

Univerzita Karlova v Praze, Přírodovědecká fakulta

Katedra buněčné biologie

Charles University in Prague, Faculty of Science

Department of Cell Biology



Autoreferát disertační práce

Summary of the PhD thesis

**Identifikace klíčových regulátorů genové exprese v savčím
oocytu a embryu**

**Identification of key regulators of gene expression in
mammalian oocyte and embryo**

Mgr. Denisa Jansová

Supervisor/Školitel: Ing. Andrej Šušor, Ph.D.

PRAHA, 2017

Doktorské studijní programy v biomedicíně

Univerzita Karlova v Praze

a
Akademie věd České republiky

Program: Vývojová a buněčná biologie

Předseda oborové rady: doc. RNDr. Petr Folk, CSc.

Školicí pracoviště: Ústav živočišné fyziologie a genetiky AVČR, v.v.i., Liběchov

Autor: Mgr. Denisa Jansová

Školitel: Ing. Andrej Šušor, Ph.D.

S disertací je možno se seznámit v příslušných knihovnách Přírodovědecké fakulty Univerzity Karlovy v Praze.

Obsah

1 Úvod	5
2 Hypotézy a cíle práce	6
3 Materiál a metodika.....	6
4 Výsledky a komentáře k vybraným publikacím.....	8
4.1 Regulace translace v čase a prostoru přes mTOR – e IF4F dráhu v savčím oocytu.....	8
4.2 Translace v čase a prostoru u savčích oocytů.....	8
4.3 Regulace 4E-BP1 a jeho role v savčím oocytu.....	9
4.4 Transkriptom a proteosyntéza v oocytu a embryu.....	9
5 Diskuse	11
6 Závěry.....	12
1 Introduction	13
2 Aims of the thesis	14
3 Material and methods	14
4 Results and comments on publications	16
4.1 Temporal and spatial regulation of translation in the mammalian oocyte via the mTOR-eIF4F pathway	16
4.2 Translation in the mammalian oocyte in space and time.....	16
4.3 Regulation of 4E-BP1 activity in the mammalian oocyte	17
4.4 Transcriptome and translation in mammalian oocyte and embryo.....	17
5 Discussion	19
6 Conclusions of thesis.....	20
7 Použitá literatura/References.....	21
8 Seznam publikací/List of publications	23
9 Životopis/Curriculum vitae	24

Souhrn práce

Savčí oocyt je vysoce diferencovaná buňka, ze které po oplození vzniká embryo. Na konci růstové fáze se plně dorostlý oocyt stává transkripčně inaktivním. Během následujících fází vývoje oocytu, tedy během jeho zrání, oplození a následně během časného embryonálního vývoje, jsou využívány pouze transkripty nasyntetizované v růstové fázi oogeneze, které oocyt skladuje k pozdějšímu využití. Distribuce mRNA je úzce svázána s lokalizací a funkcí proteinu, který kóduje. Tohoto mechanismu regulace genové exprese využívají různé typy buněk. Zatím ovšem není mnoho známo o lokalizaci mRNA molekul a jejich translaci v savčím oocytu a časném embryo. Cílem této práce bylo detektovat celkový transkriptom a komponenty translačního aparátu v savčím oocytu a dvoubuněčném embryo a odhalit mechanismus regulující translaci, která je důležitá pro správný vývoj oocytu a embrya. Ukázali jsme, že jádro myšího i lidského oocytu obsahuje RNA molekuly a RNA vazebné proteiny. Po rozpadu jaderné membrány dochází k translaci v oblasti chromosómů. Předpokládáme, že molekuly mRNA, které jsou přítomny v jádře oocytu, jsou následně po rozpadu jaderné membrány zpřístupněny translačnímu aparátu a dochází k jejich translaci a vzniku proteinů, které jsou důležité pro správný průběh meiotického zrání oocytu a časného embryonálního vývoje. Tato translace je řízena skrze mTOR–eIF4F dráhu, která je aktivována po rozpadu jaderné membrány. Tyto výsledky nasvědčují tomu, že asymetrická lokalizace RNA určuje načasování a lokalizaci translace v savčích oocytech.

Abstract

Mammalian oocyte is a highly differentiated cell which gives rise to an embryo after fertilization. Importantly, fully-grown oocytes become transcriptionally inactive at the end of the growth phase. During following stages of development, i. e. meiotic maturation of the oocyte and early embryonic development, only transcripts previously synthesized and stored are used. The tight correlation between mRNA distribution and subsequent protein localization and function provides a mechanism of spatial and temporal regulation of gene expression used by various cell types. However, not much is known about mRNA localization and translation in the mammalian oocyte and early embryo. The aim of my thesis was to determine the localization of transcripts and components of translational machinery in the mammalian oocyte and embryo and to uncover the mechanisms of spatiotemporal regulation of translation as a prerequisite for correct oocyte and embryo development. We have shown that nuclei of both mouse and human oocytes contain RNA molecules and RNA binding proteins. Following the nuclear envelope breakdown (NEBD), translational hot-spots occur in the area surrounding the nuclear region. We suppose that mRNAs previously retained in the nucleus are released to the cytoplasm during NEBD and their subsequent translation gives rise to proteins essential for further meiotic progression and embryonic development. We have further shown that protein synthesis in the mentioned hot-spots is regulated via mTOR–eIF4F pathway, which is activated after NEBD. Taken together our results support the notion that asymmetric localization of RNA determines the timing and localization of translation in mammalian oocyte.

1 Úvod

Regulace genové exprese v plně zralých oocytech je řízena výhradně na úrovni translace, stability mRNA a proteinů. Období růstu oocytu je charakterizováno vysokou transkripční aktivitou, která je nezbytná pro další vývoj oocytu a raného embrya. Naproti tomu během dlouhé periody meiotického zrání (10 hodin u myši; 48 hodin u člověka), tedy přechodu z profáze I do metafáze II, je transkripce potlačena. Celé období od pozdního růstu oocytu až po časný embryonální vývoj je tak závislé na RNA, která byla nasyntetizována a uskladněna během růstové fáze oocytu¹. Na nově syntetizovanou mRNA se vážou proteiny, které následně řídí její lokalizaci, translaci a degradaci. U různých typů buněk je regulace translace specifických mRNA v čase a prostoru nezbytná pro jejich fyziologii. Analýza genové exprese vede k identifikaci genů, které jsou nutné pro porozumění vývoje samičích pohlavních buněk. Pro pochopení funkce jednotlivých mRNA je nezbytné určit jejich lokalizaci v buňce².

Desítky let jsou známy proteiny, které jsou schopné pomocí svých domén vázat nepřekládané oblasti mRNA³. Jedním z mechanismů regulace translace mRNA je translace závislá na 7-methylguanosinové čepičce přítomné na 5' konci mRNA, tzv. cap-dependentní translace (z ang. cap, čepička). Cap-dependentní translace mRNA molekul, které obsahují oligopyrimidinový motiv (terminal oligopyrimidine tract, TOP), je řízená mTOR kinázou, která reguluje formování eukaryotického iniciačního 4F komplexu (eIF4F)⁴. Do TOP mRNA skupiny patří např. mRNA kódující některé ribosomální proteiny a regulátory buněčného cyklu⁵⁻⁷. Regulace iniciace translace je řízená na molekulární úrovni zejména fosforylací nebo defosforylací translačních iniciačních faktorů^{8,9}. Serin-treoninová kináza mTOR je součástí komplexu mTOR-Raptor neboli mTORC1, který je klíčový pro regulaci proteosyntézy^{9,10}. Stěžejní regulační krok translace je iniciační fáze, které se účastní eIF4F komplex, jež se váže na čepičku na 5' konci mRNA. Tento komplex je tvořen ze tří klíčových proteinů: na čepičku se vázajícího eIF4E, adaptorového proteinu eIF4G1 a RNA helikázy eIF4A¹¹. Významným regulátorem formování iniciačního komplexu je protein 4E-BP1, který se v hypofosforylovaném stavu váže na eIF4E, čímž zabraňuje vytvoření eIF4F komplexu a tak i iniciaci translace. Mezi další RNA vazebné proteiny, které pozitivně regulují translaci v oocytech, patří protein DAZL, který se váže na nepřekládanou oblast na 3' konci mRNA. Jeho přítomnost je nezbytná pro vývoj zárodečných buňek^{12,13}. Neméně významné jsou jaderné heterogenní ribonukleoproteiny (heterogenous nuclear ribonucleoproteins, hnRNPs), které se účastní úprav nově syntetizovaných mRNA a regulace translace. Do této rodiny proteinů patří jaderný heterogenní ribonukleoprotein A1 (hnRNP A1)¹⁴.

Nezbytnou součástí translačního aparátu jsou ribosomy tvořené ribosomální RNA a ~80 proteiny¹⁵⁻¹⁷. Ribosom je složený z velké (60S) a malé (40S) podjednotky. Mezi strukturní komponenty důležité pro tvorbu 40S podjednotky ribosomů patří ribosomální proteiny S14, S6, S3. RPS6 interaguje s ribosomálním proteinem L24 (RPL24), který je součástí 60S podjednotky¹⁸. Součástí velké ribosomální podjednotky je také ribosomální protein RPL7. Ve zralých (vývojově kompetentních) oocytech, v porovnání s nezralými oocyty, bylo detekováno vyšší množství *Rps6*, *Rpl7* a *Rpl24* mRNA¹⁹.

Mnohé z mechanismů regulace metabolismu RNA v oocytech a embryích dosud nejsou objasněny. Výsledky předkládané v této práci osvětlují vliv lokalizace maternální RNA ve spojení s regulací translace.

