem 400 zralých vajíček.

3.2.1 Oogeneze u člověka

Vývoj oocytu neboli oogeneze, začíná v okamžiku, kdy se z kmenových buněk diferencují primordiální zárodečné buňky (Obr. 7). Tyto zárodečné buňky migrují

a proliferují mitotickým dělením do genitálního hřebene, kde se z nich stávají oogonie, kterých je ve vaječniku založeno okolo 2 milionů. Oogonie se začínají mitoticky dělit od 2. měsíce intrauterinního vývoje. Následně vznikají primární oocyty. Lidské primární oocyty vstupují do meiózy v 7. měsíci intrauterinního vývoje a zastavují se v profázi prvního meiotického dělení (jedná se o 1. meiotický arest). Tento arest trvá zhruba do 12 let života ženy. Jednotlivá vajíčka začínají postupně dozrávat (znovuzahájení procesu meiózy) až do menopauzy, v průměru do 45. roku života (Greenhouse *et al.*, 1998).

Lidské oocyty dorůstají do velikosti až 120 μm . Primární oocyt svůj vývoj pozastaví v diplotene na konci profáze I a nastává diktyotenní fáze (dictyate arrest), kde oocyt setrvává několik týdnů (myš) až let (člověk), než dojde k uvolnění luteinizačního hormonu a k následné ovulaci, kdy může být meióza I dokončena. S nástupem diktyotenní fáze začínají obklopotvat jednotlivé oocyty ploché somatické buňky, které tvoří tzv. granulózu a vytvářejí se primordiální folikuly. Jádro těchto oocytů se označuje jako zárodečný váček (germinal vesicle – GV). V pohlavní dospělosti po dokončení meiózy I vzniká větší sekundární oocyt a první pólové tělísko s minimem cytoplazmy. Primordiální folikuly dozrávají v primární folikuly. Granulózní buňky se množí, vytvářejí více vrstev a mění se na kubické a folikul se zvětšuje. Vzniká sekundární folikul. Mezi granulózními buňkami se následně začínají tvořit dutinky vyplněné folikulární tekutinou a vzniká antrum Graafova folikulu. Lidský Graafův folikul dosahuje až 2 centimetrů, myší kolem 0,5 milimetrů. Oocyt je schopen v této fázi pokračovat v meióze II. Luteinizační hormon vyvolává ovulaci a způsobuje obnovení a dokončení prvního meiotického dělení (Greenhouse *et al.*, 1998; Griffin *et al.*, 2006).

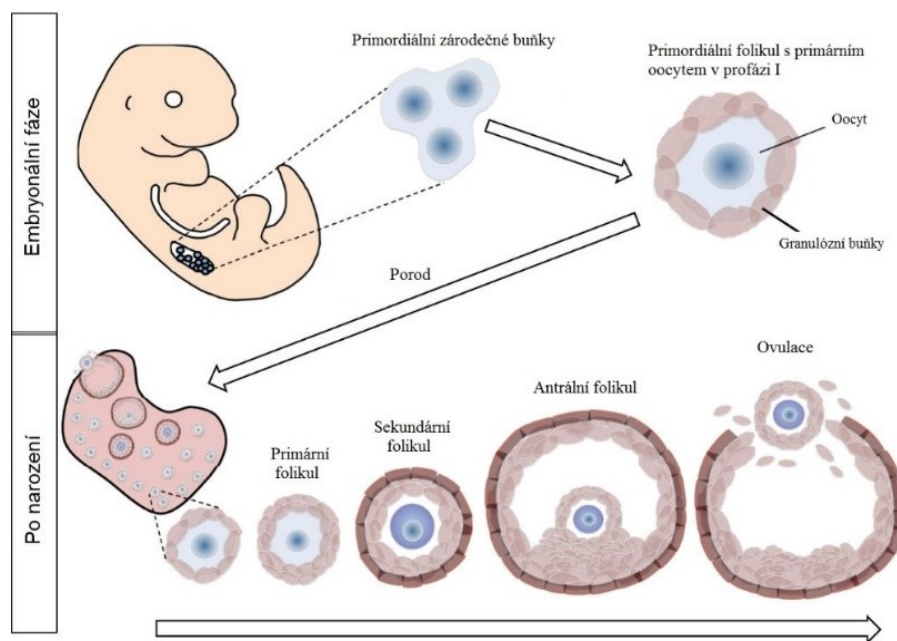
V metafázi druhého meiotického dělení oocyt opět pozastaví svůj vývoj v druhém arestu, dokud nedojde ke splnutí se spermií, k oplození. Následně se dokončuje druhé meiotické dělení, vytvoří se druhé pólové tělísko a haploidní vajíčko. Růst oocytů u člověka trvá přibližně 85 dní a obvykle vrcholí ovulací jediného vajíčka (Griffin *et al.*, 2006).

Pro plodnost je tedy rozhodující, aby oocyty procházely správným meiotickým průběhem, protože kvalita oocytů je hlavním limitujícím faktorem fertility u žen, který odráží vnitřní vývojový potenciál oocytu a má klíčovou úlohu nejen v oplození, ale také v následném dalším vývoji (Gilchrist *et al.*, 2008). Dalším faktorem zajištění normálního růstu oocytů, je třeba regulovat apoptózu podporou exprese anti-apoptotických genů. U

savců může vyvolat apoptózu oocytů několik faktorů, jako jsou například zvýšené hladiny reaktivních druhů kyslíku (ROS) nebo destrukce komunikace buněk oocytů a granulózy (Tiwari *et al.*, 2015).

3.2.2 Oogeneze u myši

U myši začíná oogeneze od 7.5 dne embryonálního vývoje (ED7.5 – embryonal day), kdy se začínají tvořit primordiální zárodečné buňky a po následné rychlé proliferaci mitotickým dělením a po transportu do genitálního hřebene vznikají oogonie. Oogonie roste a kyselina retinová stimuluje oogonie ve vaječniku, aby vstoupily do meiózy zhruba mezi ED10.5 - 13.5, kdy vzniká primární oocyt, který má zhruba 60-90 μm (Slizynski, 1957; Ginsburg *et al.*, 1990; Ikami *et al.*, 2017) Následná folikulogeneze začíná od 5 dpp a pokračuje do stadia plně dospělého zárodečného vaku (Lucifero *et al.*, 2007).



Obr. 7. Naznačený vývoj oocytu a folikulogeneze. Převzato a upraveno (Grive and Freiman, 2015).

3.3 Myš jako modelový organizmus pro studium chyb v meióze a gametogenezi

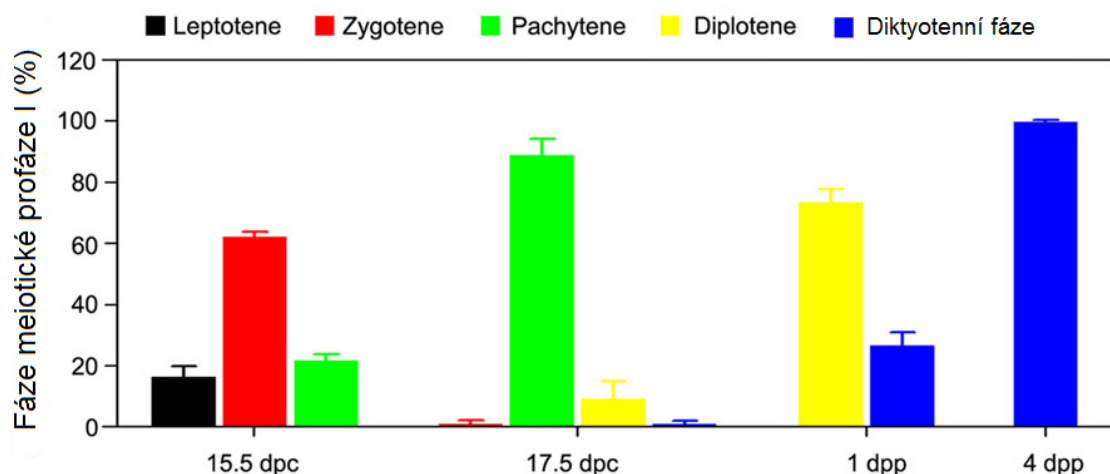
Jedním z nejběžněji používaných modelových organizmů pro studium chyb při procesech tvorby pohlavních buněk a také neplodnosti je v současné době myš (*M. musculus*).

Díky rychlé a snadné reprodukční aktivitě je zajištěn dostatečný materiál pro experimentální práci.

Velká většina genů a procesů, které se podílejí na produkci pohlavních buněk, se zdají být mezi myšmi a lidmi velice podobné a většina genů je homologních s lidskými (zdroj: <https://www.uniprot.org>).

Další výhodou myši je známá kompletní sekvence genomu a také to, že klíčové časové body výskytu určitých typů zárodečných buněk jsou dobře známé (Bellve *et al.*, 1977).

Jsou známy také časové body jednotlivých fází profáze I v myších (Obr. 8). Oocyty ve stadiu zygotene převažují v ováriu v 15.5 dpc. Většina oocytů je ve fázi pachytene v 17.5 dpc a v diplotene jsou oocyty v prvních dnech po narození. Následně je oocyt zastaven v diktyotenním arestu několik týdnů (Wang *et al.*, 2015).



Obr. 8. Jednotlivá stádia meiotické profáze I u myši. Dpc – day *post coitum* – den po oplození, dpp – day *post partum* – den po narození. Upraveno (Wang *et al.*, 2015).

4. Vinkulin

Vinkulin (VCL) je vysoce konzervovaný cytoplazmatický protein a je hlavní složkou buněčných spojení. U člověka je gen pro vinkulin lokalizován na 10. chromozomu (10q22.2), u myši se tento gen nalézá na 14. chromozomu (zdroj: <https://www.uniprot.org>).

4.1 Cytoplazmatický vinkulin

V komplexních mnohobuněčných organizmech jsou tkáně složeny z jednoho nebo více typů buněk. Buňky epiteliálního nebo endoteliálního původu přiléhají k sousedním buňkám skrze přímé interakce mezi dvěma buňkami za pomoci cytoskeletu, adherentních spojů, a váží se na základní bazální membránu prostřednictvím další interakce, fokální adheze, mezi buňkou a mezibuňčnou hmotou tzv. extracelulární matrix. Oba typy adheze jsou esenciální pro embryonální vývoj, morfogenezi, remodelaci tkáně, migraci buněk a další homeostatické procesy přežití všech mnohobuněčných organismů (BurrIDGE and Mangeat, 1984). Dysregulace adhezních komplexů vede k řadě onemocnění, jako je rakovina, diabetes a kardiovaskulární onemocnění (Brown and Izard, 2015).

VCL váže aktin ve fokálních adhezích a adherentních spojích a je jejich esenciálním regulátorem (Borgon *et al.*, 2004). VCL nemá žádnou enzymatickou aktivitu, ale reguluje adhezi přímou vazbou na aktin a stimuluje jeho polymeraci (Brown and Izard, 2015). Jeho funkce je také řízena interakcemi s ostatními proteiny, které jsou částečně vysoce regulované právě konformačními změnami a také posttranslačními modifikacemi (Tokuyasu, 1980; Babic *et al.*, 2009). Tímto způsobem je VCL zapojen do ukotvení aktinu k membráně. (Borgon *et al.*, 2004).

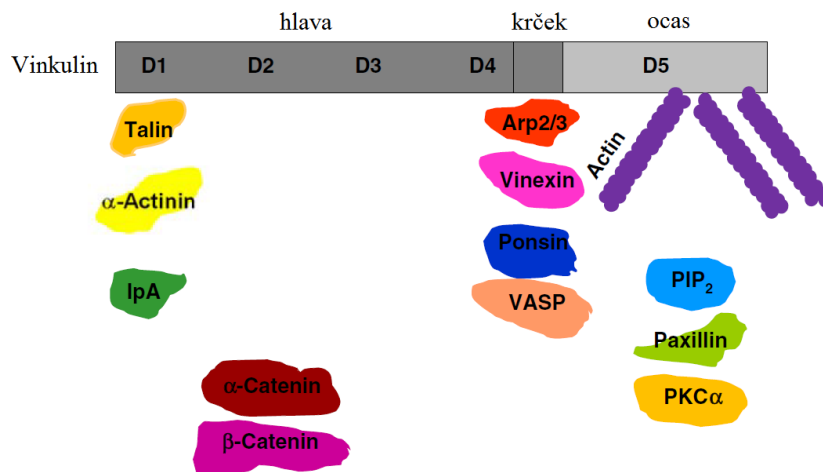
FA obsahují ploché, protáhlé struktury bohaté na integriny tzv. fokální komplexy na buněčné periferii. Cytoplazmatické konce molekul integrinů se váží s celou řadou proteinů, které aktivaci integrinů regulují. VCL je vázán k integrinům prostřednictvím interakce s talinem. Naproti tomu v místech, kde buňky přiléhají k sousedním buňkám, jsou adherentní spoje obohaceny o transmembránové adhezivní proteiny známé jako kadheriny. Klíčem k funkci je spojení adhezních proteinů s aktinovým cytoskeletem (BurrIDGE and Mangeat, 1984; Brown and Izard, 2015).

V roce 1979 byl vinkulin izolován z hladkého svalstva kuřecího žaludku jako molekula, která interagovala s α -aktininem (Jolla, 1979). Charakterizace nejprve ukázala, že byl lokalizován v oblastech, kde byly aktinové svazky zakončeny ve vazebných místech

membrány. Protein získal název vinkulin z latinského slova *vinculum* – sjednocení nebo jednota. V roce 1982 Isenberg popsal vinkulin jako kompaktní globulární protein (Isenberg *et al.*, 1982).

Vinkulin je 117-kDa α -helikální protein obsahující 1066 aminokyselin. Skládá se z velké N-terminální domény (Vh, D1-4) a malé C-koncové domény (Vt, D5) spojené s flexibilním krčkem bohatým na prolin. Vinkulin má vazebná místa pro několik proteinů. Na hlavové doméně je prvním z nich talin dále α -catenin (Weiss *et al.*, 1998), β -catenin (Hazan *et al.*, 1997), α -aktinin (Jolla, 1979) a IpaA (Tran Van Nhieu *et al.*, 1997). Proteiny, které interagují s oblastí krčku, zahrnují vazodilatačně stimulovaný fosfoprotein (VASP) (Schmekel and Daneholt, 1998; Brindle *et al.* 1996), komplex Arp2/3 (DeMali *et al.*, 2002), vinexin (Kioka *et al.* 1999) a ponsin (Mandai *et al.* 1999). Ocasní část vinkulinu zahrnuje vazebná místa pro paxillin (Turner *et al.*, 1990), F-aktin (Johnson and Craig, 1995a), fosfatidylinositol-4,5-bisphosphate (PIP₂) (Palmer *et al.*, 2009), proteinkinázu C α (PKC α) (Weekes *et al.*, 2015) a raver1 (Hüttelmaier *et al.*, 2001).

