

**Česká zemědělská univerzita v Praze**

**Fakulta agrobiologie, potravinových a přírodních  
zdrojů**

**Katedra veterinárních disciplín**



**Úloha 4E-BP1 v regulaci cap-dependentní translace  
v savčím oocytu**

**Diplomová práce**

**Autor práce: Bc. Markéta Končická**

**Vedoucí práce: prof. Mgr. Ing. Markéta Sedmíková, Ph.D.**

**Školitel specialista: Ing. Andrej Šušor, Ph.D.**

**Školitel specialista: Michal Kubelka, Csc.**

© 2015 ČZU v Praze

### **Čestné prohlášení**

Prohlašuji, že svou diplomovou práci "Úloha 4E-BP1 v regulaci cap-dependentní translace v savčím oocytu" jsem vypracovala samostatně pod vedením školitelů specialistů a vedoucího diplomové práce a s použitím odborné literatury a dalších informačních zdrojů, které jsou citovány v práci a uvedeny v seznamu literatury na konci práce. Jako autorka uvedené diplomové práce dále prohlašuji, že jsem v souvislosti s jejím vytvořením neporušila autorská práva třetích osob.

V Praze dne 8.4. 2015

---

## **Poděkování**

Ráda bych touto cestou poděkovala vedoucí práce prof. Mgr. Ing. Markétě Sedmíkové, Ph.D. za vedení této práce. Katedře veterinárních disciplín děkuji za milé studijní prostředí a zvláště pak Ing. Mgr. Tereze Krejčové, Ph.D., za ochotnou spolupráci. Celému týmu Laboratoře biochemie a molekulární biologie zárodečných buněk ÚŽFG AV ČR za milé přijetí a ochotnou spolupráci na mé diplomové práci. Školitelům specialistům Ing. Andreji Šušorovi Ph.D a Michalu Kubelkovi, Csc. za poskytnutí možnosti vypracovat tuto diplomovou práci a za ochotu při konzultacích a revizích mé diplomové práce. Jaroslavě Šupolíkové a Mgr. Renatě Černé za spolupráci na výzkumu. A mé rodině za zázemí a psychickou podporu.

# Úloha 4E-BP1 v regulaci cap-dependentní translace v savčím oocytu

## Souhrn

Pro pohlavní rozmnožování je velmi důležitá tvorba gamet. Gamety podstupují redukční dělení, díky němuž získají haploidní počet chromozómů. Oocyt si vytváří transkripty během růstové fáze a krátce po zahájení meiotického zrání je transkripce zastavena. Během meiotického zrání je exprese proteinů ovlivněna hlavně na úrovni regulace translace a stabilizace. Globální transkripce je obnovena po oplození u myši v 2buněčném embryu a u lidí ve 4buněčném embryu. Cap-dependentní translace je translace závislá na 7-methylguanositinové čepičce na 5' konci mRNA. Tato translace je iniciována přes navázání eIF4E (eukaryotic initiation translation factor 4E) a vytvoření iniciačního komplexu eIF4F. Inicivace cap-dependentní translace je inhibována hypofosforylovaným proteinem 4E-BP1 (eIF4E-binding protein 1), který blokuje protein eIF4E a zabraňuje vytvoření komplexu eIF4F. Když se protein 4EBP1 stává hyperfosforylovaným, dochází k uvolnění eIF4E z inhibice a v tomto stádiu může být aktivována translace.

Cílem mé práce bylo sledování fosforylace 4E-BP1 během meiotického zrání myších oocytů, kumulárních buňkách a regulace 4E-BP1 kinázami mTOR a PLK1. 4E-BP1 se stává hyperfosforylovaný po NEBD (nuclear envelope breakdown) a defosforylovaný po oplození. Fosforylované formy na serinu 64 a threoninu 69 jsou lokalizovány v oblasti chromozómů a později se jejich lokalizace posouvá směrem k pólům dělicího vřeténka. mTOR je hlavním regulátorem 4E-BP1 a je kolokalizován s fosforylovaným 4E-BP1. Na druhou stranu protein PLK1 (pololike kinase 1) nemá efekt na fosforylaci 4E-BP1.

**Klíčová slova:** eIF4E, 4E-BP1, cap-dependentní translace, meiotické zrání, savčí oocyty, PLK-1, mTOR

# The role of 4E-BP1 in regulation of cap-dependent translation in mammalian oocyte

## Summary

For sexual reproduction is very important gametogenesis. Gametes undergoes reducing division, which allows to proceed to haploid stage. Oocytes produce transcripts during growth phase and shortly before initiation of maturation transcription is ceased. During meiotic maturation is expression of proteins affected mainly on the level of regulation of translation and stabilization. Global transcription is resumed post fertilization in mouse in 2 cells embryo and human in 4 cells embryo. Cap-dependent translation is dependent on 7-methylguanosin cap on 5' end mRNA. This translation is initiated by binding eIF4E (eukaryotic initiation translation factor 4E) and formation of eIF4F complex. Initiation of cap-dependent translation is inhibited by hypophosphorylated protein 4E-BP1 (eIF4E-binding protein1) which inhibits protein eIF4E and prevent formation of eIF4F complex. When 4E-BP1 become hyperphosphorylated, the eIF4E is released from inhibition and activation of translation can occur in this stage.

Aim of my thesis was observation of phosphorylation of 4E-BP1 during meiotic maturation in mouse oocyte, cumulus cells and regulation of 4E-BP1 by mTOR and PLK1. 4E-BP1 become hyperphosphorylated after NEBD (nuclear envelope breakdown) and dephosphorylated post fertilization. Phosphorylated forms on serine 64 and threonine 69 are localized in the chromosomal area and later is moved to spindle poles. mTOR is the main regulator of 4E-BP1 and colocalizes with phosphorylated 4E-BP1. On another hand PLK1 do not affect phosphorylation of 4E-BP1.

**Keywords:** eIF4E, 4E-BP1, cap-dependent translation, meiotic maturation, mammalian oocyte, PLK-1, mTOR

# Obsah

|   |           |
|---|-----------|
| 1. Úvod.....  | 7         |
| 2. Cíl práce.....   | 8         |
| 3. Literární rešerše .....  | 9         |
| <b>3.1. Oogeneze .....</b>  | <b>9</b>  |
| 3.1.1. Migrace primordiálních zárodečných buněk (PGCs).....   | 10        |
| 3.1.2. Tvorba vaječnicků .....  | 12        |
| 3.1.3. Tvorba nových zárodečných buněk v ovariích savců: female germline stem cells (GSCs) nebo oogonial stem cells (OSCs)..... | 15        |
| <b>3.2. Meiotické zrání.....</b>  | <b>16</b> |
| 3.2.1. Znovuzahajení meiózy .....   | 21        |
| 3.2.2. Aneuploidie .....  | 25        |
| <b>3.3. Post-transkripční mechanismy regulace translace .....</b>   | <b>27</b> |
| 3.3.1. Připojení Poly(A) signálu na 3' konce .....  | 29        |
| 3.3.2. Cap dependentní translace.....   | 30        |
| 3.3.3. Fosforylace proteinu eIF4E .....   | 31        |
| 3.3.4. Fosforylace proteinu 4E-BP1.....   | 33        |
| 3.3.5. Faktory ovlivňující fosforylaci 4E-BP1.....  | 35        |
| 4. Metodika a materiál.....   | 40        |
| <b>4.1. Izolace oocytů .....</b>  | <b>40</b> |
| <b>4.2. Izolace kumulárních buněk z oocytů ve stádiu GV a MII.....</b>  | <b>42</b> |
| <b>4.3. Imunocytochemie (ICC).....</b>  | <b>42</b> |
| <b>4.4. Western blot .....</b>  | <b>43</b> |
| 5. Výsledky .....   | 45        |
| <b>5.1. Lokalizace globálního 4E-BP1 a jeho fosforylovaných forem v oocyту pomocí imunocytochemie .....</b>                     | <b>45</b> |
| <b>5.2. Průběh fosforylace 4E-BP1 a aktivace proteinu mTOR během zrání oocyту na western blotu .....</b>                        | <b>53</b> |
| <b>5.3. Lokalizace aktivní formy AKT a mTOR v oocyту.....</b>   | <b>54</b> |
| <b>5.4. Fosforylace 4E-BP1 u kumulárních buněk.....</b>   | <b>59</b> |
| 6. Diskuze .....  | 61        |
| 7. Závěr .....  | 65        |
| 8. Seznam použité literatury.....   | 66        |
| 9. Seznam použitých zkratk .....  | 79        |
| 10. Seznam obrázků.....   | 85        |

# 1. Úvod

Pro reprodukční biotechnologie je důležité porozumět regulačním mechanismům ovlivňujícím meiotické zrání oocyty. V oocytech je během meiotického zrání tvorba proteinů regulována přes iniciaci translace, protože tvorba transkriptů je velmi omezená. Většina mRNA, podle níž se tvoří proteiny, byla vytvořena oocytem ve fázi růstu a pro meiotické zrání je skladována v RNPs (Ribonucleoproteins) a nebo P-bodies. K obnovení translace dochází až po oplození v závislosti na druhu.

