

Univerzita Karlova v Praze
Přírodovědecká fakulta

Studijní program: Biologie



Adéla Brzáková

Úloha mitotických kináz AURKA a PLK₁ v meiotickém zrání oocytů

The involvement of mitotic kinases AURKA and PLK₁ in the oocyte meiotic maturation

Bakalářská práce

Školitel: RNDr. Petr Šolc, Ph.D.

Praha, 2011

Poděkování patří mému školiteli RNDr. Petru Šolcovi, Ph.D. za odborné konzultace a bezbřehou trpělivost.

Zvláštní poděkování pak náleží všem myším, které položily svůj život na oltář vědy.

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, 2. 5. 2011

Podpis

Obsah

| | |
|---|----|
| Seznam zkratk..... | 4 |
| Abstrakt..... | 5 |
| Klíčové pojmy..... | 5 |
| Abstract..... | 5 |
| Key words..... | 5 |
| Úvod..... | 6 |
| Cyklin-dependentní kinázy..... | 6 |
| CyklinB/Cdk1..... | 6 |
| Meióza..... | 7 |
| Oogeneze a folikulogeneze..... | 8 |
| Molekulární mechanismy regulující meiotické zrání – od prvního k druhému bloku..... | 10 |
| Profáze I a meiotický blok..... | 10 |
| Znovuzahájení meiózy..... | 11 |
| GVBD a formování dělicího vřeténka..... | 12 |
| SAC a APC..... | 13 |
| Vydělení prvního pólového tělíska a přechod do MII..... | 14 |
| Blok v MII..... | 15 |
| Aurora kinázy..... | 16 |
| Struktura..... | 16 |
| Aurora A v mitóze..... | 17 |
| Aktivace..... | 17 |
| Dělicí vřeténko..... | 17 |
| Buněčný cyklus..... | 19 |
| p53, H3..... | 20 |
| Aurora A a Plk1..... | 20 |
| Inaktivace..... | 21 |
| Rakovinné buňky..... | 21 |
| AURKA v oocytech..... | 22 |
| Exprese a lokalizace..... | 22 |
| Buněčný cyklus..... | 22 |
| Dělicí vřeténko..... | 24 |
| Polo-like kinázy..... | 26 |

| | |
|--|----|
| Struktura..... | 26 |
| Plk ₁ v mitóze | 26 |
| Aktivace | 26 |
| Lokalizace..... | 26 |
| Buněčný cyklus..... | 27 |
| Checkpoint recovery | 28 |
| Degradace mitotických proteinů..... | 28 |
| Centrosomy | 29 |
| Plk ₁ v oocytech..... | 29 |
| Exprese a lokalizace | 29 |
| Aktivace | 29 |
| Buněčný cyklus a dělicí vřeténko | 30 |
| Závěr..... | 31 |

Seznam zkratk

| | |
|---------|--|
| Cdk | Cyklin dependentní kináza |
| MPF | Maturation/mitosis/meiosis promoting factor |
| AURKA | Aurora A |
| Plk1 | Polo-like kináza 1 (u <i>Xenopa</i> odpovídá Plx1) |
| CAK | Cdk aktivující kináza |
| CKI | Cdk inhibitor |
| GV | Germinal vesicle - zárodečný váček |
| FSH | Folikulo-stimulační hormon |
| LH | Luteinizační hormon |
| GVBD | Germinal-vesicle breakdown – rozpad jaderné membrány |
| cAMP | Cyklický adenosinmonofosfát |
| ADCY | Adenylát-cykláza |
| GPCR | G-protein coupled receptor – receptor spřažený s G-proteinem |
| NPPC | Natriuretický peptidový prekurzor typu C |
| NPR2 | Receptor NPPC |
| cGMP | Cyklický guanosinmonofosfát |
| PDE | fosfodiesteráza |
| PKA | Protein-kináza A |
| RNAi | RNA interference |
| MO | Morfolino-oligonukleotidy |
| APC/C | Anaphase-promoting complex/cyclosome |
| EGF | Epidermální růstový faktor |
| EGFR | Receptor EGF |
| AREG | amphiregulin |
| EREG | epiregulin |
| BTC | betacellulin |
| PI3K | Fosfoinositid-3-kináza |
| PKB | Protein-kináza B |
| dsRNA | Double-stranded RNA – dvouřetězcová RNA |
| MTOC | Mikrotubuly-organizující centra |
| MT | mikrotubuly |
| SAC | Spindle assembly checkpoint |
| MAPK | Mitogen-activated protein kinase |
| CSF | Cytostatické faktory |
| CaMKII | Ca ²⁺ -dependentní kináza |
| spindle | Dělicí vřeténko |
| MEF | Mouse embryonic fibroblast – myší embryonální fibroblasty |
| HTLV | Human T-lymphotropic virus |
| CPEB | Cytoplasmic polyadenylation element binding protein |
| PBD | Polo-box doména |

Abstrakt

Aurora A i Polo-like kináza 1 patří do rozvětvené rodiny serin/treonin kináz řídících průběh buněčného cyklu. Obě se podílí na kontrole mitózy a přispívají i k regulaci meiotického dělení. Ačkoli se role Aurory A ve znovuzahájení meiózy po prvním meiotickém bloku zdá být otázkou, na kterou současné studie přináší spíše rozporuplné odpovědi, je prakticky jisté, že hraje nezastupitelnou úlohu ve výstavbě dělicího vřeténka. V oocytech s inhibovanou (pomocí RNAi či inhibitorů) nebo overexprimovanou Aurorou A se vytváří abnormální dělicí vřeténka bez pólů, s aberantním počtem pólů či s nezvyklou morfologií. Stejně tak narušení funkčnosti Plk1 vede v oocytech k výskytu poškozených dělicích vřetének. Plk1 navíc, téměř jistě, hraje roli i v načasování rozpadu jaderné membrány neboli v GVBD.

Klíčové pojmy

Oocyt, znovuzahájení meiózy, GVBD, dělicí vřeténko, AURKA, Plk1

Abstract

Aurora A and Plk1 belongs to the extended family of serine/threonine kinases controlling the cell cycle. Both are involved in the control of mitosis and contribute also to the regulation of meiotic division. Although the role of Aurora A in the resumption of meiosis after the first meiotic block seems to be, according to present studies, a bit questionable matter, it is virtually certain that AURKA plays an irreplaceable role in the construction of the spindle. In the oocytes with inhibited (by RNAi or small molecular inhibitors) or overexpressed Aurora A, abnormal spindles with aberrant number of poles or otherwise unusually shaped spindles are created. Disruption of Plk1 function in oocytes also leads to the appearance of damaged spindles. In addition, Plk1, almost certainly, plays a role in the timing of the nuclear membrane breakdown - at GVBD.

Key words

Oocyte, resumption of meiosis, GVBD, spindle, AURKA, Plk1

Úvod

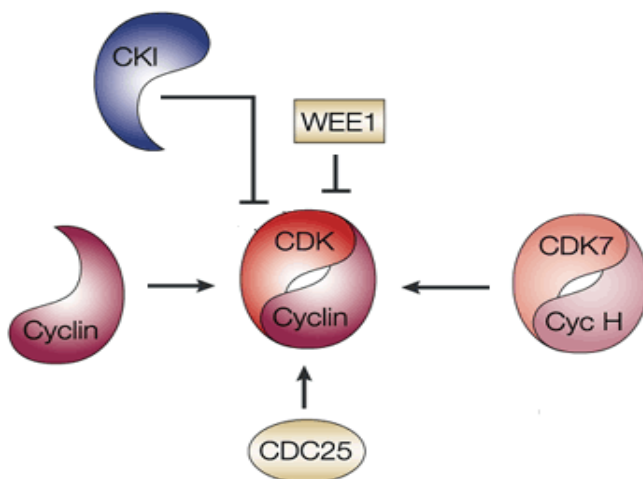
Buněčné dělení je citlivý proces vyžadující pečlivou koordinaci a kontrolu všech jednotlivých kroků vedoucích ve výsledku až ke vzniku dvou dceřiných buněk vybavených do života veškerým potřebným genetickým materiálem, který jim poslouží k naplnění jejich rozmanitého osudu. Zásadní pro postup buňky buněčným cyklem je funkčnost kináz řídících jeho průběh, jako jsou Cyklin-dependentní kinázy nebo například právě kinázy z rodin Aurora a Plk. Aurora A a Plk1 hrají roli v maturaci centrozomů, tvorbě dělicího vřeténka i v koordinaci procesů napravujících poškození DNA. Proto není divu, že narušení jejich přirozené míry exprese či aktivity je často průvodním jevem vzniku zhoubného rakovinného bujení a právě tato nemilá vlastnost kináz Aurory A a Plk1 je také odpovědí na otázku významu jejich podrobného výzkumu a poznání jejich rolí ve všech uvedených i neuvedených procesech.

Cyklin-dependentní kinázy

Ačkoli se zdá, že jsou Cyklin-dependentní kinázy evolučně mladší než ostatní kinázy regulující buněčný cyklus, jsou to právě ony, které převzaly hlavní kontrolu v eukaryotických buňkách. Tato dnešní úloha Cdk zřejmě pramení z potřeby eukaryotických buněk po nějakém mechanismu, který by řídil jejich už tak, oproti prokaryotům, dost složitý cyklus.

Synchronizace a správné pořadí jednotlivých dějů jsou pro eukaryotickou buňku velmi důležité, nemůže si například dovolit, tak jako bakterie, podstoupit dobrodružství buněčného

dělení bez zcela zreplikované DNA (výjimku z tohoto pravidla představují kvasinky), takové počínání by pro ni totiž mohlo mít až fatální následky. Aktivita cyklin-dependentních kináz závisí na řadě faktorů – jak již název napovídá, důležitá je pro ně vazba cyklinů, zásadní význam má také fosforylace (CAK, Wee1/Myt1 kinázy) či defosforylace (Cdc25 fosfatázy), nebo vazba inhibitorů (CKI – INK4 a Cip/Kip rodiny) a samozřejmě kontrola exprese a



Obrázek 1 Regulace Cyklin-dependentních kináz (upraveno z [4])

lokalizace kináz uvnitř buňky. (shrnuto v reviews [9-13])

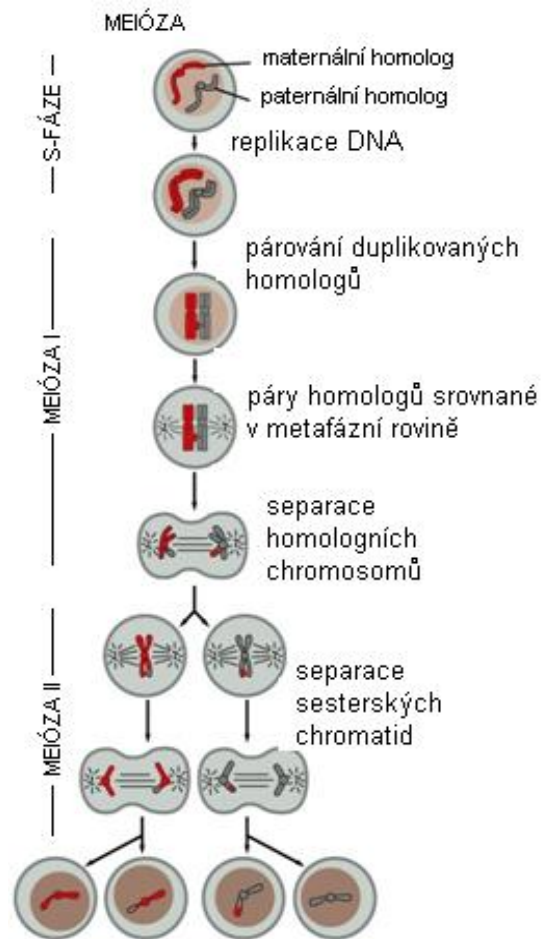
CyklinB/Cdk1

MPF byl na počátku sedmdesátých let dvacátého století identifikován jako faktor nezbytný pro vstup buněk do mitózy. V následující dekádě byla pak odhalena jeho struktura, která byla

charakterizována jako komplex cyklinu B a cyklin-dependentní kinázy 1. Pro aktivaci Cdk1 je nezbytná vazba cyklinu B, ten je syntetizován od S-fáze a vrcholu dosahuje na konci G2-fáze téhož cyklu, kdy jeho hladina dosahuje kritické hodnoty nutné pro aktivaci Cdk1. Samotná vazba cyklinu B ale ještě není dostačující pro aktivaci Cdk1, ta je během G2 blokována přetrvávající fosforylací dvou aminokyselinových zbytků (T14 a Y15), za což jsou zodpovědné Wee1/Myt1 kinázy. Proti nim působí Cdc25 fosfatázy (Cdc25A, Cdc25B, Cdc25C) odstraňující inhibiční fosforylaci, jejichž vliv na počátku M-fáze převáží. Zásadní pro aktivaci MPF je také fosforylace T161 v T-aktivační smyčce kinázy zajišťovaná Cdk-aktivující kinázou (CAK). (shrnuto v reviews [11, 14])

Meióza

Meióza je proces, který, stejně jako mitotický cyklus, začíná duplikací genetické informace. Po replikaci DNA (4N DNA) následují v těsném sledu dvě buněčná dělení, jejichž výsledkem je haploidní gameta (1N DNA). První meiotické dělení se také nazývá dělení redukční, dochází při něm k rozchodu homologních chromosomů a vznikají tak buňky, jejichž DNA odpovídá sice co do množství původní diploidní buňce (2N DNA), co do informačního obsahu získáváme ale už teď buňku haploidní. Během prvního meiotického dělení dochází události zvané crossing-over, při něm se homologní chromosomy překříží a následně si překřížené části ramének vzájemně vymění. Získáme tedy buňku, nebo vlastně buňky dvě, jejichž genetická informace se skládá z příslušného počtu párů sesterských chromatid, které mohou případně obsahovat úseky z homologních chromosomů nacházejících se toho času v sesterské buňce. A jelikož jsou sesterské chromatidy zdvojenými chromatidami, musí buňka, aby dosáhla 1N DNA, podstoupit ještě jedno dělení. A tak přichází na řadu meiotické dělení číslo dvě, při kterém se rozchází sesterské chromatidy a my se tak konečně dočkáme plnohodnotné gamety.



