Univerzita Karlova
Přírodovědecká fakulta

Regulace buněčného cyklu, výstavba dělícího vřeténka a dynamika chromosomů v oocytu a zygotě

HABILITAČNÍ PRÁCE

2018

RNDr. Petr Šolc, Ph.D.

1 Obsah

2 Poděkování 5
3 Úvod 7
3.1 Vývoj oocytu ve folikulu 7
3.2 Meiotická maturace 8
3.3 První mitotické dělení zygoty 8
4 Regulace buněčného cyklu, výstavba dělícího vřeténka a dynamika chromosomů v oocytu a zygotě 10
4.1 Profáze I blok a znovuzahájení meiózy 10
4.2 Výstavba dělícího vřeténka v meióze I 15
4.3 Anafáze I kontrolní bod a korektní segregace chromosomů 20
4.4 Integrita chromosomů a odpověď na DNA poškození během meiotické maturace 24
4.5 Výstavba dělícího vřeténka a segregace chromosomů během prvního mitotického dělení 29
5 Shrnutí a stručný výhled pro budoucí práci 31
6 Reference 33
7 Příloha – plné texty prací (p 1 – p 222) 38
7.1 Recenzované práce v zahraničních periodikách 38
7.2 Recenzované práce v domácích periodikách 39

2 Poděkování

Úvodem bych rád nejdříve poděkoval své manželce Karin za vytvoření velmi příjemného rodinného prostředí a zázemí, které bylo a také je nezbytným předpokladem pro moji práci.

Dále bych rád poděkoval všem svým kolegům a spolupracovníkům, kteří se podíleli na vzniku publikací, které jsou součástí této práce. Děkuji také všem současným i bývalým členům své laboratoře včetně studentů. Bez jejich vynikající práce a vysokého pracovního nasazení by realizace mých vědeckých projektů byla nemyslitelná. Velmi rád bych také poděkoval kolegovi MVDr. Vladimírů Baranovi, CSc. (Slovenská akademie věd) za dlouhodobou spolupráci v oblasti konfokální mikroskopie.

Zvláštní poděkování bych rád vyjádřil prof. Janu Motlíkovi za to, že mne prakticky přivedl k vědě. Dále bych mu rád poděkoval za vytvoření vynikajících podmínek, které mi umožnily zahájit moji vědeckou kariéru a následně také založit vlastní laboratoř. Dík mu patří také za vytvoření „pufrovacího" systému, který byl v určitých momentech velmi důležitý, možná až zásadní.

Také bych rád poděkoval prof. Richardu Schultzovi (*University of Pennsylvania* a *University of California*) za excelentní dlouhodobou spolupráci a mentorování. Rád bych mu také poděkoval za přijetí v jeho laboratoři ve Philadelphii během mých kratších pobytů a dále pak za velmi přátelské přijetí v Sacramentu v Kalifornii a dlouhé nejenom čistě vědecké diskuze nad vynikajícím vínem.

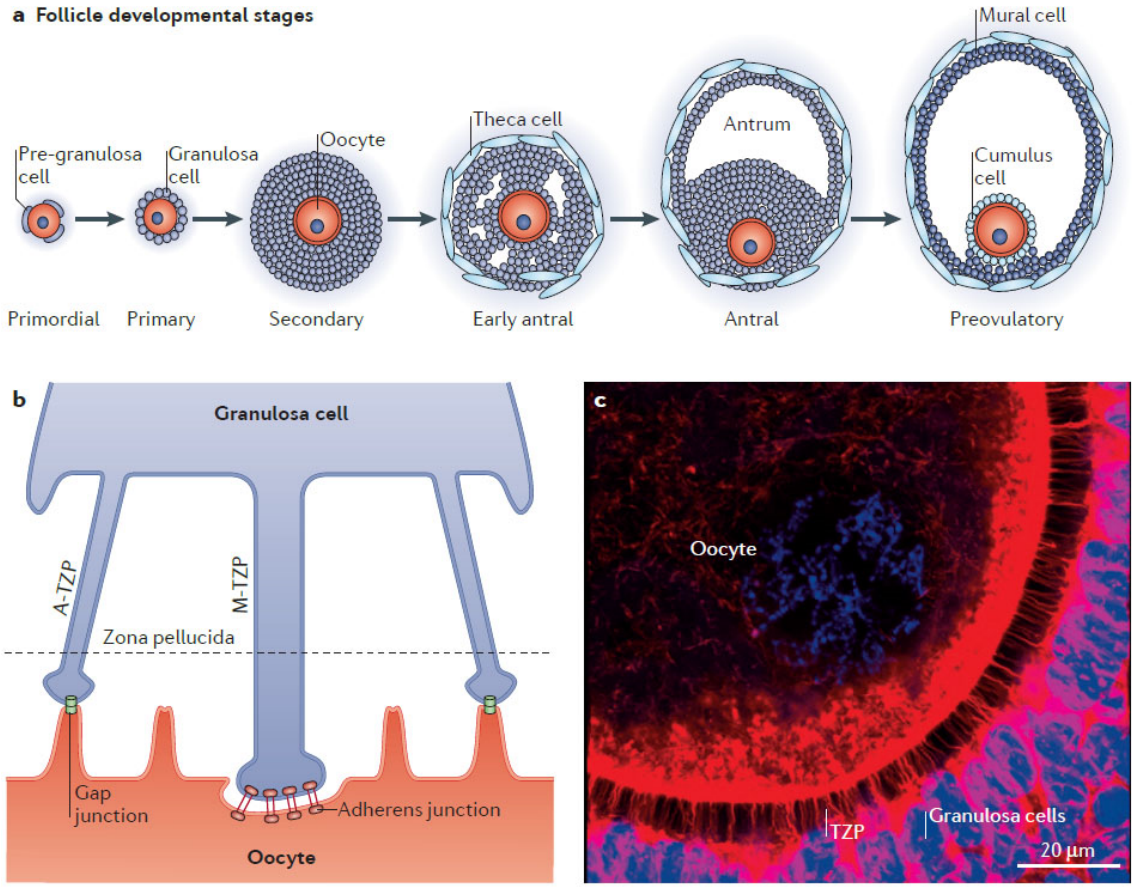
Rád bych také poděkoval prof. Janu Ellenbergovi za přijetí v jeho laboratoři na EMBL Heidelberg během mého kratšího pobytu v rámci *EMBO short term fellowship*. Jeho úvod do mikroskopie živých buněk byl pro mé další odborné směřování zcela zásadní.

Nakonec bych rád také poděkoval Dr. Tomoya Kitajimovi (*RIKEN Centre for Developmental Biology*, Kobe) za experimentální pomoc při mém pobytu v Heidelbergu a dále pak především za následnou a stále trvající velmi plodnou a přínosnou spolupráci. Taktéž děkuji Dr. Karen Schindler (*Rutgers University*) za vynikající vědeckou spolupráci a pohostinnost při mých návštěvách v New Jersey.

3 Úvod

3.1 Vývoj oocytu ve folikulu

Samičí pohlavní buňky, oocyty, vznikají již během embryonálního vývoje své nositelky z primordiálních zárodečných buněk. Už během embryonálního vývoje oocyty vstoupí do profáze I meiotického dělení, která se dále člení na leptoten, zygoten, pachyten, diploten a diakinezi. V diakinezi se však vývoj oocytu zastavuje a oocyt se pak nachází v tzv. profáze I bloku (*prophase I arrest*). Tento oocyt je obklopen jednou vrstvou pregranulózních buněk s nimiž dohromady vytváří primordiální folikul (Obrázek 1A). Již po narození dochází v periodických vlnách k dalšímu vývoji části primordiálních folikulů, které se mění na primární folikuly a následně sekundární folikuly. Tento vývoj sebou nese transformaci dlaždicových pregranulózních buněk na kubické granulózní buňky primárních folikulů a jejich následnou proliferaci, jejímž výsledkem je mnohovrstevný sekundární folikul. Až do tohoto stádia sekundárního folikulu je vývoj nezávislý na hormonu FSH a probíhá tudíž již od narození. Od dosažení pohlavní dospělosti dochází v důsledku periodických vln FSH k dalšímu vývoji sekundárního folikulu na raný antrální folikul a dále na finální preovulační antrální folikul, který je někdy také označován jako Graafův folikul [1-3].



Obrázek 1: Vývoj folikulu a interakce oocytu z granulózními buňkami. A) Vývoj savčího folikulu. B) Struktura transzonálních projekcí (TZP) vycházejících z granulózních buněk směrem k oocytu. A-TZP jsou TZP obsahující aktin, M-TZP jsou TZP obsahující tubulin. C) Imunofluorescenční obrázek kravského oocytu, TZP a okolních granulózních buněk. Převzato z [2].

Během výše popsaného vývoje folikulu (folikulogenéze) dochází k růstu oocytu, k akumulaci specifických mRNA transkriptů a vzniku glykoproteinového obalu oocytu (zona pellucida). Granulózní buňky jsou vzájemně propojeny pomocí tzv. *gap junctions* (skulinová spojení). Z granulózních buněk v těsném sousedství oocytu vychází a skrz zonu pellucidu prochází transzonální projekce (TZP – *transzonal projections*), které se přibližují k cytoplasmatické membráně oocytů (Obrázek 1B). Mezi TZP a oocytem jsou vytvořeny spoje jak ve formě *gap junction* tak i *adherent junction*. Granulózní buňky poskytují oocytu významnou metabolickou podporu v jeho růstu. Mezi oocytem a granulózními buňkami probíhá intenzivní parakrinní signalizace [1, 2].

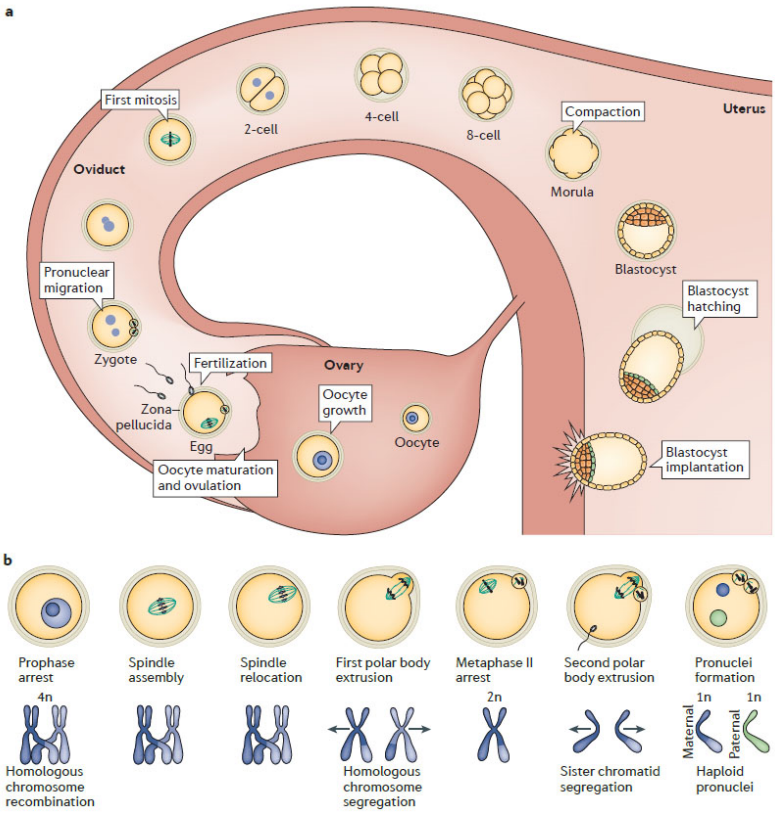
Pouze oocyt v antrálním folikulu dosahuje plné meiotické kompetence, tedy schopnosti dokončit meiózu a dosáhnout stádia metafáze II, a vývojové kompetence, tedy schopnosti po oplození v metafázi II zahájit úspěšný raný embryonální vývoj [4].

3.2 Meiotická maturace

Oocyty v antrálním folikulu se stále nachází v profázi I. V důsledku nárůstu koncentrace hormonu LH, který předchází ovulaci, dochází v oocytu k znovuzahájení meiózy, kdy oocyt vstupuje do prometafáze I, rozpadá se jaderná membrána, kondenzují chromosomy a začíná se vytvářet monopolární dělící vřeténko [5]. Po bipolarizaci dělícího vřeténka a srovnání chromosomů do ekvatoriální roviny oocyt dosahuje metafáze I, kdy dělící vřeténko je v důsledku své migrace ke kortexu oocytu excentricky umístěno (Obrázek 2). Následuje anafáze I se segregací homologních chromosomů a asymetrickým dělením, za vzniku velkého metafáze II oocytu a malého prvního pólového tělísko [6]. Zde v metafázi II se vývoj oocytu opět zastavuje a teprve po oplození spermií dochází k úplnému dokončení meiózy, kdy v anafázi II segregují sesterské chromatidy a následně se vyděluje druhé pólové tělísko [7].

3.3 První mitotické dělení zygoty

Po úspěšném oplození, kdy oocyt dokončil meiózu II vyděleným druhého pólového tělíska, se vytváří jednobuněčné embryo – zygota (Obrázek 2). Z haploidního genomu oocytu se bezprostředně po oplození vytváří samičí prvojádro. Samčí genom je v hlavičce spermie velmi kompaktně zabalen díky pozitivně nabitým proteaminům. Po průniku samčího genomu do vajíčka dochází k výměně proteaminů za klasické histony, což vede k dekompaktaci samčího genomu a vytvoření samičího prvojádra. Zygota tak obsahuje dvě jádra – samičí a samčí prvojádro [7]. Po krátké G1 fázi následuje S-fáze, kdy v obou dvou prvojádrách probíhá DNA replikace. Po dokončení S-fáze nastává krátká G2 fáze a zygoty následně vstupují do první mitózy [8]. V obou prvojádrech kondenzují chromosomy, rozpadají se obě dvě jaderné membrány a následně se začíná vytvářet dělící vřeténko [9]. Teprve během první mitózy tak dochází ke kontaktu samčího a samičího genomu. Přestože z pohledu chromosomů se zygota samozřejmě dělí mitoticky, tedy v anafázi segregují sesterské chromatidy, struktura dělícího vřeténka a mechanismus jeho výstavby je velmi podobný situaci s dělícím vřeténkem v meióze I [7, 9]. Po dokončení první mitózy vzniká dvoubuněčné embryo, kdy každá buňka embrya (blastomera) již obsahuje pouze jedno jádro s diploidním genomem. Další dělení embrya a jeho preimplantační vývoj až do stádia blastocysty probíhá ve vejcovodu.



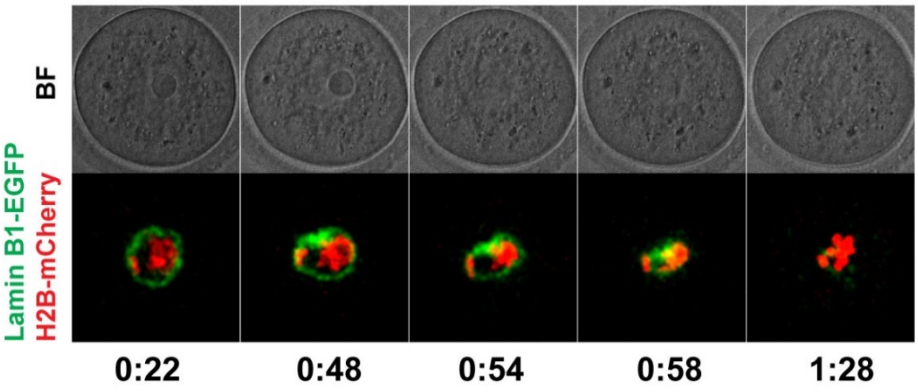
Obrázek 2: Vývoj od oocytu po embryo. A) Přehled preimplantačního vývoje. Oocyt prochází ve vaječníku meiotickou maturací. Po dosažení metafáze II je oocyt ovulován a ve vejcovodu je oplodněn spermií za vzniku zygoty. Zygota se mitoticky dělí a vzniká dvoubuněčné embryo, která dále pokračuje mitotickým dělením, až vznikne blastocysta. B) Meiotická maturace a oplození z pohledu chromosomů.

Předložená práce má za cíl sumarizovat proces meiotické maturace (meiotické buněčné dělení) a následně se také zaměřit na první mitotické dělení oplozeného oocytu – zygoty. Souběžně s tímto přehledem uvádím a komentuji své práce, kterými jsem se pokusil přispět k poznání těchto procesů.