U myších embryí je translace obnovena v 2buněčném stádiu u člověka ve 4buněčném stádiu, u skotu v 8-16buněčném stádiu a u králíka dochází k obnovení až v 16buněčném stádiu. U oocytů je významná regulace translace přes 7-methylguanidinovou čepičku na 5'konci mRNA. Iniciátorem cap-dependentní translace je komplex eIF4F. Tento komplex je tvořen proteiny eIF4E, eIF4G a eIF4A. Protein eIF4E se váže přímo na 7-methylguanidinovou čepičku na 5'konci mRNA. Aktivita tohoto proteinu je regulována eIF4E-binding proteiny (4E-BPs). V mé diplomové práci jsem se zaměřila hlavně na protein 4E-BP1.

4E-BP1 je inhibítoem eIF4E a pokud je hypofosforylován nebo nefosforylován je eIF4E blokován a neinicuje translaci. Při jeho hyperfosforylaci je eIF4E uvolněn z vazby a je schopen iniciovat cap-dependentní translaci.

Protein 4E-BP1 svojí vazbou na eIF4E blokuje vazebné místo pro eIF4G a nedochází tedy k vytváření iniciačního komplexu eIF4F a tím je blokována cap-dependentní translace.

U protein 4E-BP1 jsem se zabývala jeho fosforylačními místy na threoninu 36/45, serinu 64 a threoninu 69. Pokud je protein 4E-BP1 fosforylován na více fosforylačních místech přestává inhibovat translaci.

U oocytů dochází po zahájení meiotického zrání ve fázi NEBD k hyperfosforylaci proteinu 4E-BP1, díky čemuž je protein eIF4E volný pro vytvoření komplexu eIF4F. Vliv na fosforylaci 4E-BP1 má aktivace drah protein kináz AKT a mTOR.

## **2. Cíl práce**

Cílem této diplomové práce ověřit následující hypotézy: 4E-BP1 (4E-binding protein 1) působí jako represor cap-dependentní translace u myších oocytů. 4E-BP1 je aktivován/fosforylován pravděpodobně pomocí PLK-1 (polo-like kinase 1), CDK1 (cyklin dependentní kináza 1) a mTOR (mammalian target of rapamycin) po zahájení meiózy. Dílčí hypotézy jsou: 4E-BP1 se hyperfosforyluje po zahájení meiózy, a tak umožňuje průběh cap-dependentní translace. Tato fosforylace je následně eliminována po fertilizaci vajíčka.



### 3. Literární rešerše

#### 3.1. Oogeneze

Vytváření vaječnicků u embryí začíná migrací primordiálních zárodečných buněk (PGCs), které vznikají mimo gonády. Proces tvorby samičích gamet (gametogeneze) se skládá z těchto kroků 1) formování PGCs, 2) migrace PGCs do oblasti genitální rýhy, 3) osídlení gonád primordiálními zárodečnými buňkami, 4) diferenciaci PGCs na oogonie, 5) jejich následná proliferace (Gilbert, 2000; Van den Hurk et Zhao, 2005).

Počty primordiálních zárodečných buněk (primordial germ cells; PGCs) se zvyšují ještě před jejich vstupem do pohlavních žláz, v našem případě embryonálních vaječnicků. Tyto buňky se vyznačují vysokou mitotickou aktivitou (Fulka, 2007).

PGCs se vytvářejí v extraembryonálním epiblastu gastrulovaného embrya. Během jejich migrace procházejí přes posteriorní část primitivního proužku do endodermální části žloutkového váčku (Molyneaux et Wylie, 2004; Van den Hurk et Zhao, 2005).

Ve vznikajících PGCs bylo zjištěno velké množství proteinů Fragilis, Stella a DPPA3, (Developmental Pluripotency Associated 3). Protein Fragilis je důležitý pro homeotypickou buněčnou adhezi (buňka-buňka) a pro kontrolu buněčného cyklu (Molyneaux et Wylie, 2004; Fulka, 2007).

Na vývoji PGCs v proximálním epiblastu se podílí faktory rodiny TGF $\beta$  (transforming growth factor  $\beta$ ) a bone morfogenetic proteiny (BMP-4, BMP-8b, BMP-2). BMP-2 pochází z viscerálního endodermu a BMP-4 a BMP-8b pocházejí z extraembryonálního ektodermu. (Molyneaux et Wylie, 2004; Van den Hurk et Zhao, 2005).

Do pohlavních žláz myši putují PGCs kolem 3-4 dnů. Některé PGCs zaniknou během jejich migrace ve střevě nebo se dostanou do jiné tkáně (Fulka, 2007). Množení PGCs je nejspíše řízena SCF (stem cell factor), ten je produkován buňkami v oblasti migrace PGCs (Gilbert, 2000). Dolci et al. (1993), odebrali myší embrya 8,5, 10,5 a 11,5 den po oplození a kultivovali jejich PGCs *in vitro*. Zjistili, že přidáním SCF (stem cell factor) a nebo LIF (leukemia inhibitory factor) v kombinaci s Forskolinem (FRSK), který zvyšuje hladinu cAMK (cyklický adenosin monofosfát), dochází k výraznému zvýšení počtu PGCs buněk, oproti kontrole jak v 1. den tak 3. den kultivace (Dolci et al., 1993). Stem cell faktor je potřeba i pro proliferaci melanoblastů odvozených od neurální lišty, hematopoetických a zárodečných buněk. Myši s homozygótní mutací pro bílou barvu mají nedostatek zárodečných

buněk, melanocytů a krevních buněk, protože jejich buňky postrádají receptory pro SCF (Gilbert, 2000).

Proliferace také závisí na FGF-2 (fibroblast growth factor), IL-4 (interleukine-4), TNF $\alpha$  (tumor necrosis factor) a PACAP (pituitary adenylate cyclase activating peptide) (Van den Hurk et Zhao, 2005). Cytokiny hrají významnou roli v proliferaci a přežívání PGCs. Bylo zjištěno, že Basic fibroblast growth factor (FBF-basic), TNF $\alpha$  (tumor necrosis factor-alfa), neuregulin-beta a ligandy pro receptory *ErbB2* a *ErbB3* (geny pro human epidermal growth factor receptor 2 a 3) zvyšují počty PGCs v kultuře (Vanderhyden, 2002).