Obrázek 2 Meióza (upraveno z [5])

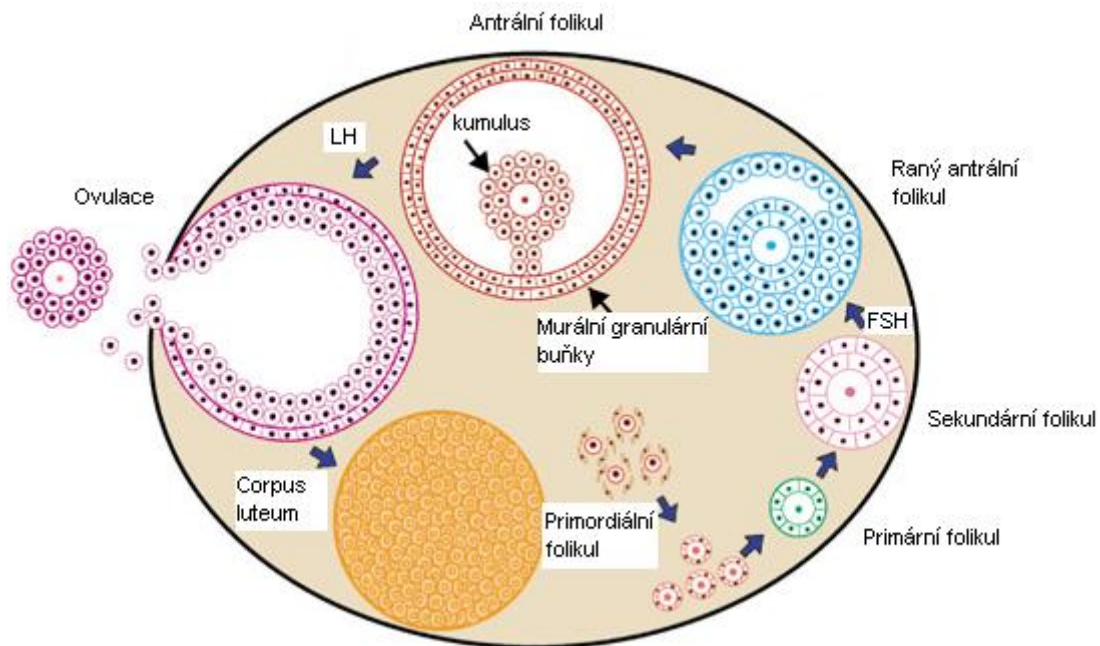
Oogeneze a folikulogeneze

Oocyty, samičí pohlavní buňky savců, jsou výsledkem procesu zvaného oogeneze. Tento proces začíná již v raném prenatálním období, kdy tzv. primordiální zárodečné buňky vstupují do vyvíjejících se gonád embrya. Podle Zuckermana nejsou již samice savců po narození (až na výjimky) schopny produkovat nové oocyty[15-16], Tilly naopak přichází s tvrzením, že, minimálně u myši, je vznik nových oocytů v průběhu dospělého života samice možný[17]. Tak či tak se v gonádách primordiální buňky mění v oogonie, které následně prochází několika cykly mitotického dělení, aby posléze, už jako primární oocyty, vstoupily do dělení meiotického. Primární oocyt vstupuje do meiózy a ještě během profáze prvního meiotického dělení je zastaven v tzv. diktyotenním stádiu, prodlouženém diplotenu profáze I, kterému se také pro dobře viditelné jádro říká GV (Germinal-Vesicle) stádium (shrnutí v review[18-19]).

Vývoj oocytu je úzce spjat s osudem tkáně, která jej bezprostředně obklopuje. Záhy potom, co oocyty vstoupí do diktyotenního stádia, obalí se jednou vrstvou plochých buněk a bazální laminou, které tak vytvoří primordiální folikul. Okolo, na bazální lamině, jsou tzv. buňky thekální. Oocyt v takovémto folikulu roste a stejně tak okolní somatické buňky se mění a proliferují - z plochých folikulárních buněk se stávají krychlové buňky granulární, okolo oocytu se navíc tvoří zona pelucida - vzniká tak primární folikul. Ve chvíli, kdy je oocyt obklopen více než jednou vrstvou granulárních buněk, se celému folikulu začíná říkat sekundární. Až do vytvoření sekundárního folikulu není tento proces závislý na přítomnosti FSH a může tak probíhat ještě před dosažením pohlavní dospělosti samice. Další vývoj už ale na FSH závislý je a dochází k němu tedy až ve chvíli, kdy je organismus schopen si dostatečnou hladinu hormonu vytvořit. V odpověď na stimul FSH pokračuje jednak proliferace somatických buněk a navíc se uvnitř folikulu vytváří dutinka zvaná antrum vyplněná folikulární tekutinou, vzniká tak tzv. antrální, neboli terciární folikul. Buňky v terciárním folikulu se dají rozlišit na dva typy: buňky bezprostředně obklopující oocyt jsou buňky kumulární (po ovulaci tvoří okolo oocytu tzv. kumulus) a buňky lemující stěnu folikulu se pak nazývají murální granulární buňky. Zralému folikulu připravenému k prasknutí a vypuštění oocytu z vaječníku do vejcovodu se říká Graafův folikul. (review [18-20]).

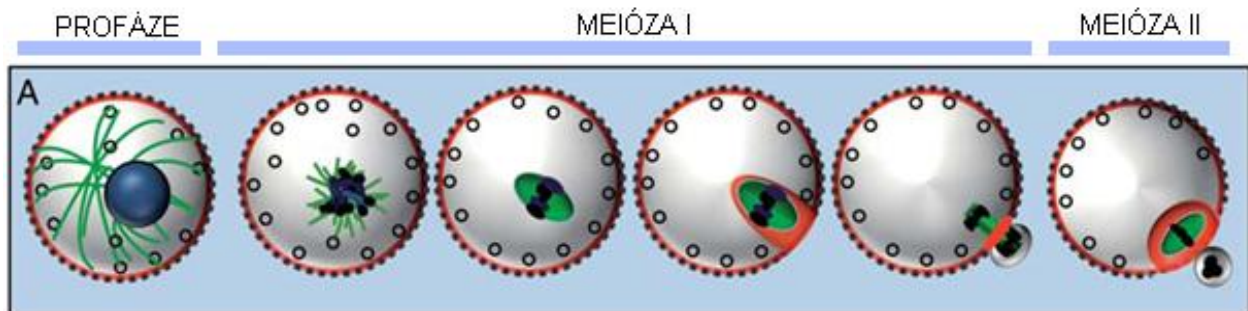
Samotný oocyt pak až do vytvoření antrálního folikulu zůstává zastaven v diktyotenním stádiu a není schopen dokončit profázi prvního meiotického dělení. Teprve oocyt z antrálního folikulu má kompetenci znovuzahájit meiózu. Signálem pro znovuzahájení meiózy je uvolnění luteinizačního hormonu z hypofýzy. Prvním viditelným znakem tohoto procesu je rozpad jaderné membrány, tzv. GVBD, po něm následuje vydělení prvního pólového tělíska. Dále

oocyt vstupuje do druhého meiotického dělení a je znovu zastaven v metafázi II, kdy dochází k ovulaci. Další vývoj oocytu je pak zahájen až průnikem spermie, který indukuje prudké zvýšení intracelulární koncentrace Ca^{2+} a stimuluje tak procesy vedoucí k finálnímu dokončení meiózy – vydělení druhého pólóvého tělíška a vzniku zygoty se samčím a samičím prvojádrům (review [19]).



Obrázek 3 Vývoj folikulu (upraveno z [21])

Molekulární mechanismy regulující meiotické zrání – od prvního k druhému bloku



Obrázek 4 Schéma událostí probíhajících v meióze: rozpad jaderné membrány a formování dělicího vřeténka, jeho migrace ke kortexu oocyty, vydělení prvního pólového tělíska a vytvoření MII-spindlu pod plasmatickou membránou (upraveno z [6])

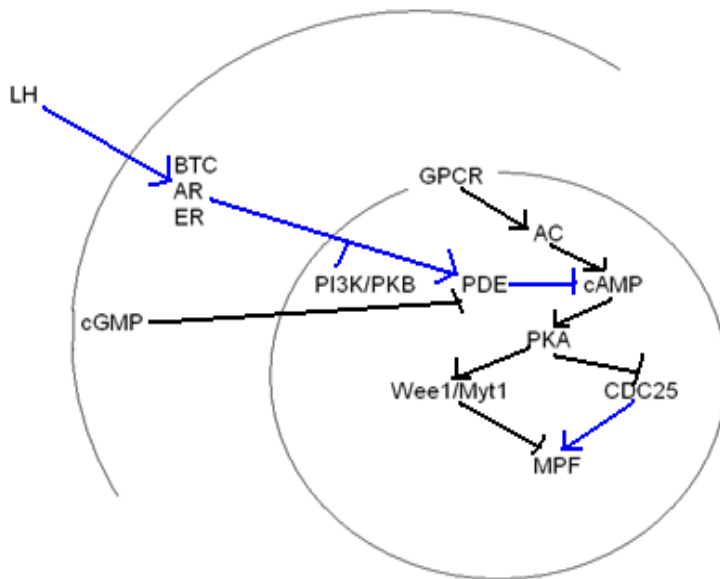
Profáze I a meiotický blok

Zásadním okamžikem v životě každého oocyty je zastavení jeho vývoje v profázi I, ve stádiu primárního oocyty obaleného jednou vrstvou somatických buněk. Od okamžiku, kdy oocyt začne být meioticky kompetentní¹, je za toto přerušení vývoje přímo odpovědné zvýšení hladiny cyklického AMP ([22], [[23]). cAMP je v oocyty produkováno adenylát-cyklázou [24-25] na základě stimulace zprostředkované stimulační podjednotkou trimerního G-proteinu (G_s)[26]. Uvolnění G_s závisí na aktivitě GPCR [27]. Dominantními hráči v této signální dráze jsou u myších i lidských oocytů GPCR3, G_{α_s} a ADCY3[26]. *In vitro* uvolnění oocyty z Graafova folikulu vede ke znovuzahájení meiózy[28], proto je zřejmé, že právě buňky folikulu se podílí na udržení meiotického bloku. Murální granulární buňky exprimují natriuretický peptidový prekurzor typu C, který se váže na svůj receptor (NPR2) v membráně kumulárních buněk, NPR2 reaguje na vazbu NPPC tvorbou cyklického GMP [29], který přes gap-junctions proniká do oocyty a zde funguje jako inhibitor fosfodiesterázy štěpící cyklické AMP[30].

Tyto inhibiční mechanismy mají tedy za cíl zvýšit v oocyty hladinu cyklického AMP, které je schopno aktivovat protein-kinázu A a udržet její vysokou aktivitu během celého meiotického bloku[31-33]. PKA pak může fosforylovat příslušné substráty a upravovat tím jejich aktivitu právě tak, aby zabránila znovuzahájení meiózy, čili vlastně aktivaci Cdk1/cyklinuB. Inhibice Cdk1 dosahuje PKA nepřímo aktivací kinázy Wee1B[34], jejíž RNAi vede k předčasnému ukončení prvního meiotického bloku u části oocytů[35]. PKA navíc fosforyluje i CDC25B fosfatázu, na kterou se následně váže 14-3-3 protein udržující Cdc25B v cytoplazmě[31, 36]. Další významnou kinázou podílející se na udržení meiotického bloku je Myt1 kináza, jejíž inhibice pomocí morfolino-oligonukleotidů má podobný efekt na oocyty zastavené v profázi I

¹ Meiotická kompetence je schopnost oocyty znovu zahájit a dokončit první meiotické dělení a opět se zastavit v druhé meiotické metafázi

jako inhibice Wee1B, inhibice obou kináz má pak za následek předčasné znovuzahájení meiózy, tentokrát už u většiny buněk[35]. Na inhibici Cdk1 v GV-oocytech se také podílí E3 ubiquitin ligáza APC/C aktivovaná kofaktorem Cdh1 (APC/C^{Cdh1}), která směřuje k degradaci mimo jiné cyklin B[37]. Aktivní cyklinB/Cdk1 je ale schopna inaktivovat APC/C^{Cdh1}, proti čemuž zase působí Cdc14B fosfatáza, ta z cyklosomu odstraňuje inhibiční fosfát a přispívá tak k udržení prvního meiotického bloku[38].



Obrázek 5 Základní schéma meiotického bloku (černě) a znovuzahájené meiózy (modře)

granulárních buňkách[41], kde způsobuje expresi EGF-like faktorů amphiregulinu (AREG), epiregulinu (EREG) a betacellulinu (BTC) [42]. Tyto EGF-like faktory se váží na EGF receptory (EGFR) a stimulují expanzi kumulu a maturaci oocyty. Roli ve znovuzahájení meiózy pak hraje také PI3K/PKB dráha, prostřednictvím PI3K je aktivována PKB a ta následně fosforyluje a tak aktivuje fosfodiesterázu3A zodpovědnou za degradaci cAMP[32, 43]. Tato aktivace PKB předchází aktivaci MPF, resp. GVBD a je tedy nezávislá na aktivitě Cdk1 a potenciálně zapojená i do její aktivace. [32, 43] Celá kaskáda obnovení meiotického cyklu tedy vede až k aktivaci PDE3A, což způsobí prudký pokles hladiny cAMP, tím i inhibici PKA a s ní i příslušných downstream signálních drah – Wee1B již není stimulována k další aktivitě a CDC25 naopak nejsou nadále inhibovány. Otevře se tak cesta ke znovuzahájení meiózy prostřednictvím aktivace Cdk1. Cdk1 je pozitivně ovlivňována vazbou cyklinuB, který je těsně před GVBD translokován do jádra, stejně tak se do jádra dostává i CDC25B,[44] obě tyto molekuly se pak podílí na aktivaci Cdk1. Na somatických buňkách bylo ale zjištěno, že k počáteční aktivaci Cdk1 nedochází v jádře, nýbrž v cytoplazmě - na centrozomech[45], CDC25B tady po aktivaci

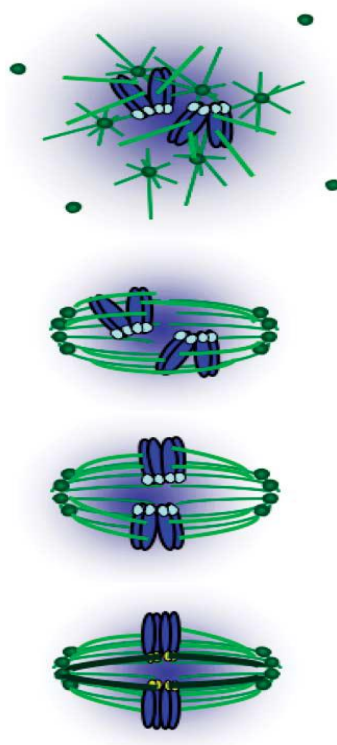
Znovuzahájení meiózy

Z bloku profáze I vysvobodí savčí oocyt až náhlý nárůst hladiny luteinizačního hormonu[39], který v konečném důsledku vede ke znovuzahájení meiózy a potažmo i ovulaci prostřednictvím snížení hladiny cAMP[40] i cGMP [30]. LH nepůsobí ovšem přímo na oocyty, jelikož ty nedisponují

příslušnými receptory, ale váže se na LH-receptory na murálních

pomocí Aurory A odstraní inhibiční fosfát z Cdk1[46] a pomůže tak buňce přejít z interfáze do mitózy. Je možné, že iniciální aktivace Cdk1 probíhá podobně i v oocytech, oocyty myších samiček neexprimujících Cdc25B nedokáží překonat první meiotický blok a takové samičky jsou tedy neplodné[47]. Další z řady CDC25 fosfatáz je CDC25A, jejíž význam pro znovuzahájení meiózy taktéž není zanedbatelný. Overexprese této fosfatázy je totiž schopna překonat meiotický blok oocyty navozený cAMP, jehož vysoká hladina je udržována pomocí IBMX (3-isobutyl-1-methylxanthine – inhibitoru PDE) [44]. Navíc inhibice CDC25A dlouhou Cdc25a dsRNA vede k poklesu počtu oocytů schopných znovuzahájit meiózu[44].

