

Univerzita Karlova
Přírodovědecká fakulta

Studijní program: Speciální chemicko-biologické obory
Studijní obor: Molekulární biologie a biochemie organismů



Monika Vlčková

Centrioly spermie a jejich úloha v reprodukci
Sperm centrioles and their role in reproduction

Bakalářská práce

Vedoucí práce: Mgr. Michaela Frolíková, Ph.D.

Praha 2019

Prohlášení

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

V Praze dne 15. 8. 2019

Podpis

Poděkování

Ráda bych tímto poděkovala své školitelce Mgr. Michaelle Frolíkové, Ph.D. za její profesionální vedení práce, vstřícný přístup, užitečné rady, ochotu a především čas, který mi při psaní této bakalářské práce věnovala.

Abstrakt

Centrioly jsou evolučně konzervované proteinové struktury složené z mikrotubulů. V somatických buňkách centrioly slouží jako bazální tělísko řasinek a bičíků a umožňují sestavení pericentriolárního materiálu, a tím vznik centrosomu. Centrosom je organela, bez jejíž přítomnosti nejsou živočišné buňky schopné jaderného dělení. Centrioly nevznikají de novo a k jejich formaci je vždy nutná přítomnost již existující centrioly. Vzhledem k tomu, že ve vajíčku, na rozdíl od spermie, nejsou v době oplození přítomné žádné centrioly, je nositelem centriol spermie, a tudíž jsou všechny centrioly nově vznikajícího organismu paternálního původu. Ve spermích nalezneme centrioly dvě - proximální válcovitého tvaru a distální, která je k proximální umístěna kolmo. Centrioly spermie jsou základem pro vznik spermatického bičíku a po oplození tvoří mitotické vřetenko zygoty, nezbytné pro rovnoměrnou distribuci DNA a rozdělení buněk. Z výše uvedeného vyplývá, že přítomnost centriol ve spermii je u savců esenciální a jejich defekty mohou vést k samčí sterilitě nebo poruchám vývoje embrya. Centrioly spermie se ale od centriol somatických buněk svou strukturou a chováním poněkud liší a porozumění těmto odlišnostem je jedním z důležitých úkolů reprodukční biologie.

Klíčová slova: centriola, spermie, centrosom, mikrotubuly, bičík, řasinka, atypická centriola, remodelace centrioly, oplození, neplodnost

Abstract

Centrioles are evolutionarily conserved protein structures composed of microtubules. In somatic cells, centrioles serve as the basal body of cilia and flagella and allow the assembly of pericentriolar material, thereby creating the centrosome. Without centrosome, animal cells are not capable of nuclear division. Centrioles do not arise de novo and their formation always requires the presence of a preexisting centriole. Since there are no centrioles in the egg at the time of fertilization, unlike spermatozoa, sperm is the carrier of centrioles and therefore all of the centrioles of the emerging organism are of paternal origin. There are two centrioles in the sperm - a cylindrical shape proximal and a distal one, which is perpendicular to the proximal. The sperm centrioles are the basis for the formation of the sperm flagellum and after fertilization form the mitotic spindle of the zygote, necessary for equal DNA and cell distribution. It follows from the above that the presence of centrioles in sperm is essential in mammals and defects in their structure may lead to male sterility or embryo development disorders. However, sperm centrioles differ from somatic centrioles in their structure and behavior and understanding these differences is one of the important tasks of reproductive biology.

Keywords: centriole, sperm, centrosome, microtubules, flagellum, cilium, atypical centriole, centriole remodeling, fertilization, infertility

Seznam zkratek

| | |
|---------------|--|
| ASS | syndrom acefalických spermií (acephalic sperm syndrome) |
| CDK2 | cyklin-dependentní kináza 2 |
| CENPJ | centromere protein J |
| CEP63 | centrosomální protein 63 |
| CEP76 | centrosomální protein 76 |
| CEP89 | centrosomální protein 89 |
| CEP110 | centrosomální protein 110 |
| CEP120 | centrosomální protein 120 |
| CEP135 | centrosomální protein 135 |
| CEP152 | centrosomální protein 152 |
| CEP164 | centrosomální protein 164 |
| CEP192 | centrosomální protein 192 |
| CEP195 | centrosomální protein 195 |
| CEP215 | centrosomální protein 215 |
| CEP290 | centrosomální protein 290 |
| CEP295 | centrosomální protein 295 |
| CETN1 | centrin 1 |
| CETN2 | centrin 2 |
| CETN3 | centrin 3 |
| CPAP | centrosomal P4.1-associated protein |
| DAP | distální přívěsky (distal appendages) |
| DC | distální centriola |
| GCP6 | γ -tubulin complex component 6 |
| HTCA | hlavička-bičík spojující aparát (head-tail coupling apparatus) |

| | |
|---------------|--|
| ICSI | metoda intracytoplasmatické injekce |
| IVF | in vitro fertilizace |
| LINC | linker nukleoskeletu a cytoskeletu (linker of nucleoskeleton and cytoskeleton) |
| MTOC | mikrotubuly-organizující centrum |
| NIP2 | NEP1-interacting protein 2 |
| PC | proximální centriola |
| PCM | pericentriolární materiál |
| PLK1 | polo-like kináza 1 |
| PLK4 | polo-like kináza 4 |
| POC1B | protein of centriole 1B |
| POC5 | protein of centriole 5 |
| SAS-6 | spindle assembly abnormal protein 6 |
| SDAP | subdistální přívěsky (subdistal appendages) |
| SPAG4 | sperm-associated antigen 4 |
| SPATA6 | spermatogenesis-associated protein 6 |
| STIL | SCL-interrupting locus protein |
| WNT | wingless/int-1 dráha |

Obsah

| | |
|---|----|
| Úvod | 1 |
| Cíle práce | 2 |
| 1. Stavba centriol..... | 3 |
| 1.1 Struktura a složení centriol | 3 |
| 1.1.1 Struktura a složení centriol somatických buněk..... | 3 |
| 1.1.2 Rozdíl mezi mateřskou a dceřinou centriolou | 5 |
| 1.1.3 Struktura a složení centriol spermie | 6 |
| 1.2 Tvorba centriol..... | 8 |
| 1.2.1 Tvorba centriol somatických buněk..... | 8 |
| 1.2.2 Tvorba centriol spermie | 11 |
| 1.3 Jak se centrioly dědí | 13 |
| 1.4 Centrosomální remodelace | 14 |
| 2. Funkce centriol..... | 15 |
| 2.1 Funkce centriol somatických buněk..... | 15 |
| 2.2 Funkce centriol spermie | 16 |
| 2.2.1 Funkce remodelované centrioly | 17 |
| 2.2.2 Funkce centriol v zygotě..... | 17 |
| 3. Evoluce centriol..... | 19 |
| 4. Variabilita centriol u řádu Rodentia | 20 |
| 5. Centrioly a možná souvislost se sterilitou | 22 |
| Závěr | 24 |
| Seznam obrazových příloh..... | 26 |
| Seznam použité literatury | 27 |

Úvod

Úspěšné oplození závisí kromě vajíčka také na spermii a pro jeho fyziologický průběh je vyžadován soubor několika komplexních událostí. Mezi tyto události můžeme zařadit mimo jiné i dekonzenci paternálních a maternálních chromosomů do samčího a samičího prvojádra, nukleaci mikrotubulů spermatického aster pro jejich apozici a obnovení centrosomu spermií (Manandhar et al., 2005). Defekty v kterékoliv z těchto událostí mohou být pro zygotu letální a ukazují se jako časté příčiny neplodnosti (Schatten and Sun, 2009).

Centrosom spermie se nachází ve spermatickém krčku a je tvořen dvěma centriolami - distální a proximální (Gatenby and Mathur, 1960). Centrioly jsou proteinové struktury, které si napříč různými skupinami eukaryot zachovávají konzervovaný počet, strukturu a proteinové složení (Robbins, 1968). Kromě centriol je součástí centrosomu také pericentriolární materiál, který centrioly obklopuje (Gould and Borisy, 1977). Stejně jako u somatických buněk je přítomnost kompletního centrosomu spermie nezbytná pro organizaci interfázické kostry mikrotubulů a dělicího vřeténka a následné rýhování embrya (Mazia, 1984). Centrioly jsou také esenciální pro pohyb spermie, dávají totiž vzniknout bičiku (Holstein and Roosen-Runge, 1981).

Centrioly se dědí paternálně, jelikož v průběhu vývoje oocyty dochází k jejich degeneraci (Schatten, 1994). Nesouměrné rozdělení centriol je jednou z hlavních příčin selhání oplození a abnormálního vývoje embrya (Simerly et al., 1995). Původně se myslelo, že v průběhu spermiogeneze je jedna z centriol degenerována a několik desetiletí tedy zůstávalo záhadou, jak zygota dosahuje správného počtu centriol, pokud od spermie zdědí centriolu pouze jednu (Sathananthan et al., 1991). Nedávno však bylo objeveno, že distální centriola spermie není degenerována, ale pouze remodelována. Od typické centrioly se svou stavbou i proteinovým složením liší, a tak byla její přítomnost přehlížena. Takto pozměněná centriola byla nazvána tzv. atypickou centriolou. Atypická centriola má stejně jako typická centriola schopnost formovat centrosom a nukleovat novou centriolu (Fishman et al., 2018).

Na základě studií různých skupin savců je zřejmé, že fyziologický stav centrosomu a centriol hraje důležitou roli v reprodukční schopnosti jedince. Objev atypické centrioly poskytl nové možnosti pro diagnostické a terapeutické strategie pro léčbu mužské neplodnosti a částečné porozumění příčinám časných vývojových vad embrya. Atypická centriola může být také klíčovou strukturou pro pohyblivost spermií, konkrétní důkazy u člověka však zatím chybí (Fishman et al., 2018).

Tato práce se zabývá studiem stavby, proteinového složení a funkce centriol savců a jejich úlohou v reprodukci. Vzájemně porovnává centrioly somatických buněk a centrioly spermií a upozorňuje na jejich rozdíly. Zahrnut je také řád Rodentia, který se od ostatních savců nepřítomností centriol výrazně liší. Poslední kapitola je věnována příčinám sterility spojovaným se stavem centriol, což se v dnešní době jeví jako stále aktuálnější téma.

Cíle práce

Cílem této bakalářské práce je shrnout dosavadní poznatky získané studiem centriol spermií, a to zejména centriol savců. Tato práce se zaměřuje na:

- (1) popis a porovnání stavby centriol somatických buněk a centriol spermie,
- (2) popis a porovnání funkcí centriol somatických buněk a funkce centriol spermie při spermatogenezi a spermiogenezi, dějích v reprodukčním traktu samice předcházejících oplození, při oplození a v rané embryogenezi,
- (3) objasnění možných příčin sterility souvisejících se stavem centriol.

1. Stavba centriol

1.1 Struktura a složení centriol

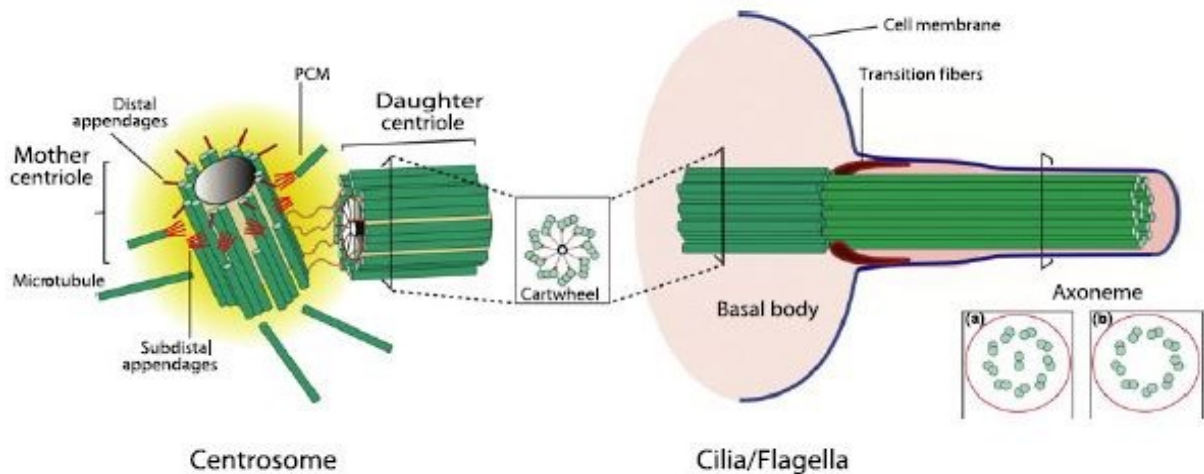
1.1.1 Struktura a složení centriol somatických buněk

Centrosom živočišných buněk je organela cytoplasmatického původu, která je tvořena párem centriol (obr. č. 1). Ten se za normálních okolností duplikuje jednou za buněčný cyklus a dává vznik mitotickým pólovým vřeténkům. Každé vřeténko obsahuje jednu novou a jednu starou centriolu (Robbins, 1968). Centrosom je úzce spojen s buněčným jádrem, nachází se v cytoplasmě těsně u jaderné membrány, která je v jeho blízkosti mírně prohloubena (Bornens, 1977). Centrioly jsou válcovité proteinové struktury o definované délce (cca 150-500 nm, v závislosti na typu buňky) a průměru (cca 250 nm), složené z devíti cirkulárně uspořádaných tripletů mikrotubulů obklopujících centriolární lumen. Tato stavba dělá z centriol jedny z největších proteinových struktur buňky (Winey and O'Toole, 2014). Struktura a proteinové složení centriol je evolučně konzervované (Carvalho-Santos et al., 2010). Živočišné buňky mají většinou dvě centrioly, které se nazývají mateřská a dceřiná a jsou umístěny kolmo k sobě (Manandhar and Schatten, 2000). Nicméně buňky se specializovanými funkcemi mohou mít až stovky centriol (Bornens, 2002). Zdá se, že všechny typy buněk mají centrosomy, které jsou považovány za organizující centra mikrotubulů (MTOC) (Schnackenberg, 1999). Centrioly i centrosomy jsou samoreprodukujícími se entitami a duplikují se v průběhu každého buněčného cyklu v synchronizaci s chromozomálním cyklem (Mazia, 1987).

Mikrotubuly v tripletech jsou označovány písmeny A, B a C. Za hlavní se považuje mikrotubul, tvořený 13 protofilamenty ve tvaru kompletního kruhu, označený písmenem A, na něj jsou dále napojeny mikrotubuly B a C (Winey and O'Toole, 2014). Centrioly jsou složeny ze stabilního konce na jedné straně a z rostoucího konce na straně druhé, můžeme o nich tedy říct, že jsou polarizované. Stabilní konec je označován také jako báze a rostoucí konec jako špička. Mikrotubuly jsou svým stabilním mínus koncem ukotveny do jádra centrosomu (Bornens, 2002) a růst probíhá přidáváním γ -tubulinových podjednotek k rostoucímu plus konci (McIntosh, 1984).

Centriola má schopnost se přichytit k buněčné membráně a změnit se v tzv. bazální tělísko, ze kterého vyrůstá primární či pohyblivá řasinka nebo bičík v případě spermie (obr. č. 1) (Anderson and Brenner, 1971). Mikrotubulární kostra uvnitř řasinky či bičíku, která vzniká prodloužením centriolárních mikrotubulů v oblasti rostoucího konce, se nazývá axonema (Bobinac et al., 1998). Axonema zrcadlí devítičlennou radiální symetrii centrioly přenášenou bazálním tělískem, ale místo devíti tripletů můžeme pozorovat devět dubletů (Bettencourt-Dias, 2013). Obecně má pohyblivá řasinka či bičík tzv. 9+2 symetrii, což znamená, že ve středu axonemy se nachází pár axiálních mikrotubulů, který je obklopen devíti mikrotubulárními dublety. Nepohyblivé řasinky onen centrální pár postrádají, a vykazují tedy symetrii 9+0 (Riparbelli et al., 2012).