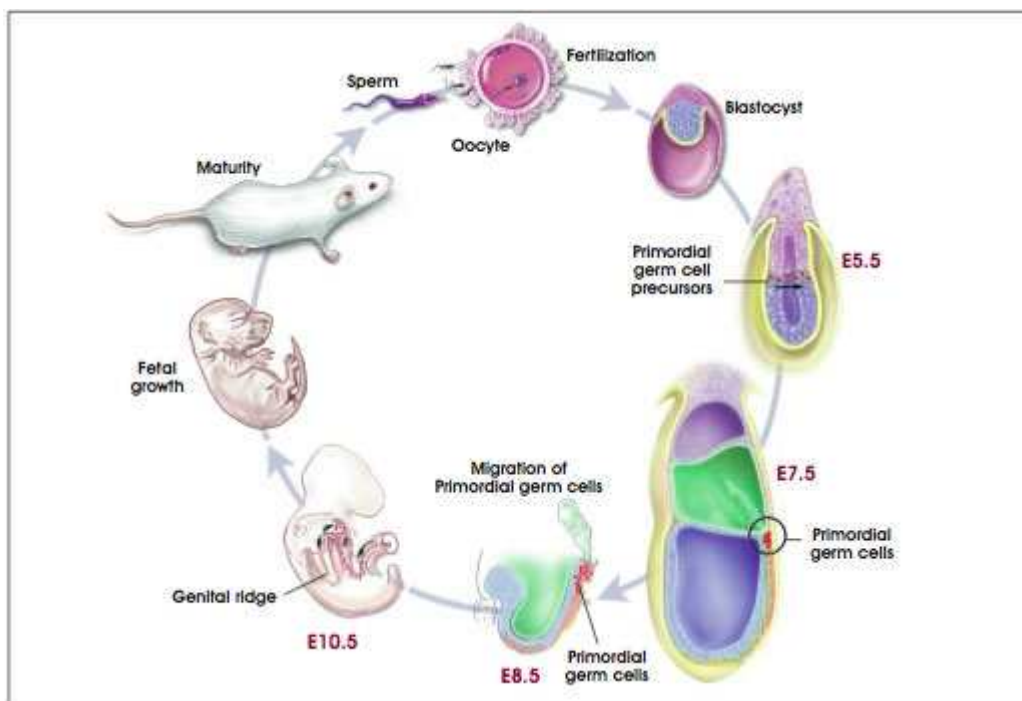
### **3.1.1. Migrace primordiálních zárodečných buněk (PGCs)**

V myším embryu prekurzory zárodečných buněk migrují z extraembryonálního mezodermu do embrya přes alantois. Z alantoidu poté přecházejí do žloutkového váčku, kde jsou pak PGCs rozděleny na 2 populace podle toho, jestli migrují do pravé nebo levé zárodečné rýhy (Gilbert, 2000; Kang et Han, 2011).

Migrace PGCs do genitální rýhy je zprostředkována KIT ligandem (C-KIT/KL/Steel factor/stem cell factor), který je tvořen somatickými buňkami v oblasti migrace. V oblasti migrace se také vyskytuje glykoprotein fybronektin, který podporuje translokaci migrujících PGCs (Fleischman, 1993).

PGCs vytváří KIT receptory od E7,5 (embryo 7,5 den) do E13,5 a KIT ligand je exprimován podél celé migrační dráhy PGCs. Předpokládá se, že kromě KL ovlivňují migraci a mitotickou aktivitu PGCs i další chemoatraktanty v genitální rýze. LIF (leukemia inhibiting factor) stejně jako KIT ligand podporuje migraci, přežívání a stimuluje proliferaci PGCs (Van den Hurk et Zhao, 2005).

**Obrázek 1. Migrace primordiálních zárodečných buněk u embrya myši**



(Winslow et Duckwall, 2001) (<http://stemcells.nih.gov/info/scireport/pages/appendixa.aspx>)

LIF a KL podporují přežívání primordiálních zárodečných buněk přes inhibici apoptózy. U myši se spontánním deficitem exprese KIT receptoru nebo jeho ligandu bylo zjištěno, že přežívání a migrace PGCs je závislá na této dráze. Aktivace fosfatidylinositol-3-kinázy (PI3K), zprostředkovaná prostřednictvím KIT, hraje důležitou roli v buněčných adhezích, proliferaci a přežití některých typů buněk. Ovšem u některých buněk s mutovaným genem pro PI3-kinázu není ovlivněna proliferace a přežití buněk plodu během oogeneze. Naproti tomu jiné výzkumy ukázaly, že PI3K je důležitá při cytokiny zprostředkovaném přežití PGCs v oogenezi, což ukazuje na to, že jsou i dráhy využívající signalizaci PI3K. Antiapoptotické účinky IGF-I (Insulin-like growth factor 1) nebo LIF/SCF byly téměř úplně eliminovány kultivací vaječníků s jedním ze dvou inhibitorů fosfatidylinositol-3'-kinázy LY294002 (5 $\mu$ M) a nebo wortmannin (50nM). Zatímco aplikace rapamycinu (25ng/ml), inhibitoru mTOR (mammalian target of rapamycin), jehož substrátem je S6K1 (Ribosomal Protein S6 Kinase, 70kDa) a 4E-BP1 (eIF4E binding protein 1), byla bez účinku (Morita et al., 1999; Vanderhyden, 2002).

PGCs se dají u myši poprvé identifikovat v oblasti žlutkového vaku pomoci barvení na alkalickou fosfatázu, když jejich počet dosáhne 45 PGCs, což je u myšního embrya ve věku 7,2 dnů (Vanderhyden, 2002) podle Godin et al. (1990) od 8,5 dnů. Kolem 7. dne vývoje

embrya se PGCs začínají objevovat na rozhraní embryonálních a extraembryonálních tkání (plodové obaly a placenta). Při vývoji těchto buněk mají velký význam růstové faktory obzvláště potom BMP (bone morphogenetic proteins) (Fulka, 2007).

Kolem 7,5 dne vývoje embrya (E7,5) se PGCs u myši začínají objevovat v oblasti alantoidu. Kolem 9. dne jsou PGCs včleněny do prvostřeva a poté putují dorsálním směrem ven ze střeva do oblasti genitální lišty (Tam et Snow, 1981).

Kolem 7,5- 8,5 dne embrya myši se špatně sleduje dění během migrace PGCs v oblasti prvostřeva, kvůli častým morfogenetickým pohybům embrya. Pohyb PGCs buněk uvnitř trávicího traktu a prvostřeva ovlivňují dva proteiny E-Kadherin a KIT ligand. Při mutaci tyrozin kinázových receptorů KIT dochází k dramatickému snížení počtu PGCs buněk v 9,5. dni vývoje embrya (Molyneaux et Wylie 2004). Data ukazují, že SDF-1 (stromal cell-derived factor 1) funguje jako atraktant pro PGCs buňky jak v *in vivo* tak *in vitro* studiích. Pokud mají zvířata mutaci genu pro daný protein a jeho receptor *Cxcr4* (chemokine receptor type 4) dochází k redukci počtu PGCs buněk, které doputovaly do genitální rýhy. U jedinců s touto mutací se počty PGCs v dřívějších fázích migrace neliší (Molyneaux et al., 2003). Genitální rýha 10,5denní myši uvolňuje protein transforming growth factor  $\beta$ 1- like (TGF-  $\beta$ 1-like) (Gilbert, 2000).

### 3.1.2. Tvorba vaječníků

Ještě před tím, než PGCs vstoupí do genitální rýhy, se smíchají se somatickými buňkami, které podporují jejich následný vývoj. PGCs se potom co jsou obklopeny pregranulózními buňkami a invaginovány do genitální rýhy, nazývají Oogonie. Tyto pregranulózní buňky vznikající z epiteliálních buněk jsou invaginovány do genitální rýhy, kde se z nich později vytvoří buňky granulózní (Vanderhyden, 2002).  $\beta$ 1-integrin je důležitý pro kolonizaci ovárie, primordiálními zárodečnými buňkami (PGCs) a E-Kadherin ovlivňuje jejich nahloučení (Van den Hurk et Zhao, 2005).

U myši probíhá dělení PGCs 8. den až 12. den, v této době jejich počet vzroste z 10 až 100 buněk na 2500-5000 PGCs. Kolem 13,5 dne by myš mohla mít už okolo 24 000 PGCs (Tam et Snow, 1981; Gilbert, 2000; Kang et Han, 2011). Tam et Snow, (1981) uvádí, že množení PGCs pokračuje do E13.5, kdy počet PGCs dosahuje svého maxima kolem 25000 buněk.