Tento protein můžeme nalézt ve dvou konformacích, a to v autoinhibované – neaktivní a otevřené – aktivní konformaci. Při neaktivní konformaci jsou vazebná místa pro proteiny nepřístupná. Vazebná místa na hlavě, ocasu a krčku jsou strukturálně odlišné, ale konformačně a termodynamicky propojené (Bakolitsa *et al.*, 2004; Borgon *et al.*, 2004).

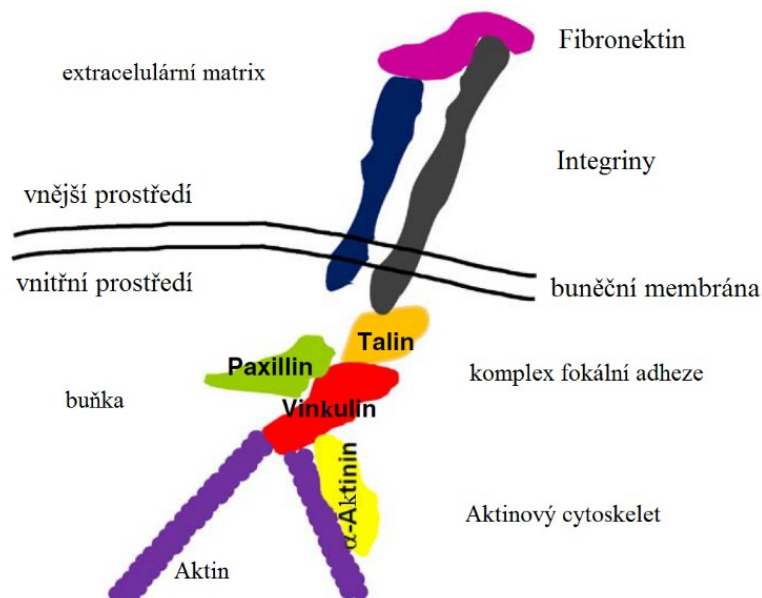


Obr. 9. Domény vinkulinu a vazebné proteiny. Upraveno (Mierke, 2009).

Úloha vinkulinu v živých organizmech stále není plně prozkoumána. Avšak je například známo, že poruchy v genu pro vinkulinu jsou příčinou kardiomyopatie (Zemljic-Harpf *et al.*, 2007). Dilatační kardiomyopatie je porucha charakterizovaná dilatací komor a narušenou systolickou funkcí, která vede k městnavému srdečnímu selhání a arytmií. Dále bylo u lidí například zjištěno, že exprese vinkulinu je zvýšená v selhávajícím srdci s mechanickou podporou oběhu (ventricular assist device – VAD), nebo v selhávajících srdcích, které ji neměly, a tedy že se exprese vinkulinu může zvýšit jako prostředek k posílení selhávající srdeční buňky (Zemljic-Harpf *et al.*, 2007).

Při celotělovém deletování genu *Vcl* u myši (VCL KO) jsou embrya o 30-40% menší s abnormálním vývojem od ED8.5 a umírají v ED10.5 dnu s neurálními defekty, včetně nedostatečné středové fúze rostrální neurální trubice a nesprávného vývoje lebečního a spinálního nervu, dále aberantním vývojem předních končetin, redukovanou velikostí srdce se sníženým počtem myocytů a také křehkými a řídkými ektodermálními tkáněmi (Zemljic-Harpf *et al.*, 2007; Xu *et al.*, 1998). V nepřítomnost vinkulinu jsou buněčné adheze poškozeny, což naznačuje, že vinkulin hraje rozhodující roli v lidské fyziologii.

Naopak v buňkách nadměrně exprimujících vinkulin se zvyšuje počet a velikost fokálních adhezí a snižuje se buněčná motilita (Fernandez *et al.*, 1992). Vinkulin tedy negativně reguluje pohyblivost buněk prostřednictvím svých účinků na buněčnou adhezi.



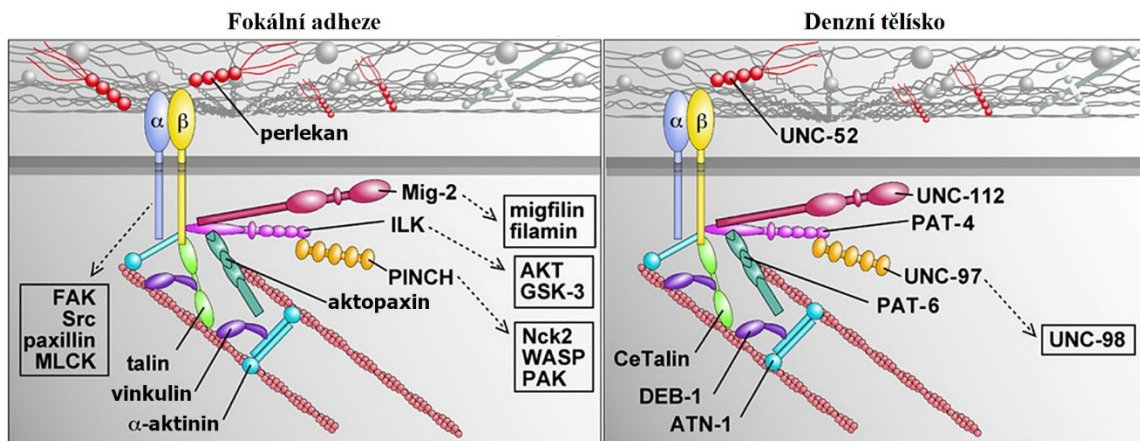
Obr. 10. Schématický nákres komplexu fokální adheze. Upraveno (Mierke, 2009).

4.2 Vinkulin v jádře pohlavních buněk

Naše laboratoř Epigenetiky buněčného jádra používá dva modelové organizmy pro zkoumání meiotických událostí. Jsou jimi myš domácí *Mus musculus* a dále háďátka obecné *Coenorabditis elegans*. Oba tyto organizmy mají homolog genu pro vinkulin.

Protein DEB-1 (z angl. Dense body) je vinkulinový homolog u *C. elegans*, kde homologie dosahuje až 85 %. Protein DEB-1 interaguje také s aktinovými filamenty, stejně jako vinkulin u člověka a u myši. U *C. elegans* jsou tato aktinová filamenta přítomna v cytoplazmě a poblíž membrány svalových denzních tělísek, kde tato vlákna DEB-1 spojuje s bazální sarkolemou ve svalu (Obr. 11) (Barstead and Waterston, 1989; Barstead and Waterson, 1991).

Narozdíl od vinkulinu má DEB-1 několik izoform, krátké a dlouhé, s tím, že krátké se vyskytují jak v cytoplazmě, tak v jádře. Bylo objeveno, že krátká jaderná izoforma má vliv na tvorbu synaptonemálního komplexu a je nepostradatelná pro stabilizaci homologních chromozomů a pro správnou segregaci chromozomů (Rohožková *et al.*, 2019).

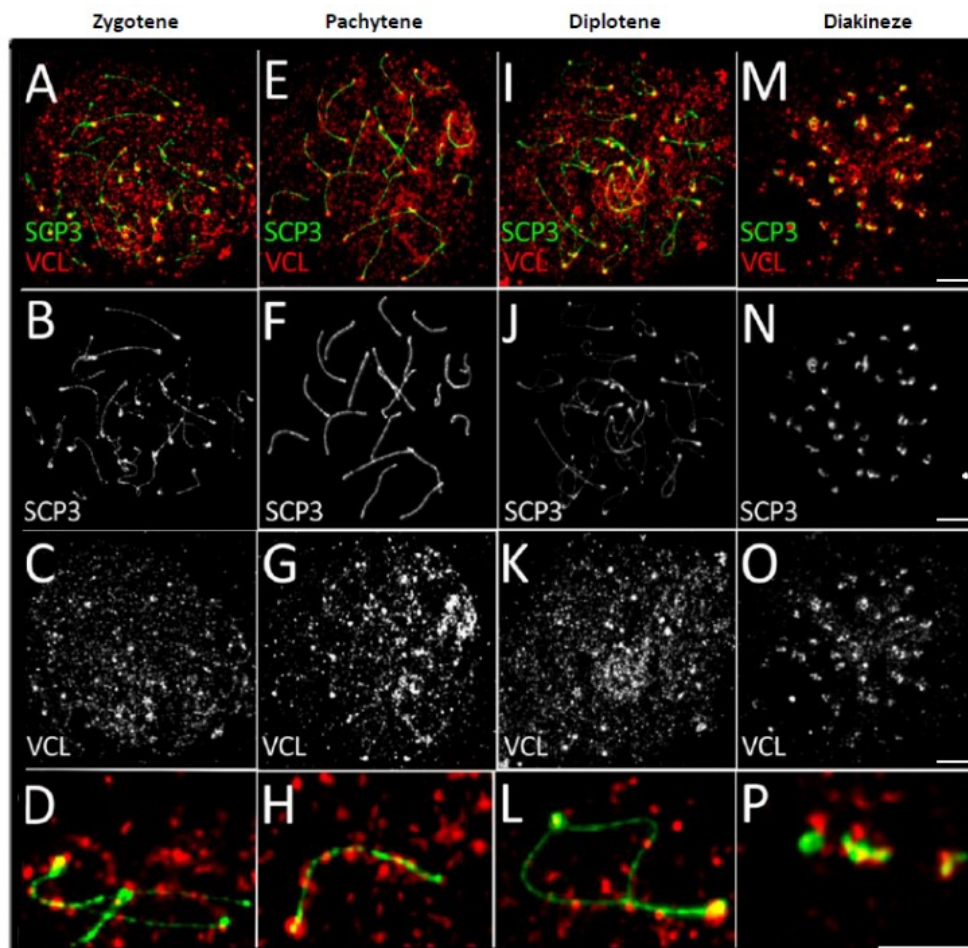


Obr. 11. Schématické porovnání fokální adheze u obratlovců a denzních tělísek u *C. elegans* obsahující několik proteinů. Na obrázku je vidět, jak interaguje vinkulin a DEB-1 s aktinovými vlákny (zdroj: <http://www.wormbook.org>; upraveno).

U myši bylo v naší laboratoři zjištěno, že se VCL lokalizuje mimojiné do jádra myších spermatocytů podstupujících meiotickou profázi I, kde VCL ve stadiu pachytene dekoruje synaptonemální komplex a v dalších fázích přetrvává na centromerách (Obr. 12) (Flachs, nepublikovaná data).

Lokalizace a jeho dynamika v jádrech spolu s pochopením jeho funkce byla prozatím neznámá. Naše laboratoř ukázala lokalizaci a aktivitu VCL v buněčném jádru, která dosud nebyla popsána.

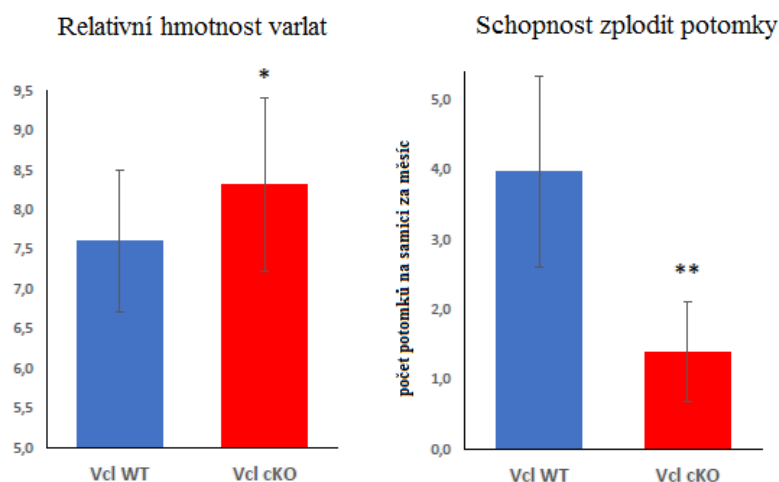
Data ukazují dynamické změny lokalizace VCL během profáze I (Obr. 12). Zatímco v leptotene se VCL lokalizuje v jádrech spermatocytů velmi slabě a je difuzní, v zygotene se začíná akumulovat (Obr. 12 A-D). V pachytene se VCL lokalizuje v těsné blízkosti centromerických oblastí a dekoruje již párované homologní chromozomy (Obr. 12 E-H). V diplotene se tato dekorace pomalu vytrácí (Obr. 12 I-L) a v diakinezi jsou patrné shluky na centromerách (Obr. 12 I-P).



Obr. 12. Lokalizace VCL v jádrech spermatocytů v jednotlivých fázích profáze I. Vinkulin - VCL červeně, Synaptonemální komplex - SCP3 zeleně. (Rohožková, nepublikovaná data)

Pro objasnění úlohy VCL v jádrech spermatocytů byl vytvořen místně i časově podmíněný knock-out VCL (VCL cKO) za použití Cre/LoxP systému, kde je Cre rekombináza řízena promotorem *Smc1b*, specifickým pro testes. Celotělová delece genu pro *Vcl* je embryonálně letální (viz kap. 4.1.) (Zemljic-Harpf *et al.*, 2007; Xu *et al.*, 1998). Pokles exprese VCL v semenotvorných tubulech byl potvrzen mikroskopicky (nepřímá imunofluorescence) a biochemicky (western-blot) (Flachs, nepublikovaná data).

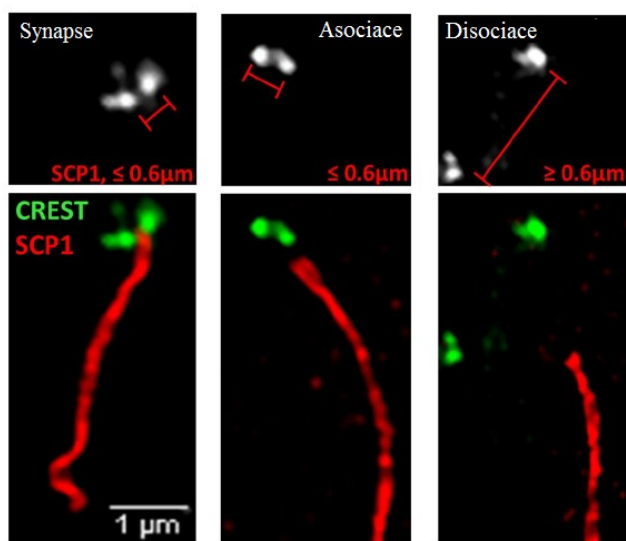
Následující experimenty ukázaly, že relativní hmotnost varlat mutantních samců (VCL cKO) je významně vyšší než relativní hmotnost varlat srovnatelných samců divokého typu (VCL WT). Také se prokázalo, že v porovnání s kontrolními samci, mutantní samci mají výrazně nižší schopnost zplodit potomky (Obr. 13) (Flachs, nepublikovaná data)



Obr. 13. Graf relativní hmotnosti varlat a samčí fertility. Potomci se počítaly ze čtyř chovů obou genotypů (VCL WT kontrolní myš, VCL cKO mutantní myš). Každý samec byl chován se dvěma samicemi po dobu 8 až 10 měsíců (Flachs, nepublikovaná data).