2 Hypotézy a cíle práce

Hypotéza: Asymetrická lokalizace RNA v oocytu určuje syntézu proteinů v čase a prostoru.

Cíl 1: Detektovat lokalizaci celkového transkriptomu a specifických transkriptů v oocytu a dvoubuněčném embryu.

Cíl 2: Určit lokalizaci RNA vazebních proteinů a komponent translačního aparátu v oocytu a dvoubuněčném embryu.

Hypotéza: mTOR–eIF4F dráha reguluje syntézu specifických proteinů v čase a prostoru během vývoje savčího oocytu.

Cíl 3: Detektovat celkovou translaci a specifickou translaci v oocytu a dvoubuněčném embryu.

Cíl 4: Identifikovat proteiny regulující aktivitu 4E-BP1 a objasnit roli 4E-BP1 proteinu v oocytu.

3 Materiál a metodika

Jednotlivé metody jsou detailněji popsány v příslušných manuskriitech, které jsou součástí této dizertační práce.

Použitý model

NIH3T3 embryonální myší fibroblasty, lidské oocyty získané s reprodukční kliniky, *Mus musculus* var. *alba*, kmen CD1, minimálně šest týdnů staré. Byly vybírány plně dorostlé oocyty ve stádiu GV, po 70 minutách kultivace po odmytí IBMX jsme získali NEBD stádium, po 3 hod kultivace po odmytí IBMX jsme získali post-NEBD, po 7 hod kultivace po odmytí IBMX jsme získali pro-MI a po 12 hod kultivace jsme získali MII stádium, 20 hod po stimulaci hCG a oplození jsme získali zygoty a za 48 hod po fertilizaci dvoubuněčná embrya.

Izolace a kultivace buněčné linie NIH3T3

Embryonální myší fibroblasty byly kultivovány 2 dny v DMEM médiu (Thermo-Fisher) v přítomnosti 10% bovinního séra (Sigma Aldrich) a 1% penicilínu a streptomycinu (Thermo-Fisher). Následně byly fixovány pomocí 4% paraformaldehydu (Sigma Aldrich).

Izolace a kultivace oocytů, *in vitro* maturace a kultivace embryí

Izolace a kultivace oocytů proběhla podle protokolu Tetkova a Hancova (2016) a tyto metodiky byly dále popsány v příloze předkládaného článku: „Regulace translace v čase a prostoru přes mTOR–eIF4F dráhu v savčích oocytech, Regulace 4E-BP1 a jeho role v savčím oocytu, Transkriptom a proteosyntéza v savčím oocytu a embryu“.

Imunocytochemie (ICC) a konfokální mikroskopie

Proteiny byly detekovány pomocí primárních protilátek a ty následně vizualizovány pomocí protilátek sekundárních značených fluorescenčními barvami. Takto připravené vzorky byly následně skenovány pomocí konfokálního mikroskopu Leica TCS SP5 (Leica, Microsystem AG, Wetzlar, Německo). Získaná data byla zpracovávána pomocí software LAS AF Lite (Leica), ImageJ/FIJI (<http://rsbweb.nih.gov/ij/>). Tato metodika je blíže popsána v mých předložených článcích: „Regulace translace v čase a prostoru přes mTOR–eIF4F dráhu v savčích oocytech“ a „Transkriptom a proteosyntéza v savčím oocytu a embryu“.

Fluorescenční RNA *in situ* hybridizace (RNA FISH)

Fluorescenční *in situ* hybridizace RNA proběhla podle protokolu Raj et al.,(2013, 2008) a mnou modifikovaného protokolu Jansova (2015) . Tato metodika je blíže popsána v mých předložených manuscriptech: „Regulace translace v čase a prostoru přes mTOR – eIF4F dráhu v savčích oocytech“ a „Transkriptom a proteosyntéza v savčím oocytu a embryu“.

Reverzně transkripční polymerázová řetězová reakce s detekcí v reálném čase (real-time RT-PCR)

Pro sledování míry exprese jednotlivých genů byla provedena jednokroková RT-PCR v reálném čase na přístroji Rotor-Gene 3000 (Corbett Research, Mortlake, Austrálie) pomocí QIAGEN One Step RT-PCR Kit (QIAGEN). Tato metodika je blíže popsána v manuscriptech: „Regulace translace v čase a prostoru přes mTOR – eIF4F dráhu v savčích oocytech“ a „Regulace 4E-BP1 a jeho role v savčím oocytu“.

Western blot (WB)

Lyzát embryí a oocytů byly analyzovány na 4–12% gradientovém gelu. Vzorky byly následně přeblotovány na polyvinyliden-fluoridovou membránu (Immobilon P; Merckmillipore) při 5 mA/cm² po dobu 25 minut. Následně byly membrány blokovány v 1% sušeném mléku při pokojové teplotě jednu hodinu a poté inkubovány s příslušnými primárními protilátkami přes noc v 4 °C. Po třech desetiminutových cyklech promývání byla membrána inkubována se sekundární protilátkou konjugovanou s křenovou peroxidázou v 3% mléku jednu hodinu při pokojové teplotě. Následně byla membrána promyta 0,05% TTBS (Tween-Tris-buffer saline; NaCl, Tween 20,2M Tris pH 7,6, destilovaná voda). Proteiny byly zviditelněny pomocí ECL-PLUS detekčního systému (Amersham, GE Healthe care life science) podle instrukcí dodavatele. Vyvolané filmy byly skenovány a data kvantifikována pomocí programu ImageJ/FIJI (<http://rsbweb.nih.gov/ij/>). „Regulace translace v čase a prostoru přes mTOR – eIF4F dráhu v savčích oocytech, Regulace 4E-BP1 a jeho role v savčím oocytu, Transkriptom a proteosyntéza v savčím oocytu a embryu“.

Proximity ligation assay (PLA)

Fyzické interakce RPL24 a RPS6 byly detekovány podle instrukcí Duolink kitu (Sigma Aldrich). Fixované oocyty byly permeabilizovány jako v případě imunofluorescenčního barvení. Embrya byla blokována 1 hod při 37 °C v blokovacím roztoku (jenž je součástí Doulink kitu). Poté byly vzorky inkubovány s primárními protilátkami anti-RPL24 (Thermo-Fisher), anti-RPS6 (Santa Cruz) přes noc ve 4 °C, následovala hybridizace +/- PLA prób, následoval oplach 6x2 minuty pomocí odmývacího pufru A (Duolink kit; Sigma Aldrich) a poté ligace 30 minut při 37 °C, nakonec amplifikace signálu pomocí φ DNA polymerázy, která trvala 100 minut při 37° C. Následoval promývací krok pomocí odmývacího pufru B (Duolink kit; Sigma Aldrich). Oocyty byly promyty a následně

montovány do HardSet Mounting Medium s DAPI (Vectashield). Tato metodika je detailněji popsána v manuskriptu s názvem „Transkriptom a proteosyntéza v savčím oocytu a embryu“.

Fluorescenční *in situ* hybridizace pomocí rolling circle amplifikaciton (RCA FISH)

Vizualizace celkového trankriptomu byla provedena na základě článků) Larsson et al., (2010) a Lee et al., (2015). Po fixaci 4% paraformaldehydu (Sigma) a následném oplachu 70% ethanolem, byly poté vzorky přepsány do cDNA pomocí M-MuLV reverzní transkriptázy (Enzymatics) přes noc při 37 °C. Následovala reziduální degradace RNA pomocí RNazy H (Enzymatics): 1 hod při 37 °C, oplach vodou a cirkularizace pomocí CircligázyII (Ilumina) 1 hod při 60 °C. Takto cirkularizovaná cDNA byla následně amplifikována pomocí φ DNA polymerázy (Enzymatics) přes noc při 37 °C. Na závěr byly hybridizovány fluorescenčně značené próby 8 nukleotidů, s náhodnou sekvencí (NNNNNN, Ilumina). Tato metodika je detailněji popsána v „Transkriptom a proteosyntéza v savčím oocytu a embryu“.

Statistická analýza

Data byla analyzována pomocí MS Excel a softwaru GraphPad 5. Byl použit Studentův t-test, za statisticky signifikantní jsou brány hodnoty s ($P<0.05$).

4 Výsledky a komentáře k vybraným publikacím

4.1 Regulace translace v čase a prostoru přes mTOR – e IF4F dráhu v savčím oocytu

Temporal and spatial regulation of translation in the mammalian oocyte via the mTOR-eIF4F pathway

Cílem této publikace bylo detailně pomocí biochemických a molekulárních metod určit roli klíčových proteinů mTOR-eIF4F dráhy v průběhu cap-dependetní translace v myším oocytu a zygotě. Tato publikace přináší nový pohled na propojení translace a lokalizace mRNA v myším oocytu. Detekovali jsme pomocí fluorescenční *in situ* hybridizace, molecular beacons a stejně tak pomocí reverzní polymerázové řetězové reakce molekuly mRNA v jádře myšího oocytu a v oblasti výstavby dělícího vřeténka. Pomocí inkorporace analogu methioninu během maturace oocytu jsme demonstrovali, že po opětovném zahájení meiózy dochází k intenzivní translaci mRNA molekul v oblasti nově se tvorícího vřeténka. Tato translace je závislá na aktivitě mTOR-eIF4F dráhy. Když je mTOR-eIF4F dráha inhibována (pomocí 4EGI nebo Rapamycinu), meióza nadále probíhá, ale výsledkem jsou oocity s aneuploidní sestavou chromosomů. Naše práce poukazuje na význam regulace translace v místě a čase během vývoje samičí zárodečné buňky.