GVBD a formování dělicího vřeténka



Obrázek 6 Formování dělicího vřeténka
Chromosomy (modře) spolu s MTOC (zeleně) řídí tvorbu bipolárního dělicího vřeténka, na konci MI jsou aktivovány kinetochory (žlutě) [7], další popis v textu

GVBD neboli „germinal-vesicle breakdown“ (popř. NEBD – nuclear-envelope breakdown) je charakterizován rozpadem jaderné membrány oocyty. Jaderná membrána představuje komplikovanou strukturu skládající se ze dvou vrstev spojených v místech jaderných pórů. Vnější jaderná membrána kontinuálně přechází v endoplasmatické retikulum, zatímco vnitřní membrána je podepřena hustou sítí jaderných laminů typu A a B a dalších rozličných proteinů. Rozpad jaderné membrány probíhá, stejně jako u somatických buněk, ve dvou krocích a je v něm zapojena celá řada proteinů včetně komplexu Cdk1/cyklinB. Nejdříve se začnou uvolňovat periferní nukleoporiny z jaderných pórů, čímž se zvyšuje jejich permeabilita, následuje fosforylace a rozpad laminů a tím i definitivní rozpad jaderné membrány. (*shrnutí v[48]*)

Těsně po GVBD se začíná formovat dělicí vřeténko okolo z kondenzovaných chromosomů[49]. Myší oocyty postrádají centrioly a tím pádem tedy i centrosomy[50] a v oocytech tak roli centrozomů obvykle nahrazují mikrotubuly-organizující centra. Absence centrozomů v samičí meióze byla zjištěna u řady druhů včetně myši[50] nebo člověka[51]. V myším oocyty se dokonce před NEBD nachází více než osmdesát MTOCs různých velikostí, jejichž převážná většina je formována *de novo*[52]. MTOCs jsou rozptýlena v cytoplazmě[52] a po GVBD jsou reorganizována tak, aby bylo vytvořeno bipolární dělicí vřeténko. Za tuto reorganizaci jsou zodpovědné samotné chromosomy, jelikož i přesto, že i v oocytech zbavených chromosomů (tzv. cytoplazmách) se bipolární dělicí vřeténko tvoří, mívají různé

velikosti a bývá jich obvykle více na jednu buňku. Čili MTOC a mikrotubuly mají potenciál vytvořit dělicí vřeténka, ale chromosomy hrají zásadní úlohu při řízení a potažmo omezování této schopnosti[53]. Při mitóze je připojení chromosomů k mikrotubulům pod kontrolou kinetochorů. K nim se připojí mikrotubuly (K-mikrotubuly), které se spojí s opačnými póly dělicího vřeténka, a když je toho dosaženo, chromosom se ustálí v ekvatoriální rovině[54]. V myších oocytech ale přichází ke slovu poněkud odlišný mechanismus. Jelikož kinetochory tu nejsou po většinu MI aktivní, ujímají se úkolu dopravit chromosomální bivalenty do středu dělicího vřeténka mikrotubuly vřeténka, které interagují přímo s raménky chromosomů a pomocí MT-asociovaných motorů je stabilizují v ekvatoriální rovině[49]. Ke kontaktu kinetochorů a mikrotubulů dochází až na konci první meiotické metafáze, což umožní konečné ustálení chromosomů ve středu ekvatoriální roviny a přechod do anafáze[49].

SAC a APC

Během GV stádia oocyty, tedy během prvního meiotického bloku, udržuje nízkou hladinu cyklinu B a potažmo tak nízkou aktivitu Cdk1 APC/C s pomocí Cdh1[37], po GVBD tento komplex svou afinitu k cyklinu B ztrácí. Po rozpadu jaderné membrány se APC/C^{Cdh1} zaměřuje na degradaci Cdc20[55] a tak vlastně naopak přispívá ke zvyšování hladiny cyklinu B. Nejprve degradace Cdc20 zřejmě poskytuje dostatek času ke správnému uspořádání chromosomů v metafázní rovině, zároveň ale fakt, že se přestal degradovat cyklin B zvyšuje aktivitu MPF a umožňuje tak Cdc20 dostat se opět ke kormidlu APC/C - degradovat Cdh1, cyklin B a securin.[55] V oocytech, stejně jako v somatických buňkách, funguje tzv. Spindle Assembly Checkpoint, který ve své funkční podobě brání vstupu buňky do anafáze až do chvíle, kdy jsou všechny chromosomy bezpečně seřazeny v ekvatoriální rovině.[56] Komponenty SAC (proteiny kódované MAD a BUB geny) se během mitózy váží na kinetochory nepřipojené nebo špatně připojené k mikrotubulům dělicího vřeténka a zároveň brání APC/C^{Cdc20} v degradaci securinu a cyklinu B vazbou a inhibicí APC aktivátoru Cdc20(shrnuto v reviews [57-58]). Ačkoli je SAC dobře zmapovaný v somatických buňkách, jeho role v meióze byla až donedávna nejasná. V oocytech ovšem způsobuje vyřazení některých hlavních komponent figurujících v mitotickém SAC akceleraci meiózy I, což nenechává dostatek času ke správnému seřazení chromosomů v ekvatoriální rovině a potažmo vede k missegregacím a aneuploidiím[59-60]. Tyto i další studie přináší důkazy o nepostradatelnosti SAC pro vývoj oocytů (další shrnutí v review [61]) Poté, co je uspokojen SAC a oocyt je vpuštěn do anafáze, chrání centromery a spojení sesterských chromatid protein shugoshin[62] a dochází tak pouze k rozchodu homologů. Potíže ovšem nastávají po knockdown Cdh1, nedegraduje se tak Cdc20 a v oocytu je rychleji degradován cyklin B a securin a tím pádem dochází k předčasné segregaci a

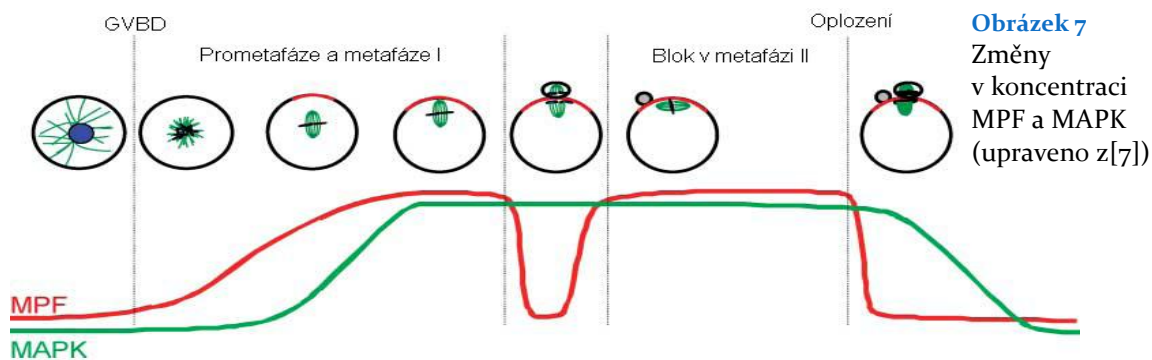
nondisjunkci chromosomů[55]. Nízká aktivita Cdc20 je ale nevhodná podobně jako jeho vysoká aktivita, v myších samicích produkujících jen malé množství Cdc20 nejsou zase naopak cyklinB a securin efektivně degradovány a počátek anafáze I jejich oocytů je tak značně opožděn, v konečném důsledku produkují tyto samice oocyty s missegragovanými chromosomy a jejich plodnost je tím pádem citelně snížena.[63] Vedle aktivátorů je destruktivní činnost APC/C komplexu řízena i pomocí inhibitorů, jedním z nich je Emi1, který ovšem těsně po GVBD sám podstupuje destrukci až je téměř nedekovatelný na pomezí MI/MII, deplece Emi1 pomocí Emi1-MO vede ke zpoždění GVBD, naopak exogenní Emi1 injikovaný do oocytů nástup rozpadu jaderné membrány uspíší [64]. Dalším inhibitorem APC/C je Emi2, který hraje významnou roli během druhého meiotického bloku.

Tabulka 1 Afinita APC/C ke svým hlavním substrátům vzhledem k navázanému aktivátoru a fázi meiózy[37, 55]

| | GV | Těsně po GVBD | Později po GVBD |
|------------------------|----------|---------------|-------------------------|
| APC/C ^{Cdh1} | Cyklin B | Cdc20 | |
| APC/C ^{Cdc20} | | | Cdh1, cyklin B, securin |

Vydělení prvního pólového tělíska a přechod do MII

Pro vznik plnohodnotných oocytů je důležité, aby oproti pólové buňce obsahovaly co největší podíl cytoplasmy a byly tak schopny poskytnout dostatek živin i mRNA případnému vyvíjejícímu se embryu. Během MI se proto dělicí vřeténko, které se zformovalo více méně uprostřed buňky, posouvá k jejímu okraji[65]. U myších oocytů tuto cestu zajišťují aktinová mikrofilamenta, jejichž nukleace je závislá na molekule FORMIN-2[66]. V procesu migrace dělicího vřeténka má také důležitou roli molekulární motor myosin-2 - inhibice myosinové aktivity vede k zastavení pohybu vřeténka směrem k periférii [52] - a také třeba MAPK[67]. MAPK je aktivována pomocí Mos kinázy[67-68] a to až po aktivaci MPF a na rozdíl od MPF její aktivita neklesá ani mezi metafázemi prvního a druhého meiotického dělení, které jsou pomocí MAPK řízeny především[69]. MAPK není aktivována v *mos*^{-/-} myších, chromatin v oocyttech takovýchto myší je částečně dekonenzovaný[68] a jejich dělicí vřeténko nemigruje, ale prodlužuje se, aby posunulo jeden pól blíže ke kortexu[65], toto posunutí ale nekompensuje zcela neschopnost migrace vřeténka a oocyt tak vyděluje větší pólové tělísko než je běžné[65, 67] Po vydělení prvního pólového tělíska se v oocytu rychle vytvoří nový spindle složený z krátkých mikrotubulů těsně nahloučených okolo zkonenzovaných chromosomů.[70]



Obrázek 7
Změny
v koncentraci
MPF a MAPK
(upraveno z[7])

Blok v MII

Tak jako během prvního meiotického dělení, je i v meióze II oocyt zastaven ve svém vývoji. Tento blok však probíhá odlišně než blok v profázi I - má podstatně kratší trvání a je také řízen odlišnými faktory. Oocyt je během meiózy II zastaven až v metafázi s chromosomy vyrovnanými v metafázní rovině[49] a dělicím vřeténkem, jehož mikrotubuly podstupují rychlou degradaci a opětovnou výstavbu [71], umístěným pod plasmatickou membránou[49]. Stejně tak aktivita MPF zůstává během celého druhého meiotického bloku vysoká.[72] Všechny procesy druhého meiotického bloku jsou v myších oocytech řízeny aktivitou tzv. cytostatických faktorů, které dokáží oocyt v tomto zvláštním stavu udržet po hodiny až celé dny i během ovulace a dál až do oplození[72], které nastartuje jeho další vývoj. Molekulární povaha CSF nebyla dlouho známá, především na oocytech *Xenopa* pak bylo zjištěno, že zahrnuje MAP kinázovou dráhu vedoucí od aktivace Mos přes MEK, MAPK až k Rsk. V myších oocytech je ale situace poněkud odlišná, Rsk se tady dráhy CSF neúčastní[73]. Každopádně následně buď Rsk nebo jiná kináza fosforyluje a tím stabilizuje inhibitor APC/C Emiz, APC/C tak nemůže degradovat cyklin B a tím je udržována vysoká aktivita MPF a potažmo i druhý meiotický blok (shrnuto v reviews [74-75]). Kalciová vlna vyvolaná oplozením pak aktivuje Ca^{2+} -dependentní kinázu CaMKII, která fosforyluje Emiz, za asistence Plx1 (studie byla provedena na oocytech *Xenopa*) je pak Emiz destruován a oplozený oocyt tak může pokročit k dalšímu vývoji[76].

Aurora kinázy

Aurora kinázy tvoří rodinu serin/treonin kináz uplatňujících se v kontrole buněčného cyklu. Poprvé byly identifikovány v roce 1995 na *Drosophila* [77] a následně na dalších druzích bezobratlých živočichů i obratlovců včetně člověka. [78-80] Již první experimenty ukázaly, že Aurora kinázy hrají nezastupitelnou roli v separaci replikovaných centrozomů a tvorbě bipolárního dělicího vřeténka. [77]

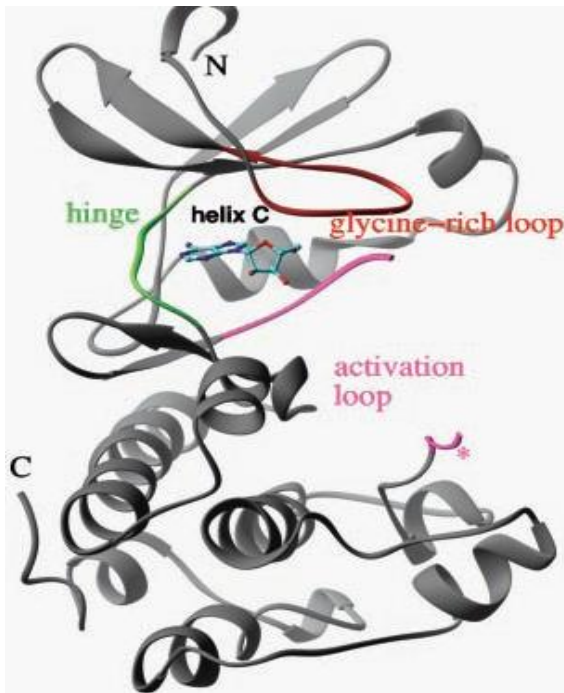
Nomenklatura Aurora kináz je poněkud nepřehledná a jednotlivé typy těchto kináz lze nalézt pod různými jmény u různých skupin živočichů. Přehled je uveden v následující tabulce.

TABLE 2 | **Nomenclature and properties of aurora family kinases**

| Nomenclature guide* | | | | | | |
|---------------------|--|----------------|-------------------|-------------------|----------------------|--|
| Mammals | Other names | <i>Xenopus</i> | <i>C. elegans</i> | <i>Drosophila</i> | <i>S. cerevisiae</i> | |
| Aurora-A | Aurora-2, HsAIRK1, ARK1, Aik, BTAK, STK-15 (human); ARK1, Ayk1, IAK1 (mouse) | Eg2 | AIR-1 | aurora | Ipl1p [†] | |
| Aurora-B | Aurora-1, HsAIRK2, ARK2, Aik2, AIM-1, STK-12 (human); ARK2, STK-1 (mouse); AIM-1 (rat) | AIRK2 | AIR-2 | IAL | | |
| Aurora-C | Aurora-3, HsAIRK3, AIE2, Aik3, STK-13 (human); AIE1 (mouse) | | | | | |

[11]

Struktura



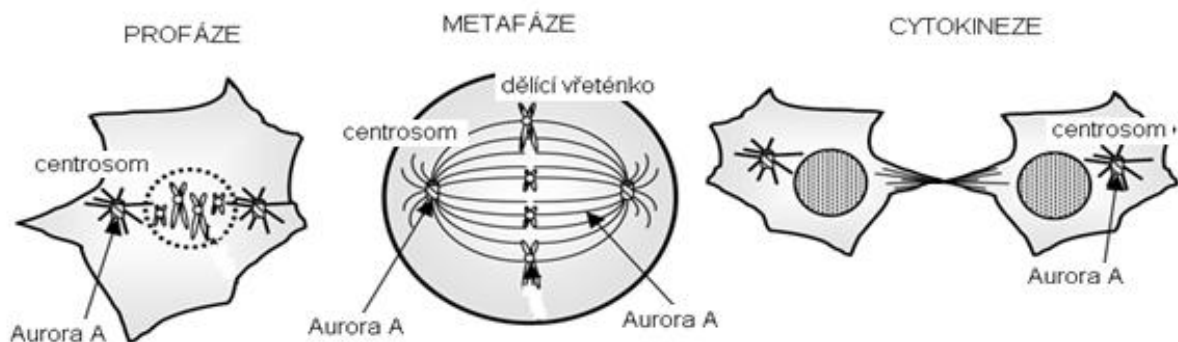
Obrázek 8 Struktura Aurory A [8]

Aurora kinázy, jak se na kinázy sluší a patří, obsahují dvě důležité domény. Jsou jimi regulační doména na N-konci a katalytická doména na C-konci. Regulační doména se mezi jednotlivými typy kináz různí, ale struktura domény katalytické zůstává v podstatě zachována - tři savčí Aurora kinázy sdílí až 70% homologie [81], (Cheetham uvádí 82%)[8], přičemž ATP-vázací místo se mezi jednotlivými kinázami prakticky neliší. [8] Aurora kinázy také obsahují tzv. D a A boxy směřující je k degradaci přes APC. [81] Za povšimnutí ovšem stojí fakt, že bez ohledu na celkový procentuální rozdíl mezi primárními sekvencemi Aurory A a Aurory B, je

možné záměnou pouhé jediné aminokyseliny ve struktuře Aurory A (glycin 198 za asparagin) změnit její lokalizaci a funkci a plně tak nahradit Auroru B [81-82].