Kromě centriol je centrosom složen také z tzv. pericentriolárního materiálu (PCM), ten byl dříve považován za amorfní (Gould and Borisy, 1977), nicméně recentní studie dokázaly, že se skládá z několika radiálních vrstev specifických proteinů umístěných okolo centriol (Mennella et al., 2014). Tyto proteiny jsou ukotveny k lumen centrioly, která slouží jako lešení pro sestavení PCM (Ou et al., 2003). Ve vnitřní vrstvě PCM nacházíme např. proteiny Cep152 a pericentrin a ve vnější Cep192 a γ -tubulin (Sonnen et al., 2013). Analýza architektury PCM je však obzvláště náročná z důvodu jeho biochemické složitosti – obsahuje stovky různých složek. Proteinové komplexy PCM tvoří tzv. astrální mikrotubuly, které vystupují z centrosomu a směřují skrz cytoplasmu k buněčné membráně (Wilde, 1999). Astrální mikrotubuly napomáhají formaci a organizaci buněčného cytoskeletu a tvoří vlákna dělicího vřeténka (Mennella et al., 2014). Proteiny PCM také hrají roli v centriolární duplikaci a pravděpodobně i v tvorbě a rozpadu buněčné řasinky (Dammermann et al., 2004).



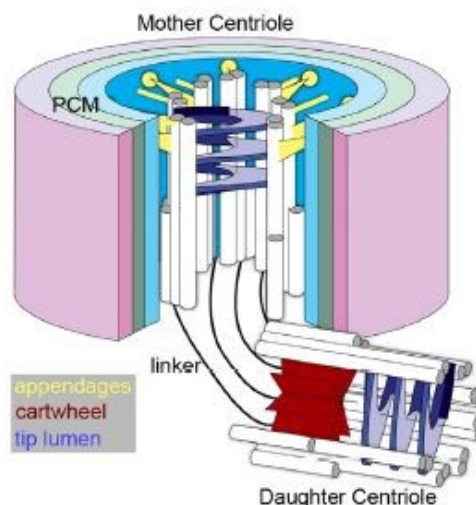
Obrázek č. 1: Stavba centrosomu a řasinky/bičíku (Bettencourt-Dias, 2013)

V rámci centriol nalezneme mnoho struktur, které asociují s centriolární stěnou, tvořenou triplety mikrotubulů (Paintrand et al., 1992). Dceřiná centriola ve svém proximálním lumen obsahuje strukturu, tzv. kolovrátek, který je složen z centrální trubice a devíti paprsků, které ji obklopují. Každý z paprsků se připojuje k A-tubulu mikrotubulárního tripletu. Kolovrátek, které své pojmenování získal právě díky svému tvaru (Winey and O'Toole, 2014), je nezbytný pro správnou formaci centrioly a v procesu tvorby centriol se objevuje jako první struktura s devítičlennou radiální symetrií (Anderson and Brenner, 1971). U člověka byl jako hlavní složka centrální trubice a paprsků identifikován protein Sas-6 a společně s ním se v paprscích nachází ještě protein Cep135 (Kraatz et al., 2016). Centriolární lumen distálně od kolovrátku je zatím nedostatečně prozkoumáno a víme o něm pouze, že obsahuje centrin, Poc5 a několik dalších proteinů (Gönczy, 2012). Na vnější straně mikrotubulární stěny se nachází vlákna, která na jejich proximálních koncích spojují uvnitř centrosomu obě centrioly. Vzdálenost mezi centriolami se neustále mění (Feldman et al., 2007).

Strukturální složitost centrosomu se odráží v jeho biochemickém složení – v centriolách nebo centrosomálním matrix je lokalizováno více než 100 proteinů (Bornens, 2012). Centrioly jsou složeny z mnoha evolučně konzervovaných proteinů (Arquint and Nigg, 2016). Nukleace centriol je iniciována dvěma PCM proteiny, které obklopují preexistující centriolu: Cep192 a Cep152 (Blachon et al., 2008). Tyto dva proteiny mají schopnost vázat kinázu Plk4, která reguluje centriolární duplikaci (viz dále) (O’Connell et al., 2001). Při formaci mikrotubulární stěny centriol asistují především proteiny Cep135 a CENPJ známý také jako CPAP (Hung et al., 2000). Proteiny Poc1b, Poc5, Ctn2 a Ctn3 vyplňují lumen centrioly a Cep295 váže PCM proteiny k centriole (Salisbury et al., 2002). Centrosom ani centrioly neobsahují žádnou DNA a ačkoliv byla přítomnost RNA v centrosomu prokázána, pravděpodobně není pro jeho funkci esenciální. Existují tři různé hypotézy vysvětlující funkce RNA v centrosomu - RNA zde slouží jako: a) předloha pro organizaci mikrotubulárních nukleačních proteinů, b) nezbytná součást pro sestavení funkčního centrosomu nebo c) část intracelulární cesty přenosu mRNA či proteinů, které mRNA kódují (Marshall and Rosenbaum, 2004).

1.1.2 Rozdíl mezi mateřskou a dceřinou centriolou

Centriolární pár, tedy mateřská a dceřiná centriola (obr. č. 2), se od sebe liší nejen strukturou (Paintrand et al., 1992), ale i funkcí. Mateřská centriola je starší a strukturně plně vyvinutá. Nezralá dceřiná centriola, která vzniká v S fázi předchozího buněčného cyklu, dosahuje asi 80 % délky mateřské centrioly (Bornens, 2012). Mateřská centriola, která byla vytvořena o nejméně 1,5 generaci dříve, se od dceřiné odlišuje přítomností dvou sad po devíti přívěscích, které radiálně vycházejí z jejího distálního konce – tzv. distálních (DAP) a subdistálních (sDAP) přívěsků. Schopnost nukleovat mikrotubuly v jejich blízkosti mají obě centrioly, ale pouze mateřská je může ukotvit ve svých sDAP (Piel et al., 2000). Připojením DAP na plasmatickou membránu buňky se z mateřské centrioly stává bazální tělísko, které je základem pro vznik řasinek a bičíků (Dawe et al., 2006).



Obrázek č. 2: Detail stavby mateřské a dceřiné centrioly (Avidor-Reiss and Fishman, 2019)

V DAP byl lokalizován protein Cep164, který je pro tvorbu řasinky nepostradatelný (Graser et al., 2007). Bazální tělísko z bičíku spermie spouští sestavení centrosomu zygoty (Bornens, 2012). DAP a sDAP jsou vzájemně odlišné struktury a sDAP nejsou esenciální pro tvorbu řasinek, tzv. ciliogenezi ani pro formaci mikrotubulárního aster (Mazo et al., 2016). Ve spermiích se mateřská centriola nachází dále od jádra, nazýváme ji tedy distální (DC) a dceřinou naopak proximální (PC), protože je umístěna jádru blíže (Gatenby and Mathur, 1960).

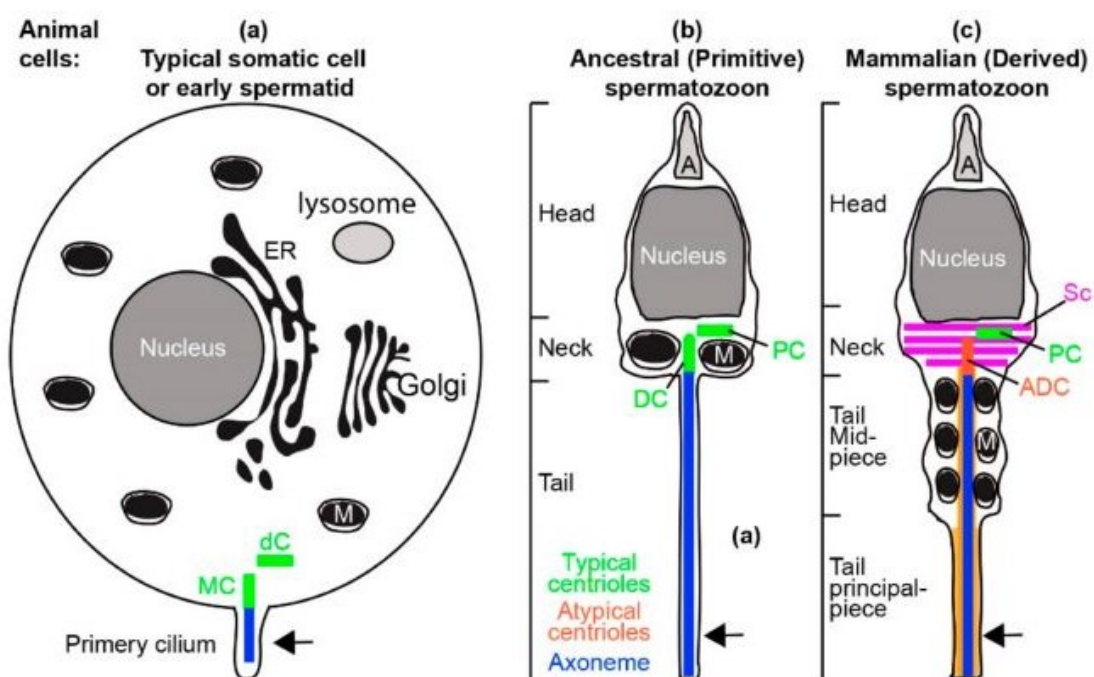
V G1 fázi buněčného cyklu je plně zralá mateřská centriola obklopena tenkou vrstvou PCM a formuje řasinku, která je posléze v S fázi rozložena. V S fázi dochází především k tvorbě nové centrioly (procentrioly), tohoto procesu se účastní i dceřiná centriola. V G2 fázi mateřská centriola váže PCM, který má schopnost nukleovat a ukotvovat mikrotubuly tvořící aster. Dceřiná centriola se odděluje od mateřské a tvoří druhý aster. V průběhu M fáze mateřská i dceřiná centriola tvoří jedno ze dvou mitotických pólových vřetének. Po rozdělení buňky se každý centriolární pár stává mateřskou a dceřinou centriolou pro jednu z dceřiných buněk (Palazzo et al., 1999). K rozdělení centriolárního páru dochází v průběhu či bezprostředně po telofázi, v této fázi mateřská centriola zůstává poblíž buněčného centra, zatímco dceřiná migruje skrz cytoplasmu (Piel et al., 2000).

1.1.3 Struktura a složení centriol spermie

Ancestrální primitivní spermie měly původně dvě typické centrioly s devítičlennou radiální symetrií (obr. č. 3) (Baccetti and Afzelius, 1976). U mnoha živočichů se ovšem později u spermií vyvinula struktura nazývaná krček, obsahující pouze jednu nebo dokonce žádnou centriolu (Hodges et al., 2010). Nejnovější studie nicméně dokazují, že u některých druhů, u kterých byla původně identifikována přítomnost jen jedné centrioly, se ve skutečnosti nachází ještě druhá, tzv. atypická centriola (Fishman et al., 2018).

Obecně bychom mohli říct, že centrioly v časných vývojových stádiích samčích germinálních buněk mají velice podobnou stavbu jako typické G1 centrioly somatických buněk (obr. č. 3). V případě savčích spermií má raná spermatida dvě typické centrioly (DC a PC) a PCM, který formuje aster (Palermo, 1997). Stejně jako u MTOC somatických buněk je přítomnost kompletního centrosomu klíčová pro organizaci interfázické kostry mikrotubulů a mitotického a meiotického vřeténka (Mazia, 1984). Jediným rozdílem se zdá být fakt, že savčí spermatocyty netvoří řasinky (Riparbelli et al., 2012). Ovšem centrioly v pozdní fázi vývoje spermie se svou stavbou od centriol spermatocytů a spermatid poněkud liší. V pozdní fázi gametogeneze dochází k meiotickým redukčním dělením a snížení počtu chromosomů a ekvivalence centrosomu. Většina organismů, dle Boveriho teorie (viz dále), řeší tento problém eliminací centriol oocyty v průběhu oogeneze a funkční centrosom je po oplození nově vznikajícímu jedinci poskytován spermií (Boveri, 1887).

U zralých spermíí savců nalezneme centrioly v oblasti krčku, který spojuje hlavičku a bičík spermie (obr. č. 3). Centrosom spermie je složen ze soudkovité PC (Zamboni et al., 1971) a atypické DC, která je strukturně a kompozičně pozměněna v procesu zvaném centrosomální remodelace (viz dále) (Fishman et al., 2018). PC se nachází uvnitř krčku, hned vedle bazální destičky hlavičky spermie a vykazuje typickou devítičlennou radiální symetrii - 9 tripletů je uspořádáno do kruhu a obklopeno PCM. Tuto symetrii nalezneme i u modifikované DC, která se nachází kolmo k PC, ale rovnoběžně s bičíkem spermie a toto postavení je příhodné pro tvorbu bičíku během spermiogeneze (Holstein and Roosen-Runge, 1981). DC funguje jako bazální tělísko bičíku spermie a centrální mikrotubulární dublet bičíku (bičíky zachovávají 9+2 symetrii) končí v PCM spodní části PC. Přítomnost dvou odlišných centriol před oplozením byla u člověka dokázána pomocí transmisní elektronové mikroskopie již před téměř 30 lety (Sathananthan et al., 1991). Společně s centriolami se v krčku spermie nachází také specializovaný PCM, známý jako tzv. členité sloupky a kapitulum, které obklopují obě centrioly (Fawcett and Philips, 1969). Ty během diferenciacce spermatid nahrazují typický PCM (Lindemann and Lesich, 2016). Kapitulum se nachází pod bazální destičkou hlavičky spermie a z boku je lemováno devíti členitými sloupky, které jsou spojené s vnějšími vlákny krčku spermie a napojují se k mikrotubulárním tripletům centriolární stěny (Sathananthan et al., 1996). Všechny komponenty centrosomu (PC, DC i PCM) jsou ve spermích modifikovány, ale nedochází k jejich eliminaci.