4.2 Translace v čase a prostoru u savčích oocytů

Translation in the mammalian oocyte in space and time

Tato souhrnná publikace vznikla na základě žádosti od editora z Cell and Tissue Research po otisknutí mojí první spoluautorské publikace (viz 4.1). Hlavním záměrem bylo objasnění role lokalizace RNA a translace ve vztahu k fyziologii vývoje savčího oocytu i časného embrya. V této práci jsou shrnutý poznatky z 202 vědeckých publikací, týkající se lokalizace a regulace translace mRNA molekul. Prezentované informace jsou zasazeny do kontextu znalostí o těchto procesech v nižších organismech a různých typů tělních buněk.

4.3 Regulace 4E-BP1 a jeho role v savčím oocytu

Regulation of 4E-BP1 activity in the mammalian oocyte

V mé prvoautorské práci jsme se zabývali translačním represorem 4E-BP, který je hlavním regulátorem cap-dependentní translace. V oocytu jsme detekovali jedinou formu tohoto proteinu, 4E-BP1, která je inaktivována pomocí fosforylace mTOR kinázou po opětovném zahájení meiózy. Naše výsledky poukazují, že kináza mTOR je primárně aktivována pomocí CDK1. Po inaktivaci 4E-BP1 dochází k zahájení cap-dependentní translace. Pomocí imunofluorescenčního značení jsme detekovali inaktivovaný 4E-BP1 v oblasti nově se tvořícího vřeténka. Exprese dominantně negativní nefosforylovatelné formy 4E-BP1 vedla k defektům tvorby dělícího vřeténka po znovu zahájení meiózy. Také jsme dokázali, že mTOR kináza je rovněž přítomna a aktivována v lidském oocytu, obdobně jako je tomu u myši. Naše výsledky poukazují na to, že mTOR má klíčovou úlohu v regulaci 4E-BP1 v myším i lidském oocytu. Tato práce přináší ucelené informace o fungování translačního represoru 4E-BP1 v oocytech dvou významných savčích druhů.

4.4 Transkriptom a proteosyntéza v oocytu a embryu

Transcriptome and translation in mammalian oocyte and embryo

Cílem publikace je vizualizace celkového transkriptomu v myším oocytu ve stádiu GV a dvoubuněčném embryu a detekce proteinů vázajících se na RNA a ribosomalních komponentů. Zpracovaný manuskript je součástí přílohy mé dizertační práce a prozatím nebyl zaslán k publikování.

Globální transkriptom v oocytu a raném embryu je částečně lokalizován do jádra

Pro vizualizaci celkového transkriptomu byly použity dvě metody značení, oligo(dT) próbami a *in situ* reverzní transkripce se značenými nukleotidy. Pro detekci polyadenylovaných RNA molekul v myším oocytu a embryu jsem použila fluorescenčně značenou oligo(dT) próbu. Pomocí *in situ* reverzní transkripce s fluorescenčně značenými nukleotidy jsem vizualizovala celkový transkriptom. Oběma metodikami jsme došli ke shodnému závěru a to, že v transkripcně inaktivním GV oocytu se vyskytují shluky RNA molekul v jádře a menší shluky v celém objemu cytoplasmy. U embrya byly detekovány velké shluky v jádře a jednotlivé molekuly RNA v celém objemu cytoplasmy. Za použití specifických protilátek jsme detekovali difúzně rozmístěnou ribosomalní 5.8S rRNA v obou stádiích. Pro vizualizaci 5'UTR konce RNA jsem použila protilátku detekující m3G-cap a m7G-cap, která mi ukázala silnější jednolitý signál v jádře oproti signálu detekovaném v cytoplasmě. Tyto výsledky potvrzují, že u GV oocytu a embrya se nachází značné množství RNA v jádře.

Detekce specifických RNA v oocytu a raném embryu

Dle mých znalostí není mnoho známo o lokalizaci konkrétních transkriptů v savčím oocytu nebo raném embryu. Další část této práce se zabývá detekcí specifických transkriptů: *Dazl*, β -*aktinu* a *Neat2*. Zatímco jsme detekovali *Dazl* mRNA v oocytu a embryu, tato mRNA nebyla přítomna v somatických kumulárních buňkách, což je v souladu s poznatkem, že exprese tohoto genu je specifická pro zárodečné buňky^{12,26}. Dále byla detekována β -*aktin* mRNA ve vedoucích okrajích (tzv. *leading edges*) u NIH3T3 buněk. V některých buňkách byla β -*aktin* mRNA přítomna i v jádře. V oocytu se β -*aktin* mRNA nachází v celém objemu cytoplasmy i v jádře, v embryu je přítomna v okolí jádra. O dlouhé nekódující RNA *Neat2* je známo, že je součástí paraspekles (tj. tělísek v blízkosti jaderných skvrn) v somatických

buňkách, což jsme potvrdili za použití buněčné linie NIH3T3. V oocytech byla *Neat2* RNA prezentována v jádře, kde vytváří globulární struktury, kdežto v buňkách embrya byla tato RNA přítomna v cytoplasmě.

Lokalizace a exprese RNA vazebných proteinů a ribonukleoproteinů v oocytu a ranném embryu

Pomocí imunofluorescenčního značení jsem detekovala čtyři proteiny vázající se na RNA: 4E-BP1, hnRNPA1, CPEB4 a eIF4A3. Úlohou proteinu 4E-BP1 je inhibovat iniciaci cap-dependentní translace (viz 4.1 a 4.3). Tento protein jsem detekovala v jádře i cytoplasmě oocytu i dvoubuněčného embrya. Po degradaci RNA pomocí RNázy A zcela zmizely granulární struktury tvořené tímto proteinem. Tento experiment poukazuje na vazbu nefosforylovaného 4E-BP1 k maternálním RNA. Imunoblot prokázal že, se množství nefosforylované formy 4E-BP1 v plně dorostlém oocytu i v dvoubuněčném embryu neliší. Heterogenní jaderný ribonukleoprotein A1 (hnRNPA1) jsme detekovali v jádře a v oblasti kortextu oocytu. Množství hnRNPA1 proteinu je stejné v oocytu a dvoubuněčném embryu. Protein vázající se na cytoplazmatický polyadenylační element 4 (CPEB4) je homogenně distribuován v celém objemu cytoplasmy a je přítomen ve stejném množství v oocytu i embryu. Dále jsme pomocí ICC detekovali eukaryotický translační iniciační faktor 4A3, jehož signál je jednolitý v cytoplasmě. Pomocí immunoblotu bylo zjištěno, že množství proteinu se neliší v embryu oproti oocytu. Bylo potvrzeno, že RNA vazebné proteiny a ribonukleoproteiny jsou obsaženy v jádře oocytu a raném embryu.

Charakteristika exprese ribosomálních proteinů v oocytu a raném embryu

Zaměřila jsem se na charakterizaci exprese ribosomálních proteinů obou ribosomálních podjednotek pomocí westernblotu a imunocytochemie. RPS14 se lokalizuje do oblasti jádra, do celé cytoplasmy a také na kortextu. U embrya byl zjištěn pomocí immunoblotu úbytek proteinu RPS14, čemuž odpovídá i úbytek fluorescence, protein se lokalizuje do oblasti kortextu a dělící rýhy. RPS3 je lokalizován v oocytu a embryu granulárně v celém objemu cytoplasmy i jádra, pomocí immunoblotu bylo zjištěno, že jeho exprese není rozdílná v GV a dvoubuněčném embryu. RPS6 se lokalizuje po celém objemu oocytu i embryu, množství proteinu je nižší v embryu oproti GV oocytu. RPL7 jsme detekovali v cytoplasmě i jádře GV oocytu. V embryu byl intenzivní signál na dělící rýze dvou blastomer. WB ukázal větší zastoupení RPL7 v oocytu oproti embryu. RPL24 se vykytuje difúzně v cytoplazmě i jádře oocytu a v embryu. Na druhou stranu oproti RPS14 a RPS6 nedochází k poklesu exprese proteinu v oocytu a embryu. Experimenty prokázali, že dochází k degradaci pouze některých specifických maternálních ribosomálních proteinů v raném embryu.

Detekce *in situ* translace v oocytu a raném embryu

Translace je nezbytná pro správný vývoj oocytu a embrya. Pomocí analogu methioninu (L-homopropargylglycin; HPG) jsem detekovala perinukleární signál globální translace v GV oocytech, zatímco v dvoubuněčném embryu byl markantně zvýšený signál v oblasti dělící rýhy. Následně jsem se zabývala lokalizací interakce obou ribosomálních podjednotek. Pomocí metody proximity ligation assay (PLA) jsme detekovali *in situ* interakci zástupců velké a malé ribosomální podjednotky, konkrétně ribosomálních proteinů L24 (RPL24) a S6 (RPS6). Zjistili jsme, že množství interakcí v dvoubuněčném embryu klesá o 69 % oproti GV oocytu ($p \leq 0.05$). 80S ribosóm se v GV oocytu distribuuje do perinukleární oblasti a oblasti kortextu, chybí v jádře, zatímco v dvoubuněčném embryu je distribuce 80S mírně zastoupená

v jádře a rovnoměrně v cytoplasmě obou blastomer. Translace v oocytu a dvoubuněčném embryo je lokalizována asymetricky.

Polydenylované RNA a RNA vazebné proteiny se lokalizují shodně v lidském i myším oocytu

Zajímá nás podobnost myšího a lidského oocytu ve vztahu lokalizace daných transkriptů a následných molekulárních dějů. Z centra asistované reprodukce se nám podařilo získat lidské GV oocyty, které jsme analyzovali pomocí RNA FISH a ICC. Detekovali jsme poly(A) RNA v jádře lidských GV oocytů obdobně jako je tomu u myši. Shodně se v obou druzích lokalizuje i 4E-BP1 a eIF4A3 v jádře.