4 Regulace buněčného cyklu, výstavba dělícího vřeténka a dynamika chromosomů v oocytu a zygotě

4.1 Profáze I blok a znovuzahájení meiózy

Přestože je již oocyt v antrálním folikulu meioticky kompetentní, stále se nachází v profázi I v důsledku profáze I bloku. Jaderná membrána je zcela intaktní, chromosomy jsou pouze částečně kondenzovány a nejsou tak vůbec zřetelné bivalenty homologních chromosomů. Transkripční aktivita je již prakticky utlumena a oocyt nyní disponuje úplnou zásobou mRNA nutnou pro následnou meiotickou maturaci a začátek raného embryonálního vývoje. Po nárůstu luteinizačního hormonu (LH) dochází k znovuzahájení meiózy. Znovuzahájení meiózy je charakterizované rozpadem jaderné membrány a úplnou kondenzací chromosomů (Obrázek 3). V mnoha pohledech lze znovuzahájení meiózy oocytů přirovnat k vstupu do mitózy u somatických buněk (G2/M přechod) či ještě lépe vstupu do mitózy po G2-bloku indukovaném DNA poškozením (*G2 checkpoint recovery*). Pro znovuzahájení meiózy, tak i pro vstup do mitózy je zcela nezbytná aktivace cyklin-dependentní kinázy 1 (CDK1 - c*yclin-dependent kinase 1*), při které dochází k translokaci komplexu CDK1-cyklin B z cytoplasmy do jádra (shrnuto v naší přehledné práci [5]).

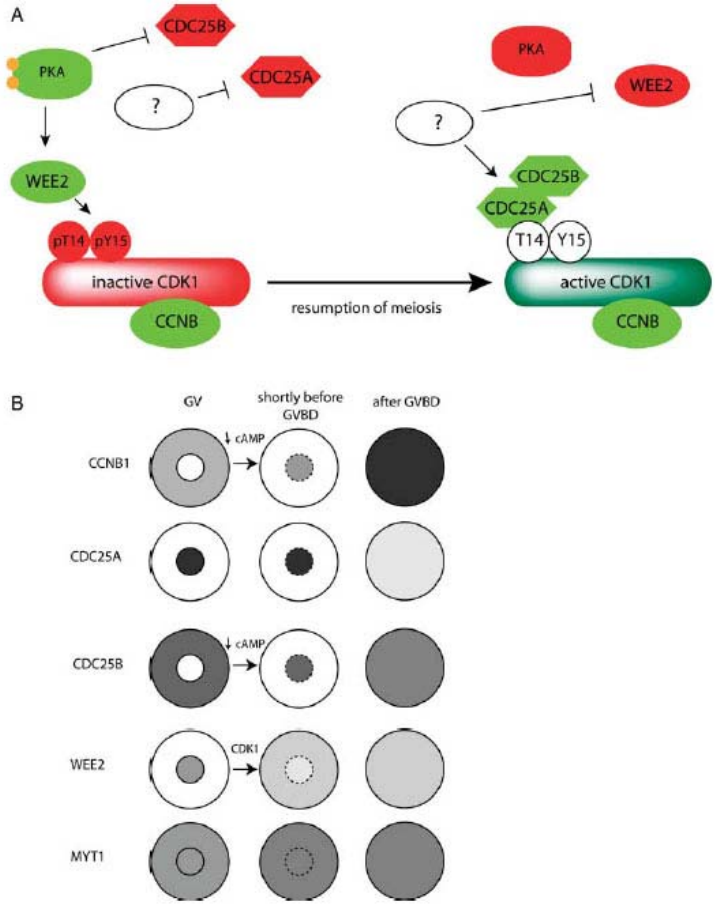


Obrázek 3: Znovuzahájení meiózy v živých myších oocytech monitorované pomocí konfokální mikroskopie. Jaderná membrána byla vizualizována pomocí Lamin B1-EGFP a chromosomy pomocí H2B-mCHERRY. Je též zobrazen kanál odpovídají procházejícímu světlu (BF – bright field), kde je zřetelná kontura jaderné membrány. Čas v h:mm. Převzato z naší práce [10].

V myších oocytech je aktivace CDK1 při znovuzahájení meiózy (Obrázek 4) závislá na duální fosfatáze CDC25B, která defosforyluje inhibiční fosforylace na N-konci CDK1 [11]. Naopak udržení neaktivní CDK1 v profáze I oocytech je závislé na kináze WEE1B, která zprostředkovává inhibiční fosforylace na N-konci CDK1 [12]

Po dosažení meiotické kompetence je profáze I blok závislý na vysoké hladině cAMP v oocytech, která je produkována především aktivitou oocytárně exprimované adenylát cyklázy 3 (ADCY3 - *adenylate cyclase 3*) [13]. Aktivita ADCY3 je stimulována signalizací přes receptor 3 spřažený s trimérními G-proteiny (GPR3 - *G-protein coupled receptor 3*) [14-17]. Během znovuzahájení meiózy dochází v myším oocytu k aktivaci fosfodiesterázy 3A (PDE3A - *phosphodiesterase 3A*), která velmi rychle sníží hladinu cAMP v oocytech, což umožní znovuzahájení meiózy [18]. V *in vivo* podmínkách dochází k znovuzahájení meiózy v oocytu nacházejícím se v antrálním folikulu po nárůstu hladiny LH hormonu. U oocytů

izolovaných z folikulů a kultivovaných v *in vitro* podmínkách dochází k znovuzahájení meiózy spontánně, přičemž tomu lze zabránit farmakologickou inhibicí PDE3A (shrnuto v naší práci [5]).

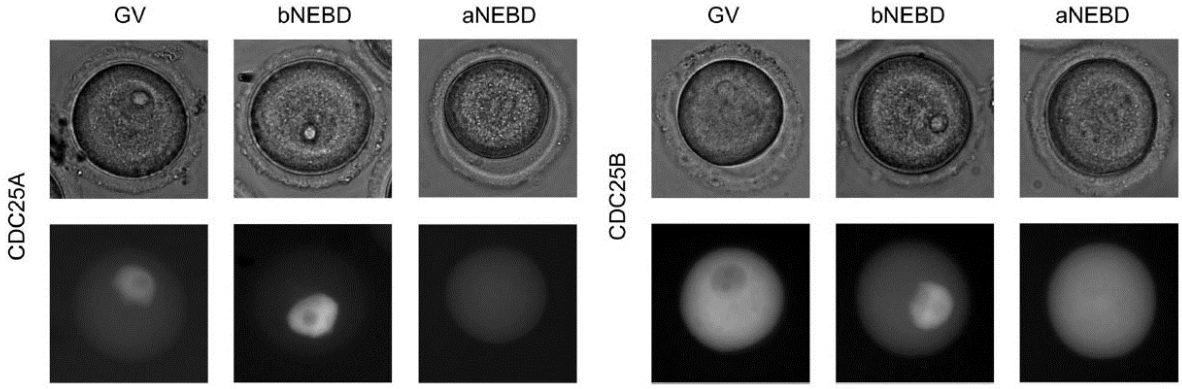


Obrázek 4: Regulace CDK1 při znovuzahájení meiózy. A) Inhibice CDK1 u oocytů v profáze I bloku a aktivace CDK1 během znovuzahájení meiózy. B) Lokalizace aktivátorů CDK1 (CCNB1 – cyklin B1, CDC25A, CDC25B) a inhibitorů CDK1 (WEE2 - WEE1B, MYT1) během znovuzahájení meiózy. GV – germinal vesical, profáze I; GVBD – germinal vesical break down, označení pro rozpad jaderné membrány. Převzato z naší práce [5].

Vysoká hladina cAMP v profáze I oocytech vede k aktivaci protein kinázy A (PKA - *Protein Kinase A*) [19]. PKA zprostředkovává fosforylaci CDC25B, což vede k inhibiční asociaci CDC25B s 14-3-3 proteinem. Tato asociace má také za následek blokování translokace CDC25B z cytoplasmy do jádra, ke které normálně během znovuzahájení meiózy dochází [20-22]. PKA však zároveň zvyšuje aktivitu WEE1B a zajišťuje lokalizaci aktivní WEE1B do jádra, kde se tak brání aktivaci CDK1, která by jinak iniciovala rozpad jaderné membrány a znovuzahájení meiózy [12, 22]. PKA tudíž aktivuje signalizaci vedoucí k inhibici CDK1 (t. j. WEE1B) a zároveň inhibuje signalizaci vedoucí k aktivaci CDK1 (t.j. CDC25B), čímž zabraňuje znovuzahájení meiózy u oocytů s vysokou koncentrací cAMP (shrnuto v našich přehledných pracích [5, 23]).

Jak již bylo zmíněno, je známo, že CDC25B je nezbytná pro aktivaci CDK1 a znovuzahájení meiózy [11]. V savčím genomu se však nachází 3 izoformy CDC25 fosfatázy. U CDC25C bylo ukázáno, že není zcela nezbytná ani pro meiózu oocytů ani pro mitózu

somatických buněk, neboť cdc25c -/- myši jsou životaschopné a fertilní [24]. My jsme se zabývali otázkou, jestli zbývající CDC25A má nějakou roli v meióze myších oocytů. V naší práci jsme ukázali, že CDC25A protein je exprimován v profáze I oocytech, avšak po znovuzahájení meiózy dochází k jeho destrukci v závislosti na CDK1 aktivitě [25]. Toto zjištění bylo překvapující, protože u somatických buněk naopak CDK1 aktivita stabilizuje CDC25A protein během mitózy [26]. Dále jsme zjistili, že na rozdíl od CDC25B, která je v profáze I oocytech lokalizována do cytoplasmy a dochází k její jaderné translokaci krátce před znovuzahájením meiózy, je CDC25A jaderný protein již v profázi I (Obrázek 5). Exogenní exprese GFP-CDC25A z mikroinjekované mRNA je schopna indukovat aktivaci CDK1 a znovuzahájení meiózy u oocytů blokovaných v profázi I. Naopak umlčení exprese *Cdc25a* pomocí mikroinjekce dlouhé dvouřetězcové RNA (RNA interference) snižuje schopnost oocytů znovuzahájit meiózu. Tato naše práce tak prokázala, že znovuzahájení meiózy je regulováno nejen CDC25B, ale také CDC25A [25].



Obrázek 5: Rozdílná lokalizace CDC25A a CDC25B během znovuzahájení meiózy. Lokalizace GFP-CDC25A a GFP-CDC25B v živých oocytech během znovuzahájení meiózy. GV – Profáze I; bNEBD – čas krátce před rozpadem jaderné membrány; aNEBD – čas krátce po rozpadu jaderné membrány. Exogenní exprese GFP-CDC25A a GFP-CDC25B po mikroinjekci příslušných mRNA. Převzato z naší práce [25].

Dále jsme se zaměřili na výzkum signalizace protein kinázy B (PKB) a její možný vztah k znovuzahájení meiózy u myši [27]. Vycházeli jsme v té době již z dostupné znalosti, že u oocytů hvězdice *Asterina pectinifera* dochází při hormonálně indukovaném (1-metyladenin) znovuzahájení meiózy k aktivaci PKB, která následně fosforyluje a inhibuje kinázu MYT1 [27], která podobně jako WEE1B v myších oocytech, inhibuje aktivaci CDK1. Navíc z oocytů žáby *Xenopus* bylo známo, že PKB je zapojena do znovuzahájení meiózy indukovaném insulinem [28, 29]. Nadto u somatických buněk bylo zjištěno, že PKB může pozitivně regulovat aktivitu CDC25B [30]. V naší práci na myších oocytech jsme kombinací biochemických a imunofluorescenčních technik ukázali, že aktivace PKB předchází aktivaci CDK1 a je na CDK1 nezávislá. Farmakologická inhibice PKB signalizace zpožďuje aktivaci CDK1 a znovuzahájení meiózy v myších oocytech [27]. Tato naše zjištění byla později rozvinuta prací jiné skupiny, kde prokázali, že PKB aktivačně fosforyluje PDE3A [31]. Na druhou stranu je třeba podotknout, že u prasečích oocytů jsme neprokázali roli PKB během znovuzahájení meiózy, ale ukázali jsme její důležitou funkci při výstavbě dělícího vřeténka

v meióze I [32]. Role PKB během výstavby dělícího vřeténka byla jinými prokázána i u myších oocytů [33].

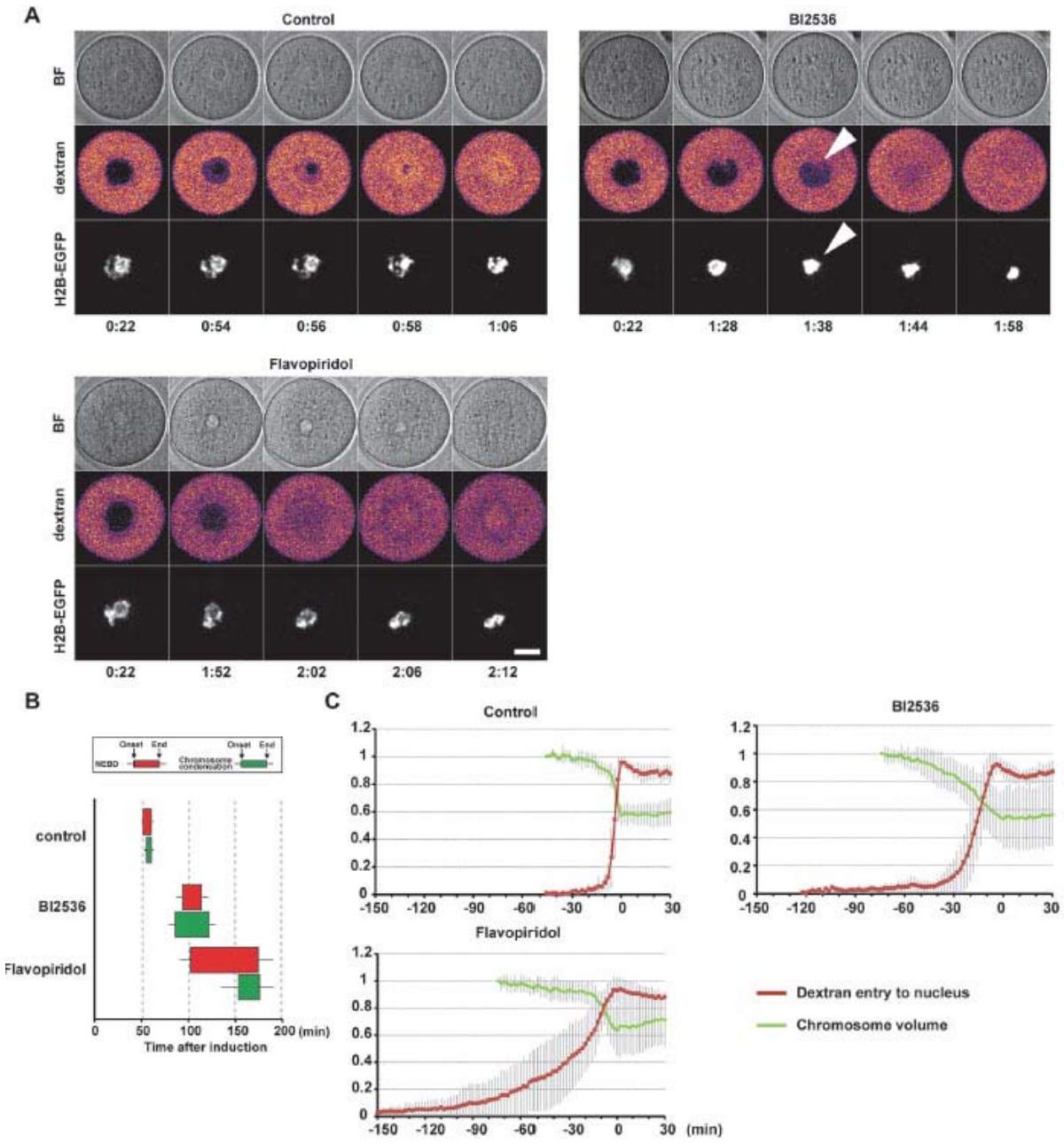
Další zajímavou kandidátní signální molekulou pro regulaci znovuzahájení meiózy pro nás byla kináza Aurora-A (AURKA). V somatických buňkách dochází k aktivaci AURKA již v G2 fázi a aktivita AURKA je klíčová pro lokalizaci komplexu CDK1-cyklin B na centrosom, kde pak dochází k jeho iniciální aktivaci a rozhodnutí o vstupu do mitózy [34]. AURKA na centrosomu fosforyluje CDC25B, což pravděpodobně zvyšuje aktivitu CDC25B a podporuje tak aktivaci centrosomálně vázané CDK1 [35]. V oocytech žáby *Xenopus* exogenní exprese konstitutivně aktivní AURKA indukuje aktivaci CDK1 a znovuzahájení meiózy [36]. V případě znovuzahájení meiózy indukovaném insulinem aktivace PI3K-PKB signalizace vede k aktivaci AURKA [37].