Aurora A v mitóze

Aurora A se podílí především na funkci centrozomu a tvorbě dělicího vřeténka. Míra její exprese je těsně svázána s postupem buněčného cyklu, vrcholu dosahuje v G₂/M a s koncem mitózy zase prudce klesá, v zásadě tak kopíruje expresi cyklinu B [79, 83]. Od profáze do anafáze je lokalizovaná na centrozomech a pólech dělicího vřeténka [79] [84-85].



Obrázek 9 lokalizace Aurory A během mitózy (převzato a upraveno z [86])

Aktivace

Aurora A je během buněčného cyklu prvně aktivována na centrozomech [87-88] na přelomu G₂/M [83, 88] pravděpodobně souběžně, nebo těsně po aktivaci Cdk1 [83]. Na aktivaci Aurory A se podílí řada molekul, mezi nimi je například LIM protein Ajuba [87] nebo PAK₁ kináza, která v savčích buňkách fosforyluje Auroru A na S₃₄₂ a T₂₈₈ [89]. Mezi další centrosomální proteiny důležitými pro aktivaci Aurory A je třeba Arpc1b [90] nebo Bora, její deplece vede ke stejným efektům na dělení buňky jako deplece samotné Aurory A [91]. Významným aktivátorem Aurory A je pak také TPX₂ [92-93], který jí umožňuje autofosforylaci a zároveň způsobuje konformační změnu vedoucí k ukrytí kritického fosfotreoninu, jehož defosforylace vede k inhibici funkce kinázy [93]. Zajímavé je zjištění z buněk *Xenopa*, kde k autofosforylaci dochází na sedmi aminokyselinových zbytcích, ale pouze jeden z nich (Thr 295) je opravdu nutný pro aktivaci Aurory A, mutace v ostatních aminokyselinách k inhibici kinázy nevede [94].

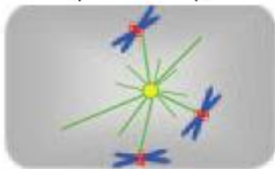
Dělící vřeténko

Aurora A je zodpovědná za správný průběh maturace centrosomů, kde jako součást tzv. PCM („pericentriolar material“) zajišťuje např. lokalizaci γ -tubulinu [85] nebo centrosominu [95] a zodpovídá také za délku a četnost astrálních mikrotubulů [84]. AURKA je též známá pro svou

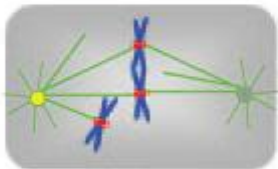
roli v separaci centrozomů. [3, 77, 84-85, 88] Inhibice samotné Aurory A MLN 8054 inhibiátorem způsobuje tvorbou abnormálních dělicích vřetének s nesprávně připojenými chromosomy. [1, 3] Stejně tak mutace v genu pro Auroru v buňkách *Drosophily* má za následek vznik defektních dělicích vřetének, především monopolární povahy. [77] Zajímavé je, že i přes defekty v separaci centrozomů, jsou některé buňky s Aurorou A inhibovanou MLN8054 inhibiátorem schopny vytvořit bipolární nebo i vícepolární spindle, přičemž pouze jeden pól takového vřeténka je pak tvořen centrozomem a další póly se vytvoří i bez asistence této struktury. [3]

Ovšem pro to, aby mohla AURKA vykonat všechny své zodpovědné funkce potřebuje být aktivní [88] a jak jsme si již řekli výše, jedním z jejích významných aktivátorů je TPX2[92]. Ten

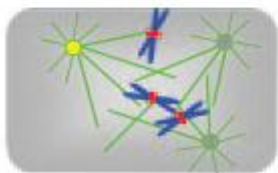
monopolární spindle



bipolární spindle s nesprávně napojenými chromosomy



multipolární spindle



Obrázek 10 Dopad inhibice Aurory A na morfologii spindlu, převzato a upraveno z [3]

jeho schopnost dostatečně zajistit tvorbu dělicích vřetének.[98] Očividný rozpor vysvětluje autor [98] neúplnou inhibicí endogenního TPX2 ve starší Brunetově studii[97]. Stejně tak je ke správnému sestavení vřeténka důležitý další partner a aktivátor Aurory A – kofaktor Bora [99] jehož deplece, případně overexprese vede ke vzniku různým způsobem deformovaných vřetének s narušenou lokalizací Aurory A i TPX2[99].

určuje přítomnost a tím pádem i aktivity kinázy na mikrotubulech spindlu [96], který bývá v buňkách s mutovaným TPX2 malý a s krátkou vzdáleností mezi póly [92]. Význam TPX2 pro výstavbu spindlu tedy není zrovna zanedbatelný a proto není divu, že vznikla řada prací zabývajících se rolí tohoto aktivátoru poněkud podrobněji. Například experimenty studující strukturu TPX2 odhalují existenci jeho dvou hlavních domén. N-doména se přímo váže na mikrotubuly a obsahuje také Aurora A-vázací peptid, přesto ale není schopna zastoupit roli endogenního TPX2 v nukleaci mikrotubulů a v podpoře tvorby dělicího vřeténka, naopak C-doména, která se neváže přímo na mikrotubuly ani Auroru A, dokáže přirozenou roli TPX2 zastat – čili v její přítomnosti dochází k Ran-GTP indukované nukleaci mikrotubulů i k výstavbě spindlu.[97] Těmto výsledkům ale protiřečí jiná práce, která sice potvrzuje schopnost části TPX2 bez sekvence vázající Auroru A podpořit nukleaci mikrotubulů, nepotvrzuje ale

Závěrem k mírně rozporuplným datům se dá snad říci, že význam Aurory A ve věcech kolem maturace a separace centrozomů či výstavby spindlu se zdá být nepopíratelný, tuto roli ale může AURKA zastat pouze ve svém aktivním stavu[88] a zmíněné TPX2 či Bora její aktivaci zajišťují[91-92], proto také narušení jejich exprese/aktivity/hladiny vede k různým defektům vyvolaným nedokonalou funkčností Aurory A. [92, 97, 99]

Buněčný cyklus

vstup do mitózy

Vstup buňky do mitózy je přímo závislý na aktivitě Cdk1, potažmo komplexu Cdk1/cyklinB, který je na přelomu G₂/M aktivován na centrozomech[45]. A jelikož se aktivní Aurora A nachází tamtéž a navíc její inhibice způsobuje různé defekty buněčného dělení (viz. výše), navrhl v roce 2003 Hirota[87] hypotézu o roli Aurory A v aktivaci Cdk1. V této studii byly použity synchronizované HeLa buňky, ve kterých byla Aurora A inhibována pomocí RNAi metody. Následně byl sledován dopad této inhibice na buněčný cyklus a aktivitu dalších klíčových molekul a byla zjištěna inhibice aktivace Cdk1[87]. Z této práce by tedy vyplývalo, že při vstupu do mitózy funguje Aurora A jako „nadřazená“ kináza Cdk1, že aktivuje MPF a je tak klíčovou pro zahájení mitotického cyklu. Dopad deplece Aurory A na vstup buňky do mitózy byl následně pozorován i na cyklujících extraktech oocytů *Xenopa*, kde ve všech sledovaných aspektech – aktivaci Cdk1, kondenzaci chromatinu i aktivaci MAPK došlo k určitému zpoždění[100], přesto ale, na rozdíl od prvního případu[87], buňky do mitózy nakonec vstoupily. [100] Podobně i v dalších pracích byl pozorován zpožděný vstup do mitózy po inhibici Aurory A pomocí RNAi nebo specifických inhibitorů [1, 83, 101] a také prodloužení doby trvání jednotlivých mitotických fází, především profáze, prometafáze a metafáze [102]. Všechny tyto výsledky by tedy v zásadě ukazovaly na vliv Aurory A na počáteční aktivaci Cdk1. Odlišných závěrů bylo ale dosaženo na embryích *C. elegans*, kde porovnání kondenzace chromatinu v buňkách s depletovanou Aurorou A se situací v kontrolních buňkách neukázalo žádný rozdíl v iniciaci, ani v trvání kondenzace, potažmo tedy zřejmě ani v aktivaci Cdk1 [103], zároveň ale deplece Aurory A vedla k významnému zpoždění a také prodloužení doby rozpadu jaderné membrány[103]. Inhibice samotné Cdk1 pak měla za následek inhibici Aurory A [83, 88] a na ní závislých aktivit dalších molekul a zároveň inhibice AURKA ke zpoždění v aktivaci Cdk1 nevedla. [88] Což, na rozdíl od předchozích prací, svědčí pro závislost Aurory A na předcházející aktivaci Cdk1, nikoli naopak. Na druhou stranu ale musíme vzít v potaz dopady inhibice Aurory A, která vede mimo jiné ke vzniku monopolárních dělicích vřetének, jež jsou zřejmě výsledkem nezdařené separace centrozomů. [88] Čili separace centrozomů závisí přímo na aktivitě Aurory A, překvapující je proto zjištění, že v HeLa buňkách

s inhibovanou Cdk1 k separaci centrozomů dochází [88, 104]. Co z toho vyplývá? Nejspíš to, že většina aktivit Aurory A je skutečně závislá na Cdk1, ale úkol separovat centrosomy předcházející aktivaci MPF je z vlivu Cdk1 vyňat[88] a to minimálně právě v HeLa buňkách.

SAC, cytokineze

Inhibice Aurory A pomocí RNAi i anti-Aurora A protilátky vede k vyššímu výskytu vícejaderných buněk [102], stejně tak mikroinjekce protilátky proti AURKA do buněk v metafázi zhatí ve většině případů dokončení cytokineze[102]. Také overexprese Aurory A způsobila v MEFs neúspěch v dokončení dělení buňky, v některých případech se vytvořila samostatná jádra, k samotné cytokinezi už ale nedošlo[105]. Tyto výsledky naznačují, že AURKA hraje jistou úlohu, ať už přímou či nepřímou, v řízení cytokineze vzhledem k tomu, že narušení její fyziologické hladiny vede v konečném důsledku ke vzniku polyploidních či vícejaderných buněk. Zajímavá je také možnost zapojení Aurory A v SAC, v buňkách s overexprimovanou Aurorou A dochází totiž k nástupu anafáze, i když je SAC uměle udržován pomocí taxolu a komponenty SAC (Mad2) jsou tak stále přítomny na kinetochorech[105].

p53, H3

Jak overexprese[105-106], tak inhibice Aurory A [1] měly zároveň za následek zvýšené procento apoptózy v postižených buněčných kulturách a vedly ke zvýšení exprese p53, frekvence apoptózy takových buněk pak byla redukována delecí p53.[106-107]

Navíc hraje Aurora A roli i v kondenzaci chromosomů, když vystupuje jako jedna z kináz fosforylujících histon H3 na Ser10, [108] fosforyluje CENP-A (variantu histonu 3) a umožňuje tak pozdější fosforylaci Aurorou B a vazbu kinetochorových proteinů na centromeru.[109]

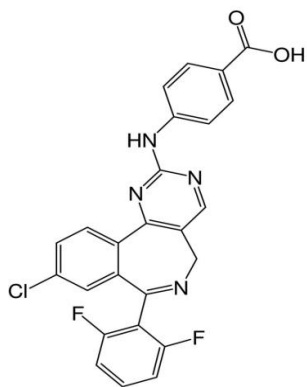
Aurora A a Plk1

Zajímavá je role Aurory A ve vztahu k Plk1 a vlastně i naopak, vztah Plk1 k Aurorě A. Na začátku jejich interakce ale stojí zřejmě Cdk1, ta fosforyluje malou molekulu s názvem Bora[99], Bora působí jako koaktivátor Polo-like kinázy 1, na kterou se váže jednak ve své nefosforylované formě [101], lépe tak ale činí právě po zákroku Cdk1. [99] Bora se tedy naváže na Plk1 a odhalí tak aktivační smyčku kinázy [101], která mimo jiné obsahuje také Thr210 určený k fosforylaci Aurorou A[101]. Aurora A tedy s pomocí Bory aktivuje Plk1 a Plk1 se vzápětí vlastně obrátí sama proti sobě, fosforyluje totiž Bora a směřuje ji tak k degradaci [99]. Co se ovšem stane, když tady Plk1 není? V buňkách s depletovanou Plk1 dochází přirozeně k hromadění Bory [99] a Aurora A se v odpověď oddělí od pólů vřetenka, dochází dokonce k nesprávné maturaci centrozomů. Vypadá to tedy, že Bora soupeří s TPX2 o vazbu Aurory A a

zvýšené množství Bory tak vede k defektům spojeným s funkcí Aurory A závislých na právě vazbě kinázy k TPX2.[99]

Inaktivace

Aurora A může být inaktivována působením PP1,[110] která je ovšem inhibována fosforylací katalyzovanou cyklin-dependentní kinázou 1. [83] Dalším faktorem způsobujícím inaktivaci, resp. degradaci Aurory A je její ubiquitinylace v pozdní anafázi zprostředkovaná APC/C, která Auroru A určuje k degradaci.[111] Na aktivaci APC/C se v této fázi buněčného cyklu podílí i Plk1[112]. Neméně důležitým inhibítorem Aurory A, minimálně v případě *Xenopa*, je p53, tumor supresorový protein často neaktivní v nádorových buňkách. p53 se váže na katalytickou podjednotku Aurory A a tak ji inhibuje, tuto interakci narušuje aktivátor Aurory A – TPX2[94].