Vizualizace translace endogenního β -aktinu v živém oocytu

K doplnění našich poznatků o lokalizaci komponent translaci mašinerie jsme využili vizualizaci translace přímo v živé buňce. Pro tyto účely jsme zvolili metodu využívající fluorescenční značení Resorufin Arsenical Hairpin (ReAsH)²⁷, která je schopna rozeznávat speciální tetracysteinovou (TC) doménu, jíž je na 5' neprekládané oblasti mRNA označen protein našeho zájmu – v tomto případě β -aktin. Do transkripčně aktivního (rostoucího) oocytu jsme mikroinjekovali plazmid obsahující sekvenci kódující právě β -aktin označený TC doménou. Tato peptidová doména váže fluorescenční barvu ReAsH už při vzniku peptidu, přímo při probíhající translaci v živém oocytu (na rozdíl od klasických značení, jakým je např. zelený fluorescenční protein, který v našem systému využíváme pro vizualizaci plně zformovaného proteinu). Takto mikroinjekovaným oocytům jsme 10–16 hodin znemožnili translaci mRNA (s použitím inhibitoru translace cykloheximidu), následně inkubovali s ReAsH barvou a neprodleně sledovali *de novo* translaci β -aktinu v živém oocytu. Díky této metodě jsme translaci β -aktinu lokalizovali na kortextu živého oocytu, což také poukazuje na časově a místně organizovanou translaci v této komplikované buňce.

5 Diskuse

Práce je zaměřena na regulaci cap-dependentní translace v savčích oocytech. Propojuje nové poznatky o lokalizaci specifických transkriptů, která má vliv na jejich následnou expresi do formy proteinu. Kompartmentalizace mRNA a následná lokální translace je základním mechanismem regulace genové exprese. Transport mRNA do kompartmentů buňky je termodynamicky výhodnější než transport plně nasyntetizovaného proteinu²⁸. Zjistili jsme, že jádro plně dorostlého myšího i lidského oocytu zadržuje populaci RNA (kódující i nekódující) spolu s RNA vazebnými proteiny²⁹. Předpokládám, že retence mRNA je potřebná pro regulaci a koordinaci správného zrání oocytu. Zadržené transkripty jsou translačně neaktivní a jsou translatovány následně ve fázi NEBD, což napomáhá k formování dělícího vřeténka a následnému meiotickému dělení. Na základě získaných dat předpokládám, že zadržené transkripty jsou dormantní a budou translatovány po rozpadu jaderné membrány. Naše výsledky jsou v souladu se současnými studiemi, které se zaměřují na identifikování transkriptů přítomných v jádře či v oblasti dělícího vřeténka^{30–33}. Dále jsme se zaměřili na úlohu Laminu A/C v oblasti nově se formujícího spindlu. Naše výsledky ukazují, že po rozpadu jaderné membrány, po vstupu do pro-metafáze části jaderné membrány obklopují oblast nově se tvořícího vřeténka²⁹, přibližně po dobu dvou hodin od NEBD. Předpokládáme, že laminové struktury společně s endoplazmatickým retikulem nebo aktinem formují „polopropustnou bariéru“, která napomáhá udržování vnitrobuněčného gradientu v této velké buňce. Naše domněnka o polopropustné struktuře je známá v mitotických buňkách^{34–36}. Polopropustná bariéra zadržuje jaderné komponenty (např. RNA) v oblasti chromosómů,

kde se vytváří dělící vřeténko. Detekce nascentní globální translace v oocytu ukázala zvýšenou translační aktivitu na vřeténku. Předpokládám, že část proteinů bude syntetizována lokálně, na druhou stranu mnohé proteiny budou do této oblasti transportovány ze vzdálenějších částí této velké buňky. Naše výsledky poukazují na zvýšenou aktivitu a lokalizaci této dráhy po NEBD právě v oblasti nově se formujícího vřeténka²⁹. Je důležité zmínit, že aktivita mTOR-eIF4F osy se signifikantně zvedá po NEBD a značný pokles sledujeme po oplození oocytu, což souvisí s aktivitou CDK1. V Jansova et al., (2017) popisuji pozitivní vliv CDK1, klíčového komponentu MPF, na aktivitu mTOR kinázy. Výsledky z detekce aktivity 4E-BP1 v kumulárních buňkách, které nevstupují do buněčného cyklu, jasně podporují naše závěry o pozitivní regulační roli CDK1 při aktivaci cap-dependentní translace. Významné navýšení aktivity cap-dependentní translace právě po vstupu do meiózy je bráno jako analogie cap-dependentní translace v mitóze^{38,39}, přestože dřívější studie v mitotických buňkách poukazovala na deaktivaci mTOR-eIF4F dráhy. Tento rozpor byl vysvětlen postupem protokolu, který se ve studiích použil na synchronizaci buněk, které jsou v dané době ve specifické části buněčného cyklu⁴⁰, což u našeho modelu oocytu neplatí. Po izolaci tvoří oocyty vysoce homogenní populaci a přirozeně vstupují do meiotického cyklu. Dalším důkazem klíčové role mTOR-eIF4F je předložený experiment s potlačením funkce mTOR-eIF4F, címž se zabrání tvorbě eIF4F komplexu, což se projeví defektem výstavby meiotického vřeténka a to vede ke chromosomálním aberacím^{29,37}. To dokládá naši hypotézu o významu mTOR-eIF4F signalizační dráhy při regulaci cap-dependentní translace.

Tato práce je zaměřena na detekci RNA (globálních i specifických), RNA vazebních proteinů a komponentů ribosomu v oocytech a dvoubuněčných embryích. Zaměřili jsme se na studium 4E-BP1, protože je to represor cap-dependentní translace. Zjistili jsme, že se váže k RNA, jelikož degradace maternální RNA za pomoci RNázy A a následná imunolokalizace 4E-BP1 proteinu prokázala ztrátu granulárních struktur tvořené tímto proteinem. Potvrdili jsme, že některé specifické maternální proteiny potřebné k translaci se degradují po fertilizaci, což je v souladu s celkovým úbytkem maternálních proteinů⁴¹. Závěrem mohu konstatovat, že moje studie přispěla k objasnění využití maternálního transkriptomu a regulace iniciace translace, které jsou nezbytné pro vývoj těchto výjimečných buňek.

6 Závěry

- Jádro myšího i lidského oocytu obsahuje RNA spolu s RNA vazebními proteiny.
- Jaderná RNA je translatována po znovuzahájení meiózy.
- Metabolismus RNA v lidském oocytu je pravdepodobně regulován obdobně jako v oocytu myším.
- mTOR-eIF4F dráha participuje na zvýšení translace v meiotickém cyklu.
- Asymetrická lokalizace mRNA je jedním z regulačních mechanismů, jenž ovlivňuje translaci mRNA v čase a prostoru.
- Cap-dependentní translace se významně aktivuje po znovuzahájení meiózy a je potlačená po fertilizaci oocytu.
- mTOR-eIF4F dráha je důležitá pro výstavbu vřeténka a tím pro zachování genomické stability buňky.
- Cyklin dependentní kináza 1 v oocytu významně reguluje mTOR-eIF4F signální dráhu.
- 4E-BP1 reguluje výstavbu vřeténka během prvního meiotického dělení savčího oocytu.
- Některé komponenty translačního aparátu se degradují v raném embryu, např. RPS14 a RPS6.

1 Introduction

The gene expression in mammalian fully grown oocyte is regulated exclusively at the level of translation, stability of mRNA and proteins. Previous growth period of oocyte is characterized by active transcription, which is necessary for further oocyte development and early embryo development. During subsequent period of meiotic maturation (10 h in mouse; 48 h in human), transition from prophase I to metaphase II, transcription is ceased. The completion of meiosis and early embryonic development in mammals relies significantly on maternal mRNAs, which were synthesized and stored during the growth phase of oogenesis¹. Transcribed mRNA is recognized and bound by RNA binding proteins, which control localization of mRNA, its translation and degradation. The tight correlation between mRNA distribution and subsequent protein localization and function provides a mechanism of spatial and temporal regulation of gene expression utilized by various cell types. Analysis of gene expression leads to identification of genes, which are crucial for understanding to development of the female germ cells².