My jsme zjistili, že v myších oocytech dochází k iniciální aktivaci AURKA na mikrotubul-organizujících centrech (MTOC) před znovuzahájením meiózy a to jak v případě spontánního znovuzahájení meiózy *in vitro* [38], tak i v případě hCG (LH) indukovaného znovuzahájení meiózy *in vivo* [39]. Tato iniciální aktivace AURKA je nezávislá jak na CDK1 tak ale i PI3K-PKB signalizaci. Pomocí RNA interference (mikroinjekce dlouhé dvouřetězcové RNA) se nám podařilo efektivně snížit expresi *Aurka* v oocytech, čímž se signifikantně snížilo množství oocytů schopných znovuzahájit meiózu [38]. Zároveň i pomocí farmakologické inhibice AURKA jsme ukázali, že oocyty bez AURKA aktivity mají významně opožděné znovuzahájení meiózy [5]. Tato naše data jasně ukázala, že aktivace AURKA vede k aktivaci CDK1 a AURKA se tak podílí na znovuzahájení meiózy. Tím, že aktivace AURKA v myších oocytech je nezávislá i na PI3K-PKB, kladli jsme si otázku, jestli by AURKA mohla být přímo molekulou, která indukuje znovuzahájení meiózy. Zvýšená exogenní exprese GFP-AURKA po mikroinjekci mRNA sice nebyla schopna indukovat znovuzahájení meiózy u oocytů *in vitro* kultivovaných v médiu s inhibitorem PDE3A (IBMX), který v důsledku blokování destrukce cAMP zabraňuje jinak spontánnímu znovuzahájení meiózy. Interpretace výsledku tohoto experimentu s *in vitro* kultivovanými oocyty však nebyla stále jednoznačná. Sice zvýšená exprese GFP-AURKA neindukovala znovuzahájení meiózy, ale to mohlo být způsobeno i relativně arteficiálními podmínkami, kdy PDE3A byla trvale inhibovaná přítomností IBMX. Tedy i v hypotetické situaci, kdy by GFP-AURKA zvýšená exprese zvyšovala aktivitu PDE3A, tato by stále byla farmakologicky inhibována a nedošlo by k poklesu cAMP a znovuzahájení meiózy. Z těchto důvodů jsme se rozhodli vytvořit transgenní model myší, který by umožnoval testovat hypotézu, jestli zvýšená aktivita AURKA může indukovat znovuzahájení meiózy oocytu v podmínkách intaktního folikulu. V té době již byly jinou skupinou publikovány CAG-CAT-*Aurka* myši, které v genomu nesly transgen pro lidskou normální *Aurka (*WT-*Aurka)* [40]. Exprese WT-*Aurka* je však blokována přítomností lox-CAT-lox sekvence. CAT sekvence obsahuje polyA signál, který ukončuje transkripci z daného lokusu. Inhibiční CAT sekvenci u tohoto transgenu lze však vyjmout pomocí Cre-zprostředkované rekombinace [40]. Křížením CAG-CAT-Aurka samiček [40] a Zp3-Cre samců [41] jsme tak vytvořili CAG-CAT-Aurka;Zp3-Cre myši (WT-*Aurka* myši), která mají zvýšenou expresi WT-*Aurka* výhradně v oocytech. Zjistili jsme, že přestože WT-*Aurka* oocyty vykazují zvýšenou aktivaci AURKA, profáze I blok je stále funkční. Zvýšená AURKA aktivita tak není schopna překonat profáze I blok

oocytů ve folikulu, který je přirozeně navozen vysokou koncentrací cAMP [39]. Lze tak shrnout, že naše studie [5, 38, 39] ukázaly, že AURKA aktivace probíhá před znovuzahájením meiózy na MTOCs, je nezávislá na CDK1 a podílí se na vlastní CDK1 aktivaci a znovuzahájení meiózy. Na druhou stranu aktivace AURKA sama o sobě není schopna překonat profáze I blok udržovaný vysokou hladinou cAMP a aktivace AURKA v oocytech za *in vivo* podmínek ve folikulu je závislá pravděpodobně na poklesu cAMP a tedy PDE3A aktivitě.

Kináza PLK1 (PLK1 - *Polo-like kinase 1*) byla další signální molekulou, kterou jsme se zabývali ve vztahu k znovuzahájení meiózy. V somatických buňkách PLK1 fosforyluje WEE1 a navozuje tím její degradaci [42]. PLK1 též inhibičně fosforyluje MYT1 [43]. Navíc je PLK1 nutná během vstupu do mitózy pro translokaci CDC25B z cytoplasmy do jádra [44]. My jsme u myších oocytů ukázali, že k iniciální aktivaci PLK1 dochází na MTOC již před znovuzahájením meiózy [10] a že farmakologická inhibice PLK1 vede k výraznému zpoždění v nástupu znovuzahájení meiózy [5, 10]. Dále pak na rozdíl od somatických buněk v oocytech po inhibici PLK1 dochází k translokaci CDC25B z cytoplasmy do jádra [10].

Rozpad jaderné membrány a masivní kondenzace chromozomů představují dvě velmi synchronizované hlavní události probíhající během znovuzahájení meiózy. Pro detailnější sledování těchto procesů v živých oocytech a jejich závislosti na PLK1 aktivitě jsme do oocytů exprimujících H2B-EGFP mikroinjekovali fluorescenčně značený 70 kDa-dextran-TAMRA. Monitorování nárůstu jaderného signálu od 70 kDa-dextran-TAMRA umožňuje velmi přesný a kvantitativní popis rozpadu jaderné membrány, kde postupná permeabilizace jaderné membrány je doprovázená nárůstem koncentrace 70 kDa-dextran-TAMRA v jádře. Kondenzaci chromosomů lze kvantitativně monitorovat po 3D rekonstrukci H2B-EGFP signálu. Zjistili jsme, že u PLK1 inhibovaných oocytů dochází k opožděnému nástupu jak rozpadu jaderné membrány, tak i kondenzace chromosomů. Navíc však zpoždění v nástupu rozpadu jaderné membrány je výrazně větší než u kondenzace chromosomů, což vede k situaci, že PLK1 inhibované oocyty mají plně kondenzované chromosomy uvnitř intaktního jádra. U normálních kontrolních oocytů se kondenzace chromosomů zahajuje krátce (~ 3.8 min) po prvotní permeabilizaci jaderné membrány. U PLK1 inhibovaných oocytů se však kondenzace chromosomů zahajuje již ~ 8 min před zahájením iniciální permeabilizace jaderné membrány. Jak již bylo zmíněno výše, je známo, že PLK1 je zahrnuta do aktivace CDK1. Zabývali jsme se tedy otázkou, jestli uvedené fenotypy inhibice PLK1 nejsou pouze nepřímým následkem snížené aktivity CDK1. Ukázalo se však, že přímá farmakologická částečná inhibice CDK1 má zcela opačný efekt, kdy iniciální fáze permeabilizace jaderné membrány předchází o ~ 50 minut zahájení kondenzace chromosomů. Na základě našich zjištění tak lze v souhrnu konstatovat, že PLK1 se významným způsobem účastní regulace znovuzahájení meiózy, kdy zajišťuje synchronizaci a časově korektní nástup rozpadu jaderné membrány a kondenzace chromosomů. Tyto její funkce jsou alespoň z části nezávislé na CDK1. PLK1 tak má kromě regulace CDK1 aktivity v procesu znovuzahájení meiózy i další své funkce [10].



Obrázek 6: Role PLK1 při znovuzahájení meiózy a rozpadu jaderné membrány (NEBD). A) Mikroskopie živých oocytů exprimujících H2B-EGFP mikroinjekovaných 70kDa-dextran-TAMRA. H2B-EGFP slouží pro vizualizaci kondenzace chromosomů, 70kDa-dextran-TAMRA pro vizualizaci permeabilizace jaderné membrány. PLK1 byla inhibována farmakologickým inhibitorem BI2536, CDK1 byla částečně inhibována inhibitorem flavopiridol. B) Grafické znázornění časového průběhu kondenzace chromozomů a NEBD. C) Kvantifikace kondenzace chromosomů a NEBD. Čas v h:mm. Převzato z naší práce [10].

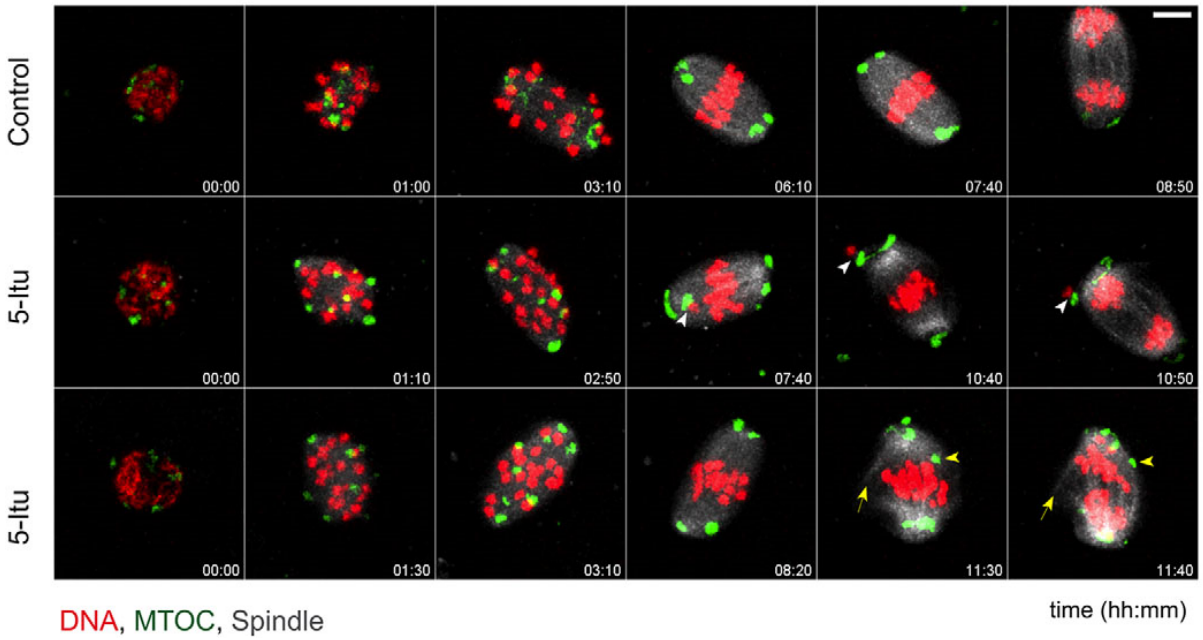
4.2 Výstavba dělícího vřeténka v meióze I

Po znovuzahájení meiózy dochází k výstavbě dělícího vřeténka, které je následně nezbytné pro segregaci homologních chromosomů v anafázi I. Oocyty neobsahují centrosom s centriolou. Místo toho obsahují mnohočetná cytoplasmatická mikrotubuly organizující centra (MTOC), která funkčně nahrazují centrosom [6]. Tato MTOC obsahují pericentrin [45]

i γ-tubulin [46]. Oocyt v profáze I bloku obsahuje pouze několik MTOC. U profáze I oocytů lze rozlišit cytoplasmatická MTOC a perinukleární MTOC, která se nachází v těsné blízkosti jaderné membrány. Během meiotické maturace dochází nejdříve k výraznému nárůstu počtu MTOC (pomnožení MTOC), která později zpět fúzují a vytváří dva póly meiotického dělícího vřeténka (Obrázek 7). Během znovuzahájení meiózy, ještě před rozpadem jaderné membrány, se zvyšuje schopnost MTOC nukleovat mikrotubuly. Nastává také první vlna pomnožení MTOCs, kdy nová cytoplasmatická MTOC se tvoří především *de novo,* avšak nová perinukleární MTOC vznikají hlavně jako výsledek fragmentace již existujících perinukleárních MTOC. Fragmentace perinukleárních MTOC před rozpadem jaderné membrány je závislá na molekulárním motoru dynein. Krátce po rozpadu jaderné membrány cytoplasmatická a perinukleární MTOC indukují masivní růst mikrotubulů a následně klastrují v oblasti chromosomů. Vytváří se tak multipolární dělící vřeténko, označované také jako mikrotubulární balón (*microtubule ball*), kdy chromosomy se dostávají na jeho povrch a individualizují se v důsledku centrifugálního a mikrotubul-dependentního procesu. Zdá se, že bezprostředně po rozpadu jaderné membrány nukleují mikrotubuly především z MTOC, teprve později se přidává i nukleace z kondenzovaných chromosomů. Po rozpadu jaderné membrány dochází k druhé fázi pomnožení MTOC v důsledku kinesin-5 (Eg5) dependentní fragmentace již existujících MTOC. Kinsein-5 má dále klíčovou funkci v transformaci multipolárního mikrotubulárního balónu na bipolární dělící vřeténko [6, 47]. Během procesu bipolarizace dělícího vřeténka jsou pomnožená MTOC sortována na dva póly v závislosti na aktivitě proteinu HURP (*hepatoma up-regulated protein*). HURP se lokalizuje na mikrotubulech spojující dva póly v závislosti na aktivitě kinesinu-5 a navozuje zde v centrální oblasti dělícího vřeténka stabilizaci mikrotubulů, která je nezbytná pro efektivní sortování MTOC [48].

Monomerní G-protein RAN hraje klíčovou roli v regulaci jaderného transportu a zároveň po rozpadu jaderné membrány též ve výstavbě dělícího vřeténka. Chromosomálně vázaný faktor RCC1(*regulator of chromosome condensation 1*) působí jako GEF (*guanine nucleotide exchange factor*) pro RAN a navozuje tak vznik aktivního komplexu RAN.GTP. Naopak cytoplasmatický RANGAP (*RAN GTPase-activating protein*) navozuje hydrolýzu GTP a podporuje vznik neaktivního komplexu RAN.GDP. Importiny fungují jako receptory pro jaderný import. Proteiny obsahující jaderný lokalizační signál (NLS - *nuclear localization signal*) interagují s importiny a translokují se do jádra. V jádře RAN.GTP navozuje uvolnění proteinů s NLS z vazby na importiny. Naopak proteiny obsahující jaderný exportní signál (NES- *nuclear export signal*) se váží v jádře na exportiny v heterotrimerickém komplexu s RAN.GTP. Po exportu do cytoplasmy RANGAP navozuje hydrolýzu vázaného GTP, vzniká tak RAN.GDP a heterotrimerický komplex se rozpadá, exportovaný náklad se uvolňuje. Po rozpadu jaderné membrány sice již RAN nemůže hrát roli v regulaci jaderného exportu a importu, hraje však důležitou roli v aktivaci tzv. SAF faktorů (*spindle assembly factor*s). Vazba importinů na SAF je inhibuje. Protože je RCC1 asociován s chromatinem, existuje kolem chromosomů při výstavbě dělícího vřeténka gradient RAN.GTP, který lokálně aktivuje SAF podílející se na výstavbě dělícího vřeténka. Asi nejznámějším SAF, který je regulován negativně importiny, je TPX2, který funguje jako nukleátor mitotických mikrotubulů. Navíc

TPX2 aktivuje AURKA, která se též podílí na výstavbě dělícího vřeténka (shrnuto v naší práci [23]).



Obrázek 7: Výstavba dělícího vřeténka, pomnožení a následná fúze MTOC v živých oocytech exprimujících H2B-mCHERRY (chromosomy, červená), mEGFP-CDKRAP2 (MTOC, zelená). Mikrotubuly jsou vizualizovány vitální fluorogenní barvičkou SiR-tubulin (šedá). Situace v kontrolním oocytu a v oocytech s farmakologicky inhibovanou kinázou Haspin (5-Itu). Hroty šipek ukazují MTOC lokalizovaná mimo póly dělícího vřeténka, šipky ukazují mikrotubuly vycházející z pólů, ale směřující do prostoru bez kontaktu s chromosomy. Převzato z naší práce [49].