Obrázek č. 3: Porovnání polohy centriol v somatických buňkách (a), u ancestrální spermie (b) a u spermie savců (c) (Avidor-Reiss, 2018)

(A – akrosom, ADC – atypická distální centriola, DC – distální centriola, ER – endoplasmatické retikulum, M – mitochondrie, PC – proximální centriola, Sc – členité sloupky)

1.2 Tvorba centriol

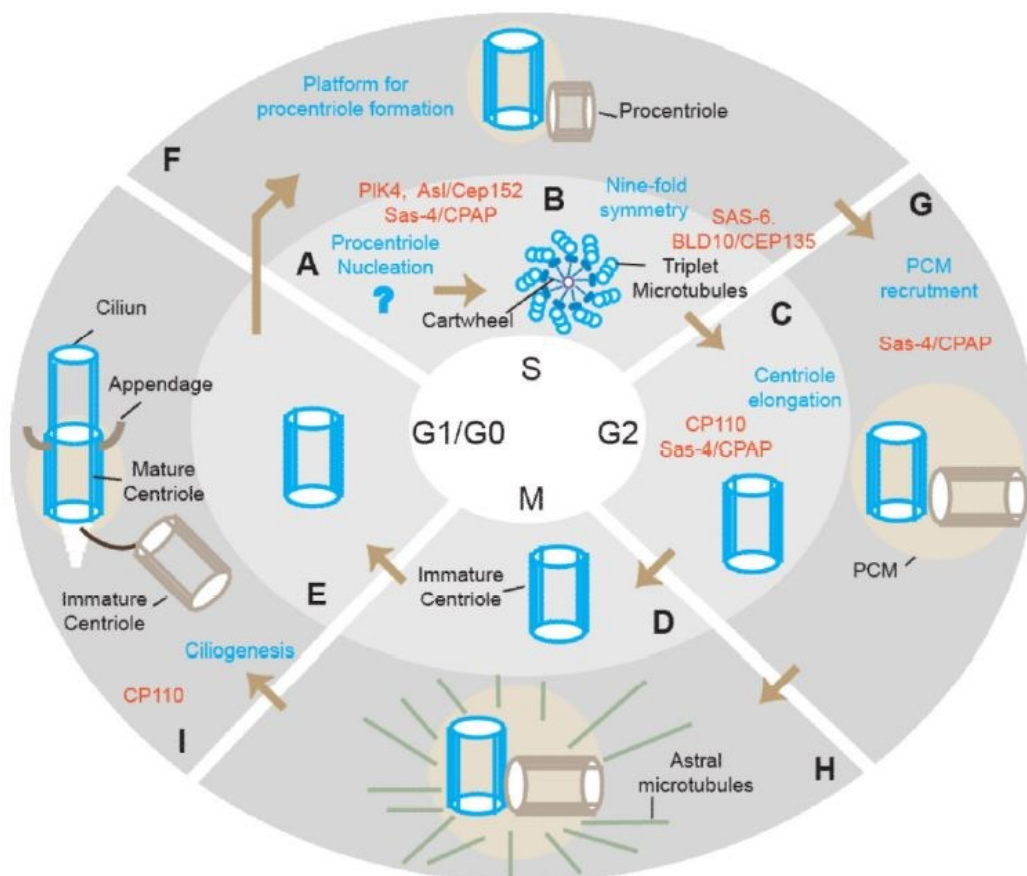
1.2.1 Tvorba centriol somatických buněk

Centrioly jsou dynamické struktury, které se v průběhu buněčného cyklu mění (Bornens, 2012). Vytvoření plně funkční centrioly, která bude schopna formovat centrosom či řasinku, vyžaduje dva buněčné cykly (obr. č. 4) (Avidor-Reiss and Gopalakrishnan, 2013). V G1 fázi má buňka dvě centrioly, nové vznikají během S fáze v procesu zvaném centriolární duplikace. Při centriolární duplikaci se blízko již existujících centriol vytvoří centrioly nové, k čemuž dochází zpravidla pouze 1x za buněčný cyklus. Tvorba centriol je regulována kinázami buněčného cyklu, jako jsou například Plk1 a Cdk2 (Hinchcliffe et al., 1999) a počet centriol v buňce je přísně kontrolován (Sluder and Rieder, 1985). Nukleace mikrotubulů je regulována komplexem γ -tubulinového kruhu (6 proteinů tvořících s γ -tubulinem kruhový komplex) a příbuznými komplexy γ -tubulinu, což poskytuje prostorovou a hlavně časovou kontrolu nad zahájením růstu mikrotubulů (Zheng et al., 1995). γ -tubulin je jediným vysoce konzervovaným centrosomálním komponentem, který byl nalezen u všech dosud zkoumaných druhů živočichů (Joshi, 1993). Je součástí MTOC, nachází se v oblasti PCM okolo centriol a pro funkčnost centrosomu je esenciální (Oakley et al., 1990).

Původní centriola slouží jako předloha, díky níž je počet nově vznikajících centriol omezen. Na jednu již existující centriolu připadá vždy pouze jedna nově vzniklá (Ross and Normark, 2012). Struktura nově vytvořené centrioly není předurčena preexistující centriolou, ale je determinována buněčným typem a z již existující centrioly neobsahuje žádný materiál (Avidor-Reiss and Gopalakrishnan, 2013). Po duplikaci je každý pár centriol přitahován na jeden z pólů buňky, aby při dělení každá dceřiná buňka obdržela přesně dvě centrioly (Connolly et al., 1986). Dva dceřiné centrosomy, vzájemně propojené pomocí spojujících vláken, organizují mitotická vřeténka a v telofázi je každé připojeno k jedné z dceřiných buněk. Přesné rozdělení buňky zajišťuje bipolární charakter mitotického vřeténka (Heald et al., 1996). Zatímco recentní studie indikují, že centrosomy nejsou pro formaci bipolárního mitotického vřeténka bezpodmínečně nutné (Khodjakov et al., 2000), u mnoha živočichů počet centrosomů určuje morfologii vřeténka. To je evidentní nejen z defektů, které vycházejí z duplikačních či separačních selhání (Mazia, 1960), ale také z multipolárních vřetének, které vznikají v přítomnosti nadpočetných centrosomů (Sluder et al., 1997). Přítomnost pouze jedné centrioly naopak vede ke vzniku monopolárních vřetének a zastavení mitózy (Kirkham et al., 2003). Vícečetná duplikace centriol, tedy více než 1x za buněčný cyklus, je běžně pozorovatelná u buněk rakovinného bujení (Pihan et al., 1998).

Na samém začátku, v S fázi prvního buněčného cyklu, dochází k nukleaci nové centrioly, tzv. procentrioly, která se vytváří v pravém úhlu k proximální části již existující centrioly (Dippell, 1968) a tento proces je koordinován kinázou Plk4 (Kleylein-Sohn et al., 2007), která fosforyluje několik procentriolárních proteinů, včetně nukleačního proteinu Cep152 (Blachon et al., 2008) a Gcp6, složky γ -tubulin mikrotubulárního nukleačního komplexu (Bahtz et al., 2012). Plk4 je považována za klíčovou kinázu zodpovědnou za zahájení centriolární duplikace a v souladu s tímto tvrzením se Plk4 společně s Cep152 nachází v PCM, kde k nukleaci procentrioly dochází (O'Connell et al., 2001). Následně procentriola získává devítičlennou radiální symetrii, a to díky konzervovanému procentriolárnímu proteinu Sas-6 (Nakazawa et al., 2007), který navíc interaguje s proteinem STIL (Tang et al., 2011). V jádru procentrioly se Sas-6 sebeuspořádává do tvaru centrální trubičky s devíti paprsky (Gopalakrishnan et al., 2010), které dohromady tvoří strukturu kolovrátku (Kilburn et al., 2007). V této fázi měří procentriola cca 200 nm a pomocí proteinového komplexu CPAP, který váže dimery γ -tubulinu a Cep110 se prodlužuje a vytváří PCM (Gopalakrishnan et al., 2011). Protein Cep110 se nachází v DC a jeho vyčerpání má za následek prodloužení centriol a tvorbu řasinky, což naznačuje, že Cep110 blokuje prodlužování centriol a zabraňuje ciliogenezi (Spektor et al., 2007).

V průběhu G2 a M fáze prvního buněčného cyklu a G1 fáze druhého buněčného cyklu se centriola elonguje do délky cca 500 nm a označuje se jako nezralá centriola. Během této doby se nezralá centriola jeví jako nefunkční a k jejímu dozrání dochází v průběhu druhého buněčného cyklu. Tento proces se nazývá centrosomální maturace neboli centrosomální zrání (Palazzo et al., 1999). V S fázi slouží nezralá centriola jako předloha pro tvorbu procentrioly. V G2 fázi se PCM, obkloupující nezralou a k ní připojenou procentriolu, zvětšuje a pomocí komplexu γ -tubulinového kruhu z cytosolu nukleuje astrální mikrotubuly a mikrotubuly vřeténka a centriolární pár obecně začíná fungovat jako nezávislý centrosom. Centrosomální zrání také vyžaduje Plk1-dependentní fosforylaci podmnožiny molekul pericentrinu v blízkosti centriolární stěny a následnou vazbu proteinu Cep192 a γ -tubulinu (Lee et al., 2012). Následně dochází k tvorbě a orientaci dělicího vřeténka a cytokinezi (Bornens, 2012). Tento centrosom je však funkčně odlišný od již existující druhé zralé centrioly (Yamashita et al., 2007). V G1 fázi nyní nově zralá centriola získává sDAP a také DAP, kterými se připojuje k plasmatické membráně buňky, kde slouží jako předloha pro tvorbu axonemy řasinky a může zahájit ciliogenezi (Avidor-Reiss and Gopalakrishnan, 2013).



Obrázek č. 4: Schéma vzniku nových centriol v průběhu dvou buněčných cyklů (Avidor-Reiss and Gopalakrishnan, 2013)

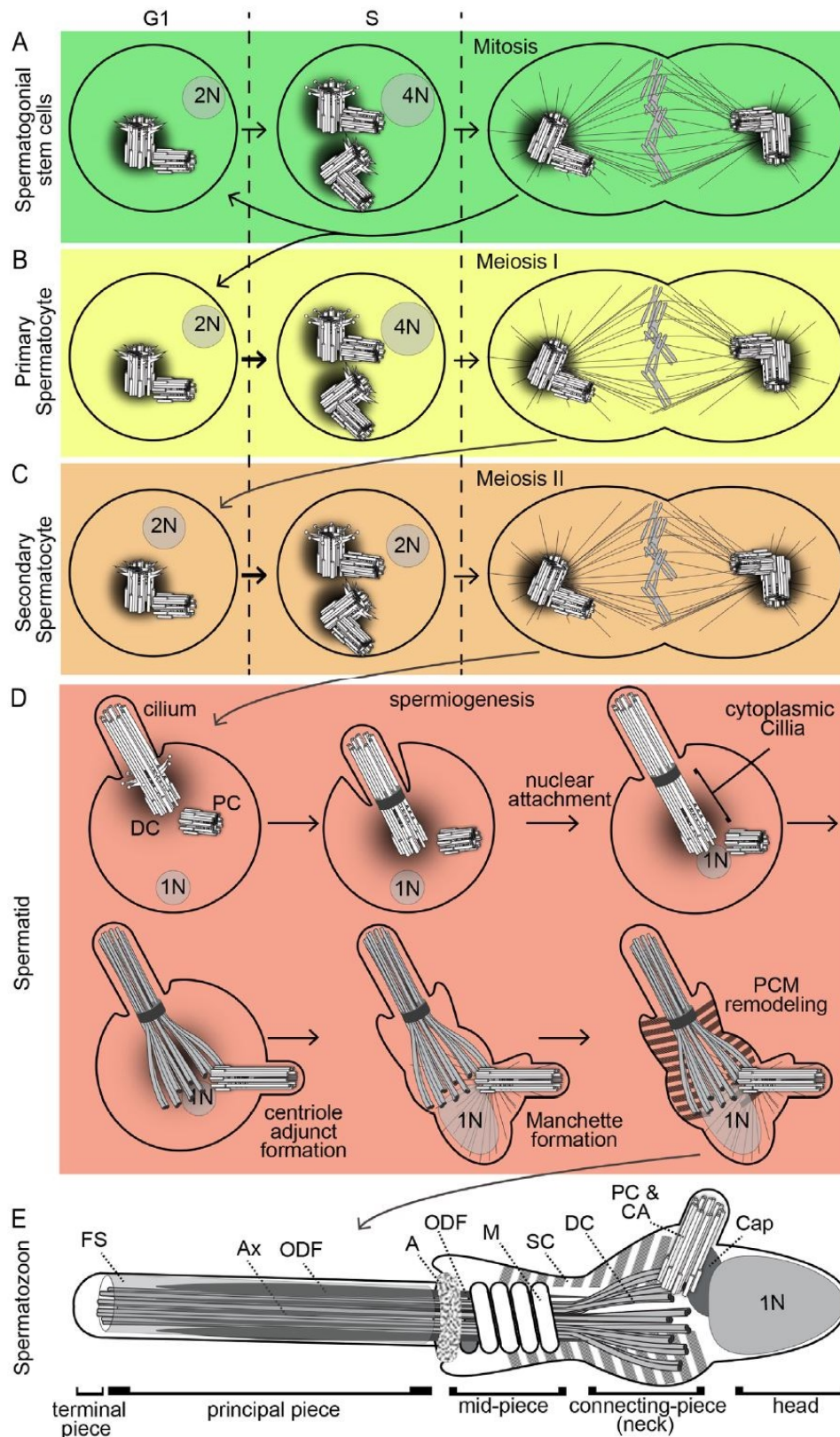
V nedávné době byla také objevena funkce proteinu centrinu, o kterém se dlouho nevědělo, k čemu v centrosomu vlastně slouží. Centrinu jsou malé Ca^{2+} vázající proteiny, které ubiquitinují komponenty centrosomu. U člověka byly objeveny tři centrinové geny: Cctn1, který je exprimován výhradně v mužských zárodečných buňkách a Cctn2 a Cctn3, které se exprimují v somatických buňkách. Cctn2 však můžeme nalézt i u centriol spermií (Hart et al., 1999, 2001). Knockdown centrinu 2 vede k selhání centriolární duplikace v průběhu buněčného cyklu. Centriolární pár se sice rozdělí, ale každá z dceřiných buněk obdrží pouze jednu centriolu. V uskutečněných pokusech některé z těchto dceřiných buněk podstoupily i druhý a některé i třetí buněčný cyklus a došlo k vytvoření mitotických vřetének s jednou nebo dokonce žádnou centriolou. Tato zjištění potvrzují důležitou roli centrinu pro centriolární duplikaci a demonstrují, že centrioly mají důležitou roli v organizování vřeténka a dokončení cytokineze (Salisbury et al., 2002).

1.2.2 Tvorba centriol spermie

Spermie se tvoří v procesu zvaném spermatogeneze a v průběhu tohoto procesu prochází několika stadii. Diploidní spermatogonia nejprve prochází několika mitotickými děleními a následně diferencují ve spermatocyty. Ze spermatocytů díky meiotickému dělení vznikají haploidní spermatidy. Kulovité spermatidy pak v procesu spermiogeneze prochází kaskádou četných změn, na jejichž konci diferencují ve vysoce specializované buňky protáhlého tvaru – spermie. Spermie v této fázi však ještě nejsou plně zralé a schopné pohybu, dozrávají až v nadvarletí, ačkoliv morfologicky jsou již kompletní (Kretser et al., 1998). Spermatidy ani spermie se už dále nijak nedělí.

Jak už bylo řečeno, spermatocyty se diferencují ze spermatogonií. Spermatogonia nejprve zdvojnásobí svůj genom, zdvojnásobí počet centriol ze dvou na čtyři a následně vstupují do mitózy. Primární spermatocyty mají zduplikovaný genom ($4n$), čtyři centrioly a meiózou I se dělí na dva sekundární spermatocyty, které mají dvě sady chromosomů ($2n$) se dvěma centriolami. Před meiózou II se počet centriol opět zduplikuje, ale počet sad chromosomů se nemění. Výsledkem jsou tedy haploidní spermatidy (n) se dvěma centriolami – distální (mateřskou) a proximální (dceřinou), která je připojena ke stěně DC (obr. č. 5) (Rattner, 1972). PC u většiny savců vzniká mezi dvěma meiózami (Krioutchkova and Onishchenko, 1998) a tato forma centriolární duplikace je v porovnání s duplikací somatických buněk unikátní, jelikož k ní nedochází v synchronizaci s duplikací DNA.

V průběhu spermiogeneze jsou DC centrioly modifikovány pomocí tzv. centrosomální remodelace a ztrácí většinu PCM. Dochází také k degradaci γ -tubulinu, ve zralých spermích už nebyl detekován. Kromě γ -tubulinu spermie přichází také cca o polovinu centrinu, který byl asociován s DC (Manandhar and Schatten, 2000). Zatímco DC slouží při spermiogenezi jako bazální tělísko bičíku, role PC není zřejmá (Rattner, 1972). V průběhu spermiogeneze se mikrotubuly PC prodlužují za vzniku krátké struktury podobné axonemě, tzv. centriolárního adjunktu (Fawcett and Philips, 1969), což je překvapivé, jelikož PC je analogem nezralé dceřiné centrioly a jak bylo uvedeno dříve, základem řasinky či bičíku je především DC. Adjunkt je u většiny savců přechodný, ale je přítomen například u ejakulovaných spermíí člověka (Manandhar and Schatten, 2000). Je záhodno ještě zmínit tzv. mančetu, což je přechodná struktura složená z mikrotubulů, která obklopuje spermatidu a pomáhá přetvářet hlavičku spermie při spermiogenezi (Lehti and Sironen, 2016). Mechanismus nukleace těchto tubulů je nejasný, jednou verzí je, že ji zprostředkovává právě centriolární adjunkt (Fishman et al., 2018). Na rozdíl od raných spermíí, zralé nepotřebují aster mikrotubulů. Pro tvorbu bičíku savčí spermie je potřeba typické centrioly. Jakmile je ale bičík vytvořen, je díky přítomným specializovaným strukturám – členitým sloupkům a kapitulu, kotvící funkce centrioly postradatelná (Avidor-Reiss, 2018).