Dále se zjistil zvýšený výskyt předčasně desynapsovaných centromer homologních chromozomů u mutantního kmene. Centromery jsou jednou z posledních oblastí, které se mají oddělit, přičemž vysoké hladiny asociace zůstávají až do konce diplotene (Obr. 14) (Qiao *et al.*, 2012). Procento centromer v homologní synapsi byla významně snížena u VCL cKO (44,95 %) ve srovnání s kontrolou (76,16 %) ve stádiu diplotene.

Na konci fáze diplotene je SCP1 lokalizován vždy s přidruženými centromerami a také s chiazmaty (Qiao *et al.*, 2012).



Obr. 14. Výskyt předčasně oddělených homologů na centromerách. Na obrázku jsou vidět centromery (CREST, zeleně) a synaptonemální komplex (SCP1, červeně). Centromery v synapsi byly definovány jako pár ložisek, které byly od sebe $\leq 0,6 \mu\text{m}$ a kolokalizovaly s SCP1. Disociované centromery byly definovány jako pár ložisek, které od sebe byly $> 0,6 \mu\text{m}$ a nekolokalizovaly s SCP1. Foceno pomocí superrezoluční mikroskopie (SIM - Structured Illumination Microscopy).

V současné době se provádí další zkoumání na buněčných kulturách, pomocí kterých je zkoumán predikovaný bipartitní jaderný lokalizační signál (NLS, z angl. Nuclear localization signal/sequence) v molekule vinkulinu, jakožto možný způsob transportu tohoto proteinu do jádra (Rohožková, nepublikovaná data).

5. Cíle

Cílem mé práce byl popis přípravy myšího kondičálního knock-out kmene ♀ VCL cKO pomocí Cre/LoxP systému. Dalšími cíly byly:

- Lokalizovat VCL v embryonálních profázních pachytenních oocytech
- Potvrdit snížení exprese VCL u mutantního kmene myši
- Analyzovat zapojení proteinu VCL do reprodukce samic a určit, zda je obdobné jako u samců
- Sledovat další specifické fenotypy mutantního kmene (např. upřednostnění jednoho pohlaví)

6. Materiály a metody

6.1 Materiál

6.1.1 Laboratorní myš

Modelový organizmus použitý pro experimenty v mé práci je myš domácí (*Mus musculus*).

Biotechnologické a biomedicínské centrum Akademie věd a Univerzity Karlovy ve Vestci disponuje bariérovým chovem, zvířata jsou tedy oddělena od vnějšího prostředí. Ke křížení byly použity inbrední laboratorní kmeny (skupina genotypově stejných zvířat vzniklá příbuzenským křížením). Pro komunikaci s ošetřovateli, katalogizaci a správu pokusných zvířat byl používán systém PyRAT (angl. Python based Relational Animal Tracking).

Kontrolní myší kmen v mé práci je $Vcl^{lox/lox}$

Tento kmen byl vyvinut jako kontrolní wild-type (WT) (Zemljic-Harpf et al. 2007). Byl vyvinut systémem Cre/LoxP. Tyto myši mají označené introny (loxP místa) kolem exonu 3 genu *Vcl* a označuje tak místo, které bude v dalších generacích myší při křížení vystřiženo Cre rekombinázou (Zemljic-Harpf et al. 2007). Tato linie byla poskytnuta z laboratoře prof. Jessbergera (Drážďany, Německo).

Mutantní myší kmen je $Vcl^{lox/lox} Gdf9-iCre$

Myši tohoto kmenu nesou gen pro *Cre* rekombinázu, která je místně i časově specifická. *Cre* rekombináza se začne exprimovat pod promotorem růstového diferenciačního faktoru 9 (*Gdf9*), specifického pro ovária (vzniklý genotyp $Vcl^{lox/lox} Gdf9-iCre$).

Kmen *Gdf9-iCre* byl zakoupen od “The Jackson Laboratory“ (USA).

Úloha GDF9 začíná v raných stádiích vývoje primárního oocyty a dále pokračuje během folikulogeneze a ovulace. Ovária myších samic také díky GDF9 tvoří primordiální folikuly a jsou schopny se vyvíjet do dalších stádií. GDF9 pomáhá také regulovat funkci pregranulových buněk (Cook-Andersen et al., 2016; Rajkovic et al., 2004).

S pokusnými zvířaty bylo zacházeno v souladu se zákonem na ochranu zvířat proti týrání § 15d odstavce 3 zákona č. 246/1992 Sb.

6.2 Metody

6.2.1 Přípouštění myši a odběr embryí

Samice byly připuštěny vždy přes noc a druhý den ráno se kontrolovalo, zda má či nemá vaginální zátku, která se tvoří po oplození. Když byla zátka přítomna, myš se považovala za gravidní, a tedy ten den již bylo embryo staré 0.5 dne (E0.5) (Behringer *et al.*, 2016). Březí samice byly usmrceny cervikální dislokací a embrya byla odebírána v jednotlivých fázích profáze I, tedy v E14.5 – E19.5 dpc a krátce po narození v 1-3dpp. Po vyjmutí embryí z dělohy byla embrya na ledu v Petriho misce, s vychlazeným 1x PBS, zbavena plodových obalů, zvážena a usmrcena dekapitací.

Fosfátový pufr (1x PBS) - 8 g NaCl; 0,2 g KCl; 1,44 g Na₂HPO₄; 0,24 g KH₂PO₄, objem do 1 litru destilované vody. pH roztoku upraveno na 7,4.

6.2.2 Izolace embryonálních ovárií a následná imunofluorescence

Při pitvě embryí byla prvním krokem dekapitace a následné odstříhnutí horních končetin a trupu. Nastříhla se kůže z obou stran podél trupu až k dolním končetinám a odstříhla se žebra. Pinzetou se tahem odebraly vnitřní orgány a zůstala jen močová a pohlavní soustava. Z embryí byly vyizolovány pod stereolupou (Zeiss) obě ovária, která jsou umístěna pod ledvinami. Ovária byla očištěna od okolních tkání, 3x byla opláchnuta ve 200 μ L 1x PBS v 12-jamkové destičce. Na připravené sklíčko bylo napipetováno přibližně 50 μ L 0,1M sacharózy (Sigma). Ovária byla přenesena na sklíčko a s pomocí dvou injekčních jehel (průměr 0,30 mm) se rozrušila celistvost ovárií, aby se z něj uvolnil co největší počet oocytů. Přidalo se dalších 50 μ L 0,1M sacharózy a buňky byly rozprostřeny rovnoměrně po skle pomocí špičky na pipetu. V hypotonickém prostředí buňky zůstaly přibližně 10 minut. Poté bylo přidáno na skla 180-200 μ L 1% PFA (Biogen) a objem se roztáhl po celém skle opět pomocí špičky. Následně se skla inkubovala 3 hodiny při 4 °C v krabici s vodou pro zachování humidity. Po 3 hodinách následovaly kroky zapsané do tabulky 1. Tabulka 2 zobrazuje použité protilátky.

Tab. 1. Protokol pro imunofluorescenci.

Destilovaná voda	1 min
1x PBS	5 min
1x PBS	5 min
Blokační roztok	90 min při 4 °C
Primární protilátka na vzorcích zředěná v blokovacím roztoku, vzorky přikryté krycím sklem	inkubace přes noc při 4 °C
1x PBS	8 min
1x PBS	8 min
Sekundární protilátka zředěná v blokovacím roztoku	60 min
1x PBS	10 min
1x PBS	10 min
Voda pro tkáňové kultury	10 min
Montovací médium vectashield s DAPI (Thermo Fisher Scientific)	

Tab. 2. Seznam použitých protilátek pro imunofluorescenci a použité koncentrace.

Primární protilátka	Koncentrace	Sekundární protilátka	Koncentrace
Vinculin mouse monoclonal (sc-73614, Santa Cruz Biotechnology)	1:100	Donkey Anti-Goat IgG H+L (Thermo Fisher Scientific)	1:1000
SCP3 mouse monoclonal (sc-74569, Santa Cruz Biotechnology)	1:50	Donkey Anti-Mouse IgG H+L (Thermo Fisher Scientific)	1:1000
CENP-A (C51A7) Rabbit mAb (#2048, Cell Signaling Technology)	1:100	Donkey Anti-Rabbit IgG H+L (Thermo Fisher Scientific)	1:1000

Blokovací roztok: 2% BSA v PBST (0,1% Tween)

Všechny vzorky byly foceny na mikroskopu (Zeiss) do 2 dnů od dokončení protokolu.

6.2.3 Izolace ovárií z dospělých samic a následné barvení vzorků

Pro tento experiment byly použity dospělé samice od 20-26 dpp. Myši byly usmrceny dislokací krční páteře, zváženy a následně byla prováděná pitva a izolace ovárií. Ovária byla vyjmuta a zvážena s přesností na tři desetinná místa v gramech. Poté byla vložena do vychlazeného Tissue-tek gelu (Sakura Finetek) ve formičce 15x15x5 mm (Sakura Finetek) a zamrazena v -80 °C po dobu 2-3 hodin. Poté byly vzorky nařezány na kryomikrotomu (Leica) a ihned zafixovány ve 4 % PFA a uskladněny ve 4 °C v 1x PBS. Vzorky byly dále barveny hematoxylinem (Sigma) a eosinem (Sigma). Všechny vzorky byly zpracovány do 24 hodin od fixace v PFA. Protokol na histologické barvení je ukázán v tabulce 3.

Tab. 3. Histologické barvení pomocí hematoxylinu a eosinu

Hematoxylin	5 min
H2O	1 min
Eosin	5 min
H2O	30 sec
50% EtOH	4 min
70% EtOH	4 min
95% EtOH	4 min
100% EtOH	4 min
100% EtOH	4 min
Xylen/EtOH (1:1)	4 min
Xylen	4 min
Xylen	4 min

Následně byly vzorky zafixovány montovacím médiem Solacryl BMX.

6.2.4 Odběr tkáně pro izolaci DNA a genotypizaci

Na základě požadavku v PyRATu byl odebrán 0,3-0,5 cm dlouhý kousek ocásku pro izolaci DNA. Kvůli zpětné kontrole genotypu byl ocásek odebírán také při experimentech v laboratoři, kde byl krátkodobě uskladněn na ledu v mikrozkuhavce (objem 1,5 ml) a dlouhodobě v mrazáku v -80 °C. Embryonální tkáň pro izolaci DNA byla odebírána při pitvách z části přední končetiny.

Lyze buněk

DNA byla izolována rychlou metodou využívající proteinázu K za účelem genotypizace. Na jeden vzorek se použilo 64,5 μ l H₂O 7,5 μ l Dream Taq Buffer a 3 μ l proteinázy K. Následně byla tkáň inkubována při teplotě 60 °C 4-5 hodin při třepání 400 otáček/min (Thermo shaker Biosan TS 100). Po rozpadu tkáně byla teplota zvýšena na 85 °C 30 minut pro deaktivaci proteinázy K. Jednotlivé složky lyzačního pufru byly dodané firmou Thermo Scientific.

PCR reakce

K amplifikaci úseků DNA *in vitro* se používala polymerázová řetězová reakce (z angl. polymerase chain reaction - PCR). Úsek je ohraničen oligonukleotidovými primery. Pro tuto metodu je potřeba pufr obsahující Mg²⁺ (DreamTaq™ Green Buffer obsahující barvu pro vizualizaci DNA na agarózovém gelu, Thermo Fisher Scientific), termostabilní DNA polymerázu (DreamTaq Thermo Fisher Scientific), primery (Sigma) a templátovou DNA. Celkový objem PCR reakce byl 20 μ l. PCR reakcí se zjišťovalo, zda má myš/embryo Cre rekombinázu pod promotorem *Gdf9*, a tak jestli se jedná o VCL cKO myš či nikoli. Schémata jednotlivých PCR reakcí jsou znázorněny na obr. 15 a 16.

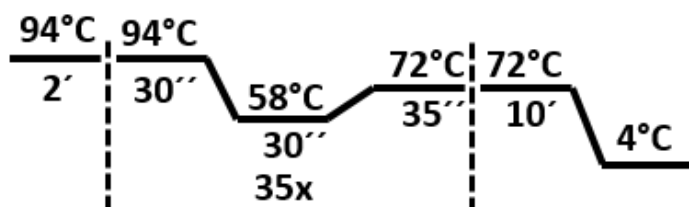
Elektroforéza

Produkty PCR byly rozděleny na 1% agarózovém gelu, barva použitá k vizualizaci produktů byla Midori Green Advance (Nippon Genetics) a byla přimíchávána přímo do agarózového gelu (Sigma) před ztuhnutím v poměru 3 μ l/100ml. PCR směs byla nanesena na gel v elektroforetické vaně (Bio-Rad Sub-Cell® Model 96 Cell, zdroj Amersham Pharmacia Biotech Electrophoresis Power Supply EPS 301) a byla rozdělena za podmínek 120 V po dobu 30 minut.

K vyhodnocení gelů byl použit Bio-Rad Molecular Imager® Gel Doc™ XR+ a Image Lab™ Software.

Použité oligonukleotidy pro Flx/Flx:

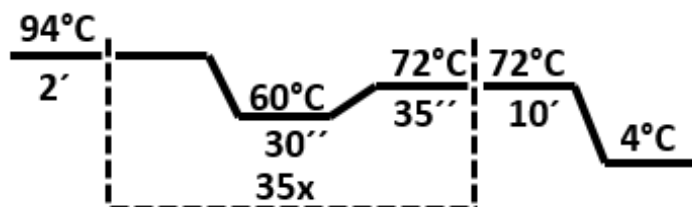
Vcl P1 F Xu	sekvence TCAGACCCATACTCGGTTCC
P2 new Vcl gen	sekvence AACTCACAGAGACCCTCCT



Obr. 15. Schématické znázornění amplifikačního programu k detekci VCL WT

Použité oligonukleotidy pro cKO:

iCre GDF9 F	sekvence TCTGATGAAGTCAGGAAGAACC
iCre GDF9 R	sekvence GAGATGTCCTTCACTCTGATTC
internal positive control IPC F	sekvence CTAGGCCACAGAATTGAAAGATCT
internal positive control IPC R	sekvence GTAGGTGGAAATTCTAGCATC



Obr. 16. Schématické znázornění amplifikačního programu k detekci VCL cKO

K reakcím PCR byl požíván přístroj Biometra TProfessional Standard 96 Gradient.