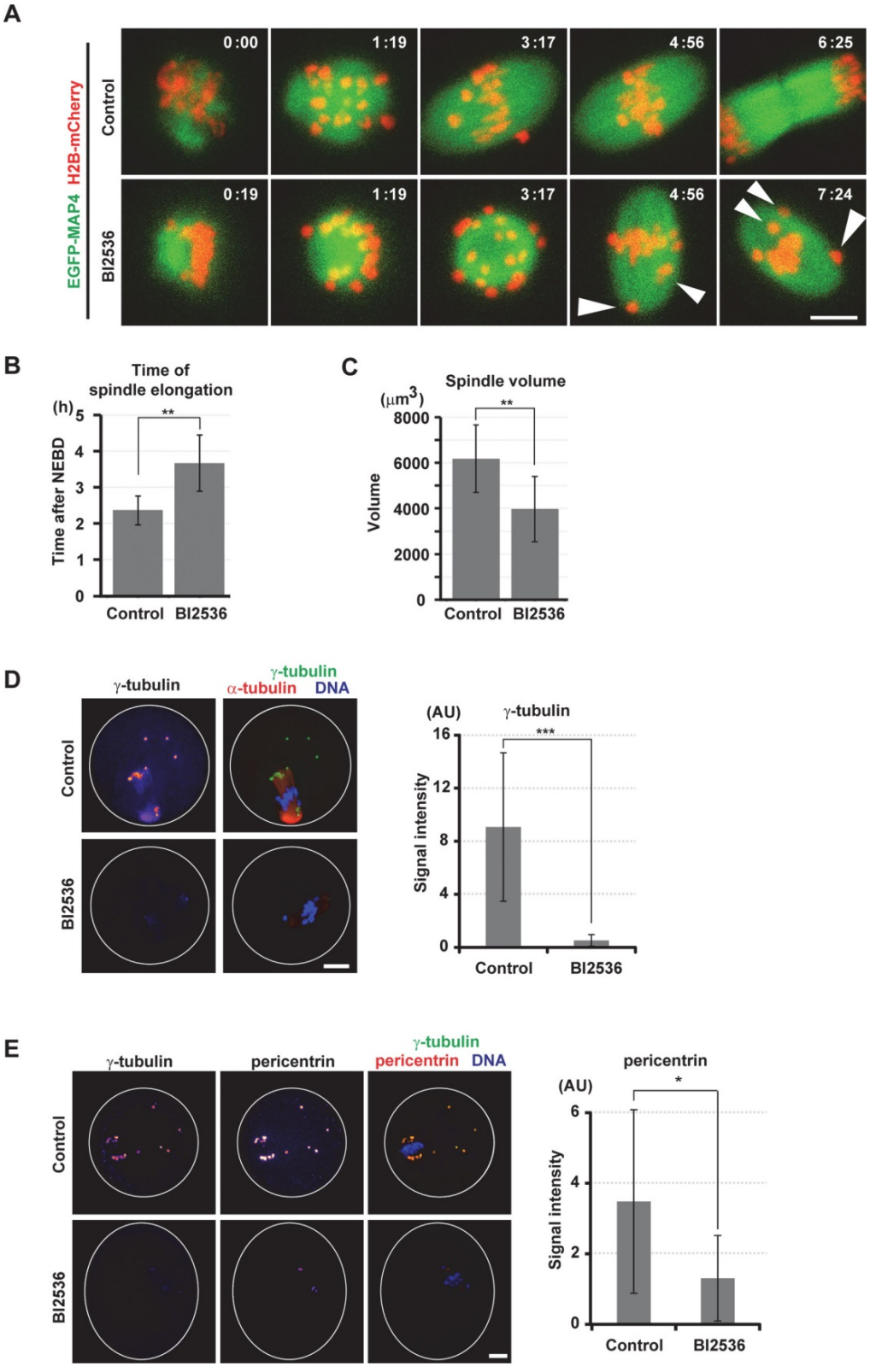
Pomocí biosensoru Rango, který využívá FRET (*fluorescence resonance energy transfer*), byl prokázán RAN.GTP gradient kolem chromosomů u dělícího vřeténka v meióze I a i meióze II myších oocytů [50]. Inhibice RAN.GTP pomocí exogenní exprese dominantně negativní mutanty RANT24N sice snižuje míru polymerace mikrotubulů po rozpadu jaderné membrány, ale nakonec se přesto vytvoří menší, ale funkční dělící vřeténko schopné zajistit segregaci chromosomů [6, 50]. Na druhou stranu, exprese RANT24N v metafáze II oocytech zcela zruší existenci dělícího vřeténka [50]. Tato data ukazují, že přestože v oocytech v meióze I existuje RAN.GTP gradient, není pravděpodobně na rozdíl od somatických buněk zcela nezbytný pro výstavbu funkčního dělícího vřeténka (shrnuto v naší práci [23]).

Jak je zmíněno již výše, ukázali jsme, že AURKA se aktivuje na MTOC již před znovuzahájením meiózy a to jak v podmínkách *in vitro* kultivace tak i v podmínkách *in vivo*, kdy je znovuzahájení meiózy experimentálně indukovatelné aplikací hCG. I po rozpadu jaderné membrány se aktivní AURKA lokalizuje na pomnožená MTOC a v metafázi I se pak aktivní AURKA nachází na MTOC, která po sortování tvoří dva póly dělícího vřeténka [38, 39]. Dále jsme prokázali, že exogenní exprese GFP-AURKA z mikroinjekované mRNA vede ke vznikům extrémně dlouhých dělících vřetének, která jsou v metafázi I často multipolární a desorganizovaná. Snížení exprese *Aurka* pomocí mikroinjekce dlouhé dvouřetězcové RNA (RNA interference) vede též k defektům ve výstavbě dělícího vřeténka [38]. Pro studium role AURKA během přirozeného meiotického zrání v *in vivo* podmínkách jsme s využitím Cre-lox

systému připravili dvě linie transgenních myší, kdy specificky pouze v oocytech byla zvýšená exprese buď lidské normální AURKA (WT-*Aurka*), nebo kinázově neaktivní (*kinase dead*) AURKA (KD-*Aurka*) [39]. Jak již bylo zmíněno, k první fázi pomnožení MTOC dochází během znovuzahájení meiózy *in vitro* ještě před rozpadem jaderné membrány [6]. My jsme však ukázali, že v podmínkách *in vivo* meiotické maturace dochází k pomnožení MTOC vždy až po rozpadu jaderné membrány, tedy po znovuzahájení meiózy. Avšak oocyty z WT-*Aurka* myší, ne však z KD-*Aurka* myší, vykazují pomnožená MTOC již v profázi I, což ukazuje, že AURKA aktivita je schopná iniciovat pomnožení MTOC. Na druhou stranu po indukci znovuzahájení meiózy pomocí hCG dochází k zániku předčasně pomnožených MTOC u WT-*Aurka* oocytů a pomnožení se opětovně objevuje až po rozpadu jaderné membrány. Přestože iniciální aktivace AURKA na MTOC probíhá ještě před rozpadem jaderné membrány, plná aktivace na MTOC, která je nezbytná pro pomnožení MTOC, vyžaduje aktivní CDC25B-CDK1 signalizaci. Velmi překvapující bylo zjištění, že oocyty v metafázi I jak z WT-*Aurka* tak i Kd-*Aurka* myší vykazují zvýšenou koncentraci γ-tubulinu na MTOC, což ukazuje, že AURKA je, nezávisle na své kinázové aktivitě, zapojena do procesu maturace MTOC, který zahrnuje i zvýšení množství γ-tubulinu na MTOC [39]. V souhrnu jsme tak ukázali, že AURKA představuje klíčovou kinázu regulující pomnožení MTOC (biogenezi MTOC) a výstavbu dělícího vřeténka v myších oocytech.

PLK1 je v somatických buňkách během mitózy důležitá pro nukleaci mikrotubulů z centrosomů, bipolarizaci dělícího vřeténka a vytvoření stabilních mikrotubul-kinetochor spojení [51-55]. My jsme ukázali, že aktivní PLK1 lokalizuje v oocytech na MTOC, do oblasti mikrotubulárního balónu, na chromosomy a ve zvýšeném množství navíc i na kinetochory. Lokalizace PLK1 na MTOC je pozitivně závislá na vlastní PLK1 aktivitě, naopak lokalizace PLK1 na kinetochory je alespoň částečně negativně ovlivněna vlastní PLK1 aktivitou. V oocytech s inhibovanou PLK1 aktivitou však na rozdíl od somatických buněk dochází k bipolarizaci dělícího vřeténka (Obrázek 8). Toto dělící vřeténko je však menší a MTOC mají extrémně nízkou hladinu γ-tubulinu a pericentrinu [10]. Vzhledem k tomu, že MTOC v oocytech hrají klíčovou roli v nukleaci mikrotubulů [6], je námi pozorovaná narušená MTOC biogeneze v oocytech s inhibovanou PLK1 aktivitou pravděpodobně alespoň částečně zodpovědná za defekty ve výstavbě dělícího vřeténka při absenci PLK1 aktivity [10]. Navíc jsme prokázali, že oocyty s inhibovanou PLK1 aktivitou mají narušeno srovnání chromosomů do metafázní roviny a tvorbu stabilních mikrotubul-kinetochor spojení. PLK1 v oocytech fosforyluje BUBR1 na T669, čímž napomáhá právě vytvoření stabilních kinetochor-mikrotubul spojů. Tyto defekty ve výstavbě dělícího vřeténka jsou také jednou (nikoliv však jedinou – viz. kapitola 4.3) z příčin, proč oocyty s inhibovanou PLK1 aktivitou zůstávají zablokovány v metafázi I a nevstupují do anafáze I [10].

Aurora kináza B (AURKB) v komplexu s proteiny survivin, borealin a INCENP vytváří CPC (*chromosomal passenger complex*). AURKB-CPC lokalizuje v metafázi na chromozomy, v anafázi se pak nachází v oblasti centrálního dělícího vřeténka (*central spindle*). V somatických mitotických buňkách je AURKB důležitá pro biorientaci chromosomů tím, že se významně podílí na tvorbě korektních mikrotubul-kinetochor spojení. AURKB je dále také zapojena do fungování anafázního kontrolního bodu a regulace cytokineze [56].



Obrázek 8: PLK1 je důležitá pro výstavbu dělícího vřeténka. A) Výstavba dělícího vřeténka v živých oocytech exprimujících H2B-mCHERRY (chromosomy) a EGFP-MAP4 (dělící vřeténko). PLK1 je inhibována pomocí BI2534. Šipky ukazují chromosomy nevyrovnané do metafázní roviny. B) Kvantifikace nástupu elongace (bipolarizace) dělícího vřeténka a C) objemu dělícího vřeténka po inhibici PLK1. D) Imunofluorescenční kvantifikace množství endogenního γ-tubulinu a E) endogenního pericentrinu na MTOC pro inhibici PLK1. Převzato z naší práce [10].

V meióze savčích oocytů je funkce AURKB doplňována meioticky specifickou Aurora kinázou C (AURKC). V oocytech tak vedle sebe existují AURKB-CPC a AURKC-CPC, s tím že AURKC zůstává během meiotické maturace stabilní, avšak AURKB stabilita a exprese postupně klesají [57]. AURKC má v oocytech unikátní a s AURKB nepřekrývající se funkci v regulaci aktivity CPC lokalizované do prostoru mezi chromatidami (ICA – *inter-chromatid axis*), dále pak v regulaci srovnání chromosomů do metafázní roviny a ve výstavbě kinetochor-mikrotubul spojení [58]. Aktivace AURKC na chromosomech je závislá na aktivitě Haspin kinázy [59]. Recentně bylo ukázáno, že Haspin-AURKC signalizace je také klíčová pro správné fungování anafázního kontrolního bodu během meiózy I [60].

My jsme ve společné práci s Dr. Karen Schindler (Rutgers University, NJ, USA) ukázali, že Haspin i AURKC lokalizují ne pouze na chromosomy, ale také i na MTOC. Navíc Haspin aktivita je důležitá pro schopnost AURKC lokalizovat na MTOC. Farmakologická inhibice Haspin kinázy (Obrázek 7) nebo inhibice AURKC pomocí exprese dominantně negativní mutanty vede u myších oocytů během výstavby dělícího vřeténka k problémům s klastrováním (sortováním nebo fúzováním) mnohočetných MTOC na dva póly dělícího vřeténka. Pomocí konfokální tříbarevné mikroskopie živých oocytů jsme prokázali, že tyto defekty ve výstavbě dělícího vřeténka jsou asociované s následnými defekty v segregaci chromosomů. Haspin-AURKC signalizace je důležitá ne jenom pouze pro vlastní klastrování MTOC na dva póly dělícího vřeténka, ale i pro udržení integrity již existujících pólů [49].

Lze shrnout, že v několika pracích s kombinací různých experimentálních technik jako jsou farmakologická inhibice, RNA interference, exprese exogenních proteinů z mikroinjekované mRNA, transgenní myší modely a konfokální mikroskopie živých oocytů jsme identifikovali klíčovou roli AURKA, AURKC a PLK1 ve všech fázích výstavby dělícího vřeténka v meióze I savčích oocytů. Velkou otázkou, kterou se nyní zabýváme, je, jakým způsobem AURKA lokalizovaná pouze na MTOC a AURKC a případně i PLK1 lokalizované jak na MTOC tak i chromosomy spolu spolupracují a vzájemně se také ovlivňují během výstavby meiotického dělícího vřeténka.

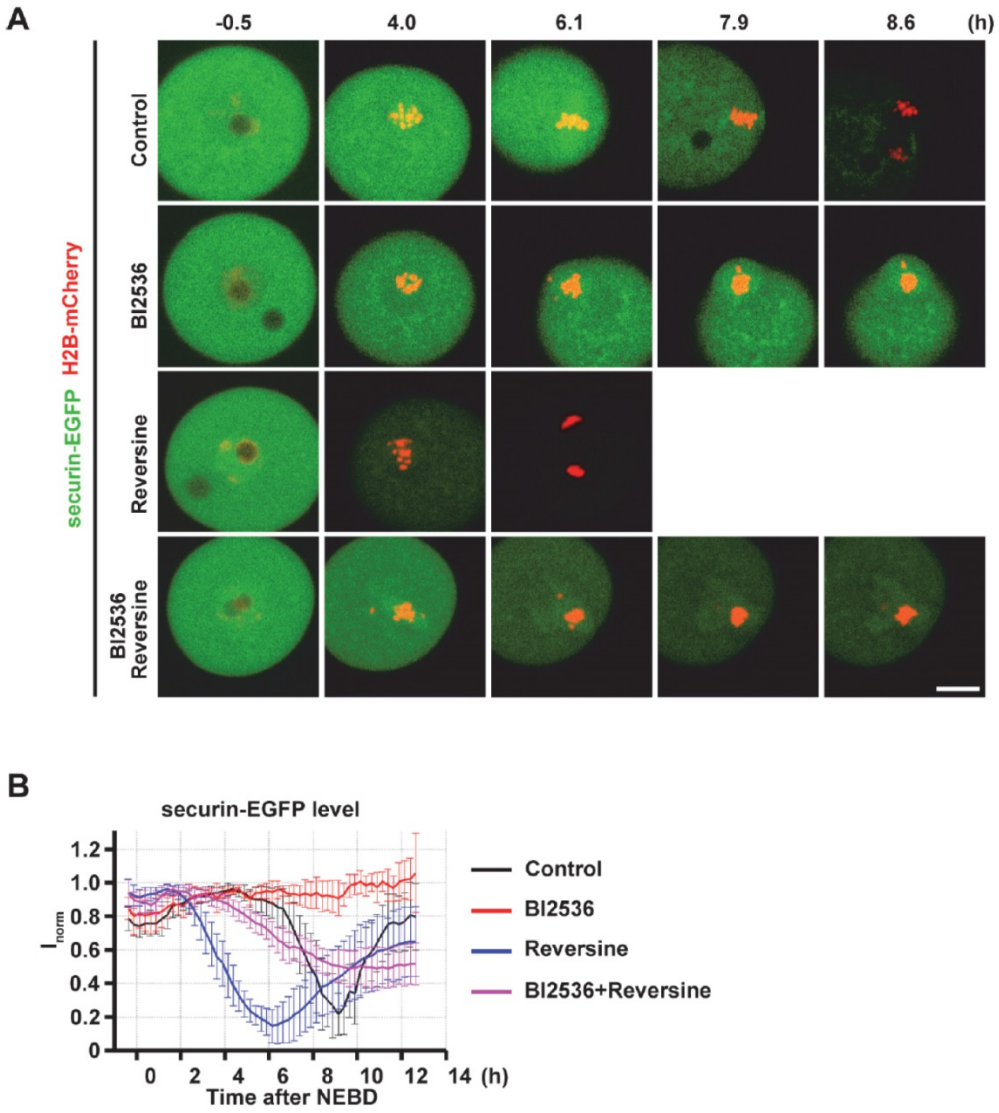
4.3 Anafáze I kontrolní bod a korektní segregace chromosomů

Vstup do anafáze a zahájení segregace chromosomů jsou kontrolovány anafázím kontrolním bodem, někdy také označovaným jako kontrolní bod sestavení dělícího vřeténka (SAC-*spindle assembly checkpoint*). V prometafázi, kdy ještě nejsou vytvořena korektní kinetochor-mikrotubul spojení (biorientace), působí neobsazené kinetochory jako platforma pro aktivaci MAD2 (*mitotic arrest deficient 2*), která je závislá na další klíčové komponentě SAC – kináze MPS1 (*protein kinase monopolar spindle 1*). Aktivovaný MAD2, který následně z kinetochor volně difunduje do cytoplasmy, inhibuje v celé buňce aktivaci E3-ubiquitin ligázy APC (*anaphase-promoting complex*). Tato SAC-dependentní inhibice APC tak zabraňuje destrukci klíčových APC substrátů securin a cyclin B. V okamžiku, kdy dojde na všech chromosomech k vytvoření biorientace, MAD2 se již neváže na kinetochory, SAC zcela přestane být aktivní, a naopak se aktivuje APC. APC indukuje proteasom-dependentní destrukci securinu a cyclinu B. Securin působí jako inhibitor separasy, proteázy, která štěpí kohesiny. Až do zahájení anafáze kohesiny drží u sebe sesterské chromatidy, a v případě meiózy I také homologní chromosomy. Separasa je též inhibována fosforylací pomocí CDK1-

cyclin B. Tedy v momentě, kdy dojde k vypnutí SAC a následně k aktivaci APC, čímž dochází k destrukci cyclinu B a securinu, a následkem toho k poklesu aktivity CDK1 a nárůstu aktivity separasy, buňka vstupuje do anafáze a segreguje chromosomy. I jedna nekorektně připojená kinetochora je schopna udržet SAC aktivitu dostatečně vysokou na zabránění aktivace APC[53].