Number of proteins that bind to untranslated regions (UTRs) of mRNA have been known for decades³. One of the known mechanisms of translational regulation is initiation dependent on 7-methyl guanosine cap, present on the 5' terminus of mRNA, so-called cap-dependent translation. Formation of eukaryotic initiation complex on the the 5' terminus of mRNA molecules, containig oligopyrimidine motif (terminal oligopyrimidine tract, TOP) is regulated by mTORC1 complex, which controls creation of eukaryotic initiation 4F complex (eIF4F)⁴. The class of TOP mRNAs includes e.g. mRNAs encoding ribosomal proteins, translation elongation factors and regulators of cell cycle⁵⁻⁷. The regulation of translation initiation is controled on molecular level especially by phosphorylation and dephosphorylation of translation factors^{8,9}. Serine-threonine kinase mTOR is component of mTORC-Raptor complex called mTORC1, which is the key player in regulation of protein synthesis^{9,10}. Crucial regulation step of translation is the initiation phase, during which of the eIF4F complex is assembled on the 7-methyl guanosine cap on the 5' terminus of mRNA. This complex is formed from three proteins: cap binding protein eIF4E, adaptor protein eIF4G1 and RNA helicase eIF4A¹¹. The key regulator of eIF4F assembly are eIF4E binding proteins (4E-BPs), mainly protein 4E-BP1. Hypophosphorylated 4E-BP1 forms heterodimer with eIF4E, which prevents formation of eIF4F complex and thereby prevents initiation of translation. One of the main kinases that phosphorylate 4E-BP1 and thus initiate translation, is mTOR kinase⁴. Another RNA binding protein positively regulating translation in the oocyte is DAZL, which binds to 3' terminus of mRNA. DAZL is essential for germ cell development^{12,13}. Major contribution on processing of mRNA and regulation of translation have heterogenous nuclear ribonucleoproteins (hnRNPs). The most studied member of this family is heterogenous nuclear ribonucleoprotein (hnRNP A1)¹⁴. Fundamental components of translation machinery are ribosomes, which are composed of ribosomal RNA and ~80 proteins¹⁵⁻¹⁷. Ribosome consists of big subunit (60S) and small subunit (40S). There are several proteins important for 40S subunit assembly, e.g ribosomal protein (RP) S14, S6 and S3. RPS6 protein physically interacts with ribosomal protein L24 (RPL24), which is a component of 60S subunit of ribosome¹⁸. Another component of the large ribosomal subunit is ribosomal protein L7. Higher levels of *Rps6*, *Rpl7* and *Rpl24* mRNAs were identified in fully grown, developmentally competent oocytes¹⁹. Although RNA metabolism is intensively studied, many regulatory aspects of this process in oocytes and embryos from various species remain to be elucidated. This thesis elucidates the metabolism of maternal RNAs and regulation of translation in mammalian oocytes.

2 Aims of the thesis

Hypothesis: Asymmetric localization of RNAs in oocyte determines temporal and spatial translation

Aim 1: To detect localization of global RNA and specific RNAs in mammalian oocyte and early embryo.

Aim 2: To determine localization of RNA binding proteins and components of translation machinery in mammalian oocyte and early embryo.

Hypothesis: mTOR-eIF4F pathway has a role in temporal and spatial translational control of specific protein expression during mammalian oocyte development

Aim 3: To detect global and specific translation in oocyte and early embryo.

Aim 4: To identify key regulators of 4E-BP1 and role of translation repressor 4E-BP1 in cap dependent translation in mammalian oocyte.

3 Material and methods

All performed methods are described in detail in the relevant manuscripts, which are attached in supplement part of this thesis.

Model use, cell specification

NIH3T3 mouse embryonal fibroblasts; human oocyte unsuitable for assisted reproduction, *Mus musculus* strain *alba* CD1, at least 6 week-old mice, for experiments were selected fully grown oocytes in GV stage, after wash from IBMX and following cultivation for 70 minutes we collected NEBD stage, after 3 h of cultivation we collected post-NEBD, after 7 h of cultivation we collected pro-MI and 12 h MII. Females were mated with males after human choriogonadotropin and zygotes were isolated 20 hours after mating and 2-cell embryo was collected after 48 h post fertilization.

Cultivation of NIH3T3 cell line for *in situ* hybridization

Mouse fibroblasts NIH3T3 was cultured in DMEM medium (Thermo Fisher) with 10% fetal bovine serum (Sigma Aldrich) and 1% penicillin, streptomycin (Thermo Fisher). Cells were seeded on cover glass and after 2 days was cell fixed by 4% paraformaldehyde (Sigma Aldrich) and then 70% ethanol.

Isolation and cultivation of oocyte, *in vitro* maturation, cultivation of embryo

Isolation and cultivation of oocyte was performed according to protocol Tetkova and Hancova (2016). These methods are described in detail in the manuscripts: „Temporal and spatial regulation of translation in the mammalian oocyte via the mTOR-eIF4F pathway, Regulation of 4E-BP1 activity in the mammalian oocyte, Transcriptome and translation in mammalian oocyte and embryo“.

Immunocytochemistry (ICC) and confocal microscopy

Proteins were detected by primary antibodies and consequently visualized by secondary antibodies with relevant Alexa Fluor 488, 594 or 647 conjugates. These samples were scanned by confocal microscope Leica TCS SP5 (Leica, Microsystem AG, Wetzlar, Germany). Images

were analyzed by softwares LAS AF Lite (Leica) or ImageJ/FIJI (<http://rsbweb.nih.gov/ij/>). This method is described in manuscript which are included in this thesis: „Temporal and spatial regulation of translation in the mammalian oocyte via the mTOR-eIF4F pathway“ and „Transcriptome and translation in mammalian oocyte and embryo“.

Fluorescence RNA *in situ* hybridization (RNA FISH)

Fluorescent *in situ* hybridization of RNA was performed according protocols Raj et al., (2013, 2008) and modified protocol from Jansova (2015). Method is described in detail: „Temporal and spatial regulation of translation in the mammalian oocyte via the mTOR-eIF4F pathway“ and „Transcriptome and translation in mammalian oocyte and embryo“.

Real-Time Reverse Transcription-Polymerase Chain Reaction (Real time RT-PCR)

For measuring of gene expression was used single Real time RT-PCR by One Step RT-PCR kit (Real time RT-PCR) on real-time cycler Rotor-Gene 3000 (Corbett Research, Mortlake, Australia). This method was described in our manuscripts: „Temporal and spatial regulation of translation in the mammalian oocyte via the mTOR-eIF4F pathway“ and „Regulation of 4E-BP1 activity in the mammalian oocyte“.

Western blot (WB)

Lysates of embryos and oocytes were analysed on 4-12% gradient acrylamide gel. Samples were transferred to polyvinylidene-fluoride membrane (Immobilon P; Merck Millipore) using blotting system (Biometra GmbH) at 5 mA/cm² during 25 min. Membranes were blocked for 1 h, at room temperature and then they were incubated at 4 °C overnight with the following primary antibodies with 1% milk/TTBS (Tween-Tris-buffer saline; NaCl, Tween 20,2M; Tris pH 7,6; dH₂O). After 3 cycles of 10 minute washing in 0,05% TTBS membrane was incubated at room temperature for 1 h in 3% milk with secondary antibody conjugated with peroxidase (Jackson Immunoresearch). Following washing step with 0,05% TTBS. Immunodetected proteins were visualized by ECL (Amersham, GE Healthcare Life Science) according instruction from supplier. Films were scanned using a GS-800 calibrated densitometer (Bio-Rad) and quantified using ImageJ/FIJI (<http://rsbweb.nih.gov/ij/>). Protocol is described more detailed in „Temporal and spatial regulation of translation in the mammalian oocyte via the mTOR-eIF4F pathway“ and “Regulation of 4E-BP1 activity in the mammalian oocyte“.

Proximity ligation assay (PLA)

Physical interaction of RPS24 and RPS6 was performed according to manual instructions of PLA Duolink kit (Sigma Aldrich). Fixed oocytes and embryos were permeabilized as same case of ICC methods. After permeabilization samples were blocked for 30 min at 37 °C by blocking solution (component PLA Duolink kit). Oocytes were incubated with primary antibodies rabbit anti-RPL24 (Thermo Fisher) and mouse anti-RPS6 (Santa Cruz) at 4 °C overnight. Then the samples were incubated with PLA probe MINUS and PLA probe PLUS stock for 1 h at 37 °C. Following washing by Wash Buffer A (PLA Duolink kit; Sigma Aldrich) for 6x2 min and then samples were ligated for 30 min at 37 °C. The final step was amplification for 100 min at 37 °C. Next samples were washed in Wash buffer B (PLA Duolink kit; Sigma Aldrich) according to protocol. The samples were mounted by Vectashield

Mounting Medium with DAPI (Vector Laboratories). This method was described in „Transcriptome and translation in mammalian oocyte and embryo“.

Fluorescent in situ hybridization with rolling circle amplification (RCA FISH)

Visualization of whole transcriptome was performed according protocols from Larsson et al., (2010) and Lee et al., (2015). Samples were fixed by 4% paraformaldehyde and washed by 70% ethanol, RNA were converted to cDNA by M-MuLV reverse transcriptase (Enzymatics) for overnight at 37 °C. Then mRNA was degraded by ribonuclease H (Enzymatics) and padlock probes are hybridized to targeted cDNA with 5' and 3' arms circularized by CircligaseII (Illumina) for 1 h at 60 °C by T4 DNA ligase. The circularized padlock probes serve as a template for amplification step by Φ29 DNA polymerase (Enzymatics), over night at 37° C. The final step was hybridization fluorescently labelled probes consists of eight nucleotides with random sequence (NNNNNNNN; Illumina). This method is described in detail in „Transcriptome and translation in mammalian oocyte and embryo“.

Statistical analysis

Mean and SD values were calculated using MS Excel, statistical significance of the differences between the groups were tested using Student's t-test (PrismaGraph5) and P<0.05 was considered as statistically significant.

4 Results and comments on publications

4.1 Temporal and spatial regulation of translation in the mammalian oocyte via the mTOR-eIF4F pathway

Aim of this manuscript was to determine role of key proteins of mTOR-eIF4F pathway in regulation by biochemical and molecular methods during cap-dependent translation in mouse oocyte and zygote. This study provide new view of connection on mRNA localization and translation in mouse oocyte. We detected mRNAs in the nucleus and in the vicinity of chromosomes post NEBD. By incorporation of methionine analog we identified translational gradient in the oocyte after NEBD where intensive translation was detected at the newly forming spindle where key factors of mTOR-eIF4F axis are present. Taken together our results show that translation at the meiotic spindle is regulated via mTOR-eIF4F pathway. Moreover our data showed that the inhibition of the mTOR-eIF4F pathway (either by 4EGI or Rapamycin treatment) leads to progression through meiosis I, however severe errors in chromosome segregation occurs. Together our findings suggest that spatiotemporally regulated translational control of spindle assembly and chromosome segregation is mediated by mTOR-eIF4F pathway in the mammalian oocyte.