Obrázek 11 MLN8054 [1]

poskytl úrodnou půdu pro testování řady látek s potenciálem inhibovat vysokou aktivitu Aurory A v rakoviných buňkách. Jednou z těchto látek, která už v poměrně nízkých dávkách dokáže Auroru A inhibovat je molekula s názvem MLN8054, která má tu výhodu, že nevykazuje inhibiční vliv na příbuzné kinázy a ovlivňuje pouze kinázovou aktivitu Aurory A[1]. Tato inhibice vede k závažnému fenotypovému projevu. Buňka ošetřená MLN8054 vykazuje defekty v morfologii dělicího vřeténka až v 95% případů, objevují se monopolární i polypolární vřeténka. I takto postižené buňky jsou ale často schopny se dělit, i když doba mitózy je u nich vůči kontrole signifikantně prodloužena a dochází také k defektům v segregaci chromosomů, které vedou k aneuploidii a smrti buněk v následujících generacích. [3] Nejnovější výzkum inhibice aktivity Aurory A se soustředil na další z řady MLN inhibitorů, tentokrát MLN8237, jehož účinky byly testovány na buňkách mnohočetného myelomu[113] a T-buňkách infikovaných HTLV-1 virem.[114] U buněk mnohočetného myelomu bylo po ošetření MLN8237

Rakovinné buňky

Jako pozitivní regulátor buněčného dělení bývá AURKA často overexprimována v rakoviných buňkách, její přítomnost byla testována mimo jiné na buňkách HeLa, které vykazovaly nejvyšší expresi Aurory A ze studovaných lidských buněk.[79] A právě výzkum rakoviny, jakožto téma stojící v popředí zájmu společnosti,



Obrázek 12 Henrietta Lacks HeLa buňky byly v roce 1951 izolovány z nádoru děložního hrdla Henrietty Lacksové, která bohužel téhož roku své nemoci podlehla.

inhibitorem zjištěno snížení aktivační fosforylace Aurory A na T288 a to bez efektu na činnost Aurory B. MLN8237 inhiboval buněčný růst a proliferaci, buňky vykazovaly abnormality ve stavbě dělicího vřeténka a to vše pak ve zvýšené míře vedlo až k apoptóze a smrti buněk. Oba Aurora A inhibitory se momentálně nachází v různých fázích klinických studií.[115-117]

AURKA v oocytech

Aurora A se zdá být dominantní isoformou Aurora kináz v savčích oocytech.[118-119] Její lokalizace a kvantita se během meiotického dělení přirozeně mění v návaznosti na postup procesu. Přehlednost situace kolem AURKA v oocytech je ale komplikována poměrně malým počtem prací na toto téma.

Exprese a lokalizace

Například poněkud nejasná je otázka míry exprese Aurory A během zrání oocyty. Její hladina je jednak definována jako nejvyšší během GV stádia a MII fáze s nižší, ale konstantní úrovní mezi těmito dvěma krajními časovými body.[120] Zatímco jiná studie udává odlišné výsledky reprezentované naopak nejnižší hladinou AURKA během GV a jejím navýšením během GVBD s následným udržením této koncentrace na přibližně stejné úrovni až do MII [2]- vzniklý rozpor vysvětlují autoři použitím odlišných protilátek.[2] Mění se lokalizace AURKA během zrání oocyty přináší také určité nesrovnalosti, opět můžeme porovnat výsledky již výše citovaných studií. V GV oocyty je shodně lokalizace Aurora A definována jako difúzní po celé buňce ovšem s akumulací buď v jádře [120], nebo na MTOC[2], což by snad lépe korespondovalo s výsledky ze somatických buněk. (např.[88]) Po GVBD panuje už co do měnicího se umístění kinázy poněkud větší shoda, AURKA, zřejmě už ve své aktivní formě [2], se nachází v okolí kondensovaného chromatinu [2, 120], navázána na MTOCs. [2] Později je pak kináza k nalezení na pólech dělicího vřeténka a to až do ukončení anafáze I. [2, 120]

Buněčný cyklus

Znovuzahájení meiózy

AURKA je aktivována fosforylací na T288 poprvé těsně před GVBD na mikrotubuly-organizujících centrech[2]. V předchozích kapitolách jsme se zabývali mimo jiné otázkou, co se stane, když v mitotických buňkách inhibujeme Auroru A, jaký bude tato inhibice mít vliv na buněčné dělení, jak ovlivní rozpad jaderné membrány, kondenzaci chromosomů a tak dále. Stejně otázky si musíme položit i pro případ meiózy, nebo momentálně pro případ savčích, resp. myších, oocytů. Takže co se stane, když zainhibujeme Auroru A v myších oocytech? Odpovědí se nabízí opět několik. Jedna například přichází s tvrzením, že použití dlouhé *Aurka* dsRNA má za následek snížení frekvence GVBD[2], podobně inhibice AURKA pomocí

protilátky vede v daných časových intervalech ke snížení procenta buněk po GVBD oproti kontrole[120]. Takže odpovědí na položené otázky by mohlo být, že na rozdíl od situace v somatických buňkách, podílí se Aurora A v oocytech na znovuzahájení meiózy do té míry, že její inhibice vede u některých buněk k jejímu zablokování. Jedna recentní práce na myších oocytech ale toto tvrzení nepotvrzuje a říká, že podíl buněk, které podstoupily GVBD se ve sledovaném čase (po dvou hodinách od odmytí IBMX (udržení MI bloku)) oproti kontrole prakticky nelišil[121]. Podobně jako na oocytech myši byly i na dalším oblíbeném modelu obratlovčí meiózy, oocytech Xenopa, zkoumány vlivy RNA interference Aurory A na průběh dělení. Vliv inhibice Aurory A na GVBD byl v tomto případě shledán v podstatě zanedbatelným, jelikož jak kontrolní, tak ošetřené oocyty vykazovaly v zásadě stejnou kinetiku GVBD i aktivace Cdk1/cyklinu B[122]. Takže tu máme výsledky, které říkají, že inhibice Aurory A vede ke snížení podílu oocytů schopných podstoupit GVBD a na druhé straně výsledky, které ukazují pravý opak a odpírají Aurory A jakýkoli vliv na znovuzahájení meiózy oocytů. Autor [121] tento zřejmý rozpor vysvětluje nedostatečnou specifičností použité dsRNA[2] či protilátky [120], což mohlo vést k fenoménům, které se po inhibici samotné Aurory A neobjevují[121]. Pokud se tedy budeme ptát, kde je pravda, objektivního výsledku se vzhledem k malému počtu prací dopátráme jen stěží. Můžeme si ale vzít na pomoc výsledky ze somatických buněk – ty vesměs tvrdí, že Aurora A určitou roli ve vstupu do mitózy hraje, jelikož inhibice AURKA vede k jeho oddálení[1, 83, 100-101, 103]. Pro vstup buněk do mitózy je tedy Aurora A důležitá, zřejmě ale ne natolik, aby její inhibice tento vstup zablokovala. Pokud se znovu podíváme pouze na výsledky ze savčích oocytů a uznáme argument o nedostatečné specifičnosti použitých technik ve dvou starších pracích, můžeme podrobit kritickému zkoumání ještě práci poslední[121], oocyty po inhibici Aurory A tu byly sledovány až po dvou hodinách od odmytí IBMX. Otázkou je, zda může takový postup odhalit případné zpoždění GVBD, které nemusí být v případě inhibice Aurory A až tak velké. Zpoždění rozpadu jaderné membrány v somatických buňkách se po inhibici AURKA pohybovalo mezi cca sedmi minutami [103] přes 20-30 minut [100] až po 1-2 hodiny [83]. Pokud by se tedy zpoždění GVBD v myších oocytech drželo po AURKA inhibici na nižších hodnotách srovnatelných se zpožděním zjištěným v somatických buňkách (7-30 min), kontrola oocytů po 120 min by je nejspíš nezaznamenala a tak nejspíš nezbyvá než počkat s odpovědí na to, co napoví další studie. O roli Aurory A ve znovuzahájení meiózy může vypovídat nejen inhibice kinázy, ale i její overexprese. Například mikroinjikace mRNA pro Auroru A do oocytů Xenopa způsobila urychlení nástupu GVBD, ovšem až po stimulaci oocytu progesteronem, samotná zvýšená exprese AURKA k aktivaci MPF nebo k rozpadu jaderné membrány nevedla [123]. Toto pozorování bylo potvrzeno i na myších oocytech inhibovaných (blokových) v GV stádiu vysokou hladinou cAMP (pomocí IBMX), kde overexprese AURKA

(mikroinjekce *Aurka* mRNA) k překonání meiotického bloku rovněž nestačila[2]. Odlišné výsledky ale předkládá jiná práce na oocytech *Xenopa*, ve které zavedení Myr-Aurora A (konstitutivně aktivní kinázy vázané na cytoplasmatickou membránu) do oocyty, který nebyl jinak nijak stimulován, k GVBD vedlo[124]. Vysvětlením by tomto případě mohla být nefyziologická lokalizace kinázy[2].

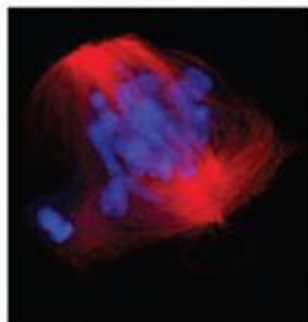
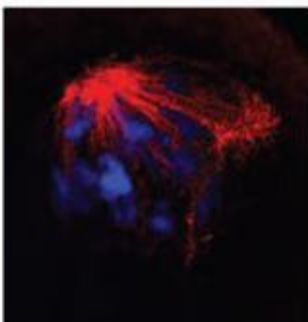
CPEB

Jiné studie Aurory A na oocytech *Xenopa* vedly k vyslovení hypotézy o další roli Aurory A při znovuzahájení meiózy.[123] Tato dříve obecně přijímaná teze staví Auroru A do role kinázy, která fosforylaci CPEB, který hraje zásadní roli v kontrole polyadenylace mRNA a tím expresi příslušných proteinů v oocyty, přispívá k iniciaci translace MOS a MAPK a touto cestou k aktivaci Cdk1. (shrnuto v review [125-126]) Pozdější práce ale přichází s odlišnými vysvětleními způsobů translace maternálních mRNA v rané fázi zrání oocyty a roli Aurory A a potažmo i samotného CPEB[127] v těchto procesech. Tuto roli Aurory A zpochybňují jednak tvrzením, že se jim nepodařilo nalézt aktivní Auroru A v tak časných fázích meiózy, aby se mohla podílet na aktivaci CPEB před GVBD [2, 128] a navíc inhibice Aurora kináz ZM inhibítorem nemá za následek snížení fosforylace CPEB.[128]

Přechod do MII

I když role Aurory A ve znovuzahájení meiózy není zrovna jasná (není totiž zcela jasné ani to, co se vlastně stane po její inhibici), autoři se v zásadě shodnou na dopadu inhibice AURKA na následující procesy. Například, jak uvidíme dále, manipulace s přirozenou hladinou Aurory A vedou obvykle k nepřirozeně zvýšené míře defektů ve výstavbě dělicího vřeténka. [2, 120-121] A zřejmě právě tyto defekty často znemožňují oocyty s ihibovanou Aurorou A vydělit první pólové tělísko a pokročit tak do MII. [2, 120-122]

Dělicí vřeténko



Obrázek 13 Dělicí vřeténko po RNAi Aurory A [2]

RNAi Aurory A v myších oocytech vede ve zvýšení míře k nesprávné lokalizaci MTOC a k tvorbě abnormálního dělicího vřeténka s chromosomy špatně srovnanými v metafázní rovině, to všechno dohromady na rozdíl od občasných jednotlivých defektů v kontrolních buňkách. [121] Inhibice

AURKA pomocí protilátek má podobný efekt, kdy vznikají dělicí vřeténka s rozmanitými abnormalitami od vřetének bez pólů po spindly sice se dvěma, ale zato nepřirozeně

rozšířenými póly. [120] Jak inhibice, tak i příliš vysoká exprese AURKA vede k defektům ve výstavbě dělicího vřeténka. V oocytech s overexprimovanou Aurorou A se tvoří nadbytečná MTOC a to i přes inhibici „hlavní kinázy“ Cdk1, z čehož by se dalo soudit, že sama Aurora A je zodpovědná za amplifikaci MTOC a alespoň tato její aktivita není závislá na aktivaci MPF.[2] Ovšem i pokud Cdk1 inhibována není, způsobuje overexprese AURKA tvorbu podivných dělicích vřetének, která se mohou táhnout až od jednoho konce buňky k druhému, což značně komplikuje oocytu jeho další vývoj.[2]

Polo-like kinázy

Polo-like kinázy patří do rodiny serin/treonin kináz regulujících buněčný cyklus eukaryot. Polo-mutace byla poprvé studována na *Drosophila* v roce 1988 jako embryonálně letální, příp. částečně embryonálně letální. Mutanti v lokusu pro *polo* vykazují problémy v buněčném dělení a disponují obvykle jen abnormálními dělicími vřeténky[129]. U člověka byla Plk kináza příbuzná Polo *Drosophily* identifikována v roce 1993[130]. U savců bylo prozatím identifikováno pět členů Plk-rodiny, označených jednoduše jako Plk₁ – Plk₅.

Struktura

Polo-like kinázy se vyznačují přítomností katalytické domény na N-konci a tzv. PBD (Polo-box domain) na C-konci molekuly. Polo-box doména určuje lokalizaci kinázy a tím zajišťuje i její správnou funkci [131] a zvyšuje účinnost katalytické domény, zřejmě změnou konformace molekuly a uvolněním inhibičních interakcí[132]. Aby se PBD vážala na určený substrát, vyžaduje tzv. „priming fosforylaci“ (pThr/pSer) [132-133], čili předchozí fosforylaci příslušných aminokyselinových zbytků na cílové molekule, kterou může zajišťovat například Cdk₁[132], ale i sama Plk [134].

Plk1 v mitóze

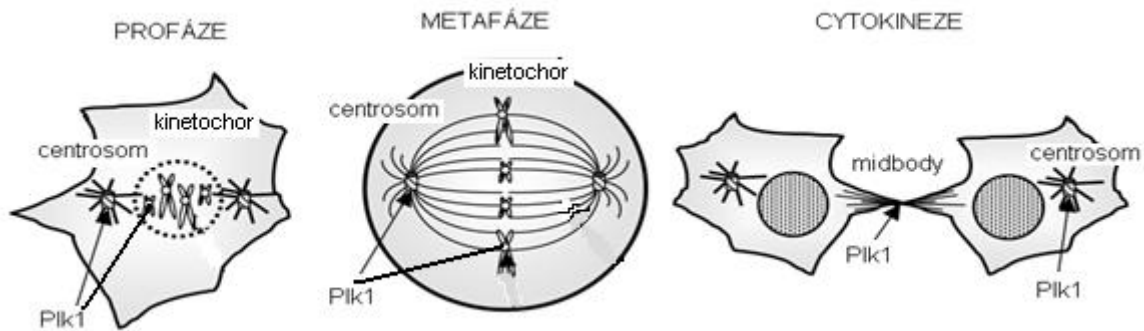
Polo-like kináza 1 je bezesporu nejprostudovanější kinázou z Plk-rodiny. Je exprimována v proliferujících buňkách, v dospělém organismu např. v buňkách placenty nebo tlustého střeva, stejně tak ovšem v buňkách nádorových[135]. Hraje důležitou roli při regulaci průběhu mitózy fosforylací celé řady mitotických proteinů[136].