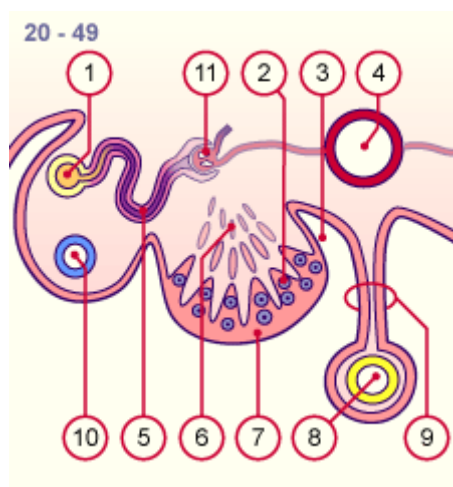
Od 12,5. dne embrya myši a 22. týdne u člověka oogonie asociují s pregranulózními buňkami genitální lišty. Pregranulózní buňky se budou vyvíjet do primordiálního folikulu.

Pregranulózní folikul je tvořen jednou vrstvou těchto buněk, které obklopují oocyt (Di Carlo et De Felici, 2000). Buněčné agregace pravděpodobně zahrnují interakce Kadherinu a KIT ligandu, které usnadňují adhezi buněk (Vanderhyden, 2002). Ovariální folikuly se nevyvíjí bez přítomnosti oocytu, což naznačuje, že oocyt se účastní tvorby folikulu hned od počátku vývoje. Faktory potřebné pro vytvoření primordiálního folikulu nejsou zcela známy, ale cílená delece faktoru FIG-alfa (factor in the germline alpha) způsobuje selhání prvotní tvorby folikulů a předčasné vyčerpání oocytů, což vede k ženské sterilitě (Soyal et al., 2000).

Hladina estrogenů je u ovcí, králíků, krav a morčat vysoká na začátku ovariální diferenciace a při zahájení meiózy se hladina estrogenů značně nebo úplně sníží. Hladina estrogenů se znovu zvýší při tvorbě folikulů (Byskov et al., 1988).

Velikost oocytu je regulována aryl-hydrocarbonovými receptory (AHR), oocyty nedostatečné velikosti podléhají buněčné smrti během samičí gametogeneze. U *in vitro* kultivovaných vaječnicků myši s knockoutem AHR je dvakrát zvýšen počet primordiálních folikulů tím, že je snížena apoptóza oocytů (Van den Hurk et Zhao, 2005).

## Obrázek 2. Raný vývoj ženských pohlavních orgánů



*Embryo v Carnegie stádium 20, přibližně 49. den.*

1. Wolfovy vývody, 2. Primordiální zárodečné buňky (PGCs), 3. Peritoneální dutina, 4. Aorta, 5. Kanálek mezonefros, 6. Degenerace kanálků gonád, 7. Zesílený epitel colemu, 8. Střevo, 9. Mezenterium (okružít), 10. Müllerovy vývody, 11. Atrofovaný mezonefrický nefron.

*Převzato a upraveno z: Online course in embryology for medicine students. Universities of Fribourg Lausanne and Bern (Switzerland)*

<http://www.embryology.ch/anglais/ugenital/diffmorpho03.html>

Tanskripční faktory jako FOXO3 (forkhead box O3), FOXL2 (forkhead box L2), FIGLA (folliculogenesis specific basic helix-loop-helix), LHX8 (LIM homeobox 8), NOBOX (ogenesis homeobox), SOHLH1 (spermatogenesis and oogenesis specific basic helix-loop-helix 1) a SOHLH2 (spermatogenesis and oogenesis specific basic helix-loop-helix 2) mohou ovlivňovat formování ovárií a folikulogenezi. Poruchy těchto regulátorů mohou způsobit ovarialní insuficienci (nedostatečnost) a neplodnost (Jagarlamudi et Rajkovic, 2012).

Osídlení ovárií je u myši kompletní v E13.5 a oocyty vstupují do profáze prvního meiotického dělení, kdy ve stádiu diplotene nastává první meiotický blok. Během proliferace PGCs v E13 až E16 dochází k atrezii většiny oogonií. Atrézii podlehnou až 70 % oogonií a jsou degradovány pomocí apoptózy (Vanderhyden, 2002). Tumor necrosis factor beta1 a beta2 a FAS ligand (FASL/CD95L/CD178; ligand pro FAS receptory) indukují atrezii oogonií, přes modulaci aktivity mitochondriálních pro-apoptotických genů pro proteiny rodiny BCL-2 (B-cell lymphoma 2). U myší s homozygótní delecí BCL-X (B-cell lymphoma x) dochází ke značné atrezii primordiálních a primárních folikulů a jejich plodnost je výrazně snížena. Studie na myších se změněnou expresí anti-apoptotického BCL-X a pro-apoptotického BAX (BCL-2-associated X protein) ukázaly, že BCL-X je nutný pro přežívání PGCs a nedostatek proteinu BAX zase výrazně snižuje apoptózu. (Rucker et al., 2000).

Základním dogmatem reprodukční biologie bylo, že oocyty se na vaječnicích zakládají jen během embryonálního vývoje (Zuckerman et Baker, 1977). Jsou druhy, které najednou produkují stovky až tisíce zralých oocytů jako žáby nebo mořský ježek. Oogonie těchto živočichů slouží zároveň jako samoobnovující se zárodečné buňky, které se v organismu vydrží dělit po celý život. U lidí se oogonie dělí od druhého do sedmého měsíce těhotenství a během té doby vznikne zhruba 7 miliard zárodečných buněk. Po sedmém měsíci počet zárodečných buněk začne prudce klesat (Gilbert, 2000). U většiny savců si někteří vědci myslí, že se ve vaječnicích nezakládá dostatek oogonií na to, aby mohly oocyty vystačit na celé reprodukční období samice. Pokud by tomu tak bylo, u člověka by některé oocyty čekaly 40 až 50 let na ovulaci. Předpokládá se tedy, že by se mohly tvořit nové oocyty i během života samice (Fulka, 2007).

### 3.1.3. Tvorba nových zárodečných buněk v ováriích savců: female germline stem cells (GSCs) nebo oogonial stem cells (OSCs)

Bylo zjištěno, že folikuly ve vaječníku myši a skotu jsou tak rychle degradovány, že by došlo k jejich vyčerpání ještě před dosažením dospělosti. Například u lidí z původního množství oocytů kolem 1 000 000 přežije do puberty samice jen asi 300 000 oocytů (Johnson et al., 2005). Výskyt GSCs (germline stem cells) byl nejdříve zjištěn u dospělých much a nižších obratlovců (Tilly et Telfer, 2009).

Což vedlo k hypotéze, že podobně jako u nižších živočichů by i u savců mohlo docházet k tvorbě nových zárodečných buněk (*de novo* z kmenových buněk). Studie u outloně váhavého (Duke, 1967) a u loriho šedého (David et al., 1974) a myši (Johnson et al., 2004) dokázaly, že ovaria stále mají mitoticky aktivní zárodečné buňky, které mohou tvořit nové oocyty i v dospělosti samice (Johnson et al., 2005).

Teoreticky je možné, že by ovaria dospělé ženy mohla být schopna nově tvořit primordiální folikuly, primitivní granulózní buňky a zárodečné buňky. Vznik nových primordiálních folikulů by mohl kompenzovat atrézii, které podléhá velká část oocytů (Vanderhyden, 2002; Van den Hurk et Zhao, 2005).

Johnson et al. (2005) zjistili, že se u samic musí vyskytovat zárodečné buňky GSCs (germinal stem cells), které by mohly obnovovat počty oocytů, protože vzhledem ke značné atrézii by oocyty nestačily na celé reprodukční období. V experimentu ozáření zbavili vaječníky dospělých myši vlastních oocytů a transplantovali jim kostní dřeň, anebo jim injekčně aplikovali periferní krev dárkyň. Na vaječnicích příjemkyň byly nalezeny oocyty pocházející od dárkyň (kostní dřeň nebo periferní krve), kterým byl vložen gen pro zeleně florescentní protein GFP (green fluorescent protein) (Johnson et al., 2005).