Savčí oocyty mají funkční SAC, přičemž experimentální inhibice klíčových SAC komponent vede k očekávané akceleraci aktivace APC, k akceleraci vstupu do anafáze a zároveň zvyšuje výskyt aneuploidií [61-63]. Ve srovnání s mitózou, je meióza I myších oocytů relativně dlouhá. Zhruba 3-4 hodiny před vstupem do anafáze dochází k vytvoření stabilních kinetochor-mikrotubul spojením, výraznému poklesu množství MAD2 vázaného na kinetochory (nikoliv však k úplnému vymizení MAD2) a následné aktivaci APC. V tento moment však ne zcela všechny chromosomy vykazují biorientaci, a přesto dochází již k aktivaci APC a zahájení destrukce cyklinu B a sekurinu [64]. Na druhou stranu aktivace APC nedosahuje maximálně možné míry. V momentě, kdy je APC již aktivované, experimentální inhibice molekul zahrnutých do SAC (MPS1 nebo AURKB/AURKC) vede k zdvojnásobení míry aktivace APC, k urychlení vstupu do anafáze o 2 h a především také ke zvýšenému výskytu aneuploidií. V oocytech tedy existuje souběh SAC a APC aktivity, který je důležitý pro zajištění prodloužení meiózy I, což poskytuje čas pro korekci nekorektních kinetochor-mikrotubul spojení a redukci možných aneuploidií [65].

Jak již bylo zmíněno, ukázali jsme, že PLK1 je v oocytech důležitá pro biogenezi MTOC, vytvoření korektních kinetochor-mikrotubul spojení a srovnání chromosomů do metafázní roviny [10]. U všech oocytů s inhibovanou aktivitou PLK1 dochází navíc k trvalému zastavení meiotické maturace v metafázi I a nikdy nedochází ke vstupu do anafáze. Pro objasnění, jestli trvalý blok v metafázi I je způsoben přetrvávající aktivací SAC a neaktivací APC, jsme v oocytech exprimovali securin-EGFP z mikroinjekované mRNA a monitorovali jeho destrukci pomocí konfokální mikroskopie živých oocytů za normálních podmínek, při inhibované PLK1 nebo za situace, kdy byla inhibována jak PLK1, tak i SAC pomocí farmakologické inhibice MPS1 (Obrázek 9). Dle očekávání, v kontrolních oocytech dochází k aktivaci APC, což se projeví destrukcí securin-EGFP, a následně vstupem do anafáze I. U oocytů s inhibovanou PLK1, které všechny zůstávají v metafázi I, nedochází k vůbec k žádné destrukci securin-EGFP a tedy ani k aktivaci APC. U oocytů s inhibovanou aktivitou MPS1, tedy s nefunkčním SAC, dochází dle očekávání předčasné aktivaci APC a předčasnému vstupu do anafáze I. U oocytů s inhibovanou PLK1 a zároveň nefunkčním SAC (MPS1 inhibice) však dochází pouze k částečné destrukci securin-EGFP a tedy částečné aktivaci APC. Hladina securin-EGFP v těchto oocytech však nedosáhne ani se zpožděním minima, kterého jinak dosáhne v kontrolních oocytech. Oocyty s inhibovanou PLK1 a současně nefunkčním SAC tak také nevstupují do anafáze I. Tato data ukazují, že PLK1 je nezbytná pro plnou aktivaci APC nezávisle na satisfakci SAC. Jinak řečeno, oocyty s inhibovanou PLK1 aktivitou, a tedy s defekty ve výstavbě dělícího vřeténka a s problémy s kinetochor-mikrotubul spojeními, zůstávají blokovány v metafázi I ne jenom kvůli přetrvávající aktivaci SAC [10].

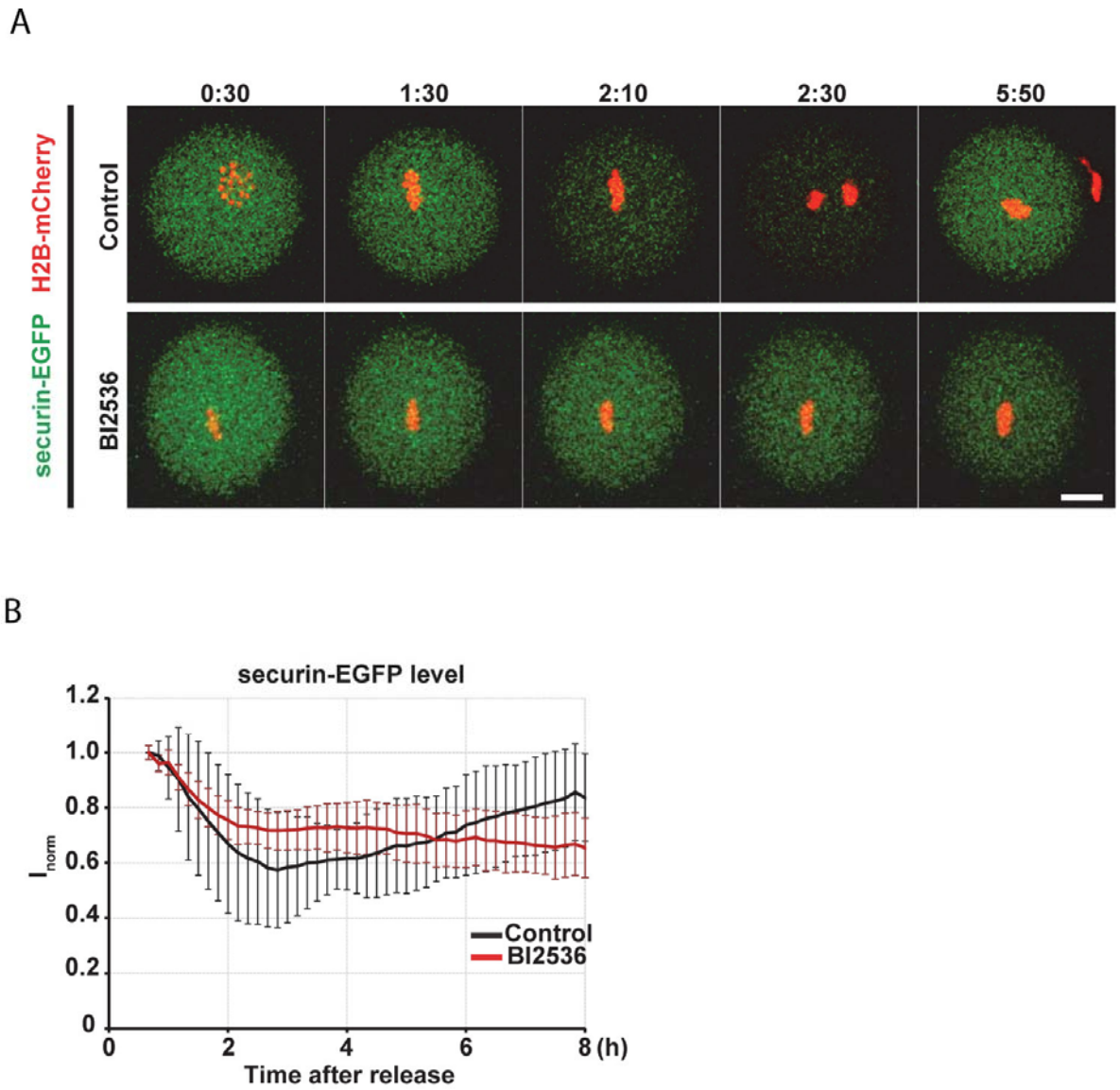


Obrázek 9: PLK1 je důležitá pro aktivaci APC nezávisle na SAC satisfakci. A) Vizualizace destrukce securin-EGFP v živých kontrolních, PLK1 inhibovaných (BI2536), SAC inhibovaných (reversine) a PLK1+SAC inhibovaných (BI2536 + reversine) oocytech. B) Kvantifikace destrukce securin-EGFP. Převzato z naší práce [10].

Ve snaze identifikovat PLK1-dependentní signální dráhy zodpovědné za aktivaci APC nezávisle na uspokojení SAC, jsme se zaměřili na destrukci APC inhibitoru EMI1 (*early mitotic inhibitor-1*), který je za normálních okolností destruován po znovuzahájení meiózy [66]. Prokázali jsme, že PLK1 fosforyluje EMI1 na S145 a S128 a tyto fosforylace jsou důležité pro degradaci EMI1. V PLK1 inhibovaných oocytech tak nedochází k efektivní destrukci EMI1. PLK1 se tak indukcí destrukce EMI podílí na aktivaci APC [10].

Dále jsme se zabývali hypotetickou možností, že existují ještě další PLK1-dependentní dráhy, které vedou k plné aktivaci APC. Pro objasnění této možnosti jsme oocyty exprimující securin-EGFP a H2B-mCHERRY kultivovali do pozdní metafáze I a teprve v tento mement přidali PLK1 inhibitor (Obrázek 10). V tento okamžik je již EMI1 zdestruován a SAC vypnut. Velkým překvapení bylo, že i za těchto podmínek dochází pouze k částečné destrukci securin-EGFP a oocyty zůstávají zastaveny v metafázi I. Lze tedy konstatovat, že existuje ještě třetí

PLK1-dependentní signální dráha vedoucí k aktivaci APC, která je nezávislá jak na satisfakci SAC, tak i destrukci EMI1 [10].



Obrázek 10: PLK1 je důležitá pro plnou aktivaci APC nezávisle na satisfakci SAC a destrukci EMI. A) Vizualizace destrukce securin-EGFP v živých kontrolních a PLK1 inhibovaných (BI2536) oocytech s tím, že BI2536 byl přidán až v pozdní metafázi I. B) Kvantifikace destrukce securin-EGFP. Převzato z naší práce [10].

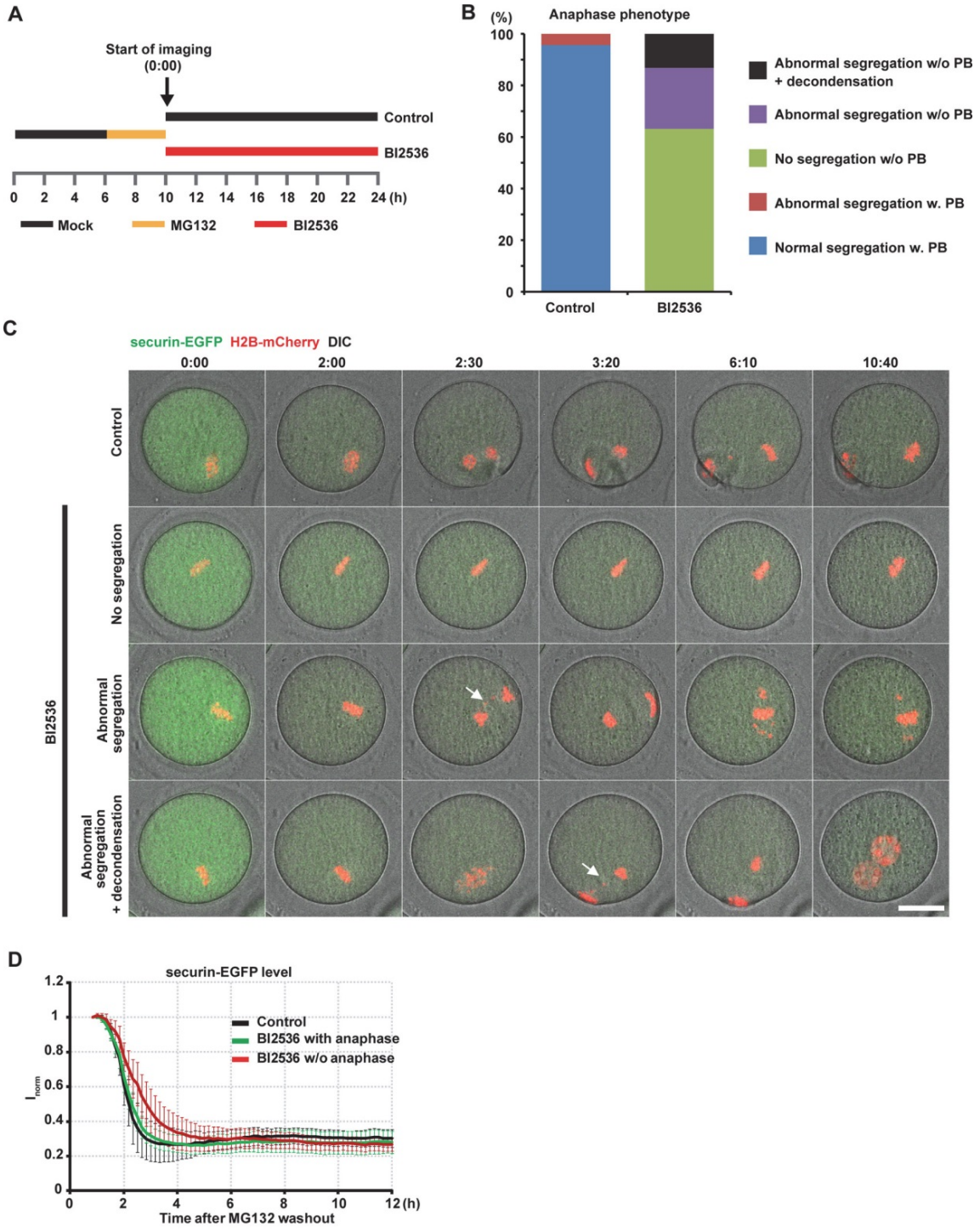
Dále jsme se zaměřili na možnost, že PLK1 je možná také důležitá pro segregaci chromosomů zcela nezávisle na aktivaci APC. Z těchto důvodů jsme oocyty exprimující securin-EGFP kultivovali *in vitro* v kontrolním médiu po dobu 6 hod, kdy již dosáhnou metafáze I. V tento moment jsme do média přidali inhibitor proteasomu (MG132) a kultivovali je další 4 hod. Po této *in vitro* kultivaci v přítomnosti MG132 se oocyty nachází na rozhraní metafáze I a anafáze I. V tento okamžik je SAC uspokojen, APC substráty jsou z velké části již ubiquitinylovány a oocyty nevstupují do anafáze I pouze kvůli nemožnosti destruovat APC substráty v proteasomu. Za těchto podmínek dochází po odmytí MG132 u kontrolních oocytů k rychlé destrukci securin-EGFP, segregaci chromosomů a vydělení prvního pólové tělíska (Obrázek 11). V případě, že po odmytí MG132 jsou oocyty navíc

ošetřeny PLK1 inhibitorem, lze u části oocytů pozorovat destrukci securin-EGFP neodlišitelnou od situace u kontrolních oocytů. Všechny tyto oocyty však vykazují závažné defekty v segregaci chromosomů. Navíc u části oocytů lze po defektní segregaci chromosomů pozorovat dekondenzaci chromatinu a tvorbu struktur připomínajících prvojádra. U zbylé části oocytů s inhibovanou PLK1 dochází k mírně pomalejší destrukci securin-EGFP, ale i tak tyto oocyty dosáhnou stejné minimální hladiny securin-EGFP jako oocyty kontrolní. Tyto oocyty však vůbec nezahájí anafázi provázenou segregací chromosomů. V souhrnu je tak PLK1 důležitá také pro vlastní segregaci chromosomů nezávisle na aktivaci APC a zároveň je důležitá pro udržení kondenzovaného stavu chromosomů během přechodu z meiózy I do meiózy II [10].