Aktivace

Jak již bylo výše zmíněno, aktivace Plk₁ je závislá na aktivitě Aurory A a vazbě kofaktoru Bora, který se hromadí během G₂ fáze buněčného cyklu[101]. Na pomezí G₂/M [101] se pak Bora váže na neaktivní Plk₁ a interaguje s Plk₁-kinázovou doménou i PBD, tato interakce zřejmě vede k zpřístupnění klíčového Thr₂₁₀, který může být následně fosforylován Aurorou A[137]. Bora je do určité míry schopna vázat se na Plk₁ nefosforylovaná[101], činí tak ale s vyšší účinností po fosforylaci Cdk₁ kinázou[99].

Lokalizace

Během mitózy je Plk₁ detekovatelná na centrozomech a kinetochorech [137-138], její lokalizace zde závisí bezprostředně na její aktivitě, důkazem budiž oddělení Plk₁ od zmíněných struktur po inhibici kinázy[139]. Později během anafáze se pak Plk₁ koncentruje na pólech dělicího vřeténka a midbody [137-138].



Obrázek 14 lokalizace Plk1 během mitózy (převzato a upraveno z [86])

Buněčný cyklus

Zásadní pro vstup buňky do mitózy je transport aktivního cyklinB/Cdk1 do jádra [140-141], tento transport je zřejmě zajišťován fosforylací cyklinu B[142], v souvislosti s čímž byla vyslovena hypotéza, že onou zodpovědnou kinázou podbíjecí se na tomto transportu by mohla být i Plk1[143-144]. Pozdější studie ale jakoukoli roli Plk1 v řízení přesunu cyklinu B do jádra zpochybnily, jelikož ani overexprese Plk1[45], ani inhibice kinázy BI2536 inhibitorem[139], neměly na lokalizaci cyklinu B v buňce žádný vliv. Naopak mezi molekuly, jež inhibicí Plk1 postiženy jsou, patří například Wee1 kináza přímo inhibující Cdk1. Wee1 je během mitózy nejprve fosforylována právě svým substrátem Cdk1 a až následně Plk1, které tak vytvoří tzv. phosphodegron, na který se váže F-box protein β -TrCP – součást SCF E3 ubiquitin ligázy a nasměruje tím Wee1 k degradaci v proteasomu[145-146]. Jiným substrátem Plk1 je další negativní regulátor MPF, Myt1 kináza, její aktivita je též inhibována působením Plk1[147], resp. Plk1 v případě Xenopa[148]. Plk1 se na aktivaci Cdk1 podílí dále i působením na aktivátory MPF, jako je třeba CDC25B fosfatáza, jejíž přesun do jádra (po stopách Cdk1) Plk1 indukuje.[149] Inhibice Plk1 dokonce zmírňuje dopady overexprese CDC25B na buněčné dělení, respektive oddaluje příliš brzký nástup mitózy v takovýchto buňkách. [149] Během profáze se také Plk1 stará o lokalizaci CDC25C fosfatázy, další MPF-aktivační molekuly, když fosforyluje a tak blokuje její jadernou exportní sekvenci. [144] Dále na rozhraní G2/M Plk1 fosforyluje transkripční faktor FoxM1 (Forkhead Box M1), který ve své aktivní formě zajišťuje expresi důležitých mitotických proteinů, včetně samotné Plk1.[81] Jak vidno, podílí se Plk1 na aktivaci řady molekul se zásadním významem pro úspěšný vstup buňky do mitózy, i přesto ale nevede její inhibice k zablokování G2/M přechodu.[88, 139] Je tu ovšem jistý efekt, který inhibice Plk1 na zahájení mitózy vykazuje a to je oddálení rozpadu jaderné membrány neboli NEBD. V buňkách s Plk1 inhibovanou pomocí BI2536 následuje rozpad jaderné membrány po

kondenzaci chromosomů o mnoho později, než je tomu u kontrolních buněk. [139] Naopak na aktivaci Cdk1 nemá inhibice Plk1 vliv.[88] Připomeňme si, že ani inhibice Aurora A kinázy nevedla k pozorování zpoždění v aktivaci Cdk1[88], co už ale na načasování aktivace MPF vliv mělo, byla inhibice obou kináz, tedy inhibice Aurory A a Plk1 zároveň. [88] Tato zjištění by hovořila pro jistou, alespoň částečnou zastupitelnost Plk1 a Aurora A kináz právě při iniciální aktivaci Cdk1 a tím i vstupu do mitózy. [88] Ovšem zcela neopomenutelným a pro další existenci buňky zásadním důsledkem inhibice Plk1 je aktivace SAC a zastavení buněčného cyklu během mitózy následované obvykle smrtí buňky apoptózou.[88, 150]

Checkpoint recovery

Ačkoli pro normální, nenarušený vstup buňky do mitózy není Plk1 klíčovým proteinem[88, 139], restartování buněčného cyklu po opravě poškození DNA na aktivitě Plk1 kinázy závisí[137], její inhibice blokuje checkpoint recovery.[137] Tento efekt zřejmě souvisí s přítomností či nepřítomností inhibičních fosfátů na Cdk1, jelikož buňky, které po poškození DNA za inhibice Plk1 kinázy nebyly schopny obnovit buněčný cyklus, tuto schopnost opět získávají po inhibici Wee1 kinázy. Podobně Aurora A, kináza aktivující Plk1, je pro znovunastartování buněčného cyklu po DNA poškození důležitá, i když má na checkpoint recovery poněkud menší vliv a její inhibice vede pouze ke snížení počtu buněk schopných opět spustit buněčný cyklus.[137]

Degradace mitotických proteinů

Na počátku anafáze přispívají Plk1 společně s MPF k aktivaci APC/C[151]. Cdk1 fosforyluje inhibitor cyklosomu Emi1[152], který je posléze fosforylován také Plk1, aby se na Emi1 mohl navázat betaTrCP a nasměrovat tak inhibitor k degradaci na proteasomu.[76] Plk1 také fosforyluje Cdc14A, který zase defosforyluje Cdh1 – aktivátor APC/C[112], na rozdíl od aktivace Cdh1 ale Plk1 přispívá naopak k degradaci Cdc20.[112] Důkaz o významu Plk1 pro aktivaci APC/C a pro degradaci některých mitotických proteinů přináší také mimo jiné zjištění, že deplece Plk1 pomocí RNAi vede ke zvýšené aktivitě Cdk1, je totiž zpomalena degradace cyklinu B, čímž se brzdí i postup mitózou. [100] Navíc v buňkách s depletovanou Plk1 vážně i degradace securinu a tím pádem se vyskytují potíže v segregaci chromosomů.[150] Aktivace APC/C s pomocí Plk1 během M-fáze není ale důležitá jen pro destrukci cyklinu B, či securinu [55], buňky s depletovanou Plk1 vykazovaly na konci mitózy například také zvýšenou hladinu Aurory A.[112] Plk1 také zodpovídá za fosforylaci cohesinu jako prvního kroku k separaci sesterských chromatid, konkrétně deplece Plk1 vedla k značné redukci až úplnému zabránění disociace cohesinu z chromatinu. [153]

Centrosomy

Plk1 se do značné míry podílí na maturaci centrozomů a tvorbě dělicího vřeténka. Vlivem její inhibice dochází ke zmenšení velikosti centrozomů způsobené například nedostatkem navázaného γ -tubulinu. [150, 154] Dělicí vřeténka v buňkách s depletovanou Plk1 pak nejsou asociována s centrosomy a nemají „zaostřené“ póly, případně se v takovýchto buňkách tvoří monopolární spindly [139, 150], vřeténka navíc nedisponují astrálními mikrotubuly[139]. Stejně tak přidáním BI2536 inhibitoru k buňkám, kde už je normální dělicí vřeténko vytvořeno, vedlo k jeho rozpadu[139]. Jednou z možností vysvětlující takovýto dopad inhibice Plk1 na strukturu dělicího vřeténka je její vliv na Bora, která funguje mimo jiné jako aktivátor Aurory A. [91]V buňkách bez aktivní Plk1 totiž není Bora správně a dostatečně degradována a její vysoká hladina pak vede k defektům v aktivitě a lokalizaci AURKA[99], kinázy mající nepopiratelný vliv na výstavbu dělicího vřeténka.

Plk1 v oocytech

První a zásadní informací o Plk1 v oocytech je, že Plk1 je tu skutečně přítomna a to ať už se bavíme o myších oocytech [155-157], o oocytech Xenopa[158] nebo dokonce o oocytech mořské hvězdice *Asterina pectinifera*. [159]

Exprese a lokalizace

Studie zabývající se mírou exprese, aktivitou či lokalizací Polo-like kinázy 1 během meiózy oocyty vyprodukovaly vzácně konzistentní výsledky a to dokonce napříč živočišnými druhy. Došly například k závěru, že exprese Plk1 se během meiotického zrání oocyty výrazně nemění. [156-157] Její aktivní fosforylovaná[160] forma se objevuje těsně před GVBD a během GVBD také dosahuje svého vrcholu, ani během MI/MII přechodu pak v zásadě nekolísá[156] a svou hladinu si udržuje až do oplození, kdy exprese Plk1 prudce klesá a to jak v myších oocytech[157] tak i u hvězdice [159]. V GV oocyty je Plk1 difuzně rozprostřena v cytoplasmě i v jádře, [155-157] po GVBD se pak soustředí v okolí kondenzovaných chromosomů[157]. V metafázi se Plk1 kondenzuje na pólech dělicího vřeténka[155-157] a od anafáze až do telofáze je lokalizovaná v rovině budoucího dělení buňky.[155-157]

Aktivace

Zdá se, že aktivace Plk1 v oocytech závisí na aktivitě Cdk1, jelikož v buňkách s inhibovaným MPF se Plk1 neaktivuje, což bylo pozorováno jak na myších oocytech[156], tak na oocytech hvězdice. [159]

Buněčný cyklus a dělicí vřeténko

Použití Plk₁ protilátek způsobilo v myších oocytech snížení počtu buněk podstoupivších GVBD, buňky navíc vykazovaly abnormality ve výstavbě dělicího vřeténka, vznikaly monopolární spindly i oocyty bez vřetének [157]. Podobný fenotyp byl pak pozorován i u hvězdice, i když v tomto případě měla inhibice Plk₁ jen nepatrný vliv na GVBD spočívající v malém zpoždění rozpadu jaderné membrány.[159] V oocytech Xenopa pak byla měřena aktivita Cdk₁/cyklinu B a CDC25C fosfatázy po inhibici Plx₁ specifickou protilátkou, takto ošetřené oocyty vykazovaly signifikantní zpoždění v aktivaci obou sledovaných molekul. [160] Dopad inhibice Plx₁ na aktivaci MPF v těchto oocytech byl zvrácen overexpresí CDC25C, navíc overexprese Plx₁ urychlila jak aktivaci CDC25C tak MPF. [160] Inhibice Plk₁ měla zásadní dopad na průběh druhého meiotického cyklu oocytů mořské hvězdice, během kterého se nereaktivoval MPF, zřejmě vlivem přítomnosti inhibičního fosfátu na Cdk₁ dosazeným Myt₁ kinázou, která není v oocytech s depletovanou Plk₁ inhibována. [159] Dalším postřehem k roli Plk₁ ve výstavbě spindlů v oocytu Plk₁ byla studie ukazující na kolokalizaci Plk₁ s MEK_{1/2}[161], regulátory organizace mikrotubulů do dělicích vřetének [162] přičemž byla autory předestřena možnost, že právě Plk₁ MEK_{1/2} svou aktivitou ovlivňuje.[161] Plk₁ se také zřejmě podílí na výstupu oocytu z meiózy. V další práci na oocytech Xenopa bylo poukázáno na roli Plx₁ ve vztahu k Emiz, ten je po oplození oocytu vyvolávajícím kalciovou vlnu fosoforylován Ca²⁺-dependentní kinázou CaMKII a navázaný fosfát pak umožňuje fosforylaci Emiz Plx₁ kinázou, která vede k navázání betaTrCP, tím k degradaci Emiz a oocyt záhy opouští meiózu. [163]

Na tomto místě není snad na škodu poznamenat, že výsledků naznačujících zásadní roli Plk₁ ve vstupu do M-fáze, a její nepostradatelnost v tomto bodě buněčného cyklu, bylo dosaženo i na mitotických buňkách[45, 143-144], jiné studie ale zase tato zjištění nepotvrdily. Role Plk₁ v zahájení mitózy tak byla časem odsunuta do pozadí a byl jí přisouzen jen jistý vliv na načasování NEBD.[88, 139] Tyto výsledky samozřejmě není možné vztahovat beze zbytku i na meiotické buňky, úloha Plk₁ v meióze se od její úlohy v mitotickém cyklu může značně lišit, přesto, zvláště vzhledem k mírné nekonzistenci citovaných prací a faktu, že si v některých aspektech odporují, je s výhodou otázku role Plk₁ v meióze předčasně neuzavírat.

Závěr

Poznání a pochopení principů buněčného cyklu je důležitým nástrojem v boji s mnoha lidskými chorobami. Kromě určení mechanismu vzniku zhoubného rakovinného bujení, pomáhá například právě výzkum zrání oocytů k popsání příčin neplodnosti. A rozpoznání příčin jde ruku v ruce a je jen předzvěstí k určení správné léčby.

Aurora A a Plki hrají nepochybně své role v regulaci mitotického i meiotického dělení. Tyto dvě kinázy fungují pravděpodobně na bázi blízké spolupráce, vzájemně se mohou aktivovat i inhibovat, částečně se doplňovat a zastupovat. A snad už jen z lidské přirozenosti, z vrozeného zájmu člověka, jako vysoce sociálně založené bytosti, o vztahy všeho druhu, dočkáme se jednou i hlubšího pochopení vztahů uvnitř regulační sítě buněčného cyklu.