Bukovsky et al. (2005) pěstovali v *in vitro* podmínkách ovariální buňky od žen ve věku 47, 40 a 39 let. Nejvíce granulózních buněk a buněk podobných oocytům vzniklo v kultuře buněk OSE (ovariálního povrchového epitelu) z vaječníků 39leté ženy pěstovaných spolu se stromálními komponenty, které byly pěstovány v médiu s fenolovou červení (má estrogení aktivitu). Ovšem tyto výsledky mohou být ovlivněny značnou řadou faktorů, jako jsou: stáří vaječníků, kultivační podmínky, složení média a vazba mezi sousedními buňkami (Bukovsky et al., 2005).

Zou et al. (2009) izolovali (magnetickou separací) z vaječníků dospělých myši GSCs. Jako protilátky pro separaci GSCs byly použity DDX4 (DEAD box polypeptide 4/vasa/MVH)

a IFITM3 (interferon-induced transmembrane protein 3/fragilis). Tyto buňky obsahovaly oba markery jak pluripotence, tak marker zárodečných buněk, měly normální karyotyp a maternální imprinting genů. Následně byly tyto izolované GSCs, produkují GFP (green fluorescent protein), transplantovány do vaječníků sterilních myší, které pak produkovaly zeleně svítící potomky (Zou et al., 2009).

Na druhé straně Zhang et al. (2012) vyvrátili přítomnost kmenových buněk, které by dávaly základ vzniku novým oocytům v dospělé ovarialní tkáni. V ozářených vaječnicích vznikaly pouze oocyty odvozené od transplantovaných PGCs pocházející z myších embryí (Zhang et al., 2012). Dalším vysvětlením, proč dochází při stárnutí ke ztrátě plodnosti, je možnost, že somatické buňky přestávají být dobrou podporou pro aktivitu GSCs (Tilly et Telfer, 2009).

### **3.2. Meiotické zrání**

Diferenciace oogonií na oocyty trvá u myši přibližně 2 dny v poslední třetině embryonálního vývoje. U králíka, křečka a prasete se ještě i po narození na vaječnicích vyskytují nejen oocyty, ale i oogonie. U skotu trvá proces transformace oogonií od druhého měsíce březosti a ukončena je až ve třetím měsíci života (Fulka, 2007).

Meióza začíná už před narozením samice, kdy dojde do diplotene profáze prvního meiotického dělení, tam je zastavena a její obnovení následuje až v období puberty (Baker, 1971). Oocyt projde stádií leptotene, zygotene a pachytene a první blok meiózy nastává ve fázi diplotene. Tento blok je prolomen až v období puberty, kdy dochází k dalšímu zrání a následné ovulaci oocytů. Další blok meiózy nastává v metafázi II a meióza je kompletně dokončena až po oplodnění oocytu spermií. Během meiózy oocytu vzniká jen jeden oocyt a dvě polární tělíška, zatímco při meióze spermie vznikají 4 spermie. (Hassold et Hunt, 2001). Oocyt během prvního meiotického bloku musí podstoupit fázi růstu, kdy získává meiotickou kompetenci. Teprve potom je po stimulu luteinizačním hormonem (LH) aktivováno jeho meiotické zrání. Spontánní maturaci oocytů inhibuje mnoho molekul včetně cyklického adenosinu monofosfátu (cAMP), KLU (Klumpfuss) a Müllerian-inhibiting substance (MIS) (Cho et al., 1974; Vanderhyden, 2002).

První meiotické dělení začíná dlouhou profází I, která je rozdělena na dalších 5 stádií (Gilbert, 2000; Hernández-Hernández et al., 2012). Oocyty zahajují meiózu již během embryonálního vývoje, ale po tom, co jsou homologní chromozómy spojeny a projdou rekombinací během procesu crossing over, nastává první meiotický blok. Crossing over je

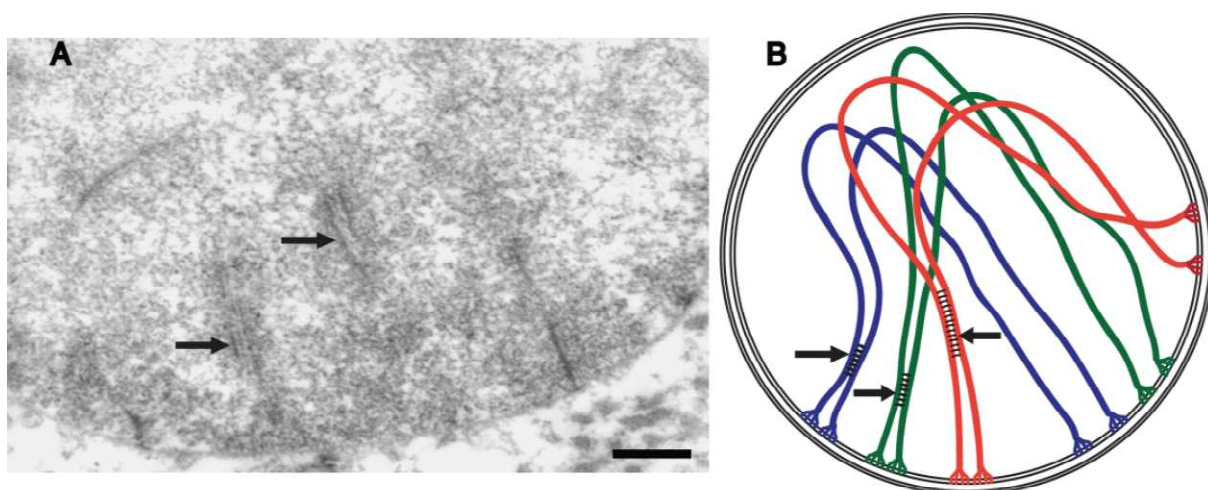


proces, při kterém dojde k překřížení homologních chromozómů, a tím výměně dědičné informace mezi chromozómy od otce a od matky (Hassold et Hunt, 2001).

V prvním stádiu leptotene dochází k rozvolnění chromatinu z chromatid, a proto se jednotlivé chromozómy nedají identifikovat. Replikace chromozómů už proběhla a ty tedy obsahují 2 paralelní chromatidy. Druhé stádium je zygotene, v něm se homologní chromozómy párují stranami k sobě. Toto párování se nazývá synapse a je typické pro meiózu, u mitózy se nevyskytuje (Gilbert, 2000).

Během zygotene, probíhá (Bouquet) proces, při němž telomery chromozómů asociují s jadernou membránou a centromery se nacházejí volně v cytoplazmě. Když se centromery homologních chromozómů dostanou k sobě blízko, dojde k jejich spojení a vytvoření synaptonemálního komplexu (Cook, 1997).

### Obrázek 3. Připojení telomer k jaderné membráně během fáze zygotene



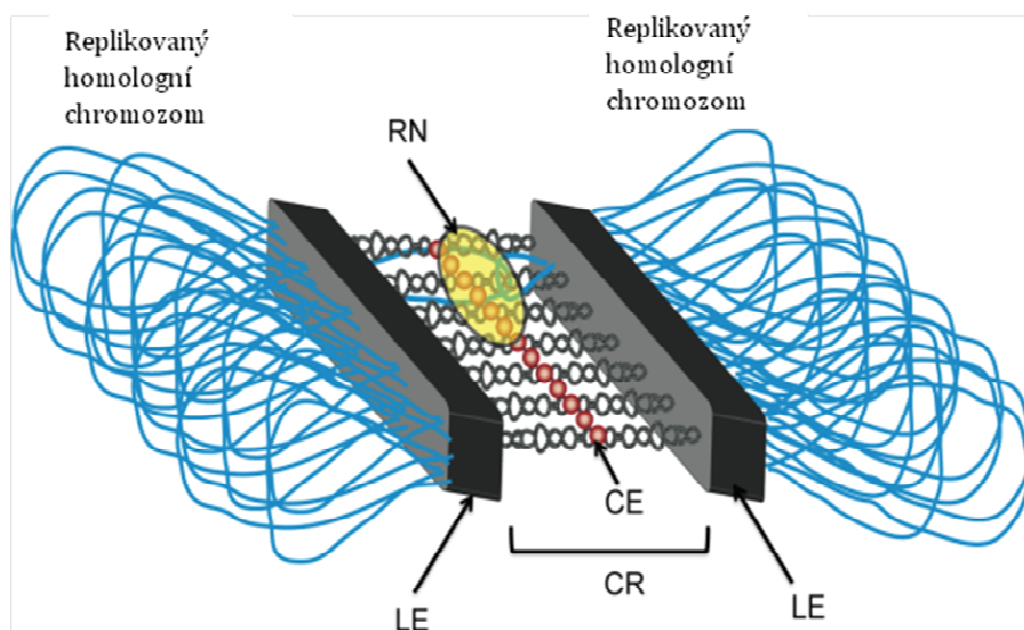
Obrázek A je z elektronové mikroskopie, kde šipka ukazuje párující se homologní chromozómy, během vytváření bouquetu chromozómů a formování synaptonemálního komplexu v zygotene. B je schématický náčrt vytváření bouquetu chromosomů ve fázi zygotene, kdy se homologní chromozómy řadí k sobě a vytváří se mezi nimi synaptonemální komplex (označen šipkou). Měřítko je 500 nm (Hernández-Hernández et al., 2012).

Homologní chromozómy jsou spolu nejspíše v kontaktu už během fáze pre-leptotene neboli S-fáze (Vázquez-Nin et al., 2003). Synaptonemální komplex je tvořen dvěma laterálními elementy (LE) a jedním centrálním regionem (CR), v jehož středu se nachází centrální element (CE). Každý replikovaný homologní chromozóm je ukotven v jednom

laterálním elementu. Výměna genetické informace mezi homogenními chromozómy probíhá v rekombinačním uzlu (RN) (Hernández-Hernández et al., 2012). Laterální elementy jsou tvořeny hlavně proteiny SYCP2 (synaptonemal complex protein 2) a SYCP3 (synaptonemal complex protein 3) (Winkel et al., 2009). Centrální region synaptonemálního komplexu je stejně jako kohesin komplex, tvořen proteiny SYCP1 (synaptonemal complex protein 1), SYCE1 (synaptonemal complex central element protein 1), SYCE2 (synaptonemal complex central element protein 2), SYCE3 (synaptonemal complex central element protein 3) a TEX12 (testis expressed 12), (Schramm et al., 2011).

N-terminální konec jednoho SYCP1 s dalším N-terminálním koncem druhého SYCP1 tvoří centrální element. Centrální element obsahuje stejné proteiny jako centrální region. Tyto proteiny jsou nutné pro správné spojení chromozómů a následně pro provedení crossing overu (Schramm et al., 2011).

#### Obrázek 4. Synaptonemální komplex



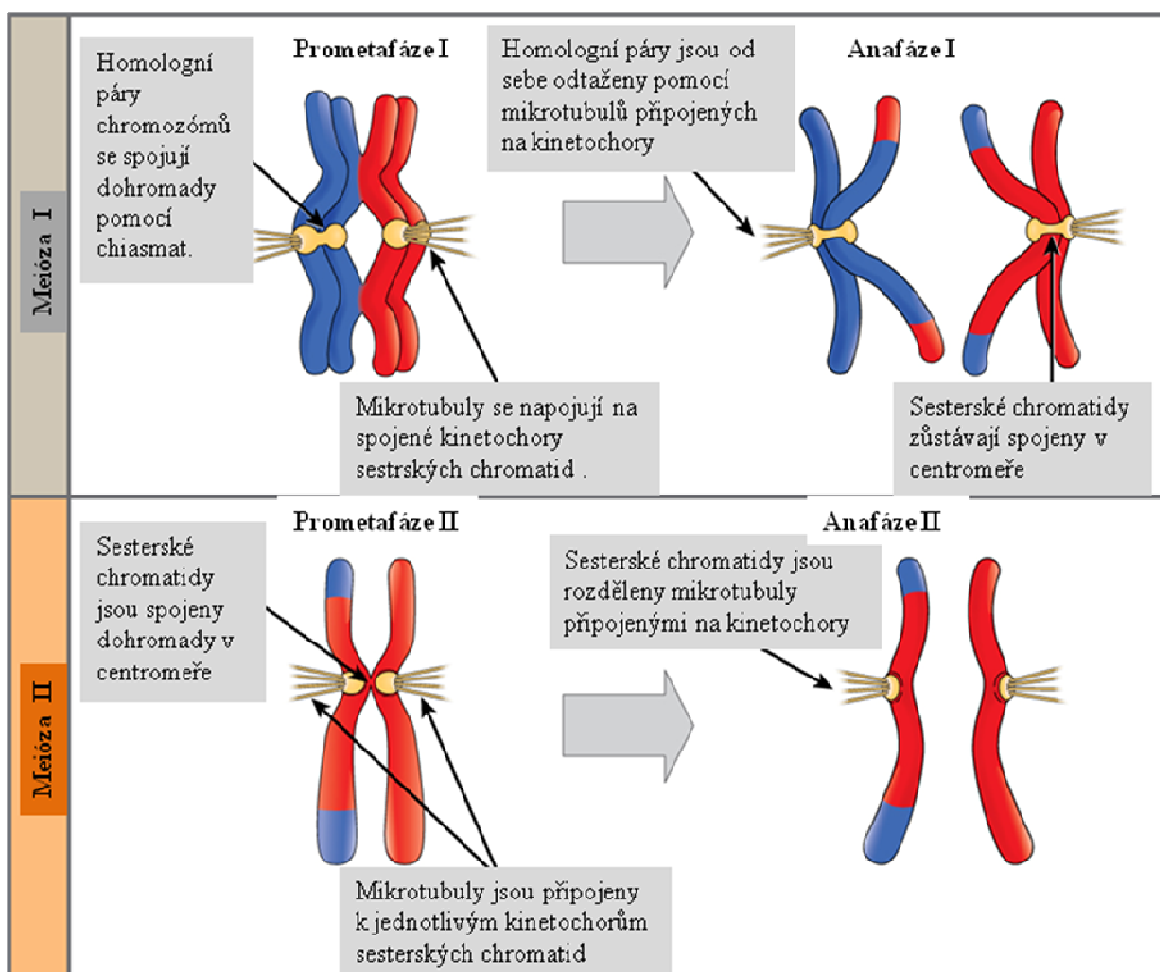
*LE - laterální element, CR - centrální region, CE - centrální element, RN - replikační uzel*

*(Hernández-Hernández et al., 2012)*

Spojením 4 chromatid k sobě jsou vytvořeny takzvané tetrády neboli bivalenty. V dalším stádiu profáze pachytene se chromozómy kondenzují, takže dojde k jejich ztluštění a zkrácení. Tetrády chromatid jsou spojeny v oblasti centromery. Od toho je také odvozen

název pachytene, který v řečtině znamená „tlustý šroub“. Nyní jsou chromozómy rozlišitelné světelným mikroskopem a také může proběhnout proces crossing over. Crossing over představuje výměnu homologních genů mezi nesesterskými chromatidami. Crossing over může pokračovat i do dalšího stádia diplotene. V tomto stádiu dochází k rozpadu synaptonemálního komplexu a dva homologní chromozómy se začínají separovat. Obvykle však chromozómy ještě zůstávají spojeny chiasmata v oblastech, kde došlo ke crossing over. V tomto stádiu je vysoká frekvence transkripce (Gilbert, 2000). Chiasmata drží pohromadě homologní chromozómy během metafáze prvního meiotického dělení (Székvölgyi & Nicolas, 2010).

**Obrázek 5. Vytváření chiasmát a proces crossing over**



(Hotchkiss, 2014)

[http://cnx.org/contents/741c9253-25a7-4537-900c-652a16f1777d@1/The\\_Process\\_of\\_Meiosis\\_-\\_SP14](http://cnx.org/contents/741c9253-25a7-4537-900c-652a16f1777d@1/The_Process_of_Meiosis_-_SP14)

Sesterské chromatidy, které jsou vytvořeny během S-fáze jsou spojeny proteinovým komplexem nazývaným kohesin. Ten tvoří kroužek kolem duplikátů DNA. Během meiózy existují dva oddělené kruhy kohesinu, protože je potřeba, aby docházelo ke ztrátě spojení chromatid postupně. Ztráta kohesinu na koncích (ramenech) chromozómů ruší spojení mezi homologními páry a umožňuje jim rozchod k opačným pólům. Soudržnost mezi sesterskými chromatidami v oblasti centromer přetrvává až do meiózy II (Marston et Amon, 2004). Kohesiny jsou chromozomální proteiny, které jsou tvořeny třemi podjednotkami, REC8 (meiotic recombination protein 8), STAG3 (stromal antigen 3) a SMC1beta (structural maintenance of chromosomes 1 beta), jejichž exprese byla nalezena v lidských oocytech (García-Cruz et al., 2010). SMC1beta, SMC3 (structural maintenance of chromosomes 3) a STAG3 jsou lokalizovány podél axiálních vláken chromozómů v přechodu mezi leptotene-zygotene fázemi při formování laterálního elementu synaptonemálního komplexu (Brar et al., 2009).

Kohesin je důležitý pro dokončení rekombinace, párování, tvorbu meiotické osy a vytvoření synaptonemálního komplexu (Brar et al., 2009). Kohesin je vytvořen v S-fázi a k jeho rozpadu dochází v anafázi II meiotického dělení. Rozpadu kohesinu během anafáze I je zabráněno proteinem SGO (shugoshin). A během anafáze II je rozdělen pomocí enzymu separázy (Marston et Amon, 2004). Kohesin zajišťuje správné upevnění chromozómů na dělicí vřeténko a zabraňuje předčasnému rozpadu sesterských chromatid od sebe (Brar et al., 2009).

V mitotickém kohesinu je komplex SCC1/RAD21 (sister chromatid cohesion protein 1/ double-strand-break repair protein) během meiózy nahrazen meiotickým REC8. Experimenty ukázaly, že REC8 je odstraněn z ramen chromozómů v meióze I, ale přetrvává v oblasti centromer až do meiózy II u kvasnic, myší a potkanů. Vliv na rozdílnou ztrátu kohesinu v oblasti ramen a v oblasti centromery má odlišná aktivita restričních separáz (Marston et Amon, 2004). Na rozdíl od meiózy probíhající u samců je kohesin u oocytů samice odstraněn ve fázi diplotene (Prieto et al., 2004).

Pro to, aby kohesin zůstal v oblasti centromer, až do anafáze, jsou nutné faktory, které ho chrání během meiózy I. Odstranění Kohesinu spojujícího ramena chromozómů dovoluje dokončení procesu crossing over. Sekurin chrání protein REC8 před štěpením Separinem. Sekurin je před začátkem anafáze označen ubikvitinilací pomocí APC/C (anaphase-promoting

complex/cyclosome) komplexu a následně degradován. U kvasinek také SPO13 (sporulation-specific protein 13) podporuje udržení soudržnosti centromer. (Marston et Amon, 2004). Další možností je, že odstranění kohesinu na ramenech je na Separinu nezávislé, zatímco jeho odstranění v oblasti centromery je na Separinu závislé. (Lee et al., 2003).

Bylo zjištěno, že spontánní meióza oocytů je efektivně blokována cyklickým adenosinem monofosfátem (cAMP) u hvězdic (Taieb et al., 1997), žab rodu *Xenopus* (Ferrell, 1999), prasat (Racowsky, 1985), skotu (Aktas et al., 1995), potkanů (Dekel et al., 1981) a myší (Vivarelli et al., 1983). Zvýšená hladina cAMP, produkovaná adenylylcyklázou je zásadní pro udržení oocytů v meiotickém bloku jak u hlodavců, tak lidí. Bylo prokázáno, že oocyty samy prostřednictvím komunikace s kumulárními buňkami přispívají k meiotickému bloku. Oocyt podporuje kumulární buňky v expresi receptorů NPR2 (natriuretic peptide receptor 2). Tento receptor je aktivován ligandem CNP (C-type natriuretic peptide) a dochází k tvorbě cGMP a tím je zabráněno aktivaci cAMP-fosfodiesterázy 3A (PDE3A). PDE3A je enzym zodpovědný za degradaci cAMP (Norris et al., 2009). Novější studie ukazují, že PDE3A je hlavní forma fosfodiesterázy exprimovaná v savčích oocytech, která zvyšuje svoji aktivitu před zahájením meiózy a to ve spontánním i gonadotropiny stimulovaném zrání (Abrieu et al., 2001).

### 3.2.1. Znovuzahajení meiózy

Získání meiotické kompetence se u oocytů shoduje s vytvořením antra folikulu, kdy má oocyt 80 % velikosti zralého oocytu (Sánchez at Smitz, 2012). Oocyt v diplotene obsahuje více organel a cytoplazmy a je větší než oogonie. Velikost oocytu je regulována arylhydrocarbonovými receptory (AHR). Oocyty nedostatečné velikosti podléhají buněčné smrti během samičí gametogeneze. U kultivovaných vaječníků myší s knockoutem AHR je dvakrát zvýšen počet primordiálních folikulů tím, že je snížena apoptóza oocytů s nízkou velikostí (Van den Hurk et Zhao, 2005).

Nedávno bylo zjištěno, že uvolnění cyklického guanosin monofosfátu (cGMP) z granulózniých buněk přes buněčné spoje gap junction, zabraňuje aktivaci cAMP-fosfodiesterázy 3A (PDE3A) v oocytu a tím udržuje oocyt v meiotickém bloku. Uvolnění PDE3A by způsobilo degradaci cAMP a znovuoobnovení meiózy (Norris et al., 2009). Udržování hladiny cAMP je nejspíše zprostředkováno kumulárními buňkami přes gap

junction. Nebo může jít o endogenní cAMP oocyty, který je indukován aktivací G proteinových receptorů 3 a 12 (Vaccari et al., 2008).

Vývoj antrálního folikulu vyžaduje stimulaci FSH (folikulostimulační hormon) a LH, které způsobí expanzi antra a změny na kumulárních a folikulárních buňkách (Harman, 1975). Zrání oocytů je zahájeno preovulační vlnou luteinizačního hormonu, který uvolní epidermal growth factor (EGF) - like protein. Pod vlivem EGF-like proteinu dochází k expanzi kumulu, přes aktivaci protein-kinázy A (PKA) a cAMP, který je produkován vnějšími vrstvami granulózy. Za této stimulace se zvyšují hladiny transkriptů zapojených do expanze kumulu jako hyaluronan synthase 2 (HAS2), pentraxin 3 (PTX3) a tumor necrosis factor alpha-induced protein 6 (TNFAIP6). Myši s deficiencí TNFAIP6 jsou neplodné, protože nedojde k expanzi kumulárních buněk (Varani et al., 2002; Fülöp et al., 2003). Po vlně LH dojde k degradaci cAMP způsobené PDE3A. Dalším možným signálem je snížená difuze cGMP a nebo cAMP z kumulárních buněk, což přispívá k obnovení meiózy. Samy oocyty se aktivně podílí na aktivaci procesu zrání (Sela-Abramovich et al., 2005; Norris et al., 2008). Bylo zjištěno, že přidání luteinizačního hormonu do kultury graafových folikulů indukuje meiotické zrání. A stejně tak vyvolává zrání i intrafolikulární injekce dibutyryl cAMP, což naznačuje, že efekt LH by mohl být přímo zprostředkovaný přes cAMP (Cho et al., 1974). To by vysvětlovalo důvod, proč oocyty zrají *in vitro* i bez přidání hormonů, kdy náhlá změna prostředí způsobí uvolnění cAMP (Cho et al., 1974; Sorensen et Wasserman, 1976).

Pro zrání je potřebný faktor MPF (maturation promotin factor), ten se skládá z katalytické podjednotky p34CDC2 (cell division cycle protein 2 homolog nebo CDK1) a regulační podjednotky cyklin B1 (CCNB1) a je nezbytný pro maturaci oocyty (Abrieu et al., 2001). Aktivita MPF se zvyšuje v průběhu zrání oocyty a klesá v anafázi prvního meiotického dělení. Zvýšená aktivita MPF zvyšuje syntézu CCNB1 (G2/Mitotic-Specific Cyclin B1) i aktivaci p34CDC2. U myši s deficiencí CDC25B (cell division cycle 25B) fosfatázy, zůstávají oocyty blokovány v profázi MI s nízkou aktivitou MPF, což způsobuje neplodnost těchto myši. Nedochází u nich k znovuoobnovení meiózy. Fosfatáza CDC25B je tedy významná v regulaci MPF (Lincoln et al., 2002). Například Katherin (CDH1) aktivuje anaphase promoting complex/cyklosome (APC/C). APC/C potlačuje degradaci hladiny CCNB1 pomocí ubikvitinilace a to způsobuje ukončení meiózy I vydělením prvního pólového tělíska (PB 1). Protein Katherin je při aktivaci meiózy snížen o 70 %. Ovšem transkripty pro dráhu ERK/MAPK (extracellular-signal-regulated kinases/mitogen-activated protein) a PI3K/AKT,

potřebné pro udržení druhého meiotického bloku, zůstávají translatovány (Chen et al., 2011; Holt et al., 2011).

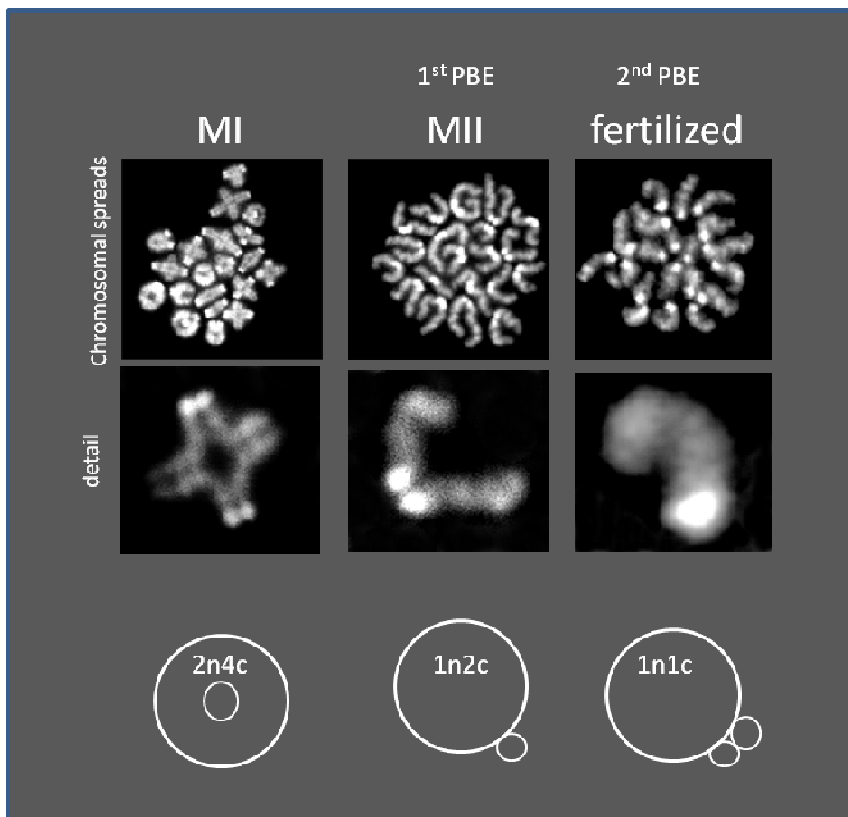
U potkanů jsou přítomny KIT receptory na plně dorostlých oocytech v preovulačním antrálním folikulu a zůstávají i po podání hCG (humane chorionic gonadotropine). KIT receptory jsou na povrchu oocytů přítomny ve všech stádiích vývoje folikulu. Jeho exprese je největší u oocytů v prvním meiotickém bloku a klesne až po dokončení maturace. Vzhledem k tomu že KIT receptor je přítomen během celého zrání oocytu, jeho exprese nejspíše není snížena vlnou LH. Hladina mRNA pro SCF (stem cell factor) v granulozních buňkách stoupá v odpovědi na hCG stimulaci jak u myší, tak potkanů. Při expanzi kumulu oocytu se rozvolní kumulární buňky a vytvoří se mezi nimi kyselina hyaluronová (Vanderhyden, 2002).

U kvasinek bylo zjištěno, že inaktivace faktoru SPO11 (Sporulation-specific protein 11) má za následek téměř náhodnou segregaci chromozómů v meióze I a že je nepostradatelný pro segregaci chromozómů u myší (Marston et Amon, 2004). U myší s knockoutem pro protein SPO11 (Sporulation-specific protein 11) bylo zjištěno, že je potřebný jak pro proliferaci oogonií, tak meiózu oocytů. Stejně tak MSH5 (muts homologue 5) a DMC1 (disrupted meiotic cDNA 1) jsou esenciální pro meiózu zárodečných buněk (Van den Hurk et Zhao, 2005).

Pro další vývoj samčích a samičích zárodečných buněk je důležitá regulace počtu chromozómů, tedy snížení z diploidního počtu na haploidní počet. Haploidní sada chromozómů obsahuje pouze jednu kopii chromozómů, na rozdíl od diploidní, která obsahuje dvě sady stejných chromozómů. Po ukončení posledního mitotického dělení nastává DNA syntéza, kdy dojde ke zdvojnásobení DNA v jádře. V tomto stádiu se chromozómy skládají ze dvou sesterských chromatid spojených kinetochory v oblasti centromer. Buňka je tedy v tuto chvíli tetraploidní a obsahuje 4 sady DNA, kdy se každý chromozóm skládá ze dvou spojených chromatid (Gilbert, 2000).

Meióza je tvořena dvěma buněčnými děleními. První je heterotypické, kdy se rozdělí homologní chromozómy od sebe membránou, vydělení 1. pólového tělíska (PB), a oocyt pak obsahuje poloviční počet chromozómů, které jsou tvořeny 2 chromatidami (Hernández-Hernández et al., 2012). Při druhém meiotickém dělení se pak oddělí 2 sesterské chromatidy a vznikne tak haploidní buňka jen s jednou kopií chromozómů. (Gilbert, 2000; Hassold et Hunt, 2001).

**Obrázek 6. Redukce genetické informace během meiotického dělení myšního oocyty**



*Oocyty v MI obsahuje 2 sady chromozómů a 4 sady chromatid ( $2n4c$ ). Ve fázi MII už došlo k rozdělení homologních chromozómů od sebe a vydělení prvního pólového tělíska. Po oplození jsou od sebe rozděleny i jednotlivé chromatidy a v mateřském prvojadru tak zůstává haploidní genetická informace ( $1n1c$ ) (A. Šušor; nepublikováno).*

Ve stádiu diakineze se centromery jednotlivých chromozómů vzdalují od sebe, ale zůstávají spojeny pouze na špičkách chromatid. V tomto posledním stádiu profáze dochází k rozpadu jaderné membrány a migraci chromozómů do ekvatoriální roviny, kde se vytváří takzvaná metafázní destička. Během anafáze I, jsou homologní chromozómy separovány od sebe navzájem. V telofázi I dochází k asymetrickemu dělení a k tvorbě 2 dceřiných buněk a každá tato buňka obsahuje jeden z homologních chromozómů. Vydělí se první pólové tělísko, které obsahuje polovinu dědičné informace, ale jen minimum cytoplasmy (Gilbert, 2000).

Po ukončení meiózy I oocyt zůstává v metafázi MII. K asymetrické diakinezi vydělení druhého PB a ukončení meiózy II dojde až po oplození oocyty spermíí. Během druhého



meiotického dělení dojde ke zrušení spojení mezi sesterskými chromatidami a ty se připojené k dělicímu vřeténku rozejdou každá k jinému pólu (Gilbert, 2000).

### 3.2.2. Aneuploidie

Pokud dojde při dělení chromozómů během meiotického zrání oocyty k chybnému napojení nebo vytvoření dělicího vřeténka může dojít k nerovnoměrnému rozdělení chromozómů. Při aneuploidii došlo k nerovnoměrnému rozdělení dědičné informace mezi oocytem a prvním nebo druhým polárním tělískem.