4.2 Translation in the mammalian oocyte in space and time

This invited review was prepared to expand our published findings (see 4.1). Review is focused on the recently emerged findings on RNA distribution related to the temporal and spatial translational control of the meiotic progression of the mammalian oocyte. We summarized knowledges from 202 scientific reports, which were focused on RNA metabolism in various cell types from different organisms in connection with mammalian oocytes and early embryos. Comparative studies in non-traditional model systems are valuable in order to address dissimilarities and overlaps in molecular physiology to provide important information regarding the components and mechanisms that may play critical regulatory roles in the fertility of mammalian species, including human.

4.3 Regulation of 4E-BP1 activity in the mammalian oocyte

This manuscript describe key role of 4E-BP proteins as translation repressors in the process of cap dependent translation initiation. Here we show that mouse oocyte contains only 4E-BP1 at the protein level and becomes inactivated by phosphorylation via mTOR kinase after nuclear envelope breakdown. Inactivation of 4E-BP1 is connected with translational reprogramming post NEBD. We support hypothesis that mTOR is activated by CDK1, which is main activator of 4E-BP1 in oocyte. Our immunofluorescence analyses show localization of inactive form of 4E-BP1 at the newly forming spindle. Moreover expression of the dominant negative 4E-BP1 mutant negatively affects translation of TOP motif reporter and results in spindle abnormality. In addition we detected similar mTOR activation postNEBD as it is in the mouse. Taken together we intensively studied regulation and role of 4E-BP1 in the mammalian meiosis.

4.4 Transcriptome and translation in mammalian oocyte and embryo

Purpose of the manuscript is visualization of global transcriptome in mouse oocyte and embryos and determination of effect to cap dependent translation. This manuscript is part of results of thesis and will be submitted to scientific journal during summer 2017.

Global transcriptome is partially localized into nucleus of oocyte and embryo

We visualized global transcriptome by two methods. Firstly, it was detected of polyadenylated RNA in mouse oocyte and embryo. For detection of whole transcriptome we used *in situ* reverse transcription following *in situ* hybridization by fluorescent random probes. Both methods leads to similar conclusion, that transcriptionally inactive GV oocyte contains number of RNA molecules in nucleus and in cytoplasm. In transcriptionally active embryo we detected strong signal in nucleus and cytoplasm. Using ICC method we detected diffusibly localized ribosomal 5.8S rRNA in both cells. Moreover for detection of m3G-cap/m7G-cap of RNAs we used specific antibody which shows stronger signal in nucleus in comparison with cytoplasm. Taken together this results confirm that nucleus of oocyte and embryo contains abundant RNA population which is most likely independent of transcriptional state of the studied cells.

Detection of specific RNAs in oocyte and embryo

It isn't much known about localization of specific maternal transcripts in mammalian oocyte and embryo. In this part we detected three transcripts *Dazl*, *β-actin* and *Neat2*. Whereas we detected *Dazl* mRNA in oocyte and embryo, this mRNA isn't present in cumulus cells, which is in accordance with expression of germ cell specific gene. Next we detected *β-actin* mRNA in leading edges and throughout cytoplasm of NIH3T3 cells and detected *β-actin* mRNA in nucleus of transcription active cells. In oocyte *β-actin* mRNA was detected in both subcellular compartments, nucleus and cytoplasm of the oocyte and dot-like structures in the cytoplasm of the embryo. Long noncoding RNA called *Neat2* is known as a component of parasomes in somatic cells, which was confirmed in NIH3T3 cell line. We detected *Neat2* in nucleus of the oocyte where forming ring structures, on the other hand in embryo was also detected in the cytoplasm.

Expression and localization of RNA binding proteins in oocyte and 2-cell embryo

We detected four RNA binding proteins: 4E-BP1, hnRNPA1, CPEB4 and eIF4A3. The key role of 4E-BP1 is repression of translation (see 4.1 and 4.3). This protein was detected in nucleus and cytoplasm in granular structures cytoplasm of oocyte. After degradation of

RNA by RNase A granular structures disappeared. This experiment proves that nonphosphorylated 4E-BP1 binds maternal RNA. Immunoblot showed no differences in expression between oocyte and early embryo. Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein A1 (hnRNPA1) is localized at the cortex of the cytoplasm and in the nucleus of the oocyte. Expression of protein hnRNPA1 doesn't change in oocyte and early embryo. CPEB4 is homogenously distributed throughout whole volume of cytoplasm and is present in oocyte and embryo in the same level. ICC shows that eIF4A3 localize mostly to the nucleus in oocyte and embryo. Immunoblot showed no changes of level of eIF4A3 protein between oocyte and embryo. We confirmed that RNA binding proteins and ribonucleoproteins are present in the nucleus of oocyte and early embryo. Destruction of maternal RNA cause disruption of granular structure of 4E-BP1.

Characterization of expression of ribosomal proteins in oocyte and early embryo

We characterized expression of ribosomal proteins both subunits of ribosome using ICC and WB. RPS14 was detected in nucleus and also in the cortex and cytoplasm. In embryo level of RPS14 protein is decreased, which also correlated with decrease of immunofluorescence in 2-cell embryo. RPS14 is localized at the cortex of oocyte and nucleoplasm, however in the 2-cell embryo is localized at the cortex. Whereas, RPS3 protein level does not differ between GV oocyte and 2-cell embryo. RPS3 is localized in both stages dispersedly throughout the whole volume of the cell and also in the cortex. Level of protein S235/236 RPS6 decreased in 2-cell embryo compared to GV oocyte. We localized S235/236 RPS6 throughout the whole volume of both stages, however 2-cell embryo is more clustered. Protein level of RPL7 is higher in GV oocyte than in 2-cell embryo. We detect fluorescent signal of RPL7 in both compartments of GV stage. We localized strong signal in ridge of dividing blastomeres. Protein level of RPL24 is stable between GV and 2-cell embryo. Protein was localized in the nucleus and diffusely in the cytoplasm in GV oocyte, in the 2-cell embryo it is distributed throughout cytoplasm and nucleus. Experiments showed degradation of RPS14, S235/236 RPS6 ribosomal proteins in early embryo.

Detection of translation in oocyte and embryo

Translation is necessary for development of oocyte and resumption of meiosis. We detected fluorescent signal of methionine analogue (L-homopropargylglycine; HPG). In the whole oocyte increased in the perinuclear area, while in 2-cell embryo we detected strong signal at dividing ridge of blastomeres. As expected, disruption of the ribosomes by puromycin decreased the intensity of HPG signal in GV oocyte. To detect assembled 80S in the oocyte and embryo we used Duolink *in situ* proximity ligation assays (PLA). We detected significant interactions of these two proteins in the cytoplasm of oocyte and 2-cell embryo. Quantification of the RPL24 and RPS6 interaction sites shows 69% ($p \leq 0,05$) decrease of interaction in the embryo in comparison with oocyte. Translation is localized asymmetrically in the mouse oocyte and embryo.

Localization of poly(A) RNA and RBPs is similar in human and mouse oocyte

We are interested in similarities in mRNA metabolism between human and mouse. We analyzed human oocytes by RNA FISH and ICC. Using single molecule FISH we detected poly(A) RNA in the nucleus and cytoplasm of human GV oocyte. To estimate the regulation of RNA metabolism of the human oocyte we labeled (translational represor) 4E-BP1 and (component of Exon Junction Complex) eIF4A3. Both proteins are localized in the nucleus

and cytoplasm of both species. Our data suggest similar distribution and RNA metabolism in both mammalian species.

Visualization of translation of endogenous β -actin mRNA in live oocyte

To enhance our knowledge of localization of the translation, we used visualization of translation of endogenous specific mRNA in the living oocyte. For this purpose we have chosen Resorufin Arsenical Hairpin (ReAsH) fluorescent tagging method²⁷ that recognizes a special tetracysteine (TC) domain. TC peptide is labeled with ReAsH dye, in this case β -actin, on the 5' terminus. We microinjected a plasmid containing a sequence coding TC- β -actin-GFP into transcriptionally active (growing) oocytes. TC domain binds ReAsH dye during the translation of the peptide, during ongoing translation in a living oocyte (as opposed to classical labels, such as GFP used in our system to visualize the fully-formed protein). In microinjected oocytes, reporter RNA is transcribed in the absence of translation using translation inhibitor cycloheximide (CHX) for 10–16 hours. After CHX wash short (30 min) translation period coupled with incubation with ReAsH dye. Imaging of live oocytes shows *in situ* translation of β -actin. We identified the translation of β -actin RNA construct on the cell cortex of the living oocyte which also refers to spatiotemporal organized translation in this large cell.

5 Discussion

This thesis is focused on regulation of cap dependent translation in mammalian oocyte. The positioning of mRNAs is required for the localized translation of proteins. Compartmentalization of RNAs and following translation is a fundamental mechanism of gene expression. mRNA localization can be more thermodynamically efficient for the cell than transporting proteins due to fewer mRNA molecules needed to be mobilized²⁸. Our results confirmed, that the nucleus of mouse GV oocyte contains large amounts of both coding and noncoding RNA and RNA binding proteins²⁹. We found that similar localization pattern persist in the human oocyte. Altogether, our findings indicate that a nuclear RNA population contributes to mammalian oocyte translational patterning and thus to the regulation of gene expression during the dynamic onset of meiosis. Moreover, in this work is highlighted for the first time the importance of nucleus retained mRNAs for the control and regulation of meiotic maturation. In addition, we expect that retained transcripts in oocytes from both species are dormant and become translated after nuclear envelope break down and this mechanism of RNA metabolism is important for meiotic spindle assembly. Our results proved recent studies, they confirmed and identify some transcripts that are present in the area of meiotic spindle³⁰⁻³³.

Furthermore our results imply a role of nuclear lamina in the meiotic spindle assembly. The rest of Lamin A/C and endoplasmic reticulum (ER) structures were detected around the area of forming spindle following the nuclear envelope breakdown²⁹. Colocalization of Lamin A/C and ER structures suggests a role of these structures in compartmentalization of cytoplasm. We present hypothesis that Lamins and other structures forming a semipermeable barrier which is important for maintenance of intracellular gradient of various constituents in this large cell. Same function of semipermeable barrier was previously known in mitotic cells³⁴⁻³⁶. The function of the semipermeable barrier in the oocyte might be spatial retention of nuclear components (e.g RNA, chromosomes) while multipolar spindle is formed.

Detection of nascent translation shows presence of increased translational activity at newly forming spindle. We proposing that local translation is crucial for synthesis of proteins essential for spindle assembly. Despite of local translation, it is important to note the contribution of transported proteins from other cellular compartments into chromosomal area. Our results indicate that mTOR-eIF4F axis has contribution to the local translation which is observed at the newly forming spindle in the vicinity of chromosomes. These data are consistent with localization of abundant population of polyadenylated RNAs. It is important to note that activity of mTOR-eIF4F is significantly increased after NEBD with decline after fertilization, which positively correlate with CDK1 activity. In Jansova et al., (2017) we described that CDK1 (key component of MPF) has positive effect on the phosphorylation of mTOR at the onset of meiotic resumption. This way mTOR is activated with its subsequent function on cap dependent translation. Moreover we did not detect 4E-BP1 phosphorylation in mitotically inactive cummular cells but it was detected in the oocyte entering to the prometaphase suggesting cell cycle dependent role of the mTOR-eIF4F axis. Our findings support results from previous studies which describe significant increased activity of cap dependent translation at onset of mitosis^{38,39}. However, it is contradictory with earlier results⁴⁰ which proposed inactivation of cap dependent translation upon entry to mitosis which might be explained by side effect of cell synchronization protocol. Downregulation of mTOR-eIF4F leading to chromosomal aberration (oocyte aneuploidy) supports our hypothesis about the role of mTOR-eIF4F pathway regulating translation at the vicinity of chromosomes during NEBD. Our hypothesis about the role of mTOR-eIF4F axis in the meiosis supports downregulation of axis which leads to aneuploidy in the oocyte. This thesis is also focused to detection of global and specific RNA, RNA binding proteins and ribosomal proteins in oocyte and two cell embryo. We decided to study 4E-BP1, because it is translation repressor of cap dependent translation. We found that 4E-BP1 indeed binds to RNA as after adding RNase A it lost its granular pattern in the oocyte. In addition, we confirmed some of ribosomal proteins, which are important for translation, are degraded after fertilization. These results positively correlate with the decrease of global translation⁴¹. This thesis contributes to elucidate the processes of regulation of maternal transcriptome and initiation of translation, which are necessary for development of these unique cell types.

6 Conclusions of thesis

- Nuclei of both mouse and human oocytes contain RNA and RNA binding proteins.
- RNA molecules retained in the nucleus are translated after the resumption of meiosis manifested by nuclear envelope breakdown.
- RNA metabolism in both human and mouse oocyte is regulated by similar mechanisms.
- Asymmetric localization of RNA regulates spatial and temporal translation in mammalian oocyte.
- Cap dependent translation is become highly active at the onset of meiosis and deactivated after fertilization.
- mTOR-eIF4F pathway is essential for meiotic spindle assembly and genome integrity of mouse oocyte.
- Cyclin-Dependent Kinase 1 regulates mTOR- eIF4F pathway in mouse oocyte.
- 4E-BP1 is responsible for regulation of translation at the meiotic spindle.
- Some components of translation machinery are degraded in early embryo, e.i RPS14 and RPS6.

7 Použitá literatura/References

1. De La Fuente, R. *et al.* Major chromatin remodeling in the germinal vesicle (GV) of mammalian oocytes is dispensable for global transcriptional silencing but required for centromeric heterochromatin function. *Dev. Biol.* **275**, 447–458 (2004).
2. Buxbaum, A. R., Haimovich, G. & Singer, R. H. In the right place at the right time: visualizing and understanding mRNA localization. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **16**, 95–109 (2015).
3. Bachvarova, R. F. A maternal tail of poly(A): the long and the short of it. *Cell* **69**, 895–897 (1992).
4. Thoreen, C. C. *et al.* A unifying model for mTORC1-mediated regulation of mRNA translation. *Nature* **485**, 109–113 (2012).
5. Meyuhas, O. & Dreazen, A. Ribosomal protein S6 kinase from TOP mRNAs to cell size. *Prog. Mol. Biol. Transl. Sci.* **90**, 109–153 (2009).
6. Yamashita, R. *et al.* Comprehensive detection of human terminal oligo-pyrimidine (TOP) genes and analysis of their characteristics. *Nucleic Acids Res.* **36**, 3707–3715 (2008).
7. Jefferies, H. B. *et al.* Rapamycin suppresses 5' TOP mRNA translation through inhibition of p70s6k. *EMBO J.* **16**, 3693–3704 (1997).
8. Schepher, G. C. & Proud, C. G. Does phosphorylation of the cap-binding protein eIF4E play a role in translation initiation? *Eur. J. Biochem.* **269**, 5350–5359 (2002).
9. Hara, K. *et al.* Raptor, a binding partner of target of rapamycin (TOR), mediates TOR action. *Cell* **110**, 177–189 (2002).
10. Oh, W. J. & Jacinto, E. mTOR complex 2 signaling and functions. *Cell Cycle Georget. Tex* **10**, 2305–2316 (2011).
11. Mader, S., Lee, H., Pause, A. & Sonenberg, N. The translation initiation factor eIF-4E binds to a common motif shared by the translation factor eIF-4 gamma and the translational repressors 4E-binding proteins. *Mol. Cell. Biol.* **15**, 4990–4997 (1995).
12. Chen, J. *et al.* Genome-wide analysis of translation reveals a critical role for deleted in azoospermia-like (Dazl) at the oocyte-to-zygote transition. *Genes Dev.* **25**, 755–766 (2011).
13. Rosario, R., Adams, I. R. & Anderson, R. A. Is there a role for DAZL in human female fertility? *Mol. Hum. Reprod.* **22**, 377–383 (2016).
14. Jean-Philippe, J., Paz, S. & Caputi, M. hnRNP A1: The Swiss Army Knife of Gene Expression. *Int. J. Mol. Sci.* **14**, 18999–19024 (2013).
15. Korobeinikova, A. V., Garber, M. B. & Gongadze, G. M. Ribosomal proteins: structure, function, and evolution. *Biochem. Biokhimiia* **77**, 562–574 (2012).
16. Ben-Shem, A. *et al.* The structure of the eukaryotic ribosome at 3.0 Å resolution. *Science* **334**, 1524–1529 (2011).
17. Bachvarova, R. & De Leon, V. Stored and polysomal ribosomes of mouse ova. *Dev. Biol.* **58**, 248–254 (1977).
18. Oliver, E. R., Saunders, T. L., Tarlé, S. A. & Glaser, T. Ribosomal protein L24 defect in Belly spot and tail (Bst), a mouse Minute. *Dev. Camb. Engl.* **131**, 3907–3920 (2004).
19. Monti, M. *et al.* Developmental Arrest and Mouse Antral Not-Surrounded Nucleolus Oocytes. *Biol. Reprod.* **88**, 2 (2013).
20. Tetkova, A. & Hancova, M. Mouse Oocyte Isolation, Cultivation and RNA Microinjection. *BIO-Protoc.* **6**, (2016).
21. Shaffer, S. M., Wu, M.-T., Levesque, M. J. & Raj, A. Turbo FISH: A Method for Rapid Single Molecule RNA FISH. *PLoS ONE* **8**, (2013).

22. Raj, A., van den Bogaard, P., Rifkin, S. A., van Oudenaarden, A. & Tyagi, S. Imaging individual mRNA molecules using multiple singly labeled probes. *Nat. Methods* **5**, 877–879 (2008).
23. Jansova, D. Single Molecule RNA FISH in the Mammalian Oocyte. *Bio-protocol* **2015**, e1666
24. Larsson, C., Grundberg, I., Söderberg, O. & Nilsson, M. In situ detection and genotyping of individual mRNA molecules. *Nat. Methods* **7**, 395–397 (2010).
25. Lee, J. H. *et al.* Fluorescent in situ sequencing (FISSEQ) of RNA for gene expression profiling in intact cells and tissues. *Nat. Protoc.* **10**, 442–458 (2015).
26. Ruggiu, M. *et al.* The mouse Dazla gene encodes a cytoplasmic protein essential for gametogenesis. *Nature* **389**, 73–77 (1997).
27. Machleidt, T., Robers, M. & Hanson, G. T. Protein labeling with FlAsH and ReAsH. *Methods Mol. Biol. Clifton NJ* **356**, 209–220 (2007).
28. Weatheritt, R. J., Gibson, T. J. & Babu, M. M. Asymmetric mRNA localization contributes to fidelity and sensitivity of spatially localized systems. *Nat. Struct. Mol. Biol.* **21**, 833–839 (2014).
29. Susor, A. *et al.* Temporal and spatial regulation of translation in the mammalian oocyte via the mTOR-eIF4F pathway. *Nat. Commun.* **6**, 6078 (2015).
30. Bhatt, D. M. *et al.* Transcript dynamics of proinflammatory genes revealed by sequence analysis of subcellular RNA fractions. *Cell* **150**, 279–290 (2012).
31. Jambor, H. *et al.* Systematic imaging reveals features and changing localization of mRNAs in Drosophila development. *eLife* **4**, (2015).
32. Lécuyer, E. *et al.* Global Analysis of mRNA Localization Reveals a Prominent Role in Organizing Cellular Architecture and Function. *Cell* **131**, 174–187 (2007).
33. Romasko, E. J., Amarnath, D., Midic, U. & Latham, K. E. Association of maternal mRNA and phosphorylated EIF4EBP1 variants with the spindle in mouse oocytes: localized translational control supporting female meiosis in mammals. *Genetics* **195**, 349–358 (2013).
34. Schlaitz, A.-L., Thompson, J., Wong, C. C. L., Yates, J. R. & Heald, R. REEP3/4 ensure endoplasmic reticulum clearance from metaphase chromatin and proper nuclear envelope architecture. *Dev. Cell* **26**, 315–323 (2013).
35. Capalbo, L., D'Avino, P. P., Archambault, V. & Glover, D. M. Rab5 GTPase controls chromosome alignment through Lamin disassembly and relocation of the NuMA-like protein Mud to the poles during mitosis. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **108**, 17343–17348 (2011).
36. Goodman, B. *et al.* Lamin B counteracts the kinesin Eg5 to restrain spindle pole separation during spindle assembly. *J. Biol. Chem.* **285**, 35238–35244 (2010).
37. Jansova, D. *et al.* Regulation of 4E-BP1 activity in the mammalian oocyte. *Cell Cycle Georget. Tex* 1–13 (2017). doi:10.1080/15384101.2017.1295178
38. Heesom, K. J., Gampel, A., Mellor, H. & Denton, R. M. Cell cycle-dependent phosphorylation of the translational repressor eIF-4E binding protein-1 (4E-BP1). *Curr. Biol.* **11**, 1374–1379 (2001).
39. Gwinn, D. M., Asara, J. M. & Shaw, R. J. Raptor is phosphorylated by cdc2 during mitosis. *PloS One* **5**, e9197 (2010).
40. Pyronnet, S., Pradayrol, L. & Sonenberg, N. A cell cycle-dependent internal ribosome entry site. *Mol. Cell* **5**, 607–616 (2000).
41. Schultz, R. M. Regulation of zygotic gene activation in the mouse. *BioEssays News Rev. Mol. Cell. Dev. Biol.* **15**, 531–538 (1993).

8 Seznam publikací/List of publications

8.1. Publikace *in extenso*, které jsou podkladem disertace

a) s IF

Susor A, **Jansova D**, Cerna R, Danylevska A, Anger M, Toralova T, Malik R, Supolikova J, Cook MS, Oh JS, Kubelka M. Temporal and spatial regulation of translation in the mammalian oocyte via the mTOR-eIF4F pathway. **Nat Commun.** 2015 Jan 28;6:6078. doi: 10.1038/ncomms7078. **IF:11,329**

Susor A, **Jansova D**, Anger M, Kubelka M. Translation in the mammalian oocyte in space and time. **Cell Tissue Res.** 2016 Jan;363(1):69-84. doi: 10.1007/s00441-015-2269-6. Review **IF:2,948**

Jansova D, Konicka M, Tetkova A, Cerna R, Malik R, Llano del E, Kubelka M, Susor A.. Regulation of 4E-BP1 activity in the mammalian oocyte, **Cell Cycle**, 2017. **IF: 3,53**

Jansova D, Konicka M, Tetkova A, Susor A. Transcriptome and translation in mammalian oocyte and embryo, **Sci. Rep.**, 2017 (submitted in summer 2017).

b) bez IF

Jansova D, (2015) Single Molecule RNA FISH in the mammalian oocyte. **Bio-protocol.** 5(23):e1666.

8.2. Publikace *in extenso* bez vztahu k tématu disertace, s IF

Nemcova L, **Jansova D**, Vodickova-Kepkova K, Vodicka P, Jeseta M, Machatkova M, Kanka J. Detection of genes associated with developmental competence of bovine oocytes. **Anim Reprod Sci.** 2016 Mar;166:58-71. doi: 10.1016/j.anireprosci.2016.01.004 **IF: 1,377**

8.3. Prezentace výsledků

Konference

- | | |
|----------|---|
| 09/ 2014 | 18th International Microscopy congress. Praha Kongresové centrum, Česká republika. Plakátové sdělení: <i>Phosphorylation of 4E-BP1 promotes translation at the oocyte spindle.</i> |
| 09/ 2015 | Protein Synthesis and Translational Control. EMBL Heidelberg, Německo. Plakátové sdělení: <i>Phosphorylation of 4E-BP1 regulates translation in mammalian germ cells.</i> |
| 09/2015 | RNA CLUB 2015, České Budějovice, Jihočeská univerzita. Plakátové sdělení: <i>Visualization of the RNA world in the mammalian oocyte.</i> |
| 09/ 2016 | RNA CLUB 2016, Brno, Masarykova univerzita. Přednáška: <i>RNA world in progress- Complex visualization of transcriptome in oocyte and embryo.</i> |
| 07/ 2017 | RNA localization and local translation 2017. Barna, Itálie. Plakátové sdělení: <i>RNA a translation machinery in oocyte and embryo.</i> |

9 Životopis/Curriculum vitae

Name: Mgr. Denisa Jansová

E-mail: jansova@iapg.cas.cz

Date of birth: 20th July 1988

Education/Qualifications

- 2013-present Charles University in Prague, Czech republic; Faculty of Science
A PhD student at the Developmental Biology Program
Research interest: Transcriptome in the mammalian germ cells
PhD Thesis: Identification of key regulators of gene expression in mammalian oocyte and embryo
- 2011-2013 Charles University in Prague, Czech Republic; Faculty of Science
Department of Cell Biology, *Master's study program*
Diploma Thesis: Transcriptional activity of the genes characterizing developmentally competent cytoplasm in bovine oocytes
- 2008-2011 Charles University in Prague, Czech Republic; Faculty of Science
Department of Cell Biology, *Bachelor's study program*
Bachelor thesis: Actin and its regulation in clathrin endocytosis

Other Experience/Presentation and conferences

- July 2017 RNA localization and local translation 2017, Barna, Italy, participant poster session: *RNA a translation machinery in oocyte and embryo*
- November 2016 Super-Resolution Microscopy Studies, CEITEC, Brno, workshop
- September 2016 RNA CLUB 2016, CEITEC Brno, Czech Republic, invited speaker, *RNA world in progress: Complex visualization of transcriptome in oocyte and embryo*
- January 2016 *Analysis and processing next generation sequencing data, Prague CLIP lab*, Czech Republic, workshop
- September 2015 EMBO conference „Protein Synthesis and Translational Control“, Heidelberg, Germany, participant poster session: *Phosphorylation of 4E-BP1 regulates translation in mammalian germ cells*
- September 2015 RNA Club 2015 Ceske Budejovice, Czech Republic, poster presentation: *Visualization of the RNA world in the mammalian oocyte*
- April 2015 Processing and analysis of microscopical data in biomedicine, Institute of Molecular Biology, Prague, Czech Republic, workshop
- September 2014 18th International Microscopy congress (Prague), Czech Republic, participant poster session, *Phosphorylation of 4E-BP1 promotes translation at the oocyte spindle*
- May 2014 Summer school of microinjection and advance microscopy technique

	(CEITEC, Brno), Czech Republic, workshop
May 2014	XXII Cytoskeletal Club meeting, Vranovska Ves, Czech Republic
2010-2011	Charles University in Prague, Czech Republic; Faculty of Science, Departement of Cell Biology. <i>Searching of candidate genes by RNAi in Wnt signaling on C. elegans</i>

Publications

Susor A, **Jansova D**, Cerna R, Danylevska A, Anger M, Toralova T, Malik R, Supolikova J, Cook MS, Oh JS, Kubelka M. Temporal and spatial regulation of translation in the mammalian oocyte via the mTOR-eIF4F pathway. *Nat Commun.* 2015 Jan 28;6:6078. doi: 10.1038/ncomms7078. **IF:11,329**

Susor A, **Jansova D**, Anger M, Kubelka M. Translation in the mammalian oocyte in space and time. *Cell Tissue Res.* 2016 Jan;363(1):69-84. doi: 10.1007/s00441-015-2269-6. Review **IF:2,948**

Nemcova L, **Jansova D**, Vodickova-Kepkova K, Vodicka P, Jeseta M, Machatkova M, Kanka J. Detection of genes associated with developmental competence of bovine oocytes. *Anim Reprod Sci.* 2016 Mar;166:58-71. doi: 10.1016/j.anireprosci.2016.01.004 **IF: 1,377**

Jansova D, Koncicka M, Tetkova A, Cerna R, Malik R, Llano del E, Kubelka M, Susor A.. Regulation of 4E-BP1 activity in the mammalian oocyte, **Cell Cycle**, 2017. **IF: 3,952**

Jansova D, Konicka M, Tetkova A, Susor A. Transcriptome and translation in mammalian oocyte and embryo, submitted 2017, **Sci. Rep.**

Grants

4/2015-12/2017 GAUK 227026, student's grant of Charles University: *RNA world in mammalian oocyte*

4/2014-12/2014 IGA, internal student's grant of the Institute of Animal Physiology and Genetics: *Localization specific mRNA in live oocyte*