1. Manfredi, M.G., et al., *Antitumor activity of MLN8054, an orally active small-molecule inhibitor of Aurora A kinase*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2007. **104**(10): p. 4106-11.
2. Saskova, A., et al., *Aurora kinase A controls meiosis I progression in mouse oocytes*. Cell Cycle, 2008. **7**(15): p. 2368-76.
3. Hoar, K., et al., *MLN8054, a small-molecule inhibitor of Aurora A, causes spindle pole and chromosome congression defects leading to aneuploidy*. Mol Cell Biol, 2007. **27**(12): p. 4513-25.
4. Malumbres, M. and M. Barbacid, *To cycle or not to cycle: a critical decision in cancer*. Nat Rev Cancer, 2001. **1**(3): p. 222-31.
5. Alberts, B.e.a., *Molecular biology of the cell*. 2008: Garland Science.
6. Brunet, S. and M.H. Verlhac, *Positioning to get out of meiosis: the asymmetry of division*. Hum Reprod Update, 2011. **17**(1): p. 68-75.
7. Brunet, S. and B. Maro, *Cytoskeleton and cell cycle control during meiotic maturation of the mouse oocyte: integrating time and space*. Reproduction, 2005. **130**(6): p. 801-11.
8. Cheetham, G.M., et al., *Crystal structure of aurora-2, an oncogenic serine/threonine kinase*. J Biol Chem, 2002. **277**(45): p. 42419-22.
9. Malumbres, M. and M. Barbacid, *Mammalian cyclin-dependent kinases*. Trends Biochem Sci, 2005. **30**(11): p. 630-41.
10. Lolli, G. and L.N. Johnson, *CAK-Cyclin-dependent Activating Kinase: a key kinase in cell cycle control and a target for drugs?* Cell Cycle, 2005. **4**(4): p. 572-7.
11. Nigg, E.A., *Mitotic kinases as regulators of cell division and its checkpoints*. Nat Rev Mol Cell Biol, 2001. **2**(1): p. 21-32.
12. Doonan, J.H. and G. Kitsios, *Functional evolution of cyclin-dependent kinases*. Mol Biotechnol, 2009. **42**(1): p. 14-29.
13. Besson, A., S.F. Dowdy, and J.M. Roberts, *CDK inhibitors: cell cycle regulators and beyond*. Dev Cell, 2008. **14**(2): p. 159-69.
14. Lindqvist, A., V. Rodriguez-Bravo, and R.H. Medema, *The decision to enter mitosis: feedback and redundancy in the mitotic entry network*. J Cell Biol, 2009. **185**(2): p. 193-202.
15. Green, S.H. and S. Zuckerman, *The number of oocytes in the mature rhesus monkey (Macaca mulatta)*. J Endocrinol, 1951. **7**(2): p. 194-202.
16. Mandl, A.M. and S. Zuckerman, *The relation of age to numbers of oocytes*. J Endocrinol, 1951. **7**(2): p. 190-3.
17. Johnson, J., et al., *Oocyte generation in adult mammalian ovaries by putative germ cells in bone marrow and peripheral blood*. Cell, 2005. **122**(2): p. 303-15.
18. Eppig, J.J., *Oocyte control of ovarian follicular development and function in mammals*. Reproduction, 2001. **122**(6): p. 829-38.
19. Rodrigues, P., et al., *Oogenesis: Prospects and challenges for the future*. J Cell Physiol, 2008. **216**(2): p. 355-65.
20. Skinner, M.K., *Regulation of primordial follicle assembly and development*. Hum Reprod Update, 2005. **11**(5): p. 461-71.
21. Matzuk, M.M. and D.J. Lamb, *Genetic dissection of mammalian fertility pathways*. Nat Cell Biol, 2002. **4 Suppl**: p. s41-9.
22. Dekel, N. and W.H. Beers, *Rat oocyte maturation in vitro: relief of cyclic AMP inhibition by gonadotropins*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1978. **75**(9): p. 4369-73.
23. Cho, W.K., S. Stern, and J.D. Biggers, *Inhibitory effect of dibutyryl cAMP on mouse oocyte maturation in vitro*. J Exp Zool, 1974. **187**(3): p. 383-6.
24. Horner, K., et al., *Rodent oocytes express an active adenylyl cyclase required for meiotic arrest*. Dev Biol, 2003. **258**(2): p. 385-96.
25. Vaccari, S., et al., *Generation of mouse oocytes defective in cAMP synthesis and degradation: endogenous cyclic AMP is essential for meiotic arrest*. Dev Biol, 2008. **316**(1): p. 124-34.

26. DiLuigi, A., et al., *Meiotic arrest in human oocytes is maintained by a Gs signaling pathway*. Biol Reprod, 2008. **78**(4): p. 667-72.
27. Hinckley, M., et al., *The G-protein-coupled receptors GPR3 and GPR12 are involved in cAMP signaling and maintenance of meiotic arrest in rodent oocytes*. Dev Biol, 2005. **287**(2): p. 249-61.
28. Pincus, G. and E.V. Enzmann, *The Comparative Behavior of Mammalian Eggs in Vivo and in Vitro : I. The Activation of Ovarian Eggs*. J Exp Med, 1935. **62**(5): p. 665-75.
29. Zhang, M., et al., *Granulosa cell ligand NPPC and its receptor NPR2 maintain meiotic arrest in mouse oocytes*. Science, 2010. **330**(6002): p. 366-9.
30. Vaccari, S., et al., *Cyclic GMP signaling is involved in the luteinizing hormone-dependent meiotic maturation of mouse oocytes*. Biol Reprod, 2009. **81**(3): p. 595-604.
31. Duckworth, B.C., J.S. Weaver, and J.V. Ruderman, *G2 arrest in Xenopus oocytes depends on phosphorylation of cdc25 by protein kinase A*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2002. **99**(26): p. 16794-9.
32. Han, S.J., et al., *Protein kinase B/Akt phosphorylation of PDE3A and its role in mammalian oocyte maturation*. EMBO J, 2006. **25**(24): p. 5716-25.
33. Newhall, K.J., et al., *Dynamic anchoring of PKA is essential during oocyte maturation*. Curr Biol, 2006. **16**(3): p. 321-7.
34. Han, S.J., et al., *Wee1B is an oocyte-specific kinase involved in the control of meiotic arrest in the mouse*. Curr Biol, 2005. **15**(18): p. 1670-6.
35. Oh, J.S., S.J. Han, and M. Conti, *Wee1B, Myt1, and Cdc25 function in distinct compartments of the mouse oocyte to control meiotic resumption*. J Cell Biol, 2010. **188**(2): p. 199-207.
36. Pirino, G., M.P. Wescott, and P.J. Donovan, *Protein kinase A regulates resumption of meiosis by phosphorylation of Cdc25B in mammalian oocytes*. Cell Cycle, 2009. **8**(4): p. 665-70.
37. Reis, A., et al., *APC^{Cdh1} activity in mouse oocytes prevents entry into the first meiotic division*. Nat Cell Biol, 2006. **8**(5): p. 539-40.
38. Schindler, K. and R.M. Schultz, *CDC14B acts through FZR1 (CDH1) to prevent meiotic maturation of mouse oocytes*. Biol Reprod, 2009. **80**(4): p. 795-803.
39. Ayalon, D., et al., *Serum gonadotrophin levels in pro-oestrous rats in relation to the resumption of meiosis by the oocytes*. J Reprod Fertil, 1972. **31**(1): p. 51-8.
40. Schultz, R.M., R.R. Montgomery, and J.R. Belanoff, *Regulation of mouse oocyte meiotic maturation: implication of a decrease in oocyte cAMP and protein dephosphorylation in commitment to resume meiosis*. Dev Biol, 1983. **97**(2): p. 264-73.
41. Amsterdam, A., et al., *Distribution of binding sites for human chorionic gonadotropin in the preovulatory follicle of the rat*. J Cell Biol, 1975. **67**(3): p. 894-900.
42. Ashkenazi, H., et al., *Epidermal growth factor family members: endogenous mediators of the ovulatory response*. Endocrinology, 2005. **146**(1): p. 77-84.
43. Kalous, J., et al., *PKB/AKT is involved in resumption of meiosis in mouse oocytes*. Biol Cell, 2006. **98**(2): p. 111-23.
44. Solc, P., et al., *CDC25A phosphatase controls meiosis I progression in mouse oocytes*. Dev Biol, 2008. **317**(1): p. 260-9.
45. Jackman, M., et al., *Active cyclin B1-Cdk1 first appears on centrosomes in prophase*. Nat Cell Biol, 2003. **5**(2): p. 143-8.
46. Dutertre, S., et al., *Phosphorylation of CDC25B by Aurora-A at the centrosome contributes to the G2-M transition*. J Cell Sci, 2004. **117**(Pt 12): p. 2523-31.
47. Lincoln, A.J., et al., *Cdc25b phosphatase is required for resumption of meiosis during oocyte maturation*. Nat Genet, 2002. **30**(4): p. 446-9.
48. Lenart, P., et al., *Nuclear envelope breakdown in starfish oocytes proceeds by partial NPC disassembly followed by a rapidly spreading fenestration of nuclear membranes*. J Cell Biol, 2003. **160**(7): p. 1055-68.

49. Brunet, S., et al., *Kinetochore fibers are not involved in the formation of the first meiotic spindle in mouse oocytes, but control the exit from the first meiotic M phase*. J Cell Biol, 1999. **146**(1): p. 1-12.
50. Szollosi, D., P. Calarco, and R.P. Donahue, *Absence of centrioles in the first and second meiotic spindles of mouse oocytes*. J Cell Sci, 1972. **11**(2): p. 521-41.
51. Hertig, A.T. and E.C. Adams, *Studies on the human oocyte and its follicle. I. Ultrastructural and histochemical observations on the primordial follicle stage*. J Cell Biol, 1967. **34**(2): p. 647-75.
52. Schuh, M. and J. Ellenberg, *Self-organization of MTOCs replaces centrosome function during acentrosomal spindle assembly in live mouse oocytes*. Cell, 2007. **130**(3): p. 484-98.
53. Brunet, S., et al., *Bipolar meiotic spindle formation without chromatin*. Curr Biol, 1998. **8**(22): p. 1231-4.
54. Begg, D.A. and G.W. Ellis, *Micromanipulation studies of chromosome movement. I. Chromosome-spindle attachment and the mechanical properties of chromosomal spindle fibers*. J Cell Biol, 1979. **82**(2): p. 528-41.
55. Reis, A., et al., *Prometaphase APC^{Cdh1} activity prevents non-disjunction in mammalian oocytes*. Nat Cell Biol, 2007. **9**(10): p. 1192-8.
56. Brunet, S., et al., *Functionality of the spindle checkpoint during the first meiotic division of mammalian oocytes*. Reproduction, 2003. **126**(4): p. 443-50.
57. Varetto, G. and A. Musacchio, *The spindle assembly checkpoint*. Curr Biol, 2008. **18**(14): p. R591-5.
58. Musacchio, A. and E.D. Salmon, *The spindle-assembly checkpoint in space and time*. Nat Rev Mol Cell Biol, 2007. **8**(5): p. 379-93.
59. Niauxt, T., et al., *Changing Mad2 levels affects chromosome segregation and spindle assembly checkpoint control in female mouse meiosis I*. PLoS One, 2007. **2**(11): p. e1165.
60. McGuinness, B.E., et al., *Regulation of APC/C activity in oocytes by a Bub1-dependent spindle assembly checkpoint*. Curr Biol, 2009. **19**(5): p. 369-80.
61. Homer, H., *New insights into the genetic regulation of homologue disjunction in Mammalian oocytes*. Cytogenet Genome Res, 2011. **133**(2-4): p. 209-22.
62. Kitajima, T.S., S.A. Kawashima, and Y. Watanabe, *The conserved kinetochore protein shugoshin protects centromeric cohesion during meiosis*. Nature, 2004. **427**(6974): p. 510-7.
63. Jin, F., et al., *Cdc20 is critical for meiosis I and fertility of female mice*. PLoS Genet, 2010. **6**(9).
64. Marangos, P., et al., *Prophase I arrest and progression to metaphase I in mouse oocytes are controlled by Emi1-dependent regulation of APC(Cdh1)*. J Cell Biol, 2007. **176**(1): p. 65-75.
65. Verlhac, M.H., et al., *Asymmetric division in mouse oocytes: with or without Mos*. Curr Biol, 2000. **10**(20): p. 1303-6.
66. Schuh, M. and J. Ellenberg, *A new model for asymmetric spindle positioning in mouse oocytes*. Curr Biol, 2008. **18**(24): p. 1986-92.
67. Choi, T., et al., *The Mos/mitogen-activated protein kinase (MAPK) pathway regulates the size and degradation of the first polar body in maturing mouse oocytes*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1996. **93**(14): p. 7032-5.
68. Verlhac, M.H., et al., *Mos is required for MAP kinase activation and is involved in microtubule organization during meiotic maturation in the mouse*. Development, 1996. **122**(3): p. 815-22.
69. Verlhac, M.H., et al., *Microtubule and chromatin behavior follow MAP kinase activity but not MPF activity during meiosis in mouse oocytes*. Development, 1994. **120**(4): p. 1017-25.

70. Kubiak, J.Z., et al., *Cell cycle modification during the transitions between meiotic M-phases in mouse oocytes*. J Cell Sci, 1992. **102** (Pt 3): p. 457-67.
71. Gorbsky, G.J., et al., *Microtubules in the metaphase-arrested mouse oocyte turn over rapidly*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1990. **87**(16): p. 6049-53.
72. Kubiak, J.Z., et al., *The metaphase II arrest in mouse oocytes is controlled through microtubule-dependent destruction of cyclin B in the presence of CSF*. EMBO J, 1993. **12**(10): p. 3773-8.
73. Dumont, J., et al., *p90Rsk is not involved in cytostatic factor arrest in mouse oocytes*. J Cell Biol, 2005. **169**(2): p. 227-31.
74. Wu, J.Q. and S. Kornbluth, *Across the meiotic divide - CSF activity in the post-Emi2/XErp1 era*. J Cell Sci, 2008. **121**(Pt 21): p. 3509-14.
75. Schmidt, A., et al., *Cytostatic factor: an activity that puts the cell cycle on hold*. J Cell Sci, 2006. **119**(Pt 7): p. 1213-8.
76. Hansen, D.V., et al., *Plk1 regulates activation of the anaphase promoting complex by phosphorylating and triggering SCFbetaTrCP-dependent destruction of the APC Inhibitor Emi1*. Mol Biol Cell, 2004. **15**(12): p. 5623-34.
77. Glover, D.M., et al., *Mutations in aurora prevent centrosome separation leading to the formation of monopolar spindles*. Cell, 1995. **81**(1): p. 95-105.
78. Giet, R. and C. Prigent, *Aurora/Iplp-related kinases, a new oncogenic family of mitotic serine-threonine kinases*. J Cell Sci, 1999. **112** (Pt 21): p. 3591-601.
79. Kimura, M., et al., *Cell cycle-dependent expression and spindle pole localization of a novel human protein kinase, Aik, related to Aurora of Drosophila and yeast Ipl1*. J Biol Chem, 1997. **272**(21): p. 13766-71.
80. Schumacher, J.M., et al., *A highly conserved centrosomal kinase, AIR-1, is required for accurate cell cycle progression and segregation of developmental factors in Caenorhabditis elegans embryos*. Development, 1998. **125**(22): p. 4391-402.
81. Fu, J., et al., *A single amino acid change converts Aurora-A into Aurora-B-like kinase in terms of partner specificity and cellular function*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2009. **106**(17): p. 6939-44.
82. Hans, F., et al., *Molecular distinctions between Aurora A and B: a single residue change transforms Aurora A into correctly localized and functional Aurora B*. Mol Biol Cell, 2009. **20**(15): p. 3491-502.
83. Marumoto, T., et al., *Roles of aurora-A kinase in mitotic entry and G2 checkpoint in mammalian cells*. Genes Cells, 2002. **7**(11): p. 1173-82.
84. Giet, R., et al., *Drosophila Aurora A kinase is required to localize D-TACC to centrosomes and to regulate astral microtubules*. J Cell Biol, 2002. **156**(3): p. 437-51.
85. Hannak, E., et al., *Aurora-A kinase is required for centrosome maturation in Caenorhabditis elegans*. J Cell Biol, 2001. **155**(7): p. 1109-16.
86. Salaun, P., Y. Rannou, and C. Prigent, *Cdk1, Plks, Auroras, and Neks: the mitotic bodyguards*. Adv Exp Med Biol, 2008. **617**: p. 41-56.
87. Hirota, T., et al., *Aurora-A and an interacting activator, the LIM protein Ajuba, are required for mitotic commitment in human cells*. Cell, 2003. **114**(5): p. 585-98.
88. Van Horn, R.D., et al., *Cdk1 activity is required for mitotic activation of aurora A during G2/M transition of human cells*. J Biol Chem, 2010. **285**(28): p. 21849-57.
89. Zhao, Z.S., et al., *The GIT-associated kinase PAK targets to the centrosome and regulates Aurora-A*. Mol Cell, 2005. **20**(2): p. 237-49.
90. Molli, P.R., et al., *Arcp1b, a centrosomal protein, is both an activator and substrate of Aurora A*. J Cell Biol, 2010. **190**(1): p. 101-14.
91. Hutterer, A., et al., *Mitotic activation of the kinase Aurora-A requires its binding partner Bora*. Dev Cell, 2006. **11**(2): p. 147-57.
92. Bird, A.W. and A.A. Hyman, *Building a spindle of the correct length in human cells requires the interaction between TPX2 and Aurora A*. J Cell Biol, 2008. **182**(2): p. 289-300.