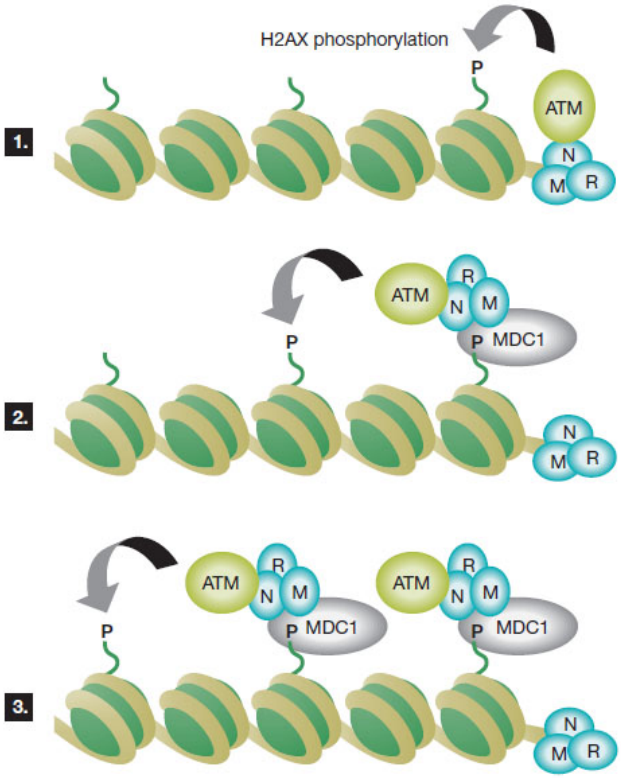
4.4 Integrita chromosomů a odpověď na DNA poškození během meiotické maturace

Korektní výstavba dělícího vřeténka a funkčnost SAC jsou klíčové předpoklady pro správnou segregaci chromosomů. Missegregace celých chromosomů (aneuploidie) však představují jen část možného rizika pro integritu genomu oocytu během meiotické maturace. Dalším vážným rizikem jsou dvouřetězcové DNA zlomy (DSB - *double-strand DNA breaks*), které představují nejzávažnější typ DNA lézi. Neopravení DSB může vést ke ztrátě genetické informace, nekorektní oprava pak ke změně genetické struktury chromosomů (např. chromosomální translokace). DSB mohou v buňce vzniknout jako následek metabolických procesů (např. kyslíkové radikály), při DNA transakcích (replikace, transkripce), v důsledku deregulace buněčného cyklu anebo také v důsledku exogenního genotoxického stresu (např. ionizující záření). Pro ochranu před DSB buňky disponují tzv. odpovědí na DNA poškození (DDR – *DNA damage response*), která zahrnuje detekci DSB, zpomalení nebo zastavení buněčného cyklu pomocí aktivace kontrolních bodů, a indukci reparace DNA. V případě, že poškození DNA je příliš vysoké a neopravitelné, buňky vstupují do senescence nebo apoptosy [67].

Komplex molekul MRE11, RAD50 a NBS1 hraje důležitou roli jak v detekci DSB, tak i v následné opravě [68]. MRN působí jako rychlý sensor DSB, který se váže na DSB a aktivuje kinázu ATM (*ataxia telangiectasia mutated*) (Obrázek 12). ATM fosforyluje histon H2AX na Ser 139, čímž vzniká tzv. γH2AX. γH2AX je následně rozpoznán adaptorovým proteinem MDC1, který má schopnost rekrutovat další komplexy MRN, které pak stimulují aktivitu dalších molekul ATM. Tímto způsobem se iniciuje pozitivní zpětná vazba, která vede k propagaci γH2AX kolem jednoho DSB, čímž vznikají tzv. γH2AX foci detekovatelná i světelnou fluorescenční mikroskopií [69-72]. MRN následně navozuje reparaci DSB pomocí homologní rekombinace (HR - *homology recombination*), nehomologního spojování konců (NHEJ - *non-homologous end-joining*) a případně i pomocí alternativního spojování konců (a-NHEJ - *alternative non-homologous end-joining*) [68].



Obrázek 11: PLK1 je důležitá pro segregaci chromosomů a udržení kondenzovaného stavu chromosomů v přechodu mezi metafází I a metafází II. A) Schéma experimentu – detaily v textu. B) Kvantifikace výskytu jednotlivých fenotypů po inhibici PLK1. C) Vizualizace destrukce securin-EGFP v živých kontrolních a PLK1 inhibovaných (BI2536) oocytech s tím, že BI2536 byl přidán až na rozhraní metafáze I/anafáze I (viz. schéma). Kvantifikace destrukce securin-EGFP. Převzato z naší práce [10].



Obrázek 12: Schéma modelu fosforylace histonu H2AX kolem vzniklého DSB. Převzato z [73].

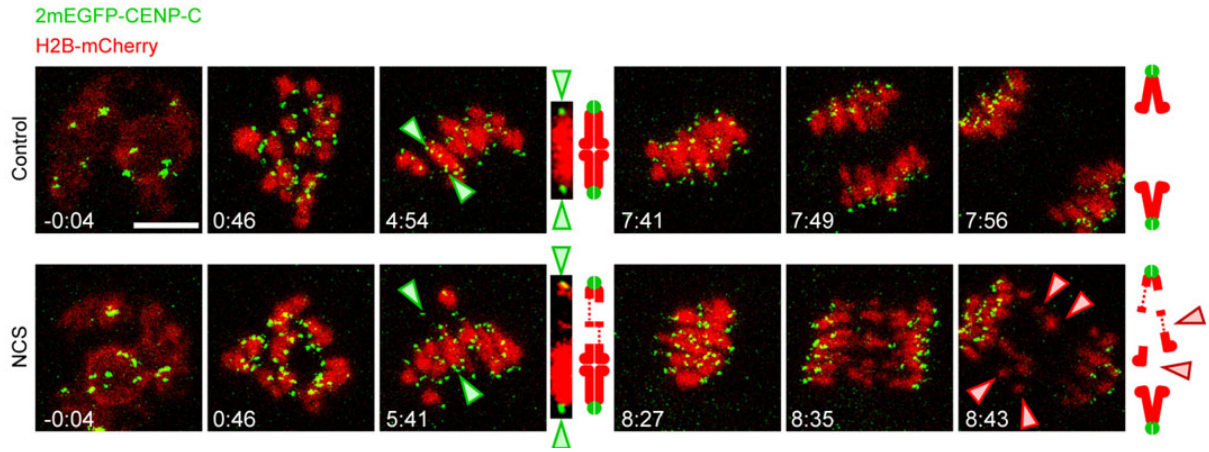
V oocytech dochází k přirozené formaci DSB během zygoten stádia aktivitou SPO11 nukleasy, která je nezbytná pro meiotickou rekombinaci homologních chromosomů [74]. Oocyty v profázi I během svého růstu ve folikulu jsou schopny opravovat případně vzniklé DSB [75].

Relativně málo informací je však známo o DDR během vlastní meiotické maturace. Přičemž z pohledu integrity genomu se jedná o velmi důležité období, protože představuje prakticky poslední možnost opravit DSB nechybovou HR před tím, než dojde k oplození a zahájení raného vývoje embrya. V naší práci jsme se zaměřili na otázky: Jakým způsobem odpovídají oocyty během meiotické maturace na zvýšené množství DSB? Dochází po indukci DSB k aktivaci kontrolních bodů buněčného cyklu a zastavení (zpomalení) průchodem meiotickou maturací? Hraje MRN komplex nějakou roli v ochraně integrity chromosomů během meiotické maturace oocytů?

Ukázali jsme, že oocyty zastavené v *in vitro* podmínkách v profázi I pomocí farmakologické inhibice PDE3A jsou schopné detekovat nové DSB indukované radiomimetickou drogou neocarcinostatinem (NCS). Ošetření oocytů pomocí NCS vede ke koncentračně závislému nárůstu γH2AX/MDC1 foci, která jsou v oocytech dobře detekovatelná a kvantifikovatelná pomocí nepřímé imunofluorescence a konfokální mikroskopie. Oocyty ošetřené NCS, které tak mají větší množství DSB, mají normální kinetiku znovuzahájení meiózy, což ukazuje, že v oocytech nedochází po vzniku DSB k aktivaci kontrolního bodu (G2 kontrolní bod), který by zpomalil či zastavil znovuzahájení meiózy [76]. Tato skutečnost je v zásadním rozdílu proti chování somatických buněk, které na DSB reagují aktivací G2 kontrolního bodu, který odloží vstup do mitózy [70]. Toto naše

zjištění je v souladu se zjištěním jiné skupiny, která také ukázala, že nově indukované DSB v profáze I oocytech neovlivňují znovuzahájení meiózy a že k aktivaci ATM dependentního G2 kontrolního bodu dochází pouze při skutečně extrémním množství DSB [77], které je zcela vzdáleno od množství DSB, která mohou nastat v oocytu za normální situace.

Dále jsme prokázali, že zvyšující se množství DSB (v rozsahu od cca 10 DSB odpovídajícím normální situaci v kontrolní skupině, až po situaci s cca 40-50 DSB) neovlivňuje časování aktivace APC a vstupu do anafáze I. Je však zajímavé, že za situace, kdy jsou oocyty ošetřené nízkou dávkou NCS (10 ng/ml), což vede k cca 2.5 násobnému nárůstu množství DSB ve srovnání s kontrolní skupinou, pouze jedna čtvrtina oocytů vykazuje defekty v segregaci chromosomů. Znamená to tedy, že nízká dávka NCS indukuje relativně malé množství DSB, které umožnuje studium fyziologicky relevantní DDR v oocytech a které je zároveň tak malé, že umožnuje opravu DSB a případně jiné DNA transakce ochraňující integritu chromosomů. Pouze za situace, kdy na začátku meiotické maturace se v oocytu nachází velmi vysoké množství DSB (~100 DSB), dochází k opožděné aktivaci APC a opožděnému vstupu do anafáze I. Na druhou stranu jsme prokázali, že zvyšující se množství DSB v profáze I oocytech vede k nárůstu defektů v segregaci chromosomů v anafázi I. Pomocí konfokální mikroskopie živých oocytů exprimujících H2B-mCHERRY (marker chromosomů) a 2mEGFP-CENP-C (marker kinetochor) s využitím vysokého rozlišení a technologie sledování kinetochor (*kinetochor tracking*) jsme zjistili, že v absolutní většině případů jsou defekty v segregaci chromosomů po zvýšení množství DSB představovány fragmentací chromosomů (Obrázek 13). Je zajímavé, že tato fragmentace nenastane v prometafázi I, ale nastane až během metafáze I a hlavně anafáze I, pravděpodobně jako důsledek velkého mechanického namáhání chromosomů a možná i souběžného odstranění kohesinů [76].

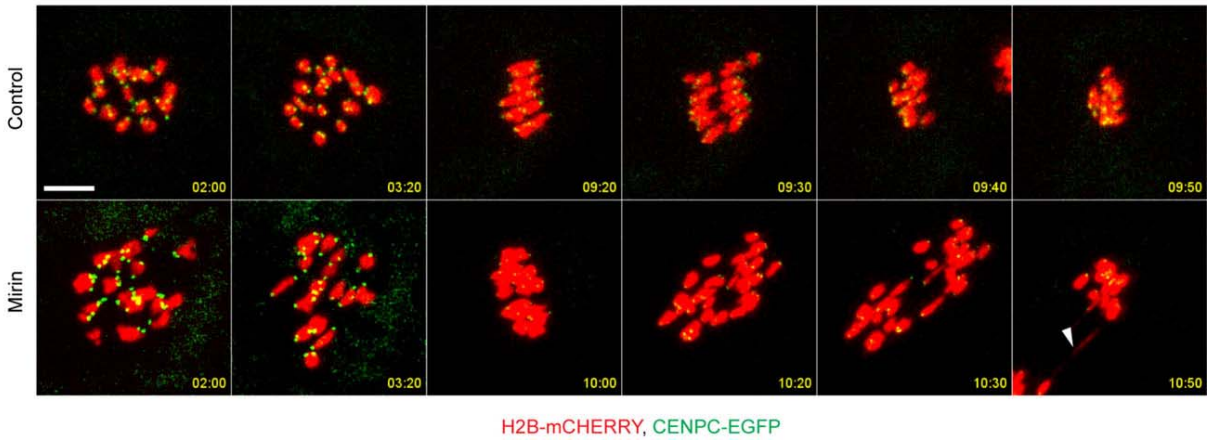


Obrázek 13: Fragmentace chromosomů po zvýšeném množství DSB. Segregace chromosomů v živých oocytech exprimujících H2B-mCHERRY (chromosomy) a 2mEGFP-CENP-C (kinetochory). Šipky ukazují fragmentaci chromosomů. DSB byly indukovány v profázi I pomocí NCS. Převzato z naší práce [76].

Zjistili jsme také, že u kontrolních oocytů i oocytů po šetření NCS dochází k poklesu množství γH2AX foci během meiotické maturace. Metafáze II oocyty tak mají vždy méně γH2AX foci než oocyty v profázi I. Zároveň v momentě, kdy jsme farmakologickou inhibicí MRE11 narušili fungování MRN komplexu během meiotické maturace, jsme detekovali

zvýšené množství γH2AX foci u metafáze II oocytů [76]. Vzhledem k tomu, že MRN je důležitý jak pro detekci DSB tak i zahájení jejich opravy [68], naše data indukují, že je možné, že během meiotické maturace probíhá reparace DSB. Pokud je toto skutečně pravda, pak je situace během meiotické maturace zcela odlišná od mitózy, kdy naopak dochází k cílenému utlumení oprav DSB [78-80].

S využitím výše popsané technologie sledování kinetochor jsme se pokusili identifikovat strukturální podstatu defektů v segregaci chromosomů po farmakologické inhibici MRE11. V případě, že bychom identifikovali fragmentaci chromosomů, lze uvažovat o problému opravovat DSB. Identifikace klasických missegregací (aneuploidií) by poukazovala na problém ohledně kinetochor-mikrotubul spojení, případě SAC. Další možností jsou anafázní DNA můstky, které ukazují na nekorektní reparaci DSB, případně také fúzi telomer. Zjistili jsme, že ve všech případech, kdy MRE11 inhibované oocyty vykazovaly defekty v segregaci chromosomů, se jedná o anafázní můstky (Obrázek 14). Přítomnost těchto můstků nakonec vede k fragmentaci chromosomů, a tedy vzniku nových DSB, což je v souladu s naším zjištěním o větším počtu γH2AX foci [76].



Obrázek 14: MRE11 je důležitá pro integritu chromosomů. Segregace chromosomů v živých oocytech exprimujících H2B-mCHERRY (chromosomy) a 2mEGFP-CENP-C (kinetochory). Šipka ukazuje anafázní DNA můstek. MRE11 aktivita byla inhibovaná farmakologicky (mirin). Převzato z naší práce [76].

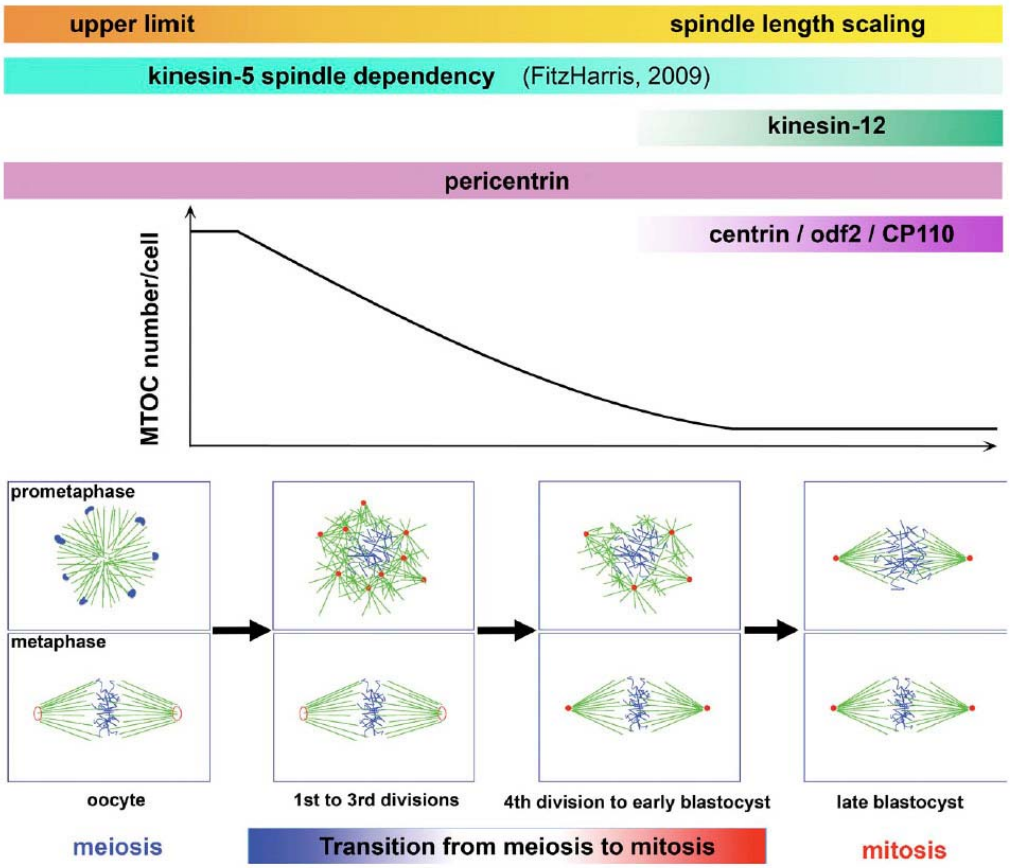
V souhrnu lze tedy konstatovat, že pokud dochází mezi profází I a metafází II k poklesu γH2AX foci a zároveň inhibice aktivity klíčového komplexu MRN vede k nárůstu γH2AX foci v metafázi II, lze se důvodně domnívat, že během meiotické maturace dochází k opravám DSB. Tato možnost by byla v souladu se zjištěními, že indukce DNA poškození pomocí UV iradiace vede u oocytů během maturace k detekovatelné DNA syntéze [81, 82] a recentním zjištěním o důležité roli RAD51 během meiotické maturace [83, 84]. Vzhledem k tomu, že během maturace oocytů neprobíhá replikace DNA, lze toto pozorování vysvětlit DNA syntézou spojenou s reparací DNA. Pokud tedy během meiotické maturace oocytů skutečně probíhá reparace DNA, vyvolává to do budoucna celou řadu zajímavých otázek jako např.: Jaký typ reparace DSB se uplatňuje? Pokud je to HR, používá se jako templát pro opravu sesterská chromatida nebo homologní chromosom? Když je možná reparace DSB, proč indukce nových zlomů v profázi I nevede k aktivaci G2 kontrolního bodu, který by

poskytl čas na opravu DSB? Je možné, že oprava během maturace v metafázi I je efektivnější než v profáze I? – To by pak vysvětlovalo absenci G2 kontrolního bodu.