Obrázek č. 5: Schéma vzniku centriol spermie (Avidor-Reiss and Fishman, 2019)

(A - prstenec, Ax - axonema, CA - centriolární adjunkt, Cap - kapitulum, DC - distální centriola, FS - vláknitý plášť, M - mitochondrie, ODF - vnější vlákna, PC - proximální centriola, SC - členité sloupky)

1.3 Jak se centrioly dědí

Na rozdíl od somatické buňky, u které bychom našli dvě funkční centrioly, má oocyt buď centrioly inaktivované, nebo dokonce žádné, jelikož v průběhu jeho vývoje zanikají. Nepodílejí se na sestavení meiotického dělicího vřeténka ani na duplikaci centriol v zygotě (Schatten, 1994). Eliminace centriol oocyty je důležitým krokem k zajištění správného počtu centriol a úspěšné mitózy po oplození (Le Guen and Crozet, 1989). Jako první ztrácí centrosom komponenty PCM a samotné centrioly zanikají v posledních fázích oogeneze před meiotickým dělením. Dle Boveriho teorie mu však zůstávají některé centrosomální proteiny, které jsou rozptýleny po oplasmě a při oplození jsou vázány centriolami spermií a použity k tvorbě centrosomu zygoty (Boveri, 1887). Jedním z uskutečněných pokusů v souvislosti s touto problematikou bylo oplození oocytů obsahujících centrioly, avšak u takto vzniklých zygot se dvěma centrosomy a čtyřmi centriolami následně došlo ke vzniku generace abnormálních multipolárních vřetének. Tyto zygoty podstoupily jen velmi málo buněčných dělení a přítomnost abnormálních vřetének vedla k aneuploidii a mozaicismu, což následně vedlo k zastavení jejich vývoje a v konečném důsledku i k samičí sterilítě (Sluder et al., 1989).

V souvislosti s absencí centriol v oocytech se má za to, že první centrioly embrya pocházejí ze spermií a můžeme tedy říct, že centrioly se dědí paternálně. Teorii paternální dědičnosti poprvé popsal v roce 1887 Theodor Boveri. Ve své práci uvedl, že zatímco spermií poskytují centrioly jakožto aktivní dělicí centrum, zralé oocyty jsou zdrojem ostatních elementů nezbytných pro vývoj embrya (Boveri, 1887). Jeho teorie bylo potvrzena pomocí moderních metod, jako je transmisní elektronová mikroskopie a imunocytochemie (Schatten et al., 1986). Tato teorie je aplikovatelná pro většinu živočišných druhů zahrnujících jmenovitě např. Echinoidea, *Xenopus*, *Caenorhabditis* (Houliston and Elinson, 1991), ze savců pak *Ovis* (Le Guen and Crozet, 1989), *Sus* (Norberg, 1973), *Oryctolagus* (Longo, 1976) a *Bos* (Long et al., 1993). U těchto skupin živočichů nalezneme vždy dvě centrioly, distální a proximální. V zygotách se každá ze dvou typických centriol duplikuje za vzniku nových typických centriol (zygotická dceřiná centriola) a každý z centriolárních párů tvoří jeden z pólů vřeténka (Houliston and Elinson, 1991). Hlavním výsledkem reprodukce centrosomu je tedy přenos polaritu do dceřiných buněk a u většiny živočišných druhů centrosom darovaný spermií definuje také polaritu embryí (Bornens, 2012). V roce 1991 bylo poprvé navrženo, že model paternální dědičnosti centriol platí i pro člověka (Sathananthan et al., 1991) a tato teorie byla následně pomocí imunocytochemie potvrzena o několik let později (Simerly et al., 1995).

Původně se myslelo, že savčí spermií (vyjma řádu Rodentia) ztrácí jednu z centriol jako součást redukce centrosomu. Tato myšlenka byla založena na pozorování, že spermií postupně přichází o PCM a centriolární proteiny (Sathananthan et al., 1991). Nedávno však bylo objeveno, že spermií zůstávají obě centrioly, ačkoliv jedna z nich je přestavěna do atypické struktury a složení (obr. č. 6) v procesu centrosomální remodelace (Fishman et al., 2018).

1.4 Centrosomální remodelace

Centrosom savčích spermií je remodelován během spermiogeneze. Proces remodelace zahrnuje degradaci astrálních mikrotubulů, ztrátu a naopak i získ některých centrosomálních proteinů, výskyt proteinů specifických pro spermie a redistribuci proteinů mezi PC, DC a PCM (Iii and Reiter, 2016). Jak už bylo řečeno dříve, v průběhu remodelace jsou typické PCM struktury nahrazeny specializovanými. Jedná se o tzv. členité sloupky a kapitulum a předpokládá se, že mají důležitou roli ve spojení hlavičky a bičíku spermie v pozdní spermiogenezi (Fawcett and Philips, 1969). Během přestavby centrosomu je velká část PCM proteinů redukována a kapitulum a členité sloupky získávají proteiny specifické pro spermie, jako je např. Spata6, Spag4 (Shao et al., 1999) a speriolin (Goto et al., 2010). Spata6 je evolučně konzervovaný gen kódující protein esenciální pro správný vývoj těchto dvou hlavních struktur zajišťujících spojení hlavičky a bičíku. Inaktivace tohoto genu u myši vedla ke vzniku acefalických spermií a následné sterilitě samců (Yuan et al., 2015). Typické PCM proteiny - γ -tubulin, pericentrin, Cep152 a Cep192 u maturovaných spermií chybí a členité sloupky obsahují centriolární proteiny rotatin, Cep164 a Cep295 a kapitulum pak Cep63 a Cep215. PC si zachovává svou typickou strukturu a některé centriolární proteiny jako jsou Cep135, Cep120 a Cep76, ale postrádá proteiny Sas-6, centrobin a rotatin, které jsou za normálních okolností v centriolách přítomné (Fishman et al., 2018).

DC prochází několika změnami, ztrácí některé proteiny typické pro centrioly, ale naopak o některé nové proteiny je obohacena. PCM a centriolární proteiny, které zůstanou, jsou redistribuovány mezi členité sloupky a kapitulum. Tripletty mikrotubulů DC se mění na dublety a proteinový spojník mezi trojicemi mikrotubulů, který je obvykle drží blízko sebe, chybí, tím se dublety mikrotubulů rozloží do tvaru podlouhlého kužele. Přítomnost těchto struktur byla dříve přehlížena, jelikož nemají typickou devítičlennou radiální symetrii a při výzkumu mohly být poškozeny některými metodami chemické fixace. Uvnitř kužele jsou proteiny v oblastech tzv. tyček zaklíněné podél mikrotubulů. DC chybí centriolární stěnové proteiny Cep135, Cep120, rotatin a Cep295, centriolární špičkové proteiny Cep110 a Cep76 a přípojné proteiny Cep89 a Cep164. Místo toho má DC kromě tyček také tzv. pruty z proteinů centriolárního lumen Cetn1/2, Poc5 a Poc1b, které asociují s mikrotubuly. Pruty jsou ukotveny PCM proteinem Cep63. S DC je spojen také centriolární protein CPAP. Zdá se, že protein přechodové zóny Cep290 formuje kruh ve spojení mezi DC a axonemou. Přítomnost těchto struktur je unikátní pro centrioly elongovaných spermatid a spermií a nenalezneme je v centriolách jiných buněk. DC spermie také ztrácí svůj barelovitý tvar a stává se zploštělou (Avidor-Reiss, 2018).

Remodelaci centrosomu spermie během spermiogeneze popisuje tzv. "Hypotéza zombie centriol". Tato hypotéza získala svůj název díky faktu, že remodelované centrioly zůstávají funkční („živé“) - vážou PCM, formují aster a duplikují se za vzniku nových centriol, nicméně dochází k jejich výrazné remodelaci, a tak se považují za „mrtvé“ centrioly (Avidor-Reiss et al., 2015).



Obrázek č. 6: Stavba atypické (remodelované) distální centrioly (Fishman et al., 2018)

(Ax – axonema, DC – distální centriola, mt – mikrotubuly, Sc – členité sloupky, V – krypta)

Předpokládá se, že remodelace DC je evolučně konzervovaný proces, který se liší pouze stupněm dokončení (Fawcett and Philips, 1969). DC má v různých skupinách jedinečné vlastnosti a zdá se, že se v evoluci progresivně mění. Např. u skotu se mikrotubuly DC rozšiřují a jsou zde přítomné 1,5 - 2x delší a širší DC tyče než u člověka. U myši byly tyčky a mikrotubuly DC pozorovány přechodně během spermiogeneze, ale jak se zdá, ve spermiích chybí (Manandhar et al., 1998).

2. Funkce centriol

2.1 Funkce centriol somatických buněk

Centrioly jsou buněčné organely, které jsou nezbytné pro mnoho dějů probíhajících v buňce. Mezi tyto děje můžeme zařadit např. mezibuněčnou komunikaci, buněčné dělení nebo pohyb buněk (Bornens, 2012). Centrioly v živočišných buňkách mají ve své podstatě dvě hlavní funkce. Tou první, evolučně konzervovanou, je tvorba pohyblivých řasinek, které zprostředkovávají pohyb a tvorba primárních řasinek, které jsou nepohyblivé a slouží k vnímání prostředí. V tomto kontextu nazýváme centrioly bazálními tělísky. Primární řasinky, které se v průběhu evoluce vyvinuly z řasinek pohyblivých, jsou senzorické organely, které koordinují mnoho mezibuněčných signálních drah (např. Hedgehog nebo Wnt) v průběhu vývoje i během života organismu. Tyto řasinky jsou také schopny detekovat stimuly jako např. světlo a širokou škálu chemických či mechanických signálů, což je klíčové nejen pro správný vývoj embrya (Goetz and Anderson, 2010). Defekty tvorby či funkce těchto organel vedou k závažným poruchám a onemocněním, běžně známým jako ciliopatie (Hildebrandt et al., 2011). Přítomnost řasinek u většiny dnešních eukaryot poskytuje přesvědčivý důkaz o tom, že poslední společný předek eukaryot vlastnil jednu nebo dvě řasinky či bičíky, poskytující organismu schopnost pohybu (Hodges et al., 2010). Proteiny a molekulární motory umožňující tento pohyb jsou v evoluci vysoce konzervované a nalezneme je i u dnešních eukaryot (Carvalho-Santos et al., 2011). Je zajímavé, že analýzy poskytují důkazy o tom, že společný předek eukaryot vlastnil centrioly s funkcí bazálního tělíska, ale žádné spojení s centrosomem (Hodges et al., 2010).

Druhou funkcí, která se vyvinula o něco později, je organizace PCM pro formaci centrosomu (Bornens and Azimzadeh, 2007). Ačkoliv bylo centrosomu v minulosti přisuzováno mnoho funkcí (Schatten, 1994), dvě z nich tuto organelu definují nejlépe: nukleace cytoplasmatických mikrotubulů a formace mitotického vřetenka (Bornens et al., 1987). Centrosom můžeme označit za hlavního organizátora mikrotubulárního cytoskeletu interfázických buněk. Zajišťuje přesné buněčné dělení (mitózu a meiózu) a podílí se na úspěšné karyogamii (proces splývání dvou pohlavních jader po splynutí buněk). Řídí architekturu buňky a účastní se také udržení buněčné polarity během migrace, růstu tkáně a homeostáze (Gomes et al., 2005). Mikrotubulové triplety, stejně jako bazální tělíska, vyžadují pro svou formaci γ -tubulin (Shang et al., 2002).

V typické somatické dělicí se buňce centrioly mění svou funkci v průběhu buněčného cyklu. Během G1 fáze centrioly formují řasinku a během S, G2 a M fáze formují centrosom, centriola není schopna formovat tyto dvě struktury najednou (Bornens, 2012). Přítomnost řasinky není slučitelná s buněčným dělením a buňky se nerozdělí, dokud se jejich centrioly „neuvolní“ z řasinky (Kim and Tsiokas, 2011). Můžeme tedy říct, že centriolární pár je hlavní částí centrosomu a má nezastupitelnou roli v udržování stability centrosomu a reprodukci organismu (Sluder and Rieder, 1985). Poškození centriol může mít negativní důsledky nejen pro buňku, ale i pro celý organismus (Bobinnec et al., 1998).

2.2 Funkce centriol spermie

Centrioly mají nezastupitelnou úlohu v průběhu tvorby spermií, v pohybu spermií a po oplození. Nicméně tyto funkce nutně nevyžadují všechny komponenty typické centrioly. Savčí centrioly v časných stádiích spermatid (velmi podobné somatickým centriolám) se připojují k buněčné membráně a formují bičík (Riparbelli et al., 2012). Eukaryotický bičík je organela zodpovědná za pohon samčích gamet u většiny živočichů. Bez výjimky jej všechny druhy savčích spermií využívají pro pohyb v samičím reprodukčním traktu (Lindemann and Lesich, 2016). V pozdějších stádiích se však centrioly mohou chovat různými způsoby. Jednou z možností je migrace centriol z buněčné periferie k jádru, což je důležité pro spojení hlavičky a bičíku spermie (Liška et al., 2009). Dále mohou centrioly tvořit specializovaný typ řasinky, tzv. cytosolickou řasinku, která vzniká tak, že se část axonemy, která se nachází poblíž centrioly, skrze cytoplasmu připojí k mitochondrii a tvoří tak střední část bičíku spermie (Avidor-Reiss and Leroux, 2015). Zajímavým faktem je, že střední část bičíku spermie přizpůsobuje svou délku v závislosti na úrovni kompetice spermií. Tato teorie byla zkoumána u několika druhů myší. U monogamních druhů je kratší, zatímco u druhů s výraznou kompeticí je delší a dochází tedy k výraznému zvýšení rychlosti pohybu spermií (Firman and Simmons, 2010). Délka střední části také koreluje s počtem a velikostí přítomných mitochondrií (Fisher et al., 2016). Tyto rozdíly dokazují důležitost sexuálního evolučního tlaku na tvar spermií (Gomendio and Roldan, 1991).

Nezbytnost centriol pro oplození je dlouhodobě uznávaným faktem, ačkoliv dlouhou dobu nebylo jasné, kolik centriol vlastně spermie zygote předá. V minulosti byl uznáván názor, že spermie poskytuje a předává centriolu pouze jednu (Sathananthan et al., 1991). Záhadou však zůstalo, odkud u člověka a savců (vyjma řádu Rodentia), zygota získává druhou centriolu. V návaznosti na tuto problematiku byla objevena tzv. atypická centriola, která má schopnost formovat centrosom a nukleovat novou centriolu (Fishman et al., 2018). Můžeme tedy říct, že tou primární a nejdůležitější funkcí centriol spermie je zavedení centrosomu do oocyty k organizaci spermatického aster zygoty (Sathananthan et al., 1996).