93. Bayliss, R., et al., *Structural basis of Aurora-A activation by TPX2 at the mitotic spindle*. Mol Cell, 2003. **12**(4): p. 851-62.
94. Eyers, P.A. and J.L. Maller, *Regulation of Xenopus Aurora A activation by TPX2*. J Biol Chem, 2004. **279**(10): p. 9008-15.
95. Terada, Y., Y. Uetake, and R. Kuriyama, *Interaction of Aurora-A and centrosomin at the microtubule-nucleating site in Drosophila and mammalian cells*. J Cell Biol, 2003. **162**(5): p. 757-63.
96. Kufer, T.A., et al., *Human TPX2 is required for targeting Aurora-A kinase to the spindle*. J Cell Biol, 2002. **158**(4): p. 617-23.
97. Brunet, S., et al., *Characterization of the TPX2 domains involved in microtubule nucleation and spindle assembly in Xenopus egg extracts*. Mol Biol Cell, 2004. **15**(12): p. 5318-28.
98. Tsai, M.Y. and Y. Zheng, *Aurora A kinase-coated beads function as microtubule-organizing centers and enhance RanGTP-induced spindle assembly*. Curr Biol, 2005. **15**(23): p. 2156-63.
99. Chan, E.H., et al., *Plk1 regulates mitotic Aurora A function through betaTrCP-dependent degradation of hBora*. Chromosoma, 2008. **117**(5): p. 457-69.
100. Liu, Q. and J.V. Ruderman, *Aurora A, mitotic entry, and spindle bipolarity*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2006. **103**(15): p. 5811-6.
101. Seki, A., et al., *Bora and the kinase Aurora a cooperatively activate the kinase Plk1 and control mitotic entry*. Science, 2008. **320**(5883): p. 1655-8.
102. Marumoto, T., et al., *Aurora-A kinase maintains the fidelity of early and late mitotic events in HeLa cells*. J Biol Chem, 2003. **278**(51): p. 51786-95.
103. Portier, N., et al., *A microtubule-independent role for centrosomes and aurora a in nuclear envelope breakdown*. Dev Cell, 2007. **12**(4): p. 515-29.
104. Vassilev, L.T., et al., *Selective small-molecule inhibitor reveals critical mitotic functions of human CDK1*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2006. **103**(28): p. 10660-5.
105. Anand, S., S. Penrhyn-Lowe, and A.R. Venkitaraman, *AURORA-A amplification overrides the mitotic spindle assembly checkpoint, inducing resistance to Taxol*. Cancer Cell, 2003. **3**(1): p. 51-62.
106. Zhang, D., et al., *Cre-loxP-controlled periodic Aurora-A overexpression induces mitotic abnormalities and hyperplasia in mammary glands of mouse models*. Oncogene, 2004. **23**(54): p. 8720-30.
107. Du, J. and G.J. Hannon, *Suppression of p160ROCK bypasses cell cycle arrest after Aurora-A/STK15 depletion*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2004. **101**(24): p. 8975-80.
108. Scrittore, L., et al., *pEg2 aurora-A kinase, histone H3 phosphorylation, and chromosome assembly in Xenopus egg extract*. J Biol Chem, 2001. **276**(32): p. 30002-10.
109. Kunitoku, N., et al., *CENP-A phosphorylation by Aurora-A in prophase is required for enrichment of Aurora-B at inner centromeres and for kinetochore function*. Dev Cell, 2003. **5**(6): p. 853-64.
110. Walter, A.O., et al., *The mitotic serine/threonine kinase Aurora2/AIK is regulated by phosphorylation and degradation*. Oncogene, 2000. **19**(42): p. 4906-16.
111. Honda, K., et al., *Degradation of human Aurora2 protein kinase by the anaphase-promoting complex-ubiquitin-proteasome pathway*. Oncogene, 2000. **19**(24): p. 2812-9.
112. van Leuken, R., et al., *Polo-like kinase-1 controls Aurora A destruction by activating APC/C-Cdh1*. PLoS One, 2009. **4**(4): p. e5282.
113. Gorgun, G., et al., *A novel Aurora-A kinase inhibitor MLN8237 induces cytotoxicity and cell-cycle arrest in multiple myeloma*. Blood, 2010. **115**(25): p. 5202-13.
114. Tomita, M. and N. Mori, *Aurora A selective inhibitor MLN8237 suppresses the growth and survival of HTLV-1-infected T-cells in vitro*. Cancer Sci, 2010. **101**(5): p. 1204-11.

115. Macarulla, T., et al., *Phase I study of the selective Aurora A kinase inhibitor MLN8054 in patients with advanced solid tumors: safety, pharmacokinetics, and pharmacodynamics*. *Mol Cancer Ther*, 2010. **9**(10): p. 2844-52.
116. Tao, X., et al., *Update on aurora kinase inhibitors in gynecologic malignancies*. *Recent Pat Anticancer Drug Discov*, 2008. **3**(3): p. 162-77.
117. Carol, H., et al., *Efficacy and pharmacokinetic/pharmacodynamic evaluation of the Aurora kinase A inhibitor MLN8237 against preclinical models of pediatric cancer*. *Cancer Chemother Pharmacol*, 2011.
118. Uzbekova, S., et al., *Spatio-temporal expression patterns of aurora kinases a, B, and C and cytoplasmic polyadenylation-element-binding protein in bovine oocytes during meiotic maturation*. *Biol Reprod*, 2008. **78**(2): p. 218-33.
119. Swain, J.E., et al., *Regulation of spindle and chromatin dynamics during early and late stages of oocyte maturation by aurora kinases*. *Mol Hum Reprod*, 2008. **14**(5): p. 291-9.
120. Yao, L.J., et al., *Aurora-A is a critical regulator of microtubule assembly and nuclear activity in mouse oocytes, fertilized eggs, and early embryos*. *Biol Reprod*, 2004. **70**(5): p. 1392-9.
121. Ding, J., J.E. Swain, and G.D. Smith, *Aurora kinase-A regulates microtubule organizing center (MTOC) localization, chromosome dynamics, and histone-H3 phosphorylation in mouse oocytes*. *Mol Reprod Dev*, 2011. **78**(2): p. 80-90.
122. Castro, A., et al., *Involvement of Aurora A kinase during meiosis I-II transition in Xenopus oocytes*. *J Biol Chem*, 2003. **278**(4): p. 2236-41.
123. Andresson, T. and J.V. Ruderman, *The kinase Eg2 is a component of the Xenopus oocyte progesterone-activated signaling pathway*. *EMBO J*, 1998. **17**(19): p. 5627-37.
124. Ma, C., C. Cummings, and X.J. Liu, *Biphasic activation of Aurora-A kinase during the meiosis I- meiosis II transition in Xenopus oocytes*. *Mol Cell Biol*, 2003. **23**(5): p. 1703-16.
125. Mendez, R. and J.D. Richter, *Translational control by CPEB: a means to the end*. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 2001. **2**(7): p. 521-9.
126. Crane, R., et al., *Aurora A, meiosis and mitosis*. *Biol Cell*, 2004. **96**(3): p. 215-29.
127. Arumugam, K., et al., *Enforcing temporal control of maternal mRNA translation during oocyte cell-cycle progression*. *EMBO J*, 2010. **29**(2): p. 387-97.
128. Keady, B.T., et al., *MAPK interacts with XGef and is required for CPEB activation during meiosis in Xenopus oocytes*. *J Cell Sci*, 2007. **120**(Pt 6): p. 1093-103.
129. Sunkel, C.E. and D.M. Glover, *polo, a mitotic mutant of Drosophila displaying abnormal spindle poles*. *J Cell Sci*, 1988. **89** (Pt 1): p. 25-38.
130. Clay, F.J., et al., *Identification and cloning of a protein kinase-encoding mouse gene, Plk, related to the polo gene of Drosophila*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 1993. **90**(11): p. 4882-6.
131. Lee, K.S., et al., *Mutation of the polo-box disrupts localization and mitotic functions of the mammalian polo kinase Plk*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 1998. **95**(16): p. 9301-6.
132. Elia, A.E., et al., *The molecular basis for phosphodependent substrate targeting and regulation of Plks by the Polo-box domain*. *Cell*, 2003. **115**(1): p. 83-95.
133. Elia, A.E., L.C. Cantley, and M.B. Yaffe, *Proteomic screen finds pSer/pThr-binding domain localizing Plk1 to mitotic substrates*. *Science*, 2003. **299**(5610): p. 1228-31.
134. Kang, Y.H., et al., *Self-regulated Plk1 recruitment to kinetochores by the Plk1-PBIP1 interaction is critical for proper chromosome segregation*. *Mol Cell*, 2006. **24**(3): p. 409-22.
135. Holtrich, U., et al., *Induction and down-regulation of PLK, a human serine/threonine kinase expressed in proliferating cells and tumors*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 1994. **91**(5): p. 1736-40.
136. Lowery, D.M., et al., *Proteomic screen defines the Polo-box domain interactome and identifies Rock2 as a Plk1 substrate*. *EMBO J*, 2007. **26**(9): p. 2262-73.
137. Macurek, L., et al., *Polo-like kinase-1 is activated by aurora A to promote checkpoint recovery*. *Nature*, 2008. **455**(7209): p. 119-23.

138. Lee, K.S., et al., *Plk is an M-phase-specific protein kinase and interacts with a kinesin-like protein, CHO1/MKLP-1*. *Mol Cell Biol*, 1995. **15**(12): p. 7143-51.
139. Lenart, P., et al., *The small-molecule inhibitor BI 2536 reveals novel insights into mitotic roles of polo-like kinase 1*. *Curr Biol*, 2007. **17**(4): p. 304-15.
140. Pines, J. and T. Hunter, *Human cyclins A and B1 are differentially located in the cell and undergo cell cycle-dependent nuclear transport*. *J Cell Biol*, 1991. **115**(1): p. 1-17.
141. Li, J., A.N. Meyer, and D.J. Donoghue, *Nuclear localization of cyclin B1 mediates its biological activity and is regulated by phosphorylation*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 1997. **94**(2): p. 502-7.
142. Hagting, A., et al., *Translocation of cyclin B1 to the nucleus at prophase requires a phosphorylation-dependent nuclear import signal*. *Curr Biol*, 1999. **9**(13): p. 680-9.
143. Yuan, J., et al., *Cooperative phosphorylation including the activity of polo-like kinase 1 regulates the subcellular localization of cyclin B1*. *Oncogene*, 2002. **21**(54): p. 8282-92.
144. Toyoshima-Morimoto, F., et al., *Polo-like kinase 1 phosphorylates cyclin B1 and targets it to the nucleus during prophase*. *Nature*, 2001. **410**(6825): p. 215-20.
145. Watanabe, N., et al., *Cyclin-dependent kinase (CDK) phosphorylation destabilizes somatic Wee1 via multiple pathways*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2005. **102**(33): p. 11663-8.
146. Watanabe, N., et al., *M-phase kinases induce phospho-dependent ubiquitination of somatic Wee1 by SCFbeta-TrCP*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2004. **101**(13): p. 4419-24.
147. Nakajima, H., et al., *Identification of a consensus motif for Plk (Polo-like kinase) phosphorylation reveals Myt1 as a Plk1 substrate*. *J Biol Chem*, 2003. **278**(28): p. 25277-80.
148. Inoue, D. and N. Sagata, *The Polo-like kinase Plx1 interacts with and inhibits Myt1 after fertilization of Xenopus eggs*. *EMBO J*, 2005. **24**(5): p. 1057-67.
149. Lobjois, V., et al., *The polo-like kinase 1 regulates CDC25B-dependent mitosis entry*. *Biochim Biophys Acta*, 2009. **1793**(3): p. 462-8.
150. Sumara, I., et al., *Roles of polo-like kinase 1 in the assembly of functional mitotic spindles*. *Curr Biol*, 2004. **14**(19): p. 1712-22.
151. Golan, A., Y. Yudkovsky, and A. Hershko, *The cyclin-ubiquitin ligase activity of cyclosome/APC is jointly activated by protein kinases Cdk1-cyclin B and Plk*. *J Biol Chem*, 2002. **277**(18): p. 15552-7.
152. Moshe, Y., et al., *Role of Polo-like kinase in the degradation of early mitotic inhibitor 1, a regulator of the anaphase promoting complex/cyclosome*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2004. **101**(21): p. 7937-42.
153. Sumara, I., et al., *The dissociation of cohesin from chromosomes in prophase is regulated by Polo-like kinase*. *Mol Cell*, 2002. **9**(3): p. 515-25.
154. Lane, H.A. and E.A. Nigg, *Antibody microinjection reveals an essential role for human polo-like kinase 1 (Plk1) in the functional maturation of mitotic centrosomes*. *J Cell Biol*, 1996. **135**(6 Pt 2): p. 1701-13.
155. Wianny, F., et al., *Mouse polo-like kinase 1 associates with the acentriolar spindle poles, meiotic chromosomes and spindle midzone during oocyte maturation*. *Chromosoma*, 1998. **107**(6-7): p. 430-9.
156. Pahlavan, G., et al., *Characterization of polo-like kinase 1 during meiotic maturation of the mouse oocyte*. *Dev Biol*, 2000. **220**(2): p. 392-400.
157. Tong, C., et al., *Polo-like kinase-1 is a pivotal regulator of microtubule assembly during mouse oocyte meiotic maturation, fertilization, and early embryonic mitosis*. *Biol Reprod*, 2002. **67**(2): p. 546-54.
158. Karaiskou, A., et al., *Polo-like kinase confers MPF autoamplification competence to growing Xenopus oocytes*. *Development*, 2004. **131**(7): p. 1543-52.
159. Okano-Uchida, T., et al., *Distinct regulators for Plk1 activation in starfish meiotic and early embryonic cycles*. *EMBO J*, 2003. **22**(20): p. 5633-42.

160. Qian, Y.W., et al., *Activated polo-like kinase Plx1 is required at multiple points during mitosis in Xenopus laevis*. *Mol Cell Biol*, 1998. **18**(7): p. 4262-71.
161. Xiong, B., et al., *Involvement of Polo-like kinase 1 in MEK1/2-regulated spindle formation during mouse oocyte meiosis*. *Cell Cycle*, 2008. **7**(12): p. 1804-9.
162. Yu, L.Z., et al., *MEK1/2 regulates microtubule organization, spindle pole tethering and asymmetric division during mouse oocyte meiotic maturation*. *Cell Cycle*, 2007. **6**(3): p. 330-8.
163. Hansen, D.V., J.J. Tung, and P.K. Jackson, *CaMKII and polo-like kinase 1 sequentially phosphorylate the cytostatic factor Emi2/XErp1 to trigger its destruction and meiotic exit*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2006. **103**(3): p. 608-13.