4.5 Výstavba dělícího vřeténka a segregace chromosomů během prvního mitotického dělení

Z čistě formálního pohledu se hned od oplození dělí rané embryo mitózou. Během anafáze tak segregují sesterské chromatidy. Z pohledu mechanismu výstavy dělícího vřeténka by však v mitóze měly být póly dělícího vřeténka tvořeny dvěma centrosomy, které obsahují vždy dvě centrioly. Avšak jak již bylo řečeno, oocyt už během meiotické maturace neobsahuje klasické centrosomy a funkci centrosomů přebírají mnohočetná MTOC centra [6]. U rodentů dochází navíc k zániku centrioly i během spermiogeneze [85]. Spermie tak nemůže do zygoty přinést funkční centrosom. Kromě toho morfologicky (hodnoceno elektronovou mikroskopií) lze detekovat v raném myším embryu centrioly až ve stádiu blastocysty [46].

V zygotě se vyskytuje velké množství acentriolárních MTOC, která se podílí na výstavbě dělícího vřeténka mechanismem velmi podobným výstavbě dělícího vřeténka oocytů v meióze I. Později v dalších buněčných děleních dochází k postupnému přechodu z meiotického MTOC-dependentního dělícího vřeténka na mitotické centrosom-dependentní dělící vřeténko (Obrázek 15). Teprve v blastocystě se tak vyskytuje klasické mitotické dělící vřeténko, kdy dva centrosomy tvoří jeho póly [9].



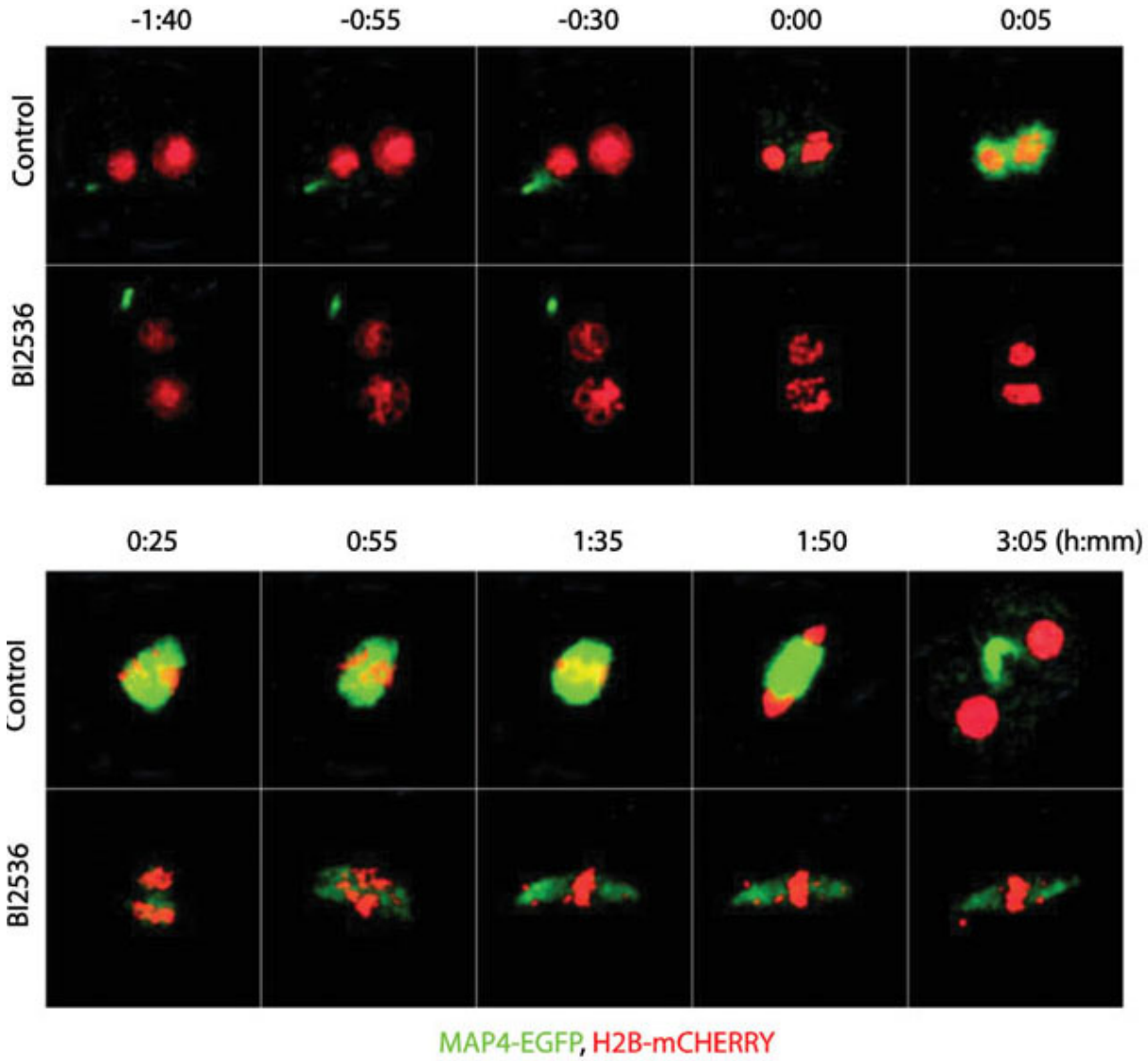
Obrázek 15: Postupný přechod z meiotického MTOC dependentního dělícího vřeténka na mitotické dělící vřeténko s centrosomy obsahujícími centrioly. Převzato z [9].

Protože jsme identifikovali PLK1 a AURKA signalizaci jako klíčové signální dráhy důležité pro korektní výstavbu meiotického dělícího vřeténka v oocytech [10, 38, 39], zajímalo nás také, jakou roli hrají tyto dráhy během první mitózy zygoty. U klasické centrosom dependentní mitózy je PLK1 zcela nezbytná po bipolarizaci dělícího vřeténka a absence PLK1 aktivity vede ke vzniku defektního dělícího vřeténka, které způsobuje permanentní aktivaci SAC. Blok v prometafázi/metafázi u PLK1 inhibovaných buněk lze zrušit, a umožnit tak vstup do anafáze, současnou inhibicí SAC [52]. Na druhou stranu u oocytů v meióze I PLK1 není zcela nezbytná pro bipolarizaci dělícího vřeténka, ale je však nezbytná pro plnou aktivaci APC nezávisle na satisfakci SAC. Blok v metafázi I u PLK1 inhibovaných oocytů tak nelze překonat souběžnou inhibicí SAC [10]. A jaká je tedy situace u zygot, které se sice formálně dělí mitoticky, ale vlastní dělící vřeténko vykazuje spíše základní charakteristiky dělícího vřeténka oocytů v meióze I?

Zjistili jsme, že PLK1 je na úrovni proteinu v zygotě exprimována již krátce po oplození a během průchodu první buněčným cyklem dochází k další akumulaci PLK1 s tím, že v první mitóze exprese dosahuje lokálního maxima a následně dochází k prudkému poklesu exprese PLK1 při rozdělení na 2-buněčné embryo. Těsně před vstupem do první mitózy dochází k aktivaci PLK1 na MTOC a také v jádře. V metafázi první mitózy se aktivní PLK1 nachází na MTOC (pólech dělícího vřeténka) a mitotických chromosomech. V případě, že je PLK1 farmakologicky inhibována, dochází ke vstupu do mitózy v čase srovnatelném s kontrolními zygotami, avšak je významně zpožděn nástup tvorby dělícího vřeténka. Nakonec se však vytvoří bipolární dělící vřeténko, které je zřetelně morfologicky abnormální a část chromosomů není vyrovnána do metafázní roviny (Obrázek 16). PLK1 inhibované zygoty ani se zpožděním neaktivují APC. Souběžná farmakologická inhibice SAC pomocí inhibice kinázy MPS1 neumožní těmto zygotám vstoupit do anafáze. Lze tak shrnout, že PLK1 není nezbytná pro vstup do mitózy, je však důležitá pro korektní výstavbu dělícího vřeténka a srovnání chromosomů do metafázní roviny. Navíc je PLK1 nezbytná pro aktivaci APC a vstup do anafáze nezávisle na satisfakci SAC [86, 87]. Přestože se tedy zygota dělí mitoticky, funkce PLK1 během této první mitózy je spíše podobná funkci PLK1 v meióze I než funkci PLK1 v somatických mitotických buňkách.

Dále jsme ukázali, že tak jako v oocytech, tak i v zygotách se aktivní AURKA lokalizuje během první mitózy na MTOC. Zygoty s inhibovanou aktivitou sice vstupují do mitózy, ale mají signifikantně prodlouženou dobu, kterou potřebují na vstup do anafáze. Toto zjevně souvisí s tím, že AURKA inhibované zygoty mají opožděný nástup tvorby dělícího vřeténka a vytvořené vřeténko vykazuje silné defekty. I přesto však nakonec většina zygot vstupuje do anafáze a dělí se za vzniku 2-buněčného embrya. Segregace chromosomů je však defektní, vede k aneuploidiím a vzniku mikrojader. Dle očekávání se AURKA inhibovaná embrya dále špatně vyvíjí a prakticky nejsou schopna dosáhnout 8-buněčného stádia [88]. Funkce AURKA v první mitóze je tak prakticky identická s funkcí AURKA v meióze I.

V určitém zobecnění můžeme konstatovat, že v mnoha aspektech je mechanismus tvorby dělícího vřeténka a průchod mitózou (vstup do anafáze) v mitoticky se dělících zygotách více podobný meióze I oocytů než mitóze somatických buněk.



Obrázek 16: Výstavba dělícího vřeténka v zygotách je závislá na aktivitě PLK1. Výstavba dělícího vřeténka v živých zygotách exprimujících H2B-mCHERRY (chromosomy) a MAP4-EGFP (dělící vřeténko). PLK1 je inhibována pomocí BI2534. Převzato z naší práce [86].

5 Shrnutí a stručný výhled pro budoucí práci

Jak je vidět z předešlých kapitol, můj odborný zájem začínal na problematice buněčné signalizace regulující znovuzahájení meiózy, dále se pak posunul na problematiku regulace buněčného cyklu během celé meiotické maturace oocytů s akcentem na výstavbu dělícího vřeténka a segregaci chromosomů. V poslední době jsem se též zaměřil na odpověď oocytů na poškození DNA. Právě problémy v segregaci chromosomů a nárůst poškození DNA oocytů představují jednu z hlavních příčin neplodnosti u lidí a dávají tak našemu výzkumnému snažení propojení s reprodukční medicínou a genetikou. V současné době jsem svůj výzkum rozšířil i o problematiku odpovědi na DNA poškození u raných embryí, protože detekce DNA poškození a jeho oprava je v těchto embryích zcela závislá na maternálně exprimovaných faktorech přicházejících z oocytu. Navíc naše současné poznatky jasně naznačují, že problematika integrity genomu v oocytech a raných embryích je velmi spojena. Pozorujeme, že DNA poškození vzniklé a detekované v jedné fázi vývoje oocytu nebo embrya vede ke

změnám v regulaci buněčného cyklu až v dalších fázích vývoje a též oprava vlastního DNA poškození může přijít až později.

Nejnovějším rozvíjeným tématem je pak problematika odpovědi na DNA poškození u Huntingtonovy choroby s důrazem na výzkum odpovědi na DNA dvouřetězcové zlomy u primárních buněk získaných ze zvířecích modelů, ale také od lidských pacientů. Byť se může na první pohled jednat o zcela odlišné téma, s předchozími tématy se tu vhodně kombinují například techniky mikroskopie primárních buněk, FRET biosensorů a laserové mikroiradiace. Lze tak shrnout, že můj současný odborný zájem se zaměřuje na dynamiku a integritu chromosomů ve vztahu ke dvěma závažným lidským onemocněním – neplodnosti a neurodegeneraci.

Z metodického hlediska považuji za zásadní další rozvoj metod mikroskopie živých buněk, kdy bych rád kromě konfokální mikroskopie rozvíjel i tzv. *light sheet* mikroskopii (SPIM - *Selective Plane Illumination Microscopy*), která vyniká svojí minimální fytotoxicitou a rychlostí snímání. Možnosti nové SPIM mikroskopie a zároveň možnosti snadnější tvorby geneticky upravených zvířecích modelů (fluorescenčně reportérové kmeny, knock-out, knock-in) pomocí CRISPR/Cas9 technologie tak otvírají zcela nové možnosti v oblasti vývojové a buněčné biologie.

6 Reference

1. Clarke, H.J., *Regulation of germ cell development by intercellular signaling in the mammalian ovarian follicle.* Wiley Interdiscip Rev Dev Biol, 2017.
2. Li, R. and D.F. Albertini, *The road to maturation: somatic cell interaction and self-organization of the mammalian oocyte.* Nat Rev Mol Cell Biol, 2013. 14(3): p. 141-52.
3. Rodrigues, P., et al., *Oogenesis: Prospects and challenges for the future.* J Cell Physiol, 2008. 216(2): p. 355-65.
4. Mitra, J. and R.M. Schultz, *Regulation of the acquisition of meiotic competence in the mouse: changes in the subcellular localization of cdc2, cyclin B1, cdc25C and wee1, and in the concentration of these proteins and their transcripts.* J Cell Sci, 1996. 109 (Pt 9): p. 2407-15.
5. Solc, P., R.M. Schultz, and J. Motlik, *Prophase I arrest and progression to metaphase I in mouse oocytes: comparison of resumption of meiosis and recovery from G2-arrest in somatic cells.* Mol Hum Reprod, 2010. 16(9): p. 654-64.
6. 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.
7. Clift, D. and M. Schuh, *Restarting life: fertilization and the transition from meiosis to mitosis.* Nat Rev Mol Cell Biol, 2013. 14(9): p. 549-62.
8. Artus, J. and M. Cohen-Tannoudji, *Cell cycle regulation during early mouse embryogenesis.* Mol Cell Endocrinol, 2008. 282(1-2): p. 78-86.
9. Courtois, A., et al., *The transition from meiotic to mitotic spindle assembly is gradual during early mammalian development.* J Cell Biol, 2012. 198(3): p. 357-70.
10. Solc, P., et al., *Multiple requirements of PLK1 during mouse oocyte maturation.* PLoS One, 2015. 10(2): p. e0116783.
11. Lincoln, A.J., et al., *Cdc25b phosphatase is required for resumption of meiosis during oocyte maturation.* Nat Genet, 2002. 30(4): p. 446-9.
12. 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.
13. Horner, K., et al., *Rodent oocytes express an active adenylyl cyclase required for meiotic arrest.* Dev Biol, 2003. 258(2): p. 385-96.
14. 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.
15. Mehlmann, L.M., T.L. Jones, and L.A. Jaffe, *Meiotic arrest in the mouse follicle maintained by a Gs protein in the oocyte.* Science, 2002. 297(5585): p. 1343-5.
16. Mehlmann, L.M., et al., *The Gs-linked receptor GPR3 maintains meiotic arrest in mammalian oocytes.* Science, 2004. 306(5703): p. 1947-50.
17. Norris, R.P., et al., *A G(s)-linked receptor maintains meiotic arrest in mouse oocytes, but luteinizing hormone does not cause meiotic resumption by terminating receptor-G(s) signaling.* Dev Biol, 2007. 310(2): p. 240-9.