2.2.1 Funkce remodelované centrioly

Jak už bylo zmíněno dříve, nedávné studie vyvrátily, že by DC v důsledku centrosomální remodelace degenerovala. Naopak bylo dokázáno, že je dramaticky strukturně i kompozičně remodelována, ale zůstává funkční (Fishman et al., 2018). Bylo navrženo, že remodelovaná DC funguje jako přechodná spojující centriola mezi axonemou a PC. V tomto modelu je DC bazálním tělesem bičíku a centrem pohyblivosti spermií (Zamboni et al., 1971). Tento model nicméně nevysvětloval úlohu remodelace DC a jak tento proces zlepšuje pohyblivost. Dle nejnovějších studií DC zastává normální centriolární funkce (vazba PCM, předloha pro tvorbu procentrioly) až na to, že není schopna formovat řasinku a má odlišnou stavbu. Proč je tedy tak výhodné vlastnit remodelovanou centriolu? Jednou potenciální rolí atypické centrioly u savců je poskytování signálu pro diferenciační osudy dceřiných buněk zygoty, nicméně tato teorie ještě nebyla testována (Avidor-Reiss and Fishman, 2019).

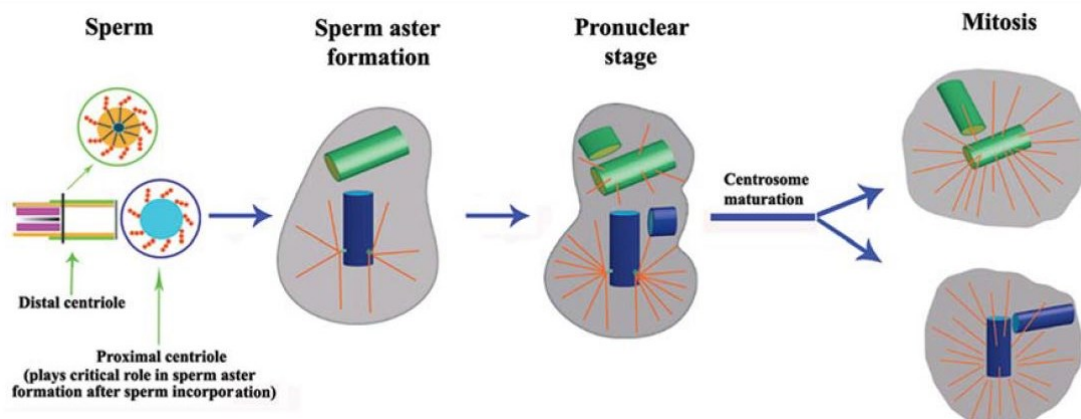
2.2.2 Funkce centriol v zygote

Zygota a rané embryo nepotřebují bičík a po spermii není požadováno, aby dopravila centriolu schopnou jeho formace. Musí však posloužit jako nukleační síť k vazbě PCM proteinů a předloha pro duplikaci centriol (obr. č. 7) (Avidor-Reiss, 2018). Jedním z důležitých rysů oplození je asymetrická dědičnost centriol. U většiny živočišných druhů (s výjimkou Rodentia) je to právě spermie, která přináší do oplozeného oocyty počáteční centrioly, jež pomocí vazby centrosomálních proteinů z cytoplasmu staví první zygotický centrosom, nezbytný pro raný vývoj embrya (Schatten et al., 1991). Pokud porovnáme centrioly z krčku spermie s centriolami detekovanými v časných embryonálních buňkách, jsou identické svou velikostí i strukturou, kromě obsahu PCM. Centriola se zbytky bičíku je ve všech fázích začlenění spermie do oocyty spojena s vyvíjejícím se samčím prvojádrem, než dojde k její duplikaci v pronukleárním stádiu. Otcovské centrioly jsou tedy předchůdci centriol ve fetálních i dospělých somatických buňkách (Sathananthan et al., 1996).

Krátce po inkorporaci spermie do oocyty z PC vzniká spermatický aster, který umožní apozici prvojader. PC udržuje úzké spojení s dekonduzujícím jádrem spermie, které se postupně přetváří v samčí prvojádro. V paralele s tvorbou spermatického aster, vajíčko, které se nachází v metafázi meiózy II, restartuje meiózu a vytvoří nové polární tělísko a samičí prvojádro. Jakmile je spermatický

aster a samičí prvojádru vytvořeno, aster usnadňuje migraci samčího a samičího prvojádru k sobě, aby mohlo dojít ke karyogamii (Manandhar et al., 2005). Předpokládá se, že tato migrace je zprostředkována cytoplazmatickými dyneinovými motory připojenými k prvojádru. Dynein je asociován se samičím prvojádrem a jeho kofaktor dynaktin je spojen s oběma prvojádry, tedy samičím i samčím (Payne, 2003). Po apozici lze prvojádra odlišit jejich velikostí, samčí je větší a aster se k němu většinou nachází blíže (Navara et al., 1994).

Po pronukleární apozici zygota vstupuje do S fáze, chromosomy se zdvojí a dochází k duplikaci centriol spermie během tzv. pronukleárního stádia (v následných buněčných cyklech během G1/S fáze). Každá ze dvou centriol spermie tvoří novou procentriolu a váže maternální PCM proteiny z ooplasmu, které znovusestavují centrosom ještě před tím, než se centrioly zduplikují (Stearns and Kirschner, 1994). Naproti tomu, u klasického buněčného cyklu, je PCM rekrutován k centriole až po formaci procentrioly jako součást maturace centrosomu (Schatten, 1994). PCM je spojen s proximální oblastí centrosomu a dává vznik dceřiným centriolám (v následných buněčných cyklech S a G2 fáze). Výsledkem jsou dva páry centriol a tento vzorec centriolární duplikace nazýváme semikonzervativní, jelikož každá dceřiná buňka obdrží jednu centriolu mateřskou a jednu dceřinou (Kochanski and Borisy, 1990). Stejně je tomu i u duplikace centriol v somatických buňkách.



Obrázek č. 7: Schéma vzniku nového centrosomu zygoty (Schatten and Sun, 2009)

Rekonstituovaný centrosom zygoty vytváří rozsáhlý spermatický aster podílející se na pólové formaci. Na jeho nukleaci se podílí např. specializované centrosomální proteiny jako pericentrin (Doxsey et al., 1994), centrin (Salisbury, 1995) a nukleární mitotický aparát (NuMA) (Schatten and Sun, 2009). Astrální mikrotubuly jsou také nukleovány γ -tubulinovými komplexy, a tak je zajímavé, že spermatické centrioly ztrácí své γ -tubulinové komplexy v průběhu centrosomální remodelace. Jedním vysvětlením je, že používají jiné isoformy stejného proteinu, popř. je γ -tubulin děděn po maternální linii (Kollman et al., 2011). U savců (s výjimkou Rodentia) se páry centriol následně oddělí a migrují kolem jádra zygoty k opačným stranám buňky, kde každý z párů vytvoří jeden z pólů prvního mitotického vřeténka (Sathananthan et al., 1991). Póly mitotického vřeténka slouží jako mitotické centrum během

prvního a všech následujících buněčných dělení (Kirschner, 1986). Bipolární vřetenko je důležité pro rovnoměrnou distribuci genomů do dceřiných buněk v průběhu rýhování. Nesouměrné rozdělení centriol je jednou z hlavních příčin selhání oplození a abnormálního vývoje embrya (Simerly et al., 1995). Výsledkem prvního dělení jsou tedy dvě dceřiné buňky, z nichž každá obsahuje jeden centrosom s párem centriol. Centrioly byly detekovány od jednobuněčného až do osmibuněčného stádia embryonálního dělení a dokonce i ve vyvíjející se blastocystě (Sathananthan et al., 1996).

3. Evoluce centriol

U ancestrálních eukaryot byly centrioly přítomné už před miliardou let (Chapman et al., 2000), ale objeveny byly teprve před necelými 150 lety německým biologem Theodorem Boveri. Jako první se pokusil o definici centrosomu a ve své práci jej roku 1887 popsal jako polární tělísko obsahující centrioly (Boveri, 1887). Schopnost centriol fungovat jako centrosomální organizátory pólů dělicího vřetenka a také jako bazální tělíska, byla původně navržena roku 1898 v hypotéze Henneguy-Lenhossek, která předpověděla funkční ekvivalenci těchto organel (Henneguy, 1897; Lenhossek, 1898). Tento popis byl později nahrazen funkčnější definicí, která centrosom charakterizovala jako MTOC (Pickett-Heaps et al., 1986). Mezi těmito dvěma termíny je však nutno rozlišovat, jelikož centrosom je vždy MTOC, ale MTOC nemusí být nutně centrosomem, vzhledem k tomu, že mikrotubuly mohou vznikat i nezávisle na centriolárních strukturách (Khodjakov et al., 2000). Co se týče funkce centrosomu, Michael Bornens jej navrhl jako strukturu, odpovědnou za dvě hlavní události – nukleaci mikrotubulů a formaci mitotického vřetenka (Bornens et al., 1987).

Vývoj centrosomu mezi divergentními eukaryoty odráží buněčné variace lokomoce, senzorky nebo divize, což je základem adaptivní evoluce organismů (Bornens, 2012). Evolučně konzervovaná devítinásobná struktura centriol dokazuje nejen to, že jsou pro eukaryotické buňky esenciální, ale také to, že jejich přesná struktura je podstatná a k variacím nedochází, anebo jsou nutně škodlivé. A přesto, u některých skupin eukaryot centrioly zcela chybí (viz dále) (Azimzadeh and Bornens, 2005). Tento paradox je mnohem složitější, ale vypadá to, že souvisí s jejich dvojí funkcí. První a nejvíce nepostradatelnou funkcí centriol, která se v evoluci vyvinula, byla tvorba axonemy pro formaci řasinky či bičíku, čímž byl buňkám umožněn pohyb. Pro replikaci buněk s výjimkou samčí meiózy už tak důležité nejsou (Debec et al., 2010). Proč je centrosom pro samčí meiózu zvláště nepostradatelný, zůstává záhadou.

Typické centrioly jsou obklopeny PCM, který kotví a nukleuje astrální mikrotubuly. Téměř u všech skupin živočichů ztrácí centrioly spermiie astrální mikrotubuly a většinu (ne-li všechny) PCM během spermiogeneze v procesu zvaném centrosomální remodelace (Schatten, 1994). Tento trend mohl být přítomen už u společného předka všech živočichů. Bylo však navrženo, že atypická centriola je nedávno vyvinutým trendem a není tedy společná pro všechna amniota. Jedním hypotetickým modelem je, že centriolární remodelace proběhla v několika krocích. Prvním krokem byla ztráta astrálních

mikrotubulů a PCM. U amniot byl druhým krokem vstup centrálních mikrotubulů do axonemy v DC a třetím krokem u živočišného předka byl rozpad devíti tripletů DC a jejich následné nahrazení devíti dublety (Avidor-Reiss, 2018).

Vhled do funkce remodelované centrioly lze získat sledováním změn v organizaci spermií během evoluce. Diverzita ve struktuře centriol spermie může být způsobena selekcí výhodných adaptací nebo driftem, který je následkem náhodných změn spermie. Příkladem zvýhodňující adaptace může být například to, že savčí atypická centriola má bilaterální symetrii podobnou zbytku spermatického krčku a bičíku, což může spermii zvýhodňovat v pohybu a usnadňovat tak navigaci v komplexním prostředí, jako je samičí reprodukční trakt (Avidor-Reiss, 2018). Symetrie bičíku navíc koreluje s typy oplození. U živočichů s vnějším typem oplození má bičík většinou radiální devítinásobnou symetrii, zatímco u živočichů s vnitřním typem oplození vykazuje bičík bilaterální dvojnásobnou symetrii (Lindemann and Lesich, 2016).

Pokud se zaměříme na zygotu, tak zjistíme, že má pro centrioly mnoho unikátních charakteristik. Došlo například ke ztrátě příslušenství pro tvorbu řasinek, jelikož nejsou v časném vývoji embrya potřeba. Je tedy možné, že typické centrioly byly evolucí uzpůsobeny ke klasickým buněčným funkcím a atypické byly optimalizovány ke spermatickým a zygotickým funkcím. Vystává zde tedy otázka, zda jsou atypické centrioly potřebnou adaptací nebo jestli jsou výsledkem vyvíjeného evolučního tlaku k vytvoření pohyblivějších spermií (Avidor-Reiss and Fishman, 2019).

4. Variabilita centriol u řádu Rodentia

Matoucím aspektem nedávného objevu atypické DC u člověka, je jeho zjevná neshoda se současnou literaturou zabývající se řádem Rodentia. Počet centriol je v buňce přísně kontrolován, a tak je logické předpokládat, že zygota potřebuje dvě centrioly poskytované spermií, ať už jsou typické nebo atypické. Je tedy zarážející, že hlodavcům centrioly ve spermiích chybí, ztrácí je v procesu centrosomální redukce a v průběhu oplození spermie nepřináší do zygoty žádný centrosom (Woolley and Fawcett, 1973). Molekulární mechanismus centrosomální redukce dosud nebyl objasněn. Ve stádiu kulovitých i elongujících spermatid ještě u hlodavců nalezneme typický centrosom s párem centriol a γ -tubulinem, ale ztrácí schopnost nukleovat mikrotubuly. Následně dochází k disipaci zbytkového γ -tubulinu a DC zaniká v průběhu testikulární fáze spermiogeneze a PC v průběhu epididymální. Žádné centriolám podobné struktury nebyly v krčku zralé hlodavčí spermie dosud objeveny a neplatí pro ně ani Boveriho teorie paternální dědičnosti (Manandhar et al., 1998). Dominantními MTOC jsou u hlodavců místo centriol tzv. mikrotubulární můstky, vytvořené v průběhu embryonálních dělení (Zenker et al., 2017).

Kromě toho, dva centrosomy a dva velké astery, které jsou běžně pozorovatelné například v zygotě člověka a jiných savců, v zygotách hlodavců nenalezneme. Místo toho, stejně jako k tomu dochází například v oocytech, zygota formuje mnoho malých asterů, které se následně účastní formace acentriolárního vřeténka (Schatten et al., 1985). Toto vřeténko je na rozdíl od špičatého vřeténka nehlodavčích savců válcovité, s plochými póly, které rekrutují centrosomální proteiny i přes skutečnost, že neobsahují typické centrioly (Coelho et al., 2013). Nedávno bylo dokonce navrženo, že mitóza hlodavčích zygot začíná se dvěma vřeténky, samčím a samičím, které fungují odděleně až do metafáze. Během anafáze se obě vřeténka spojí a vytvoří jedno, kde se ovšem paternální a maternální chromosomy nacházejí v odlišných skupinách (Reichmann et al., 2018).

V souvislosti s touto problematikou bylo uskutečněno několik experimentů. Pokusy, ve kterých bylo do oocytu *Felis catus* injikováno sperma *Mus musculus*, vyústily v dominantní spermatický aster, jak by se dalo očekávat, kdyby byly ve spermiích přítomné funkční centrioly (Comizzoli et al., 2006). Toto zjištění naznačuje, že centriolární schopnost tvořit centrosom a aster v zygotě, je determinována maternálně, nezávisle na schopnosti centriol organizovat mikrotubuly. Tato myšlenka byla podpořena experimenty, kdy bylo naopak sperma *Felis catus* injikováno do oocytu *Mus musculus* (Xu et al., 2011). V této studii bylo vřeténko vždy válcovité, bez ohledu na druh spermatu, což by mohlo být důkazem, že mateřský program myšního vajíčka potlačuje tvorbu spermatických aster, nezávisle na přítomnosti centriol spermií. Tyto dvě studie tedy předpokládají, že program, který v myším oocyту umlčuje centrioly v průběhu meiózy, pokračuje i v rané zygotě. Je také možné, že rozšíření nezávislosti oocytu na centriolách poskytlo těmto živočichům evoluční pružnost, což nakonec vyústilo v rozsáhlou centrosomální redukci u spermií hlodavců (Woolley and Fawcett, 1973).

Typické centrioly, které fungují jako MTOC, se objevují u hlodavců až ve 32-buněčném stádiu buňky (Gueth-Hallonet et al., 1993) a řasinky dokonce až krátce po stádiu 64 buněk (Bangs et al., 2015). Prvních pár buněčných cyklů vývoje hlodavců tedy pravděpodobně dochází k mitotickým dělením nezávislých na centriolách. Tuto anomálii se pokusila objasnit tzv. „Hypotéza maternálního prekurzoru“, která navrhla, že oocyt obsahuje nerozpoznatelný centriolární prekurzor, který v pozdější fázi vývoje neznámým způsobem umožňuje vznik centriol embrya (Calarco, 2000). Jednou z dalších teorií byla „Hypotéza de novo vzniku centriol“ v 32/64 stádiu embrya, ale tento proces by byl velice náchylný k chybám, a proto je to spíše nepravděpodobné (Courtois et al., 2012). Studie prováděné na tkáňové kultuře ukázaly nekontrolovaný počet centriol, což vyústilo v abnormální buněčné dělení (La Terra et al., 2005), proto stále není jasné, jak hlodavci získávají svou první embryonální centriolu a i přes absenci preexistující centrioly v průběhu embryogeneze dosahují správného počtu centriol. Nicméně je možné, že centrioly spermií hlodavců jsou ještě atypičtější, než centrioly ostatních savců, což případně vysvětluje, proč ještě nebyly objeveny. Tuto teorii podporuje např. přítomnost centriolárního proteinu speriolinu, který byl u hlodavců nalezen (Goto et al., 2010) a také důkaz, že formace vřeténka zygoty vyžaduje klíčovou centriolární kinázu Plk4 (Coelho et al., 2013).

5. Centrioly a možná souvislost se sterilitou

Úspěšnost oplození závisí jak na vajíčku, tak na spermii a vyžaduje komplexní sérii událostí, mezi něž patří například dekondezace jádra spermie a maternálních chromosomů do mužského a ženského prvojádra, obnovení centrosomu spermií a nukleace mikrotubulů spermatického aster, který je nezbytný pro apozici prvojader (Manandhar et al., 2005). První mitotické vřetenko by mělo být bipolární a musí oddělit chromosomy do dceřiných blastomer. Defekty v kterémkoliv z těchto událostí mohou být pro zygotu letální a ukazují se jako časté příčiny neplodnosti (Schatten and Sun, 2009). Migrace prvojader a tvorba prvního mitotického vřetenka je funkcí mikrotubulů a MTOC - centrosomu (Schatten, 1994).

Vzhledem k tomu, že součástí centrosomu jsou centrioly i pericentriolární materiál, poškození správné funkce centrosomu se může vztahovat k oběma strukturám, popř. jen jedné z nich (Sathananthan et al., 1996). Centrosomální defekty způsobí selhání oplození a zástavu vývoje zygoty v pronukleární fázi (Schatten and Sun, 2009). Patologie centrosomu mohou být podmíněny geneticky (Baccetti et al., 1989), ale také faktory okolního prostředí, např. chemikáliemi. U bisphenolu-A, 2-methylestradiolu či kokainu bylo prokázáno, že destabilizují strukturu centrosomu (Schatten and Sun, 2009). V posledních letech byly navrženy a využívány různé metody pro stanovení integrity a funkčnosti centrosomu spermie a sestavení spermatického aster. Patří mezi ně studie, které hodnotily formaci spermatického aster v oplozeném oocytu, aby bylo možné předpovědět úspěšné spojení prvojader spermie a oocytu a pozitivní potenciál vývoje. Tyto experimenty jasně prokázaly vztah mezi neplodností a dysfunkcí centrosomů spermií (Navara et al., 2002; Tachibana et al., 2009).

Jednou z hlavních příčin mužské neplodnosti je abnormální vývoj spermatid v pohyblivé spermie. Defekty ve vývoji spermií mohou způsobit vznik různých typů abnormálních teratozoospermií spojených s deformacemi hlavičky spermie (např. globozoospermie – hlavička spermií je menší a kulatější v důsledku absence akrosomu) či spermií se stočenými bičičky (Liška et al., 2009). Také abnormální spojení hlavičky a krčku spermie v důsledku abnormálního vývoje během spermiogeneze může mít negativní dopad na oplození (Chemes et al., 1999). Významnou roli při formování hlavičky spermie hraje také centrobín, známý i pod názvem Nip2. Jedná se o vysoce konzervovaný savčí centrosomální protein, asociovaný s PC (Jeong et al., 2007). U člověka je exprimován v různých tkáních, ale největší exprese tohoto proteinu byla pozorována ve varlatech (Zou et al., 2005). Centrobín byl lokalizován u vyvíjejících se spermatocytů i spermií, konkrétně v oblasti tzv. akroplaxomu, mančety a v hlavička-bičík spojujícím aparátu (HTCA). Akroplaxom je struktura, která se nachází mezi akrosomální a jadernou membránou spermie (Kierszenbaum et al., 2003). Na *Rattus norvegicus* byla provedena studie hypodatylového lokusu (hd) ovlivňujícího správný průběh spermatogeneze. Hd mutace byla způsobena inzercí retroviru do intronu 10 genu pro protein centrobín, což vedlo k expresi zkrácených proteinů. Mutovaní jedinci vykazovali poškozený akroplaxom a separaci centrosomu od

jádra spermií. Tato separace korelovala s disrupcí HTCA, což způsobilo dekapitaci spermií v poslední fázi spermiogeneze a absenci centriol v epididymis. U člověka tento defekt nazýváme jako „Syndrom snadno dekapitovaných spermií“ (Liška et al., 2009).

Nepohyblivé či neprogresivně se pohybující spermií mohou vykazovat centriolární abnormality či dokonce absenci centriol. Jedním z řešení tohoto problému by mohlo být použití dárcovských spermií, jejichž centrosomy by byly schopné nahradit dysfunkční centrosomy neplodných jedinců. Bylo provedeno několik experimentů, při kterých byly do oocytu vpraveny separované segmenty spermií (pouze hlavička, hlavička i bičík nebo pouze bičík). V jednom z experimentů se podařilo vytvořit funkční spermatický aster pomocí zavedení izolovaného dárcovského bičíku spermií do oocytu (Van Blerkom and Davis, 1995). Studie s *Felis catus* dává naději, že terapie pomocí náhrady dysfunkčního centrosomu dárcovským centrosomem by mohla umožnit nový způsob léčby neplodným párům, u nichž je neplodnost důsledkem dysfunkce spermií souvisejících s centrosomy (Comizzoli et al., 2006).

Objev atypické centrioly člověka a dalších savců přináší nový vhled do problematiky posledních desetiletí. Z důkazů ze studií na zvířatech je zřejmé, že centrioly hrají velkou roli v plodnosti a atypická centriola může být důležitá pro pohyblivost spermií a časný embryonální vývoj. Konkrétní důkazy u člověka však zatím chybí (Fishman et al., 2018). Mezi možné klinické důsledky objevu atypické centrioly patří skutečnost, že defekt v procesu přestavby centrosomu může být potenciálně novou příčinou reprodukčních onemocnění, jako je např. idiopatická neplodnost, časný potrat nebo vady vývoje embrya. Některé v současné době používané metody léčby mužské neplodnosti, konkrétně např. ICSI, mohou mít na atypické centrioly nevědomky negativní dopad. Navíc mohou být nedostatečné pro překonání jejich vad, a proto by studium centriol během ICSI a odhalení potenciálních abnormalit mohlo zlepšit úspěšnost této metody. Metoda intracytoplasmatické injekce (ICSI) byla poprvé popsána roku 1992 a umožnila nový způsob překonání mužské neplodnosti (Palermo, 1992). Nahradila in vitro fertilizaci (IVF) v případech nedostatku motility spermií nebo jiných neznámých faktorů. V současné době však neexistuje žádný důkaz, že by po ICSI došlo k nárůstu dysfunkcí centrosomu. Spekuluje se také o tom, že by atypické centrioly mohly být cílem pro mužskou kontracepci (Avidor-Reiss and Fishman, 2019). Můžeme tedy konstatovat, že objev atypických centriol otevírá pomyslné dveře novým směrům výzkumu a má potenciál vést k inovativním přístupům v reprodukční medicíně.

Závěr

Tato bakalářská práce si kladla za cíl: a) popsat a porovnat stavbu a složení centriol, které nalezneme v somatických buňkách a centriol nacházených v samčích germinálních buňkách - spermiiích, b) vzájemně porovnat funkce centriol somatických buněk a funkce centriol spermie při spermatogenezi a spermiogenezi, dějích v reprodukčním traktu samice předcházejících oplození, při oplození a v rané embryogenezi a c) představit problematiku samčí sterility související s fyziologickým stavem centriol.

Centrosom somatických buněk je u většiny savců tvořen párem centriol - mateřskou a dceřinou, které jsou umístěny kolmo k sobě. Centrioly jsou proteinové struktury soudkovitého tvaru, které jsou složeny z devíti kruhovitě uspořádaných tripletů mikrotubulů a obklopeny pericentriolárním materiálem. Pericentriolární materiál dává vznik astrálnímu mikrotubulům, které obklopují centrosom a tvoří buněčný cytoskelet a vlákna dělicího vřeténka. V centriolách bylo identifikováno více než 100 různých proteinů. Ve spermiiích nalezneme centrioly v oblasti krčku. Mateřská centriola se nachází dále od jádra, nazýváme ji proto distální a dceřiná je umístěna blíže, nazýváme ji proximální. Proximální centriola má soudkovitý tvar, avšak distální je rozevřena do tvaru kužele v procesu tzv. centrosomální remodelace, ke které dochází v pozdní fázi spermiogeneze a mikrotubulární triplety jsou redukovány v dublety. Mění také své proteinové složení a v důsledku těchto změn ji nazýváme tzv. atypickou centriolou. K objevu atypické centrioly došlo teprve nedávno a byl tím vyvrácen názor, že v průběhu vývoje spermie dochází k eliminaci distální centrioly. Centrioly spermie jsou obklopeny specializovaným pericentriolárním materiálem, který nazýváme členité sloupky a kapitulum.

Centrioly somatických buněk se duplikují v průběhu každého buněčného cyklu v synchronizaci s chromozomálním cyklem. Blízko již existujících centriol dochází ke vzniku dvou nových centriol a k této události dochází zpravidla 1x za cyklus. Duplikace centriol je regulována kinázami a počet centriol v buňce je přísně kontrolován. Centrosom dává vznik dvěma bipolárním mitotickým pólovým vřeténkům a každé vřeténko obsahuje jednu novou a jednu starou centriolu. Každý z párů je následně přitahován na jeden z pólů a stává centrosomem nově vytvořené dceřiné buňky. Spermie se tvoří v procesu spermatogeneze. Diploidní spermatogonia se čtyřmi centriolami diferencují v primární spermatocyty, které obsahují také čtyři centrioly. Meiózou I se primární spermatocyty dělí na dva sekundární spermatocyty, z nichž každý obsahuje dvě centrioly. Před meiózou II se počet centriol opět zduplikuje a výsledkem jsou tedy haploidní spermatidy se dvěma centriolami. Kulovité spermatidy následně v procesu spermiogeneze diferencují ve spermie. Na rozdíl od duplikace centriol somatických buněk k duplikaci centriol nedochází v synchronizaci s duplikací DNA.

Centrioly somatických buněk mají dvě hlavní funkce: a) slouží jako bazální tělísko pohyblivých řasinek zajišťujících pohyb buňky a nepohyblivých řasinek pro vnímání signálů z okolního prostředí a b) organizace pericentriolárního materiálu pro formaci centrosomu. Centrosom tvoří mikrotubulární cytoskelet buňky a formuje mitotická vřeténka. Tím řídí architekturu buňky a podílí se na úspěšném

rozdělení dceřiných buněk. Centrioly však nikdy nejsou schopny formovat řasinku i centrosom současně, jejich funkce se mění v průběhu buněčného cyklu. Podobně jako řasinky somatických buněk jsou centrioly spermií důležité pro zajištění pohybu spermie. Distální centriola dává vznik bičíku spermie, který je stejně jako řasinka tvořen mikrotubulárními dublety. Důležitou roli hrají centrioly také při oplození a v následném vývoji zárodku. V průběhu vývoje oocyty funkční centrioly zanikají a bylo dokázáno, že se centrioly dědí se po paternální linii. Eliminace centriol oocyty je klíčová pro správný vývoj embrya. Při oplození však oocyty poskytují některé centrosomální proteiny pro sestavení prvního centrosomu zygoty, který dále slouží jako mitotické centrum. První centrioly embrya jsou tedy otcovské a jsou předchůdci centriol ve fetálních i somatických buňkách.

Součástí centrosomu spermie jsou centrioly i pericentriolární materiál a poškození, která mají za následek samčí neplodnost, se mohou vztahovat k oběma z nich. Centrosomální defekty mohou být podmíněny geneticky či faktory okolního prostředí a způsobují selhání oplození a zástavu vývoje zygoty v pronukleární fázi nebo vady vývoje embrya. Nepohyblivost spermií může být důsledkem centriolárních abnormalit či úplné nepřítomnosti centriol. Jako řešení tohoto problému se nabízí nahrazení dysfunkčních centrosomů funkčními centrosomy dárcovských spermií. Tato terapie by mohla umožnit nový způsob léčby párům, které nejsou schopny úspěšného oplození z důvodu přítomnosti poškozených centriol spermie. Centrioly by také teoreticky mohly být cílem pro mužskou kontracepci. Nedávný objev atypické centrioly přináší mnoho vysvětlení, ale také otázek, na které bude nutné v průběhu příštích let hledat odpovědi.

V poslední kapitole této práce je také zahrnut centrosomální protein centrobin, jehož výzkumu bych se ráda věnovala v průběhu psaní své diplomové práce. Spojení jádra spermie s bičíkem je nezbytným krokem pro produkci spermií schopných přirozeného oplození a tohoto spojení je dosaženo pomocí HTCA struktury. Pro správnou funkci HTCA jsou nezbytnými komponenty komplex LINC (linker nukleoskeletu a cytoskeletu), mikrotubuly, proteiny spojené s mikrotubuly a vnější hustá vlákna. Centrobin interaguje s komplexem LINC během spermiogeneze, podílí se na transportu a sestavení HTCA, ale důležitou roli má i ve zralém HTCA. Mutace centrobinu u *Rattus norvegicus* vede k ASS (syndromu acefálních spermií) a fenotyp tohoto syndromu blízce odpovídá popisu ASS u člověka a *Mus musculus*. Díky novým poznatkům o interakci centrobinu a LINC budeme schopni detailněji pochopit složení a funkci HTCA, který by mohl sloužit jako nástroj pro zlepšení hodnocení kvality spermií u savců a diagnostiku genetických příčin mužské neplodnosti u člověka. V současné éře asistované reprodukce bude úspěšná molekulární diagnostika předpokladem pro prevenci přenosu poškozených alel během IVF, poskytne nové možnosti pro výběr gamet nebo vhodnou modifikaci léčby pomocí IVF.

Seznam obrazových příloh

| | |
|--|----|
| Obrázek č. 1: Stavba centrosomu a řasinky/bičíku | 4 |
| Obrázek č. 2: Detail stavby mateřské a dceřiné centrioly | 5 |
| Obrázek č. 3: Porovnání polohy centriol | 7 |
| Obrázek č. 4: Schéma vzniku nových centriol v průběhu dvou buněčných cyklů | 10 |
| Obrázek č. 5: Schéma vzniku centriol spermie | 12 |
| Obrázek č. 6: Stavba atypické (remodelované) distální centrioly | 15 |
| Obrázek č. 7: Schéma vzniku nového centrosomu zygoty | 18 |

Seznam použité literatury

- Anderson, R.G.W., and Brenner, R.M. (1971). The formation of basal bodies (centrioles) in the Rhesus monkey oviduct. *J. Cell Biol.* 50, 10–34.
- Arquint, C., and Nigg, E.A. (2016). The Plk4 – STIL – Sas-6 module at the core of centriole duplication. *Biochem. Soc. Trans.* 44, 1253–1263.
- Avidor-Reiss, T. (2018). Rapid evolution of sperm produces diverse centriole structures that reveal the most rudimentary structure needed for function. *Cells* 7, 67.
- *Avidor-Reiss, T., and Fishman, E.L. (2019). It takes two (centrioles) to tango. *Reproduction* 157, R33–R51.
- Avidor-Reiss, T., and Gopalakrishnan, J. (2013). Building a centriole. *Curr. Opin. Cell Biol.* 25, 72–77.
- *Avidor-Reiss, T., and Leroux, M.R. (2015). Shared and distinct mechanisms of compartmentalized and cytosolic ciliogenesis. *Curr. Biol.* 25, R1143–R1150.
- *Avidor-Reiss, T., Khire, A., Fishman, E.L., and Jo, K.H. (2015). Atypical centrioles during sexual reproduction. *Front. Cell Dev. Biol.* 3, 1–19.
- Azimzadeh, J., and Bornens, M. (2005). The centrosome in evolution. In *Centrosomes in Development and Disease*, pp. 93–122.
- Baccetti, B., and Afzelius, B. (1976). The biology of the sperm cell. In *Monographs in Developmental Biology*, Vol. 10, p.
- Baccetti, B., Burrini, A.G., Collodel, G., Magnano, A.R., Piomboni, P., Renieri, T., and Sensini, C. (1989). Crater defect in human spermatozoa. *Gamete Res.* 22, 249–255.
- Bahtz, R., Seidler, J., Arnold, M., Haselmann-Weiss, U., Antony, C., Lehmann, W.D., and Hoffmann, I. (2012). Gcp6 is a substrate of Plk4 and required for centriole duplication. *J. Cell Sci.* 125, 486–496.
- Bangs, F.K., Schrode, N., Hadjantonakis, A.K., and Anderson, K.V. (2015). Lineage specificity of primary cilia in the mouse embryo. *Nat. Cell Biol.* 17, 113–122.
- *Bettencourt-Dias, M. (2013). Q&A: Who needs a centrosome? *BMC Biol.* 11, 28.
- Blachon, S., Gopalakrishnan, J., Omori, Y., Polyanovsky, A., Church, A., Nicastro, D., Malicki, J., and Avidor-reiss, T. (2008). *Drosophila* asterless and vertebrate Cep152 are orthologs essential for centriole duplication. *Genetics* 180, 2081–2094.
- Van Blerkom, J., and Davis, P. (1995). Evolution of the sperm aster after microinjection of isolated human sperm centrosomes into meiotically mature human oocytes. *Hum. Reprod.* 10, 2179–2182.
- Bobinnec, Y., Khodjakov, A., Mir, L.M., Rieder, C.L., Eddé, B., and Bornens, M. (1998). Centriole disassembly in vivo and its effect on centrosome structure and function in vertebrate cells. *J. Cell Biol.* 143, 1575–1589.
- Bornens, M. (1977). Is the centriole bound to the nuclear membrane? *Nature* 270, 80–82.
- Bornens, M. (2002). Centrosome composition and microtubule anchoring mechanisms. *Curr. Opin. Cell Biol.* 14, 25–34.

- *Bornens, M. (2012). The centrosome in cells and organisms. *Science* (80-.). 335, 422–426.
- Bornens, M., and Azimzadeh, J. (2007). Origin and evolution of the centrosome. In *Eukaryotic Membranes and Cytoskeleton*, pp. 119–129.
- Bornens, M., Paintrand, M., Berges, J., Marty, M.-C., and Karsenti, E. (1987). Structural and chemical characterization of isolated centrosomes. *Cell Motil. Cytoskeleton* 8, 238–249.
- Boveri, T. (1887). *Zellen-Studien, Heft 1.* (München: Jena, Verlag von Gustav Fischer).
- Calarco, P.G. (2000). Centrosome precursors in the acentriolar mouse oocyte. *Microsc. Res. Tech.* 49, 428–434.
- Carvalho-Santos, Z., Machado, P., Branco, P., Tavares-Cadete, F., Rodrigues-Martins, A., Pereira-Leal, J.B., and Bettencourt-Dias, M. (2010). Stepwise evolution of the centriole-assembly pathway. *J. Cell Sci.* 123, 1414–1426.
- Carvalho-Santos, Z., Azimzadeh, J., Pereira-Leal, J.B., and Bettencourt-Dias, M. (2011). Tracing the origins of centrioles, cilia, and flagella. *J. Cell Biol.* 194, 165–175.
- *Chapman, M.J., Dolan, M.F., and Margulis, L. (2000). Centrioles and kinetosomes: form, function and evolution. *Q. Rev. Biol.* 75, 409–429.
- Chemes, H.E., Puigdomenech, E.T., Carizza, C., Olmedo, S.B., Zanchetti, F., and Hermes, R. (1999). Acephalic spermatozoa and abnormal development of the head–neck attachment: a human syndrome of genetic origin. *Hum. Reprod.* 14, 1811–1818.
- Coelho, P.A., Bury, L., Sharif, B., Riparbelli, M.G., Fu, J., Callaini, G., Glover, D.M., and Zernicka-Goetz, M. (2013). Spindle formation in the mouse embryo requires Plk4 in the absence of centrioles. *Dev. Cell* 27, 586–597.
- Comizzoli, P., Wildt, D.E., and Pukazhenthil, B.S. (2006). In vitro development of domestic cat embryos following intra-cytoplasmic sperm injection with testicular spermatozoa. *Theriogenology* 66, 1659–1663.
- Connolly, J., Kioussis, B., and Kalnins, V. (1986). Centrioles are lost as embryonic myoblasts into myotubes in vitro. *Eur. J. Cell Biol.* 39, 341–345.
- Courtois, A., Schuh, M., Ellenberg, J., and Hiragi, T. (2012). The transition from meiotic to mitotic spindle assembly is gradual during early mammalian development. *Journall Cell Biol.* 198, 357–370.
- Dammermann, A., Müller-Reichert, T., Pelletier, L., Habermann, B., Desai, A., and Oegema, K. (2004). Centriole assembly requires both centriolar and pericentriolar material proteins. *Dev. Cell* 7, 815–829.
- Dawe, H.R., Farr, H., and Gull, K. (2006). Centriole/basal body morphogenesis and migration during ciliogenesis in animal cells. *J. Cell Sci.* 120, 7–15.
- Debec, A., Sullivan, W., and Bettencourt-Dias, M. (2010). Centrioles: Active players or passengers during mitosis? *Cell. Mol. Life Sci.* 67, 2173–2194.
- Dippell, R. V. (1968). The development of basal bodies in paramecium. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 61, 461–468.
- Doxsey, S.J., Stein, P., Evans, L., Calarco, P.D., and Kirschner, M. (1994). Pericentrin, a highly conserved centrosome protein involved in microtubule organization. *Cell* 76, 639–650.

- Fawcett, D.W., and Philips, D.M. (1969). The fine structure and development of the neck region of the mammalian spermatozoon. *Anat. Rec.* *165*, 153–183.
- Feldman, J.L., Geimer, S., and Marshall, W.F. (2007). The mother centriole plays an instructive role in defining cell geometry. *PLoS Biol.* *5*, 1284–1297.
- Firman, R.C., and Simmons, L.W. (2010). Experimental evolution of sperm quality via postcopulatory sexual selection in house mice. *Evolution (N. Y.)*. *64*, 1245–1256.
- Fisher, H.S., Jacobs-Palmer, E., Lassance, J.M., and Hoekstra, H.E. (2016). The genetic basis and fitness consequences of sperm midpiece size in deer mice. *Nat. Commun.* *7*, 1–9.
- Fishman, E.L., Jo, K., Nguyen, Q.P.H., Kong, D., Royfman, R., Cekic, A.R., Khanal, S., Miller, A.L., Simerly, C., Schatten, G., et al. (2018). A novel atypical sperm centriole is functional during human fertilization. *Nat. Commun.* *9*, 2210.
- Gatenby, J.B., and Mathur, R.S. (1960). Position of the proximal centriole in flagellate spermatozoa. *Nature* *186*, 900–901.
- *Goetz, S.C., and Anderson, K. V (2010). The primary cilium: a signalling centre during vertebrate development. *Nat. Rev. Genet.* *11*, 331–344.
- Gomendio, M., and Roldan, E.R.S. (1991). Sperm competition influences sperm size in mammals. *Proc. R. Soc. B Biol. Sci.* *243*, 181–185.
- Gomes, E.R., Jani, S., and Gundersen, G.G. (2005). Nuclear movement regulated by Cdc42, MRCK, myosin, and actin flow establishes MTOC polarization in migrating cells. *Cell* *121*, 451–463.
- *Gönczy, P. (2012). Towards a molecular architecture of centriole assembly. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* *13*, 425–435.
- Gopalakrishnan, J., Guichard, P., Smith, A.H., Schwarz, H., Agard, D.A., Marco, S., and Avidor-Reiss, T. (2010). Self-assembling Sas-6 multimer is a core centriole building block. *J. Biol. Chem.* *285*, 8759–8770.
- Gopalakrishnan, J., Mennella, V., Blachon, S., Zhai, B., Smith, A.H., Megraw, T.L., Nicastro, D., Gygi, S.P., Agard, D.A., and Avidor-Reiss, T. (2011). Sas-4 provides a scaffold for cytoplasmic complexes and tethers them in a centrosome. *Nat. Commun.* *2*, 311–359.
- Goto, M., O'Brien, D.A., and Eddy, E.M. (2010). Speriolin is a novel human and mouse sperm centrosome protein. *Hum. Reprod.* *25*, 1884–1894.
- Gould, R.R., and Borisy, G.G. (1977). The pericentriolar material in Chinese hamster ovary cells nucleates microtubule formation. *J. Cell Biol.* *73*, 601–615.
- Graser, S., Stierhof, Y., Lavoie, S.B., Gassner, O.S., Lamla, S., Clech, M. Le, and Nigg, E.A. (2007). Cep 164, a novel centriole appendage protein required for primary cilium formation. *J. Cell Biol.* *179*, 321–330.
- Le Guen, P., and Crozet, N. (1989). Microtubule and centrosome distribution during sheep fertilization. *Eur. J. Cell Biol.* *48*, 239–249.
- Gueth-Hallonet, C., Antony, C., Aghion, J., Santa-Maria, A., Lajoie-Mazenc, I., Wright, M., and Maro, B. (1993). γ -Tubulin is present in acentriolar MTOCs during early mouse development. *Cell Sci.* *105*, 157–166.

- Hart, P.E., Glantz, J.N., Orth, J.D., Poynter, G.M., and Salisbury, J.L. (1999). Testis-specific murine centrin, *Cetn1*: genomic characterization and evidence for retroposition of a gene encoding a centrosome protein. *Genomics* 60, 111–120.
- Hart, P.E., Poynter, G.M., Whitehead, C.M., Orth, J.D., Glantz, J.N., Busby, R.C., Barrett, S.L., and Salisbury, J.L. (2001). Characterization of the X-linked murine centrin *Cetn2* gene. *Gene* 264, 205–213.
- Heald, R., Tournebise, R., Blank, T., Sandaltzopoulos, R., Becker, P., Hyman, A., and Karsenti, E. (1996). Self-organization of microtubules into bipolar spindles around artificial chromosomes in *Xenopus* egg extracts. *Nature* 382, 420–425.
- Henneguy, L.F. (1897). Sur les rapports des cils vibratiles avec les centrosomes. In *Archives d'Anatomie Microscopique* 1, pp. 481–496.
- Hildebrandt, F., Benzing, T., and Katsanis, N. (2011). Ciliopathies. *N. Engl. J. Med.* 364, 1533–1543.
- Hinchcliffe, E.H., Chan, A.C., Desai, D.M., Weiss, A., Immur, A.R., Li, C., and Thompson, E.A. (1999). Requirement of Cdk2 – cyclin E activity for repeated centrosome reproduction in *Xenopus* egg extracts. *Science* (80-.). 283, 851–854.
- Hodges, M.E., Scheumann, N., Wickstead, B., Langdale, J.A., and Gull, K. (2010). Reconstructing the evolutionary history of the centriole from protein components. *J. Cell Sci.* 123, 1407–1413.
- Holstein, A.F., and Roosen-Runge, E.S. (1981). *Atlas of Human Spermatogenesis* (Grosse Verlag, Berlin).
- Houlston, E., and Elinson, R.P. (1991). Patterns of microtubule polymerization relating to cortical rotation in *Xenopus laevis* eggs. *Development* 112, 107–117.
- Hung, L., Tang, C.C., and Tang, T.K. (2000). Protein 4.1 R-135 interacts with a novel centrosomal protein (CPAP) which is associated with the γ -tubulin complex. *Mol. Cell. Biol.* 20, 7813–7825.
- *Iii, G.G., and Reiter, J.F. (2016). A primer on the mouse basal body. *Cilia* 5, 1–9.
- Jeong, Y., Lee, J., Kim, K., Yoo, J.C., and Rhee, K. (2007). Characterization of Nip2/centrobin, a novel substrate of Nek2, and its potential role in microtubule stabilization. *J. Cell Sci.* 120, 2106–2116.
- Joshi, H.C. (1993). γ -Tubulin: The hub of cellular microtubule assemblies. *BioEssays* 15, 637–643.
- Khodjakov, A., Cole, R.W., Oakley, B.R., and Rieder, C.L. (2000). Centrosome-independent mitotic spindle formation in vertebrates. *Curr. Biol.* 10, 59–67.
- Kierszenbaum, A.L., Rivkin, E., and Tres, L.L. (2003). The actin-based motor myosin Va is a component of the acroplaxome, an acrosome-nuclear envelope junctional plate, and of manchette-associated vesicles. *Cytogenet. Genome Res.* 103, 337–344.
- Kilburn, C.L., Pearson, C.G., Romijn, E.P., Meehl, J.B., Giddings, T.H., Culver, B.P., Yates, J.R., and Winey, M. (2007). New Tetrahymena basal body protein components identify basal body domain structure. *J. Cell Biol.* 178, 905–912.
- Kim, S., and Tsiokas, L. (2011). Cilia and cell cycle re-entry: More than a coincidence. *Cell Cycle* 10, 2683–2690.
- Kirkham, M., Müller-Reichert, T., Oegema, K., Grill, S., and Hyman, A.A. (2003). Sas-4 is a *C. elegans* centriolar protein that controls centrosome size. *Cell* 112, 575–587.

- Kirschner, M. (1986). Beyond self-assembly: From microtubules to morphogenesis. *Cell* 45, 329–342.
- Kleylein-Sohn, J., Westendorf, J., Le Clech, M., Habedanck, R., Stierhof, Y.-D., and Nigg, E.A. (2007). Plk4-induced centriole biogenesis in human cells. *Dev. Cell* 13, 190–202.
- Kochanski, R.S., and Borisy, G.G. (1990). Mode of centriole duplication and distribution. *J. Cell Biol.* 110, 1599–1605.
- Kollman, J.M., Merdes, A., Mourey, L., and Agard, D.A. (2011). Microtubule nucleation by γ -tubulin complexes. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 12, 709–721.
- Kraatz, S., Guichard, P., Obbineni, J.M., Olieric, N., Hatzopoulos, G.N., Hilbert, M., Sen, I., Missimer, J., Gönczy, P., and Steinmetz, M.O. (2016). The human centriolar protein Cep135 contains a two-stranded coiled-coil domain critical for microtubule binding. *Structure* 24, 1358–1371.
- Kretser, D.M., Loveland, K.L., Meinhardt, A., Simorangkir, D., and Wreford, N. (1998). Spermatogenesis. *Hum. Reprod.* 13, 1–8.
- Krioutchkova, M.M., and Onishchenko, G.E. (1998). Structural and functional characteristics of the centrosome in gametogenesis and early embryogenesis of animals. In *International Review of Cytology*, pp. 107–156.
- Lee, K.-Y., Davies, T., and Mishima, M. (2012). Cytokinesis microtubule organisers at a glance. *J. Cell Sci.* 125, 3495–3500.
- *Lehti, M.S., and Sironen, A. (2016). Formation and function of the manchette and flagellum during spermatogenesis. *Reproduction* 151, R43–R54.
- Lenhossek, M. von (1898). Ueber Flimmerzellen. In *Verh. Anat. Ges.* 12, pp. 106–128.
- *Lindemann, C.B., and Lesich, K.A. (2016). Functional anatomy of the mammalian sperm flagellum. *Cytoskeleton* 669, 652–669.
- Liška, F., Cardoso, M.C., Lee-Kirsch, M.A., Rooij, D.G. de, Krejčí, E., Domaing, P., Gosele, C., Křenová, D., Křen, V., Hubner, N., et al. (2009). Rat hd mutation reveals an essential role of centrobin in spermatid head shaping and assembly of the head-tail coupling apparatus. *Biol. Reprod.* 81, 1196–1205.
- Long, C.R., Pinto-Correia, C., Duby, R.T., De Leon, F.A.P., Boland, M.P., Roche, J.F., and Robl, J.M. (1993). Chromatin and microtubule morphology during the first cell cycle in bovine zygotes. *Mol. Reprod. Dev.* 36, 23–32.
- Longo, F.J. (1976). Sperm aster in rabbit zygotes: its structure and function. *J. Cell Biol.* 69, 539–547.
- Manandhar, G., and Schatten, G. (2000). Centrosome reduction during Rhesus spermiogenesis: γ -tubulin, centrin and centriole degeneration. *Mol. Reprod. Dev.* 511, 502–511.
- Manandhar, G., Sutovsky, P., Joshi, H.C., Stearns, T., and Schatten, G. (1998). Centrosome reduction during mouse spermiogenesis. *Dev. Biol.* 203, 424–434.
- *Manandhar, G., Schatten, H., and Sutovsky, P. (2005). Centrosome reduction during gametogenesis and its significance. *Biol. Reprod.* 72, 2–13.
- Marshall, W.F., and Rosenbaum, J.L. (2004). Are there nucleic acids in the centrosome? In *Current Topics in Developmental Biology*, pp. 187–205.

- Mazia, D. (1960). The multiplicity of the mitotic centers and the time-course of their duplication and separation. *J. Cell Biol.* 7, 1–20.
- Mazia, D. (1984). Centrosomes and mitotic poles. *Exp. Cell Res.* 153, 1–15.
- Mazia, D. (1987). The chromosome cycle and the centrosome cycle in the mitotic cycle. In *International Review of Cytology*, pp. 49–92.
- Mazo, G., Soplop, N., Wang, W., Uryu, K., Tsou, M.B., Mazo, G., Soplop, N., Wang, W., Uryu, K., and Tsou, M.B. (2016). Spatial control of primary ciliogenesis by subdistal appendages alters sensation-associated properties of cilia. *Dev. Cell* 39, 424–437.
- McIntosh, J.R. (1984). Tubulin hooks as probes for microtubule polarity: an analysis of the method and an evaluation of data on microtubule polarity in the mitotic spindle. *J. Cell Biol.* 98, 525–533.
- Mennella, V., Agard, D.A., Huang, B., and Pelletier, L. (2014). Amorphous no more: subdiffraction view of the pericentriolar material architecture. *Trends Cell Biol.* 24, 188–197.
- Nakazawa, Y., Hiraki, M., Kamiya, R., and Hirono, M. (2007). Sas-6 is a cartwheel protein that establishes the 9-fold symmetry of the centriole. *Curr. Biol.* 17, 2169–2174.
- Navara, C.S., First, N.L., and Schatten, G. (1994). Microtubule organization in the cow during fertilization, polyspermy, parthenogenesis, and nuclear transfer: the role of the sperm aster. *Dev. Biol.* 162, 29–40.
- Navara, C.S., First, N.L., and Schatten, G. (2002). Phenotypic variations among paternal centrosomes expressed within the zygote as disparate microtubule lengths and sperm aster organization: correlations between centrosome activity and developmental success. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 93, 5384–5388.
- Norberg, H.S. (1973). Ultrastructural aspects of the preattached pig embryo: Cleavage and early blastocyst stages. *Z. Anat. Entwicklungsgesch.* 143, 95–114.
- O’Connell, K.F., Caron, C., Kopish, K.R., Hurd, D.D., Kempfues, K.J., Li, Y., and White, J.G. (2001). The *C. elegans* *zyg-1* gene encodes a regulator of centrosome duplication with distinct maternal and paternal roles in the embryo. *Cell* 105, 547–558.
- Oakley, B.R., Oakley, C.E., Yoon, Y., and Jung, M.K. (1990). γ -Tubulin is a component of the spindle pole body that is essential for microtubule function in *Aspergillus nidulans*. *Cell* 61, 1289–1301.
- Ou, Y.Y., Zhang, M., Chi, S., Matyas, J.R., and Rattner, J.B. (2003). Higher order structure of the PCM adjacent to the centriole. *Cell Motil. Cytoskeleton* 55, 125–133.
- Paintrand, M., Moudjou, M., Delacroix, H., and Bornens, M. (1992). Centrosome organization and centriole architecture: Their sensitivity to divalent cations. *J. Struct. Biol.* 108, 107–128.
- Palazzo, R.E., Vogel, J.M., Schnackenberg, B.J., Hull, D.R., and Xingyong, W. (1999). Centrosome maturation. *Curr. Top. Dev. Biol.* 49, 449–470.
- Palermo, G. (1992). Pregnancies after intracytoplasmic injection of single spermatozoon into an oocyte. *Lancet* 340, 17–18.
- *Palermo, G. (1997). The human sperm centrosome is responsible for normal syngamy and early embryonic development. *Rev. Reprod.* 2, 19–27.

- Payne, C. (2003). Preferentially localized dynein and perinuclear dynactin associate with nuclear pore complex proteins to mediate genomic union during mammalian fertilization. *J. Cell Sci.* *116*, 4727–4738.
- Pickett-Heaps, J.D., Tippit, D.H., Cohn, S.A., and Spurck, T.P. (1986). Microtubule dynamics in the spindle, theoretical aspects of assembly/disassembly reactions in vivo. *J. Theor. Biol.* *118*, 153–169.
- Piel, M., Meyer, P., Khodjakov, A., Rieder, C.L., and Bornens, M. (2000). The respective contributions of the mother and daughter centrioles to centrosome activity and behavior in vertebrate cells. *J. Cell Biol.* *149*, 317–330.
- Pihan, G.A., Wallace, J., Woda, B., Purohit, A., Doxsey, S.J., Knecht, H., and Quesenberry, P. (1998). Centrosome defects and genetic instability in malignant tumors. *Cancer Res.* *58*, 3974–3985.
- Rattner, J.B. (1972). Observations of centriole formation in male meiosis. *J. Cell Biol.* *54*, 20–29.
- Reichmann, J., Nijmeijer, B., Hossain, M.J., Eguren, M., Schneider, I., Politi, A.Z., Roberti, M.J., Hufnagel, L., Hiiragi, T., and Ellenberg, J. (2018). Dual-spindle formation in zygotes keeps parental genomes apart in early mammalian embryos. *Science* (80-.). *361*, 189–193.
- Riparbelli, M.G., Callaini, G., and Megraw, T.L. (2012). Assembly and persistence of primary cilia in dividing *Drosophila* spermatocytes. *Dev. Cell* *23*, 425–432.
- Robbins, E. (1968). The centriole cycle in synchronized HeLa cells. *J. Cell Biol.* *36*, 329–339.
- *Ross, L., and Normark, B.B. (2012). Evolutionary problems in centrosome and centriole biology. *J. Evol. Biol.* *28*, 995–1004.
- Salisbury, J.L. (1995). Centrin, centrosomes, and mitotic spindle poles. *Curr. Opin. Cell Biol.* *7*, 39–45.
- Salisbury, J.L., Suino, K.M., Busby, R., and Springett, M. (2002). Centrin-2 is required for centriole duplication in mammalian cells. *Curr. Biol.* *12*, 1287–1292.
- Sathananthan, A.H., Kola, I., Osborne, J., Trounson, A., Ng, S.C., Bongso, A., and Ratnam, S.S. (1991). Centrioles in the beginning of human development. *Proc. Natl. Acad. Sci.* *88*, 4806–4810.
- Sathananthan, A.H., Ratnam, S.S., Ng, S.C., Tarín, J.J., Gianaroli, L., and Trounson, A. (1996). The sperm centriole: Its inheritance, replication and perpetuation in early human embryos. *Hum. Reprod.* *11*, 345–356.
- Schatten, G. (1994). The centrosome and its mode of inheritance: The reduction of the centrosome during gametogenesis and its restoration during fertilization. *Dev. Biol.* *165*, 299–335.
- *Schatten, H., and Sun, Q.Y. (2009). The role of centrosomes in mammalian fertilization and its significance for ICSI. *Mol. Hum. Reprod.* *15*, 531–538.
- Schatten, G., Simerly, C., and Schatten, H. (1985). Microtubule configurations during fertilization, mitosis, and early development in the mouse and the requirement for egg microtubule-mediated motility during mammalian fertilization. *Proc. Natl. Acad. Sci.* *82*, 4152–4156.
- Schatten, G., Simerly, C., and Schatten, H. (1991). Maternal inheritance of centrosomes in mammals? Studies on parthenogenesis and polyspermy in mice. *Proc. Natl. Acad. Sci.* *88*, 6785–6789.

- Schatten, H., Schatten, G., Mazia, D., Balczon, R., and Simerly, C. (1986). Behavior of centrosomes during fertilization and cell division in mouse oocytes and in sea urchin eggs. *Proc. Natl. Acad. Sci.* *83*, 105–109.
- Schnackenberg, B. (1999). Identification and function of the centrosome centromatrix. *Biol. Cell* *91*, 429–438.
- Shang, Y., Li, B., and Gorovsky, M.A. (2002). *Tetrahymena thermophila* contains a conventional γ -tubulin that is differentially required for the maintenance of different microtubule-organizing centers. *J. Cell Biol.* *158*, 1195–1206.
- Shao, X., Tarnasky, H.A., Lee, J.P., Oko, R., and Van Der Hoorn, F.A. (1999). Spag4, a novel sperm protein, binds outer dense-fiber protein Odf1 and localizes to microtubules of manchette and axoneme. *Dev. Biol.* *211*, 109–123.
- Simerly, C., Wu, G.-J., Zoran, S., Ord, T., Rawlins, R., Jones, J., Navara, C., Gerrity, M., Rinehart, J., Binor, Z., et al. (1995). The paternal inheritance of the centrosome, the cell's microtubule-organizing center, in humans, and the implications for infertility. *Nat. Med.* *1*, 47–52.
- Sluder, G., and Rieder, C.L. (1985). Centriole number and the reproductive capacity of spindle poles. *J. Cell Biol.* *100*, 887–896.
- Sluder, G., Miller, F.J., and Rieder, C.L. (1989). Reproductive capacity of sea urchin centrosomes without centrioles. *Cell Motil. Cytoskeleton* *13*, 264–273.
- Sluder, G., Thompson, E.A., Miller, F.J., Hayes, J., and Rieder, C.L. (1997). The checkpoint control for anaphase onset does not monitor excess numbers of spindle poles or bipolar spindle symmetry. *J. Cell Sci.* *110*, 421–429.
- Sonnen, K.F., Gabryjonczyk, A.-M., Anselm, E., Stierhof, Y.-D., and Nigg, E.A. (2013). Human Cep192 and Cep152 cooperate in Plk4 recruitment and centriole duplication. *J. Cell Sci.* *126*, 3223–3233.
- Spektor, A., Tsang, W.Y., Khoo, D., and Dynlacht, B.D. (2007). Cep97 and CP110 suppress a cilia assembly program. *Cell* *130*, 678–690.
- Stearns, T., and Kirschner, M. (1994). In vitro reconstitution of centrosome assembly and function: The central role of γ -tubulin. *Cell* *76*, 623–637.
- Tachibana, M., Sparman, M., Sritanandomchai, H., Ma, H., Clepper, L., Woodward, J., Li, Y., Ramsey, C., Kolotushkina, O., and Mitalipov, S. (2009). Mitochondrial gene replacement in primate offspring and embryonic stem cells. *Nature* *461*, 367–372.
- Tang, C.J.C., Lin, S.Y., Hsu, W. Bin, Lin, Y.N., Wu, C.T., Lin, Y.C., Chang, C.W., Wu, K.S., and Tang, T.K. (2011). The human microcephaly protein STIL interacts with CPAP and is required for procentriole formation. *EMBO J.* *30*, 4790–4804.
- La Terra, S., English, C.N., Hergert, P., McEwen, B.F., Sluder, G., and Khodjakov, A. (2005). The de novo centriole assembly pathway in HeLa cells: Cell cycle progression and centriole assembly/maturation. *J. Cell Biol.* *168*, 713–722.
- Wilde, A. (1999). Stimulation of microtubule aster formation and spindle assembly by the small GTPase Ran. *Science* (80-.). *284*, 1359–1362.

*Winey, M., and O'Toole, E. (2014). Centriole structure. *Philos. Trans. R. Soc. B Biol. Sci.* 369.

Woolley, D.M., and Fawcett, D.W. (1973). The degeneration and disappearance of the centrioles during the development of the rat spermatozoon. *Anat. Rec.* 177, 289–301.

Xu, Y.-N., Cui, X.-S., Sun, S.-C., Jin, Y.-X., and Kim, N.-H. (2011). Cross species fertilization and development investigated by cat sperm injection into mouse oocytes. *J. Exp. Zool. Part A Ecol. Genet. Physiol.* 315A, 349–357.

Yamashita, Y.M., Mahowald, A.P., Perlin, J.R., and Fuller, M.T. (2007). Asymmetric inheritance of mother versus daughter centrosome in stem cell division. *Science* (80-.). 315, 518–521.

Yuan, S., Stratton, C.J., Bao, J., Zheng, H., Bhetwal, B.P., Yanagimachi, R., and Yan, W. (2015). Spata6 is required for normal assembly of the sperm connecting piece and tight head–tail junction. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 112, 430–439.

Zamboni, L., Zemjanis, R., and Stefanini, M. (1971). The fine structure of the neck of mammalian spermatozoa. *Anat. Rec.* 169, 155–172.

Zenker, J., White, M.D., Templin, R.M., Parton, R.G., Thorn-Seshold, O., Bissiere, S., and Plachta, N. (2017). A microtubule-organizing center directing intracellular transport in the early mouse embryo. *Science* (80-.). 357, 925–928.

Zheng, Y., Wong, M.L., Alberts, B., and Mitchison, T. (1995). Nucleation of microtubule assembly by a γ -tubulin-containing ring complex. *Nature* 378, 578–583.

Zou, C., Li, J., Bai, Y., Gunning, W.T., Wazer, D.E., Band, V., and Gao, Q. (2005). Centrobin: A novel daughter centriole-associated protein that is required for centriole duplication. *J. Cell Biol.* 171, 437–445.

(* označuje sekundární zdroje)