6.2.5 Statistické zpracování výsledků grafů

Data byla vyhodnocena pomocí Man-Whitney testu v programu GraphPad Prism 7. Parametry byly nastavené na rozdělení oboustranné a nepárové. Byl zvolen 95% interval spolehlivosti.

7. Výsledky

7.1 Struktura experimentů

Experimentální práce zahrnovala tři sady experimentů.

První sada obsahovala křížení myši a ověřování genotypů pro další plánované experimenty.

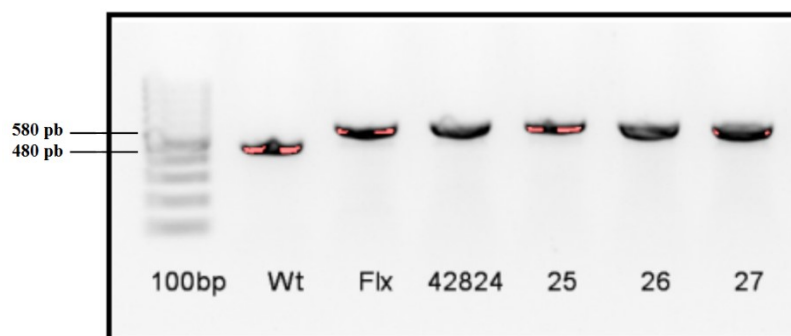
Druhá sada experimentů byla prováděna na embryonálních oocytech, kde se zjišťovala lokalizace VCL, zda se vyskytuje v profázních jádrech oocytů a zároveň se u cKO myši sledovalo, zda mají sníženou expresi toho proteinu v profázních jádrech oocytů.

Třetí sada experimentů byla prováděna na dospělých myších, kdy se sledoval počet narozených potomků a jejich pohlaví a dále se porovnávala velikost ovárií u WT a cKO myši.

7.2 Křížení myši a ověřování genotypů cKO a WT

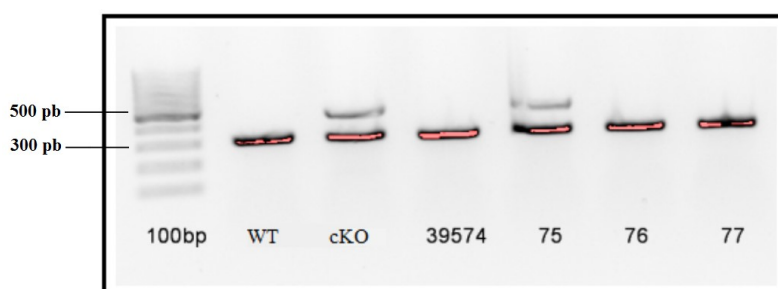
Základem pro provádění naplánovaných experimentů bylo ověření, že Cre/LoxP systém funguje. Ověřovala jsem myši zařazené do experimentů na základě genotypizace (viz kap. 6.2.4.)

Výsledky genotypizace, která určuje myši $Vcl^{flx/flx}$ jsou vidět na obr. 17 a 18. Pro toto ověřování byly použity dvě kontrolní DNA. Negativní kontrola byla DNA z divokého typu myši a pozitivní kontrolou byla DNA obsahující zavedená Flx místa kolem genu pro vinkulin. Genotyp pro WT (negativní kontrola) byl vyhodnocen na základě PCR produktu o velikosti 480 pb (párů bazí z angl. Base pair) - značen Wt. Pozitivní kontrola měla PCR produkt o velikosti 580 pb, značen Flx. Z obrázku je patrné, že zkoumané myši, označené čísly, byly všechny genotypu $Vcl^{flx/flx}$.



Obr. 17. Výsledky genotypizace pro *Vcl*^{flox/flox} genotyp myši. Na obrázku je vidět reprezentativní fotka z genotypizace. Proužek o velikosti 580 pb je pro genotyp *Vcl*^{flox/flox} značící místa Flx okolo genu *Vcl*. Proužek o velikosti 480 pb značí WT myš (negativní kontrola). Sloupce s označenými čísly značí jednotlivé vzorky, které byly zkoumány.

Myši, které byly genotypu *Vcl*^{flox/flox} jsem dále křížila s myšmi genotypu *Gdf9-iCre*. Pro kontrolu výsledného genotypu (*Vcl*^{flox/flox} *Gdf9-iCre*) jsem genotypizaci dále zjišťovala, zda je gen pro vinkulin vystřižen a výsledné myši jsou cKO. Tato genotypizace zjišťuje, zda Cre rekombináza je či není v myších přítomna, ne však, jestli Cre rekombináza je v jedné nebo obou alelách. Samostatný proužek o velikosti 300 pb značí pouze interní pozitivní kontrolu (IPC, z angl. Internal positive control), to znamená, že PCR proběhla v pořádku, ale Cre rekombináza není v myších přítomna a tedy není vystřižen vinkulinový gen (označeno WT, druhý sloupec). Pokud však byly přítomny dva proužky o velikosti 300 pb (IPC) a 500 pb (PCR produkt pro přítomnost Cre rekombinázi) myš měla genotyp *Vcl*^{flox/flox} *Gdf9-iCre*, kdy Cre rekombináza byla přítomna, tím došlo k vystřihnutí vinkulinového genu (viz kap. 6.1.1) a myš byla cKO.



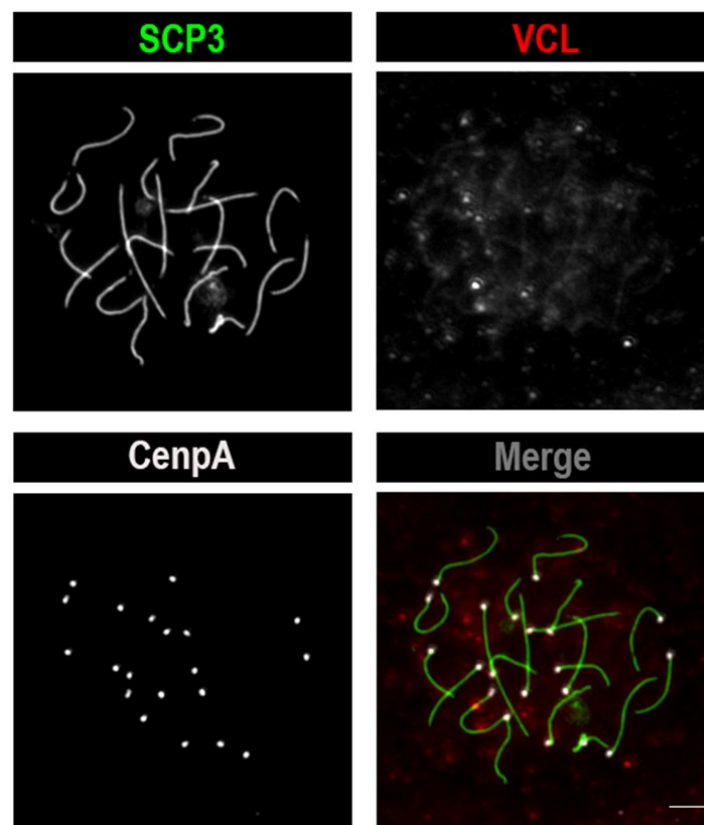
Obr. 18. Výsledky genotypizace pro cKO genotyp myši. Na obrázku je vidět reprezentativní fotka z genotypizace. Proužek o velikosti 300 pb je IPC. Proužek 500 pb označuje přítomnost Cre rekombinázy. WT – kontrola pro WT, cKO – kontrola pro myš genotypu *Vcl*^{flox/flox} *Gdf9-iCre*. Čísla (39574-77) udávají čísla zkoumaných myši. Výsledkem této genotypizace byla pouze 1 myš 39575 cKO.

Myši vybrané na základě získaných genotypů byly dále udržovány v chovech. Před každým experimentem jsem genotyp myši kontrolovala stejným způsobem, který je uvedený výše.

7.3 Sada experimentů na myších embryích

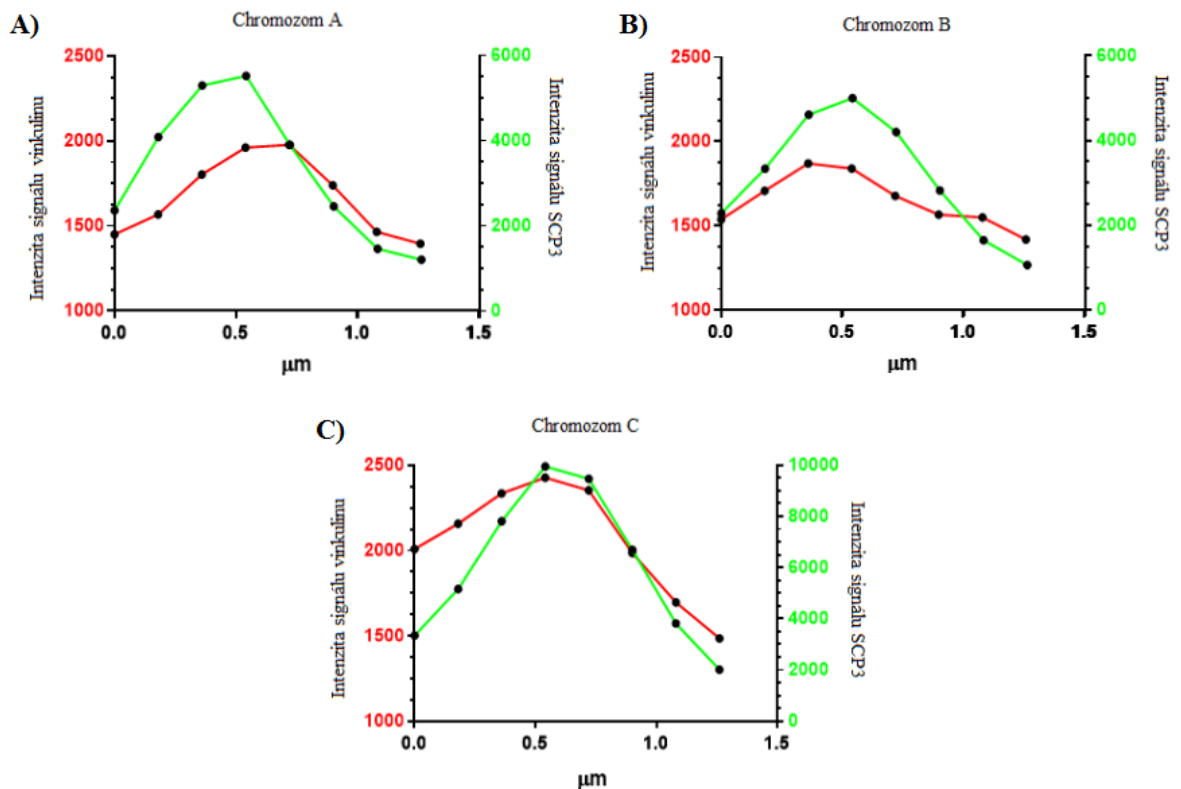
7.3.1 Lokalizace vinkulinu v jádře embryonálního profázního oocyty u WT myši

Pro potvrzení, že se VCL vyskytuje také v jádře oocytů, jsem izolovala oocyty z embryonálních ovárií během profáze meiózy I. Pitvu jsem prováděla v 17.5-19.5 dnu březosti samice, kdy je u oocytů nejvíce zastoupená fáze pachytene. Na panelovém obrázku (Obr. 19) je vidět, že se vinkulin lokalizuje do jádra oocytů a dekoruje synaptonemální komplex (SCP3). Signál vinkulinu je disperzní a je pro něj charakteristický tečkovaný vzor (tzv. dotted pattern).



Obr. 19. Chromozomy embryonálního pachytenního oocyty a lokalizace vinkulinu u WT myši. Na obrázku (popis zleva) je vidět synaptonemální komplex 20 spárovaných chromozomů značen protilátkou proti SCP3. Vinkulin dekoruje synaptonemální komplex charakteristickým disperzním vzorem. Centromery jsou značené pomocí protilátky CenpA. Poslední obrázek je fúze všech kanálů – SCP3 zeleně, VCL červeně, CenpA bíle. Měřítka 5 μm .

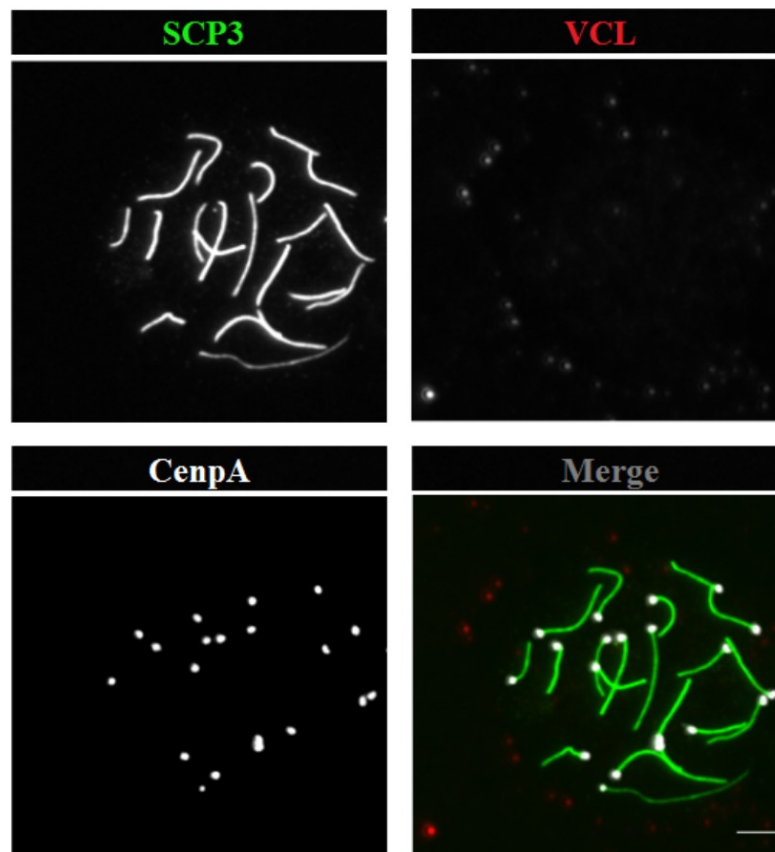
Na potvrzení kolokalizace VCL se synaptonemálním komplexem, jsem využila funkce v programu ImageJ, kdy se na jednom chromozomu vzaly náhodně 4 body, přes které se napříč vedla úsečka o délce 1,3 μm , kde byla změřena intenzita signálu pro VCL i SCP3 a výsledné měření bylo zaneseno do grafů. Na reprezentativních grafech (Graf č. 1 A, B, C) je vidět, že kolokalizace není stoprocentní, jelikož se vinkulin váže spíše do okolí chromozomů.



Graf č. 1. (A, B, C) Reprezentativní grafy kolokalizace náhodně vybraných tří měření na odlišných chromozomech z rozdílných buněk z různých myší. Měření bylo prováděno napříč jednotlivými chromozomy, délka měřeného úseku byla 1,3 μm . Na grafech je vidět, že vinkulin (červeně) dekoruje synaptonemální komplex (zeleně). Intenzita signálu vinkulinu (červeně, Y osa vlevo) je nižší než signál SCP3 (zeleně, Y osa vpravo).

7.3.2 Mikroskopická kontrola poklesu signálu vinkulinu v jádře embryonálního profázního oocyty u cKO myši

Pro potvrzení, že Cre/LoxP systém funguje správně, se zvolila mikroskopická kontrola, kde by měl být vidět pokles signálu pro vinkulin v jádře embryonálních profázních oocytů cKO genotypu. Z obrázku 20 je zřejmé, že námy připravený a použitý systém Cre/LoxP funguje předpokládaným způsobem. Experiment byl několikrát opakován v 18.5-19.5 dpc – 3 dpp i na více myších stejného genotypu a při přípravě preparátů a pořizování mikroskopických obrázků byly použity stejné podmínky jako u kontrolních WT myši. V jádře embryonálních profázních oocytů byl pokaždé signál pro vinkulin mnohem méně patrný nebo chybějící v porovnání s WT, čímž byla potvrzena funkčnost Cre/LoxP systému a našeho modelu (obr. 19).

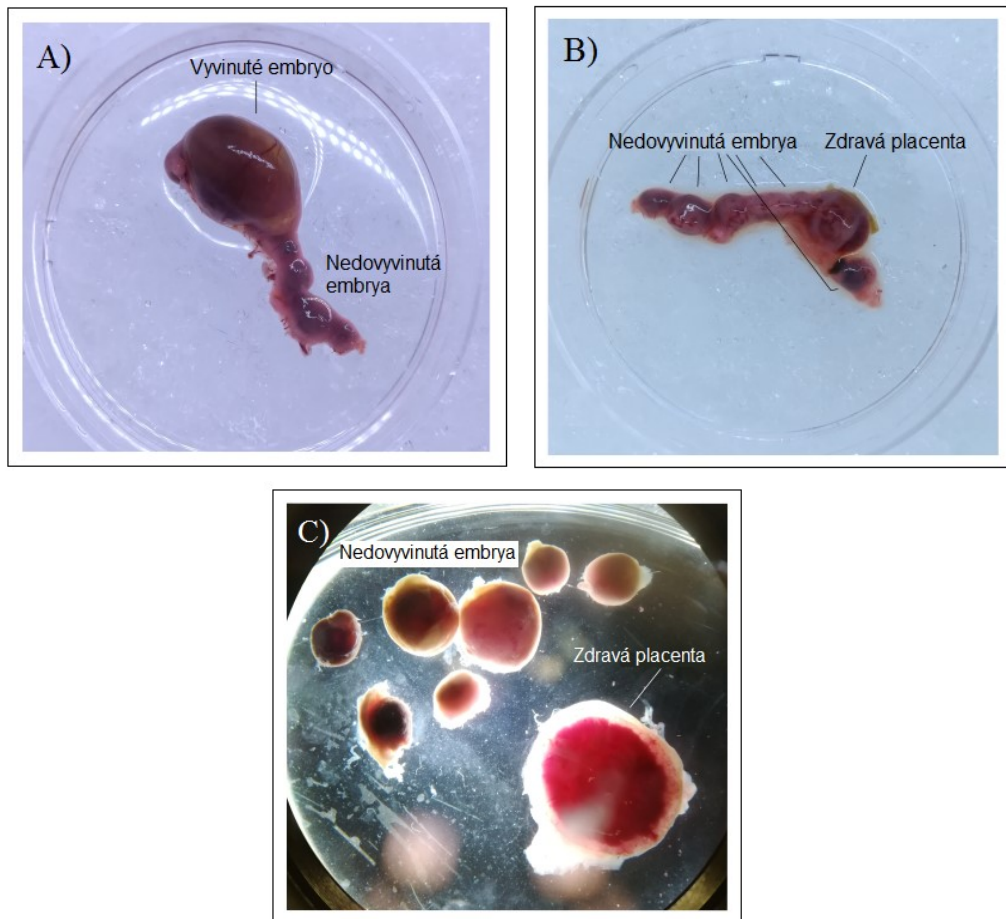


Obr. 20. Chromozomy embryonálního pachytenního oocyty a pokles signálu VCL u cKO myši. Na obrázku je vidět synaptonemální komplex 20 spárovaných chromozomů barven protilátkou SCP3. Signál pro vinkulin v jádře oocyty není pozorován klasický vzor dekorace synaptonemálního komplexu. Centromery jsou značeny pomocí protilátky CenpA. Poslední obrázek je fúze všech kanálů – SCP3 zeleně, VCL červeně, CenpA bíle. Měřítka 5 μm .

7.4 Sada experimentů na dospělých myších

7.4.1 Sledování fertility a počtu potomků u cKO samic

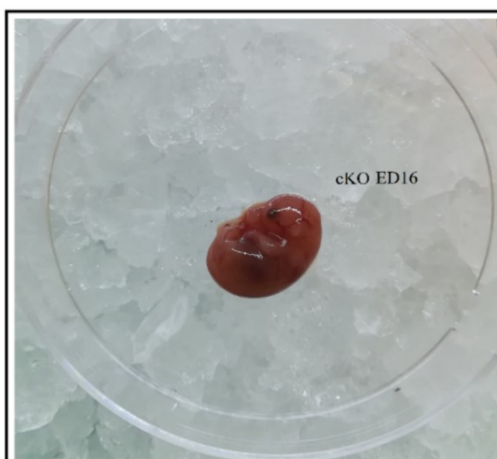
Pro zjištění jaký vliv má VCL na fertilitu samic, jsem sledovala počty potomků u kontrolních a mutantních myší. U cKO samic jsem pozorovala zvýšený počet problémů s fertilitou párů, kdy u samic byla nalezena zátka, ale samice nebyla při dalším sledování březí. Po pitvě některých cKO samic, které měly zátku, ale nepřibíraly na váze, se ukázalo, že samice mají zduřelou dělohu, vaječníky a často nedovyvinutá embrya nebo měly pouze placentu bez vyvíjejícího se zárodka. Při pitvě cKO samic, které měly zátku, přibíraly na váze a byly zjevně březí, jsem pozorovala zvýšený počet potratů, kdy samice měla v děloze zárodky, ale ty byly již v procesu vstřebávání. Tento jev se nazývá efekt Bruceové, který byl u myší popsán například při nahrazení samce za jiného, který by narozená mláďata zahubil. Nicméně tato výměna v našich chovech neprobíhala a chovné páry nebyly během experimentu měněny. Na obr. 21 A) B) vidíme dělohu cKO samice v 16. dnu březosti s jedním zdravým embryem a ostatními embryi silně nedovyvinutými. Na reprezentativním obr. 21B a 22 je děloha cKO samice v 16. a 17. dnu březosti, kdy se nedovyvinulo ani jedno embryo. Pro porovnání na obrázku 23 je cKO embryo 16 dpc své běžné velikosti.



Obr. 21. Ukázka dělohy cKO samice v 16. dnu březosti. A) Na obrázku je vidět jedno zdravé embryo běžné velikosti a korálky nedovyvinutých mláďat. B) Po vyjmutí zdravého embrya z plodového obalu je vidět zdravá placenta a korálky nedovyvinutých embryí. C) S pomocí lupy jsem oddělila zdravou placentu a neidentifikovatelné útvary. Zvětšení 8x.



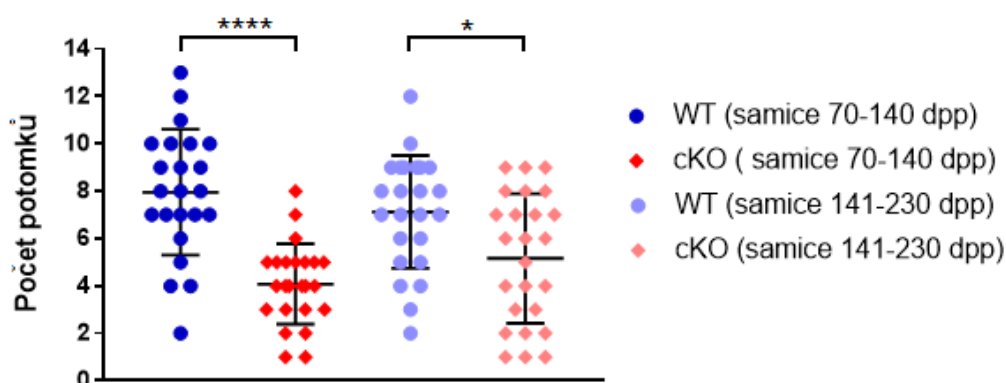
Obr. 22. Další ukázka nedovyvinutých mláďat po pitvě samice v 17. dnu březosti.



Obr. 23. Vyvinuté cKO embryo 16 dpc běžné velikosti zbavené plodových obalů.

Pro kvantifikaci komplikací během březosti samic jsem počítala narozená mláďata u kontrolních a mutantních samic. Rozdělila jsem samice na dvě testované skupiny, a to mladé samice standardním reprodukčním věku 70-140 dnů a starší samice 141-230 dnů, jelikož u starších samic se může plodnost lišit, vzhledem k závislosti na věku, a také se mohou defekty výrazněji projevit. Následná analýza ukázala (Graf č. 2), že u mutantní myši se rodí signifikantně méně mláďat než u kontrolní ve standardním reprodukčním věku. U starších cKO samic byl počet narozených mláďat také signifikantně snížený, ale už ne s takovým rozdílem, jako u samic mladších.

Tento výsledek naznačuje, že snížení exprese VCL má pravděpodobně vliv na fertilitu samic.

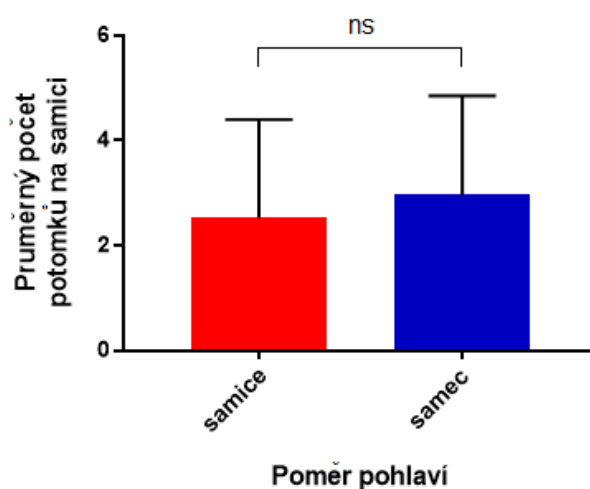


Graf č. 2. Srovnání počtu narozených potomků u kontrolní myši (modrá tmavě, světle) a mutantní myši (červená tmavě, světle). Při porovnání počtu potomků u samic mladších (první dva sloupce) vidíme velmi signifikantní rozdíl. U starších samic (3. a 4. sloupec) rozdíl signifikantní je, avšak ne takový.

7.5 Sledování dalších fenotypů delece vinkulinu

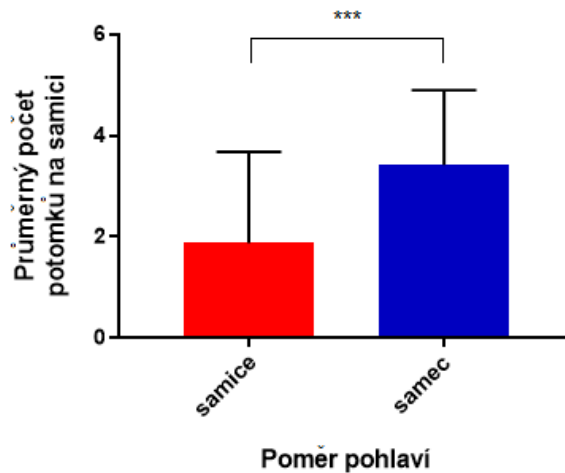
Na základě svých pozorování jsem také otestovala, zda mutace neovlivňuje poměr pohlaví (sex ration), jelikož při provádění experimentů, kdy jsem izolovala embrya a jejich oocyty, jsem si všimla, že je mnohem více samečků než samiček na jednu březí samici. Z tohoto důvodu, jsem začala zaznamenávat jaký je poměr samců a samiček narozených na jeden vrh u WT a cKO samic.

Zprůměrované počty jsem zanesla do grafu (Graf č. 3). Výsledek však neukázal statisticky významný rozdíl a počty narozených samců a samiček byly srovnatelné. Do této analýzy jsem zahrnula 63 vrhů od různých cKO samic to odpovídalo 346 mládřatům.



Graf č. 3. Sledování počtu pohlaví. Na ose X je zanesené pohlaví narozených mládřat (červeně samice, modře samec). Na ose Y je zanesen průměrný počet potomků na jeden vrh. Mann whitney test, Signifikance (P value), ns = 0,1698.

Jelikož byl počet embryonálních samiček, které jsem zpracovávala pro izolaci oocytů pro lokalizaci VCL opravdu nízký, zopakovala jsem analýzu pouze na tato embrya a spočítala poměr pohlaví. V této skupině jedinců vyšel signifikantně nižší výskyt samiček než samců na jeden vrh (Graf č. 4). Zahrnula jsem do něj embrya z 26 pitev, což odpovídalo 138 embryím.



Graf č. 4. Sledování počtu pohlaví z embryí zařazených do sady experimentů pro lokalizaci vinkulinu. Na ose X je zanesené pohlaví narozených mláďat (červeně samice, modře samec). Na ose Y je zanesen průměrný počet potomků na jeden vrh. Výsledek je signifikantní. Mann whitney test, Signifikance (P value) *** = 0,0004.

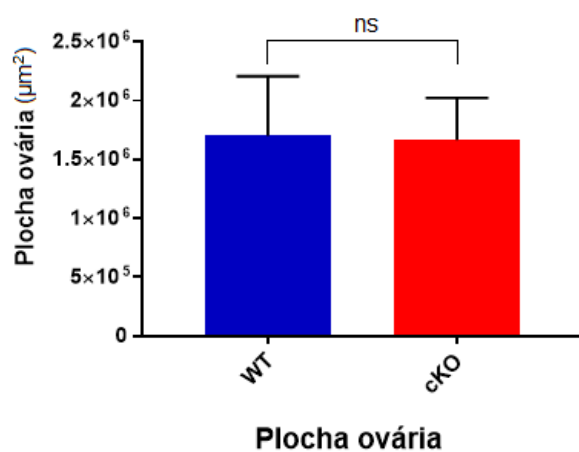
Tato analýza ukázala, že samice, zařazené do experimentu pro lokalizaci VCL, měly větší počet samců na samici.

7.6 Morfologická studie na 20-26 dpp myších ováriích

V morfologické studii jsem porovnávala velikost ovárií u WT a cKO myši.

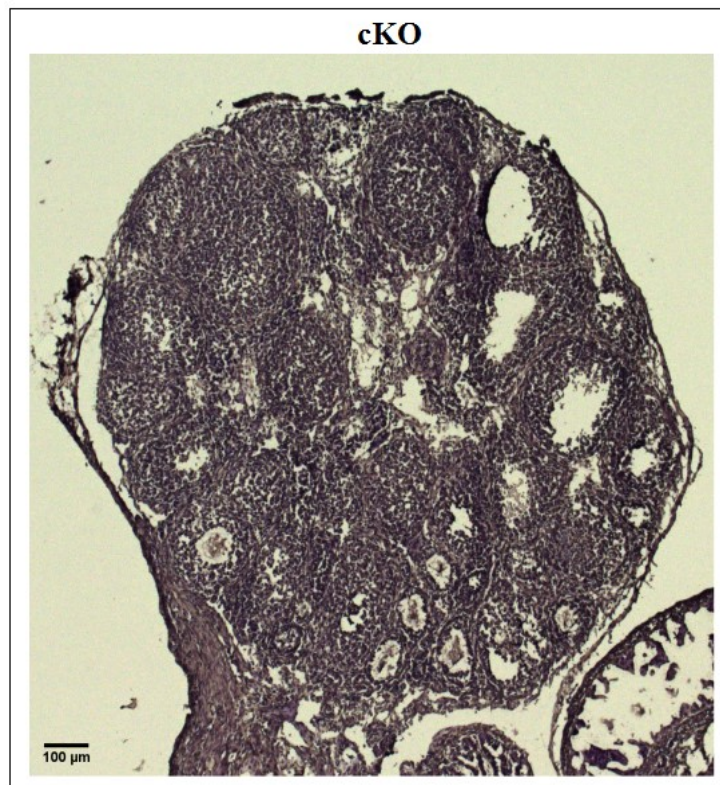
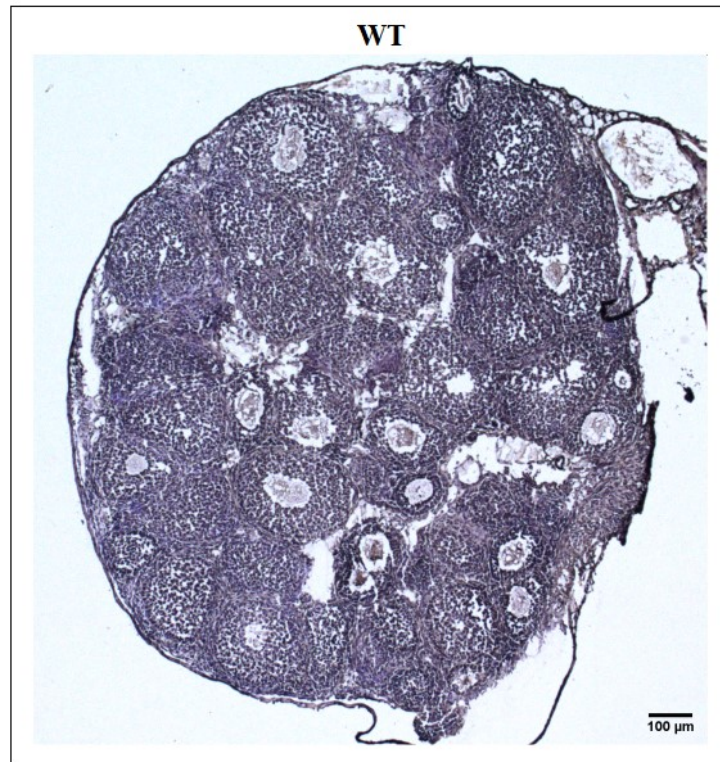
U mutantních samců byla pozorována zvětšená varlata (viz kap. 5.1). Chtěla jsem tedy vědět, zda se bude vyskytovat toto zvětšení u cKO samic také. Měřila jsem hmotnost ovárií u 20-26 dpp samic, kdy jsem izolovala ovária, na předvážkách měřila hmotnost a výsledná čísla porovnávala v závislosti na genotypu. Toto měření neukázalo signifikantní rozdíl a váha ovárií cKO a WT dosahovala v průměru 0,004 g.

Pro přesnější měření jsem izolovaná ovária zamrazila v $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$, nařezala na kryomikrotomu, nabarvila hematoxylinem a eosinem a v centrální rovině měřila s pomocí programu ImageJ plochu ovária. Následná analýza, která je znázorněná grafem č. 5, ukázala, že velikost ovárií cKO samic se opravdu neliší od ovárií WT samic.



Graf č. 5. Plocha ovária. Na ose X je zanesen genotyp zkoumaných myší (modře WT, červeně cKO). Na ose Y je zanesena plocha ovária v μm^2 . V grafu je vidět nesignifikantní rozdíl velikosti plochy ovárií.

Na obr. 24 jsou reprezentativní fotky středového řezu ovária WT a cKO myši.



Obr. 24. Reprezentativní fotky středového řezu ovária WT a cKO myši.

Výsledek analýzy ukázal, že ovária WT a cKO myši se zdají být morfológicky stejná.

8. Diskuze

Tato práce se zabývá proteinem vinkulinem, jakožto potenciálním novým účastníkem meiózy a jeho lokalizací v jádře oocytů a dále jeho vlivem na fertilitu.

Dosud byl vinkulin popsán jako cytoplazmatický protein účastnící se vazby aktinu ve fokálních adhezích a adherentních spojích (Borgon *et al.*, 2004). Bylo zjištěno, že při celotělovém deletování genu pro *Vcl* u myši (VCL KO) jsou embrya o 30-40 % menší s abnormálním vývojem od ED8.5 a umírají v ED10.5 dnu s neurálními defekty, včetně nedostatečné středové fúze rostrální neurální trubice a nesprávného vývoje lebečního a spinálního nervu. Dále byl zjištěn aberantní vývoj předních končetin, redukovanou velikost srdce se sníženým počtem myocytů a také křehké a řídké ektodermální tkáň (Zemljic-Harpf *et al.*, 2007; Xu *et al.*, 1998).

Na základě výzkumu prováděného v laboratoři prof. Hozáka, bylo objeveno, že se VCL lokalizuje mimojiné do jádra myších spermatocytů podstupujících meiotickou profázi I a dekoruje strukturu synaptonemálního komplexu (Flachs, nepublikovaná data). V rámci dalších výzkumů bylo naplánováno, že se laboratoř zaměří i na myši oocyty pro následné porovnání výsledků jednotlivých experimentů na spermatogenezi a oogenezi. Je důležité zmínit, že zatímco spermatogeneze je kontinuální proces a spermatocyty se tvoří po celý život, oogeneze, zvláště první meiotické dělení, se děje v embryonální fázi vývoje. U myši začíná zhruba od 10.5 dpc (Slizynski, 1957). Tato práce tedy byla rozdělena na experimenty prováděné v embryonální fázi vývoje a experimenty prováděné na dospělých samicích.

Pro zjištění jaký vliv bude mít pokles exprese VCL na probíhající meiózu a fertilitu myši, byl v první řadě křížením připraven kondicionální knock-out genu pro *Vcl*, za pomoci Cre/LoxP systému (viz kap. 6.1.1) (Glaser *et al.*, 2005; Weyden *et al.*, 2009). Tento systém je místně i časově specifický a dochází u něj k vystřížení genu pro *Vcl* v ováriích začátkem meiózy I. Pro tyto účely byly kříženy dva kmeny. Kmen *Vcl^{flox/flox}* měl označená místa okolo třetího exonu genu *Vcl* (Zemljic-Harpf *et al.*, 2007) a kmen *Gdf9-iCre* nesl Cre rekombinázu, která v potomcích křížení obou kmenů úsek DNA mezi LoxP místy vystříhla, čímž byla porušena exprese funkčního genu pro *Vcl*. Ověřením, zda myš je či není cKO, byla následně použita genotypizace (viz kap. 7.2.).

Na myších spermatocytech byl ukázán a potvrzen pokles exprese VCL v semenotvorných tubulech mikroskopicky a biochemicky (viz kap. 4.2.) (Flachs, nepublikovaná data). Pro zjištění, zda použitý Cre/LoxP systém funguje i na samičích oocytech, byla využita metoda imunofluorescence a provedly se experimenty na lokalizaci vinkulinu stejným způsobem u WT i cKO myši ve stádiu pachytene, kde byl výskyt nejprůkaznější. V první řadě se musel optimalizovat protokol imunofluorescence, jelikož celkový signál VCL v jádrech byl slabý v porovnání s cytoplazmatickým. Objemově se tedy protilátky dávalo více a nechávala se inkubovat se vzorky přes noc. Výsledné experimenty ukázaly pokles signálu pro VCL v oocytech u cKO myši (Obr. 20) v porovnání s WT (Obr. 19).

Pro definitivní potvrzení funkčnosti VCL cKO je dalším plánovaným krokem provést biochemické potvrzení poklesu exprese VCL, který byl zaznamenán na mikroskopických preparátech. Tento experiment využije metodu imunochemické detekce (western-blot) jaderné a cytoplazmatické frakce získané frakcionací myších ovárií z 19.5 dpc a myši starých 5 dpp a 14 dpp. Získané frakce budou následně rozděleny za pomoci SDS-PAGE elektroforézy v polyakrylovém gelu a přeneseny na celulósovou membránu. Vizualizace VCL bude probíhat za pomoci specifických protilátek, poté bude provedena kvantifikace (Yin *et al.*, 2017).

Pro stanovení přesnější lokalizace VCL v embryonálních oocytech byla vybrána fáze pachytenních oocytů (u myši ED17-19), kdy se očekávala viditelná dekorace synaptonemálního komplexu u WT (analogicky k lokalizaci VCL v jádrech pachytenních spermatocytů). Tato analýza se prováděla pomocí metody nepřímé imunofluorescence na mikroskopických preparátech fixovaných oocytů, které byly před fixací inkubovány v hypotonickém prostředí (Peters *et al.*, 1997). VCL vykazoval jasný signál v jádrech oocytů, kde podobně jako u spermatocytů dekoroval synaptonemální komplex spárovaných chromozomů (Obr. 19). Pro přesnější znázornění byl z pořízených mikroskopických obrázků vygenerován profil intenzit VCL a synaptonemálního komplexu v programu ImageJ (Graf č. 1). Ze získaných dat bylo zjištěno, že dekorace SC není plně souvislá (tečkovaný vzor) a je patrné, že se vinkulin nelokalizuje primárně jen na SC, ale difúzně do celého jeho okolí. Není však patrné, jestli se VCL v oocytech lokalizuje do okolí centromer, jako tomu bylo u spermatocytů (Flachs, nepublikovaná data), avšak zatím

nebylo provedeno potřebné měření signálu VCL na těchto místech a jejich okolí. Tato analýza je předmětem dalšího zkoumání.

V současné době probíhají další experimenty, které jsou zaměřeny na ostatní fáze meiózy I a na potvrzení, zda je lokalizace VCL podobná jako u spermatocytů (Obr. 12), kdy se lokalizace VCL dynamicky mění v závislosti na jednotlivých fázích profáze I.

Nedílnou součástí práce bylo též sledování, zda snížená exprese VCL má vliv na fertilitu pozorovaných myší. Při sledování počtů potomků u kontrolních a mutantních myší data ukázala zvýšený počet problémů s fertilitou cKO párů, zvýšený výskyt nedovyvinutých embryí a snížený počet narozených potomků (Graf č. 2, Obr. 21 a 22). Tento jev se vyskytuje u myší například při nahrazení samce za jiného, který by narozená mláďata zahubil (efekt Bruceové) (Bruce, 1960). V našich chovech však tato výměna samců neprobíhala a chovné páry nebyly během experimentu měněny. Samice tedy potratila z jiného důvodu. Tento podobný fenotyp reabsorbce embryí, nedovyvinutých embryí či jiné problémy párů, byly také popsány v jiné práci, kdy zkoumali protein SPRASA podílející se na interakci mezi spermií a oocytem (Wagner *et al.*, 2015). V našem případě, po analýze dat z počtů narozených potomků, byl výsledek signifikantní a mutantním samicím se rodilo méně mláďat než kontrolním myším (Graf č. 2). Tento výsledek naznačil, že VCL má pravděpodobně vliv na fertilitu samic. Starší samice tak signifikantní rozdíl v počtech potomků nevykazovaly (Graf č. 2). To může vysvětlovat zvyšující se věk samic, jelikož reprodukční stárnutí zahrnuje snížení počtu oocytů i vyšší výskyt vývojových vad z důvodu zkracování telomer v oocytech a tím snižuje kvalitu oocytů pro fertilizaci (Kalmbach *et al.*, 2015; Keefe and Liu, 2008).

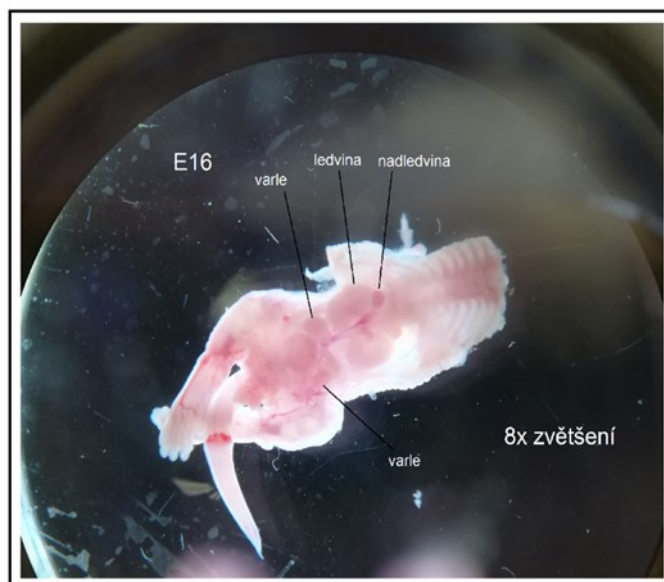
Výsledky v této sadě experimentů mohou být vysvětleny problémy při oplodnění vajíčka spermií, kdy vajíčko může mít sníženou schopnost přijmout spermii, ačkoli samice nevykazovaly viditelné morfologické rozdíly na ováriích v porovnání s kontrolními myšmi (Obr. 24, Graf č. 5). Je také možné, že se problémy mohou vyskytovat ve folikulogenezi a dozrávajících folikulech, a to mohlo mít vliv na kvalitu oocytů. To by znamenalo, že po fertilizaci není vajíčko schopno se uhnízdít nebo se dál vyvíjet (Eppig and O'Brien, 1996). Tato možnost by musela být dále zkoumána. Dalším problémem by mohlo být málo dozrálých oocytů připravených pro folikulaci a následně pro fertilizaci. V současné době probíhají experimenty, při kterých se nařeže celé ovárium a počítají se zralé oocyty u kontrolních a mutantních myší, pro porovnání folikulogeneze, které by mohly objasnit

tento potenciální problém. Tuto metodu použili v laboratoři (Gao *et al.*, 2014), kdy zkoumali hlavní protein v savčí oční čočce, který hraje důležitou roli při udržování průhlednosti oční čočky a mimojiné hraje také důležitou roli v mnoha jiných tkáních a orgánech a také v ováriích. Po snížení exprese toho proteinu u myši pozorovali snížený počet primárních a sekundárních folikulů a zralých folikulů před ovulací. Kromě toho zaznamenali při odebírání oocytů menší počet oocytů ve vejcovodu po superovulaci v porovnání s kontrolou (Gao *et al.*, 2014). Nelze vyloučit, že tento popsáný efekt nižšího počtu oocytů po superovulaci by mohl být příčinou sníženého počtu mláďat i v našem případě.

Pro hlubší specifikaci problémů s fertilitou je proto v plánovaných experimentech také *in vitro* fertilizace. Tato metoda by pomohla generovat velké množství ovariálních folikulů a embryí, což by mohl být pro náš výzkum velice přínosné. Oogeneze a folikulogeneze lze modelovat pomocí zrání oocytů *in vitro* (IVM - *in vitro* maturation), což je systém zrání ovariálních folikulů v kultivační misce (Kidder, 2014). Kromě toho, fertilizaci a časnou embryogenezi, lze modelovat pomocí oplodnění *in vitro* (IVF), které zahrnuje oplodnění zralých oocytů spermii po kapacitaci v kultivační misce (Kidder, 2014). Tak bychom mohli pozorovat progresi oocytů do metafáze II, jestli právě zde není problém například s hromaděním buněk ve stádiu diplotene, což je znak dále nepostupující meiózy (Eppig and O'Brien, 1996). Také by tato metoda IVF umožnila sledovat následný postup dělení embrya od dvoubuněčného až po blastocytu.

Samice vybrané pro experimenty prováděné na embryonálních oocytech vykazovaly vyšší výskyt samčích potomků (synů) na jeden vrh (Graf č. 4), které tím pádem nešlo využít. Tento výsledek by byl velice zajímavým fenotypovým projevem. Z toho důvodu byla provedena analýza počtu samčích a samičích mláďat v jednom vrhu na samici (Graf č. 3). Avšak tato analýza ukázala, že zde o fenotyp upřednostnění pohlaví nejde. Dalším možným vysvětlením by mohla být imitace fenotypu celotělového VCL KO, pokud by byla Cre rekombináza pod *Gdf9* promotorem částečně exprimována i v ostatních buňkách embrya. Embrya by tak mohla umírat s vývojovými vadami zapříčiněnými částečnou ztrátou VCL a to by se mohlo týkat pouze samic, jelikož je Cre rekombináza pod kontrolou pro samičí pohlaví specifického promotoru *Gdf9*. Pozorovaný rozdíl v poměru pohlaví u potomků VCL cKO samic by neměl být způsoben chybou během určování pohlaví zkoumaných embryí. Při pitvě embryí totiž po odebrání vnitřních orgánů tahem pinzety

zůstala v břišní části embrya močová a pohlavní soustava, kdy bylo rozpoznávání pohlaví dobře proveditelné. Samci v embryonálním vývoji nemají ještě sestouplá varlata, která jsou kaudálně od ledvin (Obr. 25) a po odstranění orgánů dutiny břišní byla varlata vždy snadno viditelná. Samice mají v této části vidět pouze močový měchýř a ledviny. U samic jsou ovária překrytá ledvinami a po nadzvednutí ledviny je ovárium viditelné.



Obr. 25. Na obrázku je vidět samčí embryo ED16 po dekapitaci, zbavené vnitřích orgánů, kromě močové a pohlavní soustavy. V této fázi pitvy jsou zřetelně vidět ledviny, nadledviny a varlata, podle kterých jsem se při rozpoznávání pohlaví orientovala. Při pitvách byla používána Stereolupa (Zeiss) a zvětšení 8x.

V naší laboratoři bylo také prokázáno, že relativní hmotnost varlat samců VCL cKO byla významně vyšší než relativní hmotnost varlat kontrolních samců. Analogický experiment (vážení ovárií) byl proveden i na samicích. Byla změřena hmotnost ovárií u dospělých samic (data neuvedena), ale toto měření prokázalo nesignifikantní výsledek a váha ovárií cKO a WT dosahovala srovnatelných hodnot. Pro přesnější porovnání velikosti ovárií byla částečně použita metodika z práce (Griffin *et al.*, 2006), kdy byla izolovaná ovária zamrazena v $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$, nařezána a nabarvena pro měření plochy v centrální rovině. Tato analýza ukázala, že velikost ovárií cKO samic se opravdu významně neliší od ovárií WT samic (Graf č. 5). V obdobných publikovaných studiích, kde byla cíleně snižována exprese různých proteinů, například KAT8, se váha ovárií většinou lišila, ale samicím odebírali a porovnávali ovária ve vyšším věku samic (Yin *et al.*, 2017). Do budoucna je

tedy pro nás nezbytné se zaměřit na porovnání ovárií z dospělých samic v reprodukčním věku a také na folikulogenezi a spočítat jednotlivá stádia folikulů, jelikož právě zde by mohl být viditelný rozdíl.

Dále bylo v naší laboratoři samců potvrzeno, že je VCL důležitý pro výstup z fáze diplotene meiózy I (Flachs, nepublikovaná data) Tyto experimenty byly provedeny na základě metodiky předešlých publikovaných prací, které se zabývaly meiotickými defekty (Sun and Handel, 2008; Tarsounas *et al.*, 1999). Naším dalším plánovaným experimentem je pozorování, zda jednotlivá stádia meiózy nejsou u embryonálních oocytů opožděná, a zda se vyskytují v běžných časových fázích a intervalech (Wang *et al.*, 2015). V dalším plánovaném kroku tohoto výzkumu je třeba se také podívat na to, zda se u mutantního kmene objevují předčasně oddělené homology na centromerách pro srovnání s předchozími výsledky na spermatocytech (Flachs, nepublikovaná data).

Obecněji je pro tuto studii nutné sledovat i pokles signálu VCL v cytoplazmě, kde se, jak známo, VCL účastní dalších důležitých procesů, jako jsou fokální adheze a adherentní spoje. Nelze proto vyloučit, že pozorovaný fenotyp může být částečně způsoben také chybějícím proteinem VCL v cytoplazmě. Nicméně na základě porovnávání morfologie ovárií u kontrolních a cKO myší nebyly zaznamenány žádné významné viditelné rozdíly. Ovária byla kompaktní, nebyla měkčí, difúzní ani poničená, na řezech nebyly viditelné změny, a tak je předpokládáno, že zastavení exprese VCL je primárně v oocytech. Pro další potvrzení, že se exprese VCL nemění v cytoplazmě somatických buněk, je naplánováno udělat biochemické potvrzení poklesu exprese z různých typů buněk ovárií (Yin *et al.*, 2017).

Následné experimenty zaměřené na podrobné popsání zapojení VCL do meiotických procesů (podobně jako u samců) by mohly více specifikovat konkrétní vztah VCL s pozorovaným fenotypem a tím potvrdit vliv konkrétně jaderného VCL na meiózu.

V práci, týkající se role jaderného VCL ve spermatogenezi, je naše laboratoř mírně napřed a pozorování naznačují regulační funkci VCL na dynamice výměny různých faktorů na centromerách, jakožto klíčových struktur tvorby kinetochoru a správné segregaci chromozomů (Flachs, nepublikovaná data). Pokud by se výsledky experimentů na samicích popsaných v této práci shodovaly s výstupy získanými na samcích, lze navrhnout hypotetický model konkrétního vlivu snížené exprese VCL na oogenezi a tím i na samičí sníženou plodnost. Správné párování a napojení centromery určuje připojení

dělicího vřeténka, čímž je zajištěná správná segregace chromozomů do budoucích pohlavních buněk. Pokud je tento proces narušen může se zvýšit procento aneuploidií a dalších chromozomálních aberací v budoucích gametách, čímž se snižuje množství kvalitních vajíček a/nebo zvyšuje počet embryí, které díky nesprávné segregaci zahynou ještě během embryonálního vývoje. Oba fenomény nebo jejich kombinace se navenek projeví jako snížená fertilita samic, podobně jako to pozorujeme v našem modelu VCL cKO samic (Mogessie and Schuh, 2017).

9. Závěr

V této práci bylo provedeno křížení myši za pomoci Cre/LoxP systému, na základě kterého byl vytvořen kondicionální knock-out myši, u kterého docházelo k vystřížení genu pro vinkulin v ováriích v rané fázi meiózy I.

Pomocí imunofluorescence a následné mikroskopie se porovnávala exprese VCL u kontrolní WT a mutantní VCL cKO myši. U WT myši se vinkulin lokalizoval do jádra embryonálních profázních oocytů, kde kolokalizoval se synaptonemálním komplexem, zatímco u VCL cKO myši byl signál vinkulinu snížen.

Dále se sledovala fertilita VCL cKO samic, u kterých se vyskytoval zvýšený počet potratů, zvýšený výskyt nedovyvinutých embryí. Pro kvantifikaci komplikací během březosti samic se počítala narozená mláďata a tyto počty se porovnávaly s WT samicemi. Analýza ukázala, že u VCL cKO myši se rodí signifikantně méně mláďat než u kontrolních.

Pro potvrzení či vyvrácení těchto výsledků bude třeba pokračovat se sbíráním dalších dat a zapojit další experimenty a pozorování. Získaná data mohou přispět k pochopení některých možných komplikací v průběhu meiózy, celosvětovému trendu snižování plodnosti a mohly by se tak odhalit nové funkce během chromozomální dynamiky.

10. Seznam použité literatury

- Agarwal, Ashok, Aditi Mulgund, Alaa Hamada, and Michelle Renee Chyatte. 2015. "A Unique View on Male Infertility around the Globe." *Reproductive Biology and Endocrinology* 13(1): 1–9.
- *Amann, Rupert P. 2008. "The Cycle of the Seminiferous Epithelium in Humans: A Need to Revisit?" *Journal of Andrology* 29(5): 469–87.
- Babic, I., S. Sharma, and D. L. Black. 2009. "A Role for Polypyrimidine Tract Binding Protein in the Establishment of Focal Adhesions." *Molecular and Cellular Biology* 29(20): 5564–77.
- Bakolitsa, Constantina et al. 2004. "Structural Basis for Vinculin Activation at Sites of Cell Adhesion." *Nature* 430(6999): 583–86.
- Barstead R.J, and Waterston R.H. 1989. "The Basal Component of the Nematode Dense-Body Is Vinculin." *Journal of Biological Chemistry* 264(17): 10177–85.
- Behringer, Richard, Marina Gertsenstein, Kristina Nagy, and Andras Nagy. 2016. "Selecting Female Mice in Estrus and Checking Plugs." *Cold Spring Harbor Protocols* 2016:
- Bellve, A. R. et al. 1977. "Spermatogenic Cells of the Prepuberal Mouse. Isolation and Morphological Characterization." *Journal of Cell Biology* 74(1): 68–85.
- Bolcun-Filas, Ewelina, and John C Schimenti. 2012. "Genetics of Meiosis and Recombination in Mice." *International Review of Cell and Molecular Biology* 298: 179–227.
- *Borg, Claire L., Katja M. Wolski, Gerard M. Gibbs, and Moira K. O'Bryan. 2009. "Phenotyping Male Infertility in the Mouse: How to Get the Most out of a 'Non-Performer.'" *Human Reproduction Update* 16(2): 205–24.
- Borgon, Robert A et al. 2004. "Crystal Structure of Human Vinculin." *Structure* 12(7): 1189–97.

- Bower, Jacquelyn J. et al. 2017. "Patterns of Cell Cycle Checkpoint Deregulation Associated with Intrinsic Molecular Subtypes of Human Breast Cancer Cells." *npj Breast Cancer* 3(1): 1–9.
- Brindle, N P et al. 1996. "The Focal-Adhesion Vasodilator-Stimulated Phosphoprotein (VASP) Binds to the Proline-Rich Domain in Vinculin." *The Biochemical journal* 318 (Pt 3: 753–57.
- Brown, David T., and Tina Izard. 2015. "Vinculin-Cell Membrane Interactions." *Oncotarget* 6(33): 34043–44.
- Bruce, H. M. A block to pregnancy in the mouse caused by proximity of strange males. *Reproduction*. 1960, I, s. 96-103.
- Burridge, Keith, and Paul Mangeat. 1984. "An Interaction between Vinculin and Talin." *Nature* 308(5961):
- *Cobb, John, and Mary Ann Handel. 1998. "Dynamics of Meiotic Prophase I during Spermatogenesis: From Pairing to Division." *Seminars in Cell and Developmental Biology* 9(4): 445–50.
- Cook-Andersen, Heidi et al. 2016. "Growth and Differentiation Factor 9 Promotes Oocyte Growth at the Primary but Not the Early Secondary Stage in Three-Dimensional Follicle Culture." *Journal of Assisted Reproduction and Genetics* 33(8):
- Daina, Gemma et al. 2014. "Non-Meiotic Chromosome Instability in Human Immature Oocytes." *European Journal of Human Genetics* 22(2): 202–7.
- DeMali, Kris A., Christy A. Barlow, and Keith Burridge. 2002. "Recruitment of the Arp2/3 Complex to Vinculin: Coupling Membrane Protrusion to Matrix Adhesion." *Journal of Cell Biology* 159(5): 881–91.
- Dobson, Melanie J et al. 1994. "Synaptonemal Complex Proteins: Occurrence, Epitope Mapping and Chromosome Disjunction." *J Cell Sci* 107.

- Eppig, John J, and Marilyn J O'Brien. 1996. "Development in Vitro of Mouse Oocytes from Primordial Follicles1." *Biology of Reproduction* 54(1): 197–207.
- Fernandez, J. L.R. et al. 1992. "Suppression of Tumorigenicity in Transformed Cells after Transfection with Vinculin CDNA." *Journal of Cell Biology* 119(2): 427–38.
- Gao, Qian et al. 2014. "Crybb2 Deficiency Impairs Fertility in Female Mice." *Biochemical and Biophysical Research Communications* 453.
- Gilchrist, Robert B, Michelle Lane, and Jeremy G Thompson. 2008. "Oocyte-Secreted Factors: Regulators of Cumulus Cellfunction and Oocyte Quality" *Hum Reprod Update* 14(2)
- Ginsburg, M, M H Snow, and A McLaren. 1990. "Primordial Germ Cells in the Mouse Embryo during Gastrulation." *Development (Cambridge, England)* 110(2): 521–28.
- Glaser, Stefan, Konstantinos Anastassiadis, and Adrian Stewart. 2005. "Current Issues in Mouse Genome Engineering." *Nature genetics* 37: 1187–93.
- Greenhouse, Stephen, Tracy Rankin, and Jurrien Dean. 1998. "Genetic Causes of Female Infertility: Targeted Mutagenesis in Mice." *American journal of human genetics* 62: 1282–87.
- Grelon, Mathilde. 2016. "Meiotic Recombination Mechanisms." *Comptes Rendus Biologies* 339(7–8): 247–51.
- Griffin, Jeanine et al. 2006. "Comparative Analysis of Follicle Morphology and Oocyte Diameter in Four Mammalian Species (Mouse, Hamster, Pig, and Human)." *Journal of Experimental and Clinical Assisted Reproduction* 3: 1–9.
- Grive, Kathryn J., and Richard N. Freiman. 2015. "The Developmental Origins of the Mammalian Ovarian Reserve." *Development* 142(15): 2554–63.
- *Handel, Mary Ann, and John C Schimenti. 2010. "Genetics of Mammalian Meiosis: Regulation, Dynamics and Impact on Fertility." *Nature Reviews Genetics* 11(2): 124–36.

- Harper, L. 2004. "A Bouquet of Chromosomes." *Journal of Cell Science* 117(18): 4025–32.
- Hartwell LH, and Weinert TA. 1989. "Checkpoints: Controls That Ensure the Order of Cell Cycle Events." *Science* 246(4930): 629–34.
- Hassold, Terry, Heather Hall, and Patricia Hunt. 2007. "The Origin of Human Aneuploidy: Where We Have Been, Where We Are Going." *Human Molecular Genetics* 16(R2): 203–8.
- *Hassold, Terry, and Patricia Hunt. 2001. "To Err (Meiotically) Is Human: The Genesis of Human Aneuploidy." *Nature Reviews Genetics* 2(4): 280–91.
- Hazan, Rachel B et al. 1997. "Vinculin Is Associated with the E-Cadherin Adhesion Complex." *Journal of Biological Chemistry* 272(51): 32448–53.
- Hess, Rex A., and Luiz Renato de Franca. 2008. "Spermatogenesis and Cycle of the Seminiferous Epithelium." 636(August).
- *Hunt, Patricia A., and Terry J. Hassold. 2002. "Sex Matters in Meiosis." *Science* 296(5576): 2181–83.
- Hüttelmaier, Stefan et al. 2001. "Raver1, a Dual Compartment Protein, Is a Ligand for PTB/HnRNPI and Microfilament Attachment Proteins." *Journal of Cell Biology* 155(5): 775–85.
- Ikami, Kanako, Nafisa Nuzhat, and Lei Lei. 2017. "Organelle Transport during Mouse Oocyte Differentiation in Germline Cysts." *Current Opinion in Cell Biology* 44: 14–19.
- Isenberg, Gerhard, Kevin Leonard, and Brigitte M Jockusch. 1982. "Structural Aspects of Vinculin-Actin Interactions." *Journal of Molecular Biology* 158(2): 231–49.
- Ishii, Tetsuya, and Mitinori Saitou. 2017. "Promoting In Vitro Gametogenesis Research with a Social Understanding." *Trends in Molecular Medicine* 23(11): 985–88.

- Israels, D. E, and L. G Israels. 2001. "The Cell Cycle." *Stem cells* (Dayton, Ohio) 19: 88–91.
- Johnson, Martin H. 2007. "Ovarian Function in the Adult." In *Essential Reproduction*, , 80–102.
- Jolla, La. 1979. "A 130K Protein from Chicken Gizzard : Its Localization at the Termini of Microfilament Bundles in Cultured Chicken Cells." *Cell*.18(September): 193–205.
- Kalmbach, Keri, Danielle Antunes, Fabiana Kohlrausch, and David Lawrence Keefe. 2015. "Telomeres and Female Reproductive Aging." *Seminars in reproductive medicine* 33.
- Keefe, David L, and Lin Liu. 2008. "Telomeres and Reproductive Aging." *Reproduction, Fertility and Development* 21(1): 10–14.
- Kidder, Benjamin. 2014. "In Vitro Maturation and In Vitro Fertilization of Mouse Oocytes and Preimplantation Embryo Culture." *Methods in molecular biology (Clifton, N.J.)* 1150: 191–99.
- Kioka, Noriyuki et al. 1999. "Vinexin: A Novel Vinculin-Binding Protein with Multiple SH3 Domains Enhances Actin Cytoskeletal Organization." *Journal of Cell Biology* 144(1): 58–69.
- Lingala, Shilpa MD, and Marc G MD MHSc Ghany. 2016. "The Sertoli Cell: One Hundred Fifty Years of Beauty and Plasticity L." 25(3): 289–313.
- Link, Jana, and Verena Jantsch. 2019. "Meiotic Chromosomes in Motion: A Perspective from *Mus Musculus* and *Caenorhabditis Elegans*." *Chromosoma* (2).
- Lucifero, Diana et al. 2007. "Coordinate Regulation of DNA Methyltransferase Expression during Oogenesis." *BMC Developmental Biology* 7(1): 36. <https://doi.org/10.1186/1471-213X-7-36>.
- Mandai, Kenji et al. 1999. "Ponsin/SH3P12: An 1-Afadin- and Vinculin-Binding Protein Localized at Cell-Cell and Cell-Matrix Adherens Junctions." *Journal of Cell Biology* 144(5): 1001–17.

- Martinez, Gladys, Kimberly Daniels, and Anjani Chandra. 2006. "National Health Statistics Reports Number 51, April 12, 2012." 51(51): 2006–10.
- Martínez, G.M., Daniels, K.A., & Chandra, A. (2012). Fertility of men and women aged 15-44 years in the United States: National Survey of Family Growth, 2006-2010. *National health statistics reports*, 51, 1-28 .
- Mascarenhas, Maya N. et al. 2012. "National, Regional, and Global Trends in Infertility Prevalence Since 1990: A Systematic Analysis of 277 Health Surveys." *PLoS Medicine* 9(12): 1–12.
- Mierke, Claudia Tanja. 2009. "The Role of Vinculin in the Regulation of the Mechanical Properties of Cells." *Cell Biochemistry and Biophysics* 53(3): 115–26.
- Mogessie, Binyam, and Melina Schuh. 2017. "Actin Protects Mammalian Eggs against Chromosome Segregation Errors." *Science* 357(6353).
- Nagano, Reiko et al. 2000. "Reproliferation and Relocation of Mouse Male Germ Cells (Gonocytes) during Prespermatogenesis." *Anatomical Record* 258(2): 210–20.
- Nagano, Takashi et al. 2017. "Cell-Cycle Dynamics of Chromosomal Organization at Single-Cell Resolution." *Nature* 547: 61.
- Nagaoka, So I., and Terry J. Hassold. 2013. "Human Aneuploidy: Mechanisms and New Insights into an Age- Old Problem." *Nat Rev Genet* 13(7): 493–504.
- Oakberg, Eugene F. 1956. "A Description of Spermiogenesis in the Mouse and Its Use in Analysis of the Cycle of the Seminiferous Epithelium and Germ Cell Renewal." *American Journal of Anatomy* 99(3): 391–413.
- Ohkura, Hiroyuki. 2015. "Meiosis: An Overview of Key Differences from Mitosis." *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology* 7(5): 1–15.
- Palmer, Sean M. et al. 2009. "Lipid Binding to the Tail Domain of Vinculin. Specificity and the Role of the N and C Termini." *Journal of Biological Chemistry* 284(11): 7223–31.

- Pellestor, F. 2002. "Mechanisms of Non-Disjunction in Human Female Meiosis: The Co-Existence of Two Modes of Malsegregation Evidenced by the Karyotyping of 1397 in-Vitro Unfertilized Oocytes." *Human Reproduction* 17(8): 2134–45.
- Peters, A.H.F.M., A W Plug, M J van Vugt, and P de Boer. 1997. "A Drying down Technique for the Spreading of Mammalian Meiocytes from the Male and Female Germline." 5: 66–68. <http://edepot.wur.nl/147790>.
- Qiao, Huanyu et al. 2012. "Interplay between Synaptonemal Complex, Homologous Recombination, and Centromeres during Mammalian Meiosis." *PLoS Genetics* 8(6).
- R.J Barstead, and Waterston R.H. 1991. "Vinculin Is Essential for Muscle Function in the Nematode." *Journal of Cell Biology* 114(4): 715–24.
- Rajkovic, Aleksandar & Pangas, Stephanie & Ballow, Daniel & Suzumori, Nobuhiro & Matzuk, Martin. (2004). "NOBOX Deficiency Disrupts Early Folliculogenesis and Oocyte-Specific Gene Expression." *Science* 305(5687): 1157–59.
- Rohožková J., Augustová L., Flachs P, Hozák P (2019). "Pairing of Homologous Chromosomes in *C. Elegans* Meiosis Requires DEB-1 - an Orthologue of Mammalian Vinculin." *Nucleus (Austin, Tex.)* 10(1): 93–115.
- Sertoli E. Dell'esistenza di particolari cellule ramificate nei canalicoli seminiferi del testicolo umano. Morgagni. 1865; 7:31–40.
- * Schafer, K A. 1998. "The Cell Cycle: A Review." *Veterinary Pathology* 35(6): 461–78.
- Schmekel, Karin, and Bertil Daneholt. 1998. "Evidence for Close Contact between Recombination Nodules and the Central Element of the Synaptonemal Complex." *Chromosome Research* 6(3): 155–59.
- Slizynski, B. M. 1957. "Meiotic Prophase in Female Mice." *Nature* 179(4560): 638.
- Snustad DP, Simmons MS (2009) *Genetika*. Brno: Masarykova univerzita. 871 p.
- Sun, Fengyun, and Mary Ann Handel. 2008. "Regulation of the Meiotic Prophase I to Metaphase I Transition in Mouse Spermatocytes." *Chromosoma* 117(5): 471–85.

- Szostak, J.W., Orr-Weaver, T.L., Rothstein, R.J., & Stahl, F.F. (1983). The double-strand-break repair model for recombination. *Cell*, 33, 25-35.
- Tarsounas, M, R E Pearlman, and P B Moens. 1999. "Meiotic Activation of Rat Pachytene Spermatocytes with Okadaic Acid: The Behaviour of Synaptonemal Complex Components SYN1/SCP1 and COR1/SCP3." *Journal of cell science* 112 (Pt 4: 423–34.
- Thomas, Anthony J et al. 2002. "Best Practice Policies for Male Infertility." *Fertility and Sterility* 77(5): 873–82.
- *Tiwari, Meenakshi et al. 2015. "Apoptosis in Mammalian Oocytes: A Review." *Apoptosis : an international journal on programmed cell death* 20.
- Tokuyasu, K T. 1980. "An Intracellular Protein Localized at Specialized Sites Where Microfilament Bundles Terminate at Cell Membranes." 77(7): 4127–31.
- Tran Van Nhieu, G., A. Ben-Ze'ev, and P J Sansonetti. 1997. "Modulation of Bacterial Entry into Epithelial Cells by Association between Vinculin and the Shigella IpaA Invasin." *EMBO Journal* 16(10): 2717–29.
- Turner, Christopher E., John R. Glenney, and Keith Burridge. 1990. "Paxillin: A New Vinculin-Binding Protein Present in Focal Adhesions." *Journal of Cell Biology* 111(3): 1059–68.
- Wagner, Angela et al. 2015. "The Role of SPRASA in Female Fertility." *Reproductive Sciences* 22(4): 452–61.
- Wang, Y. et al. 2015. "Cyclic AMP in Oocytes Controls Meiotic Prophase I and Primordial Folliculogenesis in the Perinatal Mouse Ovary." *Development* 142(2): 343–51.
- Weekes, John, Simon T. Barry, and David R. Critchley. 2015. "Acidic Phospholipids Inhibit the Intramolecular Association between the N- and C-Terminal Regions of Vinculin, Exposing Actin-Binding and Protein Kinase C Phosphorylation Sites." *Biochemical Journal* 314(3): 827–32.

- Weiss, Elisabeth E et al. 1998. "Vinculin Is Part of the Cadherin-Catenin Junctional Complex: Complex Formation between α -Catenin and Vinculin." *Journal of Cell Biology* 141(3): 755–64.
- Welburn, Julie P.I. et al. 2009. "The Human Kinetochores Kinetochore Complex Facilitates Microtubule Depolymerization-Coupled Motility." *Developmental Cell* 16(3): 374–85.
- Welch, David Mark, and Matthew Meselson. 2000. "Evidence for the Evolution of Bdelloid Rotifers without Sexual Reproduction or Genetic Exchange." *Science* 288(5469): 1211–15.
- van der Weyden, Louise, Charles Shaw-Smith, and Allan Bradley. 2009. "Chromosome Engineering in ES Cells" - Gene Knockout Protocols: Second Edition." In eds. Wolfgang Wurst and Ralf Kühn. Totowa, NJ: Humana Press, 49–77.
- Wilson, M. L. 2011. "Fertility and Pregnancy. An Epidemiologic Perspective By Allen J Wilcox." *American Journal of Epidemiology* 173(6): 712–13.
- Xu, W, H Baribault, and E D Adamson. 1998. "Vinculin Knockout Results in Heart and Brain Defects during Embryonic Development." *Development (Cambridge, England)* 125(2): 327–37.
- Yin, Shi et al. 2017. "Histone Acetyltransferase KAT8 Is Essential for Mouse Oocyte Development by Regulating Reactive Oxygen Species Levels." *Development* 144(12): 2165–74.
- Zemljic-Harpf, A. E. et al. 2007. "Cardiac-Myocyte-Specific Excision of the Vinculin Gene Disrupts Cellular Junctions, Causing Sudden Death or Dilated Cardiomyopathy." *Molecular and Cellular Biology* 27(21): 7522–37.
- Zickler, D, and N Kleckner. 1998. "The Leptotene-Zygotene Transition of Meiosis." *Annual review of genetics* 32: 619–97.

*Sekundární citace jsou označeny hvězdičkou.

Internetové zdroje:

<https://www.uniprot.org>

<http://www.technologynetworks.com>

<http://www.wormbook.org>