18. Masciarelli, S., et al., *Cyclic nucleotide phosphodiesterase 3A-deficient mice as a model of female infertility.* J Clin Invest, 2004. 114(2): p. 196-205.
19. Bornslaeger, E.A., P. Mattei, and R.M. Schultz, *Involvement of cAMP-dependent protein kinase and protein phosphorylation in regulation of mouse oocyte maturation.* Dev Biol, 1986. 114(2): p. 453-62.
20. 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.
21. Zhang, Y., et al., *Protein kinase A modulates Cdc25B activity during meiotic resumption of mouse oocytes.* Dev Dyn, 2008. 237(12): p. 3777-86.
22. 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.
23. Kalab, P., P. Solc, and J. Motlik, *The role of RanGTP gradient in vertebrate oocyte maturation.* Results Probl Cell Differ, 2011. 53: p. 235-67.
24. Chen, M.S., et al., *Absence of apparent phenotype in mice lacking Cdc25C protein phosphatase.* Mol Cell Biol, 2001. 21(12): p. 3853-61.
25. Solc, P., et al., *CDC25A phosphatase controls meiosis I progression in mouse oocytes.* Dev Biol, 2008. 317(1): p. 260-9.
26. Mailand, N., et al., *Regulation of G(2)/M events by Cdc25A through phosphorylation-dependent modulation of its stability.* EMBO J, 2002. 21(21): p. 5911-20.
27. Kalous, J., et al., *PKB/AKT is involved in resumption of meiosis in mouse oocytes.* Biol Cell, 2006. 98(2): p. 111-23.
28. Andersen, C.B., R.A. Roth, and M. Conti, *Protein kinase B/Akt induces resumption of meiosis in Xenopus oocytes.* J Biol Chem, 1998. 273(30): p. 18705-8.
29. Andersen, C.B., et al., *Protein kinase B/Akt is essential for the insulin- but not progesterone-stimulated resumption of meiosis in Xenopus oocytes.* Biochem J, 2003. 369(Pt 2): p. 227-38.
30. Baldin, V., et al., *PKB/Akt phosphorylates the CDC25B phosphatase and regulates its intracellular localisation.* Biol Cell, 2003. 95(8): p. 547-54.
31. 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.
32. Kalous, J., et al., *AKT (protein kinase B) is implicated in meiotic maturation of porcine oocytes.* Reproduction, 2009. 138(4): p. 645-54.
33. Hoshino, Y. and E. Sato, *Protein kinase B (PKB/Akt) is required for the completion of meiosis in mouse oocytes.* Dev Biol, 2008. 314(1): p. 215-23.
34. 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.
35. 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.
36. 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.

37. Sarkissian, M., R. Mendez, and J.D. Richter, *Progesterone and insulin stimulation of CPEB-dependent polyadenylation is regulated by Aurora A and glycogen synthase kinase-3.* Genes Dev, 2004. 18(1): p. 48-61.
38. Saskova, A., et al., *Aurora kinase A controls meiosis I progression in mouse oocytes.* Cell Cycle, 2008. 7(15): p. 2368-76.
39. Solc, P., et al., *Aurora kinase A drives MTOC biogenesis but does not trigger resumption of meiosis in mouse oocytes matured in vivo.* Biol Reprod, 2012. 87(4): p. 85.
40. 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.
41. Lewandoski, M., K.M. Wassarman, and G.R. Martin, *Zp3-cre, a transgenic mouse line for the activation or inactivation of loxP-flanked target genes specifically in the female germ line.* Curr Biol, 1997. 7(2): p. 148-51.
42. 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.
43. 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.
44. Lobjois, V., et al., *The polo-like kinase 1 regulates CDC25B-dependent mitosis entry.* Biochim Biophys Acta, 2009. 1793(3): p. 462-8.
45. Carabatsos, M.J., et al., *Sorting and reorganization of centrosomes during oocyte maturation in the mouse.* Microsc Res Tech, 2000. 49(5): p. 435-44.
46. Gueth-Hallonet, C., et al., *gamma-Tubulin is present in acentriolar MTOCs during early mouse development.* J Cell Sci, 1993. 105 (Pt 1): p. 157-66.
47. Clift, D. and M. Schuh, *A three-step MTOC fragmentation mechanism facilitates bipolar spindle assembly in mouse oocytes.* Nat Commun, 2015. 6: p. 7217.
48. Breuer, M., et al., *HURP permits MTOC sorting for robust meiotic spindle bipolarity, similar to extra centrosome clustering in cancer cells.* J Cell Biol, 2010. 191(7): p. 1251-60.
49. Balboula, A.Z., et al., *Haspin kinase regulates microtubule-organizing center clustering and stability through Aurora kinase C in mouse oocytes.* J Cell Sci, 2016. 129(19): p. 3648-3660.
50. Dumont, J., et al., *A centriole- and RanGTP-independent spindle assembly pathway in meiosis I of vertebrate oocytes.* J Cell Biol, 2007. 176(3): p. 295-305.
51. 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.
52. 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.

53. Liu, D., O. Davydenko, and M.A. Lampson, *Polo-like kinase-1 regulates kinetochore-microtubule dynamics and spindle checkpoint silencing.* J Cell Biol, 2012. 198(4): p. 491-9.
54. 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.
55. van Vugt, M.A., et al., *Polo-like kinase-1 is required for bipolar spindle formation but is dispensable for anaphase promoting complex/Cdc20 activation and initiation of cytokinesis.* J Biol Chem, 2004. 279(35): p. 36841-54.
56. Carmena, M., et al., *The chromosomal passenger complex (CPC): from easy rider to the godfather of mitosis.* Nat Rev Mol Cell Biol, 2012. 13(12): p. 789-803.
57. Schindler, K., et al., *Maternally recruited Aurora C kinase is more stable than Aurora B to support mouse oocyte maturation and early development.* Proc Natl Acad Sci U S A, 2012. 109(33): p. E2215-22.
58. Balboula, A.Z. and K. Schindler, *Selective disruption of aurora C kinase reveals distinct functions from aurora B kinase during meiosis in mouse oocytes.* PLoS Genet, 2014. 10(2): p. e1004194.
59. Nguyen, A.L., et al., *Phosphorylation of threonine 3 on histone H3 by haspin kinase is required for meiosis I in mouse oocytes.* J Cell Sci, 2014. 127(Pt 23): p. 5066-78.
60. Quartuccio, S.M., S.S. Dipali, and K. Schindler, *Haspin inhibition reveals functional differences of interchromatid axis-localized AURKB and AURKC.* Mol Biol Cell, 2017. 28(17): p. 2233-2240.
61. Hached, K., et al., *Mps1 at kinetochores is essential for female mouse meiosis I.* Development, 2011. 138(11): p. 2261-71.
62. Homer, H.A., et al., *Mad2 prevents aneuploidy and premature proteolysis of cyclin B and securin during meiosis I in mouse oocytes.* Genes Dev, 2005. 19(2): p. 202-7.
63. Li, M., et al., *Bub3 is a spindle assembly checkpoint protein regulating chromosome segregation during mouse oocyte meiosis.* PLoS One, 2009. 4(11): p. e7701.
64. Lane, S.I., Y. Yun, and K.T. Jones, *Timing of anaphase-promoting complex activation in mouse oocytes is predicted by microtubule-kinetochore attachment but not by bivalent alignment or tension.* Development, 2012. 139(11): p. 1947-55.
65. Lane, S.I. and K.T. Jones, *Non-canonical function of spindle assembly checkpoint proteins after APC activation reduces aneuploidy in mouse oocytes.* Nat Commun, 2014. 5: p. 3444.
66. 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.
67. Altmeyer, M. and J. Lukas, *To spread or not to spread--chromatin modifications in response to DNA damage.* Curr Opin Genet Dev, 2013. 23(2): p. 156-65.
68. Stracker, T.H. and J.H. Petrini, *The MRE11 complex: starting from the ends.* Nat Rev Mol Cell Biol, 2011. 12(2): p. 90-103.
69. Burma, S., et al., *ATM phosphorylates histone H2AX in response to DNA double-strand breaks.* J Biol Chem, 2001. 276(45): p. 42462-7.

70. Carson, C.T., et al., *The Mre11 complex is required for ATM activation and the G2/M checkpoint.* EMBO J, 2003. 22(24): p. 6610-20.
71. Jungmichel, S. and M. Stucki, *MDC1: The art of keeping things in focus.* Chromosoma, 2010. 119(4): p. 337-49.
72. Uziel, T., et al., *Requirement of the MRN complex for ATM activation by DNA damage.* EMBO J, 2003. 22(20): p. 5612-21.
73. West, A.G. and H. van Attikum, *Chromatin at the crossroads. Meeting on signalling to chromatin epigenetics.* EMBO Rep, 2006. 7(12): p. 1206-10.
74. Baudat, F., et al., *Chromosome synapsis defects and sexually dimorphic meiotic progression in mice lacking Spo11.* Mol Cell, 2000. 6(5): p. 989-98.
75. Carroll, J. and P. Marangos, *The DNA damage response in mammalian oocytes.* Front Genet, 2013. 4: p. 117.
76. Mayer, A., et al., *DNA damage response during mouse oocyte maturation.* Cell Cycle, 2016. 15(4): p. 546-58.
77. Marangos, P. and J. Carroll, *Oocytes progress beyond prophase in the presence of DNA damage.* Curr Biol, 2012. 22(11): p. 989-94.
78. Orthwein, A., et al., *Mitosis inhibits DNA double-strand break repair to guard against telomere fusions.* Science, 2014. 344(6180): p. 189-93.
79. Terasawa, M., A. Shinohara, and M. Shinohara, *Double-strand break repair-adox: Restoration of suppressed double-strand break repair during mitosis induces genomic instability.* Cancer Sci, 2014. 105(12): p. 1519-25.
80. Terasawa, M., A. Shinohara, and M. Shinohara, *Canonical non-homologous end joining in mitosis induces genome instability and is suppressed by M-phase-specific phosphorylation of XRCC4.* PLoS Genet, 2014. 10(8): p. e1004563.
81. Brazill, J.L. and Y. Masui, *Changing levels of uv light and carcinogen-induced unscheduled DNA synthesis in mouse oocytes during meiotic maturation.* Exp Cell Res, 1978. 112(1): p. 121-5.
82. Masui, Y. and R.A. Pedersen, *Ultraviolet light-induced unscheduled DNA synthesis in mouse oocytes during meiotic maturation.* Nature, 1975. 257(5528): p. 705-6.
83. Jin, Z.L. and N.H. Kim, *RAD51 maintains chromosome integrity and mitochondrial distribution during porcine oocyte maturation in vitro.* J Reprod Dev, 2017. 63(5): p. 489-496.
84. Kim, K.H., et al., *The role of Rad51 in safeguarding mitochondrial activity during the meiotic cell cycle in mammalian oocytes.* Sci Rep, 2016. 6: p. 34110.
85. Manandhar, G., et al., *Centrosome reduction during mouse spermiogenesis.* Dev Biol, 1998. 203(2): p. 424-34.
86. Baran, V., et al., *PLK1 regulates spindle formation kinetics and APC/C activation in mouse zygote.* Zygote, 2016. 24(3): p. 338-45.
87. Baran, V., et al., *Polo-like kinase 1 is essential for the first mitotic division in the mouse embryo.* Mol Reprod Dev, 2013. 80(7): p. 522-34.
88. Kovarikova, V., et al., *Aurora kinase A is essential for correct chromosome segregation in mouse zygote.* Zygote, 2016. 24(3): p. 326-37.

7 Příloha – plné texty prací (p 1 – p 222)

7.1 Recenzované práce v zahraničních periodikách

1. Kalous J, Solc P, Baran V, Kubelka M, Schultz RM, Motlik J. PKB/AKT is involved in resumption of meiosis in mouse oocytes. Biol Cell. 2006 Feb;98(2):111-23. PubMed PMID: 15842198.
..... p 1

2. Solc P, Saskova A, Baran V, Kubelka M, Schultz RM, Motlik J. CDC25A phosphatase controls meiosis I progression in mouse oocytes. Dev Biol. 2008 May 1;317(1):260-9. PubMed PMID: 18367163
..... p 15

3. Saskova A, Solc P, Baran V, Kubelka M, Schultz RM, Motlik J. Aurora kinase A controls meiosis I progression in mouse oocytes. Cell Cycle. 2008 Aug;7(15):2368-76. PubMed PMID: 18677115.
..... p 25

4. Kalous J, Kubelka M, Solc P, Susor A, Motlík J. AKT (protein kinase B) is implicated in meiotic maturation of porcine oocytes. Reproduction. 2009 Oct;138(4):645-54. PubMed PMID: 19633130.
..... p 35

5. Solc P, Schultz RM, Motlik J. Prophase I arrest and progression to metaphase I in mouse oocytes: comparison of resumption of meiosis and recovery from G2-arrest in somatic cells. Mol Hum Reprod. 2010 Sep;16(9):654-64. Review. PubMed PMID: 20453035
..... p 45

6. Kalab P, Solc P, Motlik J. The role of RanGTP gradient in vertebrate oocyte maturation. Results Probl Cell Differ. 2011;53:235-67. PubMed PMID: 21630149.
..... p 57

7. Solc P, Baran V, Mayer A, Bohmova T, Panenkova-Havlova G, Saskova A, Schultz RM, Motlik J. Aurora Kinase A Drives MTOC Biogenesis but Does Not Trigger Resumption of Meiosis in Mouse Oocytes Matured In Vivo. Biol Reprod. 2012 Jul 25. PubMed PMID: 22837479.
..... p 91

8. Baran V, Solc P, Kovarikova V, Rehak P, Sutovsky P. Polo-like kinase 1 is essential for the first mitotic division in the mouse embryo. Mol Reprod Dev.2013 Jul;80(7):522-34. PubMed PMID: 23649868
..... p 103

9. Chalupnikova K, Solc P, Sulimenko V, Sedlacek R, Svoboda P. An oocyte-specific ELAVL2 isoform is a translational repressor ablated from meiotically competent antral oocytes. Cell Cycle. 2014 Apr 1;13(7):1187-200. PubMed PMID: 24553115.
..... p 117

10. Solc P, Kitajima TS, Yoshida S, Brzakova A, Kaido M, Baran V, Mayer A, Samalova P, Motlik J, Ellenberg J. Multiple requirements of PLK1 during mouse oocyte maturation. PLoS One. 2015 Feb 6;10(2):e0116783. PubMed PMID: 25658810.

..... p 131

11. Mayer A, Baran V, Sakakibara Y, Brzakova A, Ferencova I, Motlik J, Kitajima TS, Schultz RM, Solc P. DNA damage response during mouse oocyte maturation. Cell Cycle. 2016;15(4):546-58. doi: 10.1080/15384101.2015.1128592. Epub 2016 Jan 8. PubMed PMID: 26745237.

..... p 157

12. Kovarikova V, Burkus J, Rehak P, Brzakova A, Solc P, Baran V. Aurora kinase A is essential for correct chromosome segregation in mouse zygote. Zygote. 2016 Jun;24(3):326-37. doi: 10.1017/S0967199415000222. Epub 2015 Jul 15. PubMed PMID: 26174602.

..... p 171

13. Baran V, Brzakova A, Rehak P, Kovarikova V, Solc P. PLK1 regulates spindle formation kinetics and APC/C activation in mouse zygote. Zygote. 2016 Jun;24(3):338-45. doi: 0.1017/S0967199415000246. Epub 2015 Jul 15. PubMed PMID: 26174739.

..... p 183

14. Balboula AZ, Nguyen AL, Gentilello AS, Quartuccio SM, Drutovic D, Solc P, Schindler K. Haspin kinase regulates microtubule-organizing center clustering and stability through Aurora kinase C in mouse oocytes. J Cell Sci. 2016 Aug 25. PubMed PMID: 27562071.

..... p 191

7.2 Recenzované práce v domácích periodikách

15. Ferencova I, Solc P. Úloha cyklín dependentej kinázy 1 pri meiotickom dozrievani oocytov. Bioprospect 2015, 25 (3): 65-67.

..... p 211

16. Mayer A, Solc P. Odpověď na poškození DNA v oocytech. Bioprospect 2015, 25(2): 41-43.

..... p 215

17. Ferencova I, Solc P. Auxínom indukovaná špecifická degradácia proteínouv v cicavčích bunkách ako experimentálny nástroj pre studium funkcie proteínov. Bioprospect 2017, 27 (4): 104-106.

..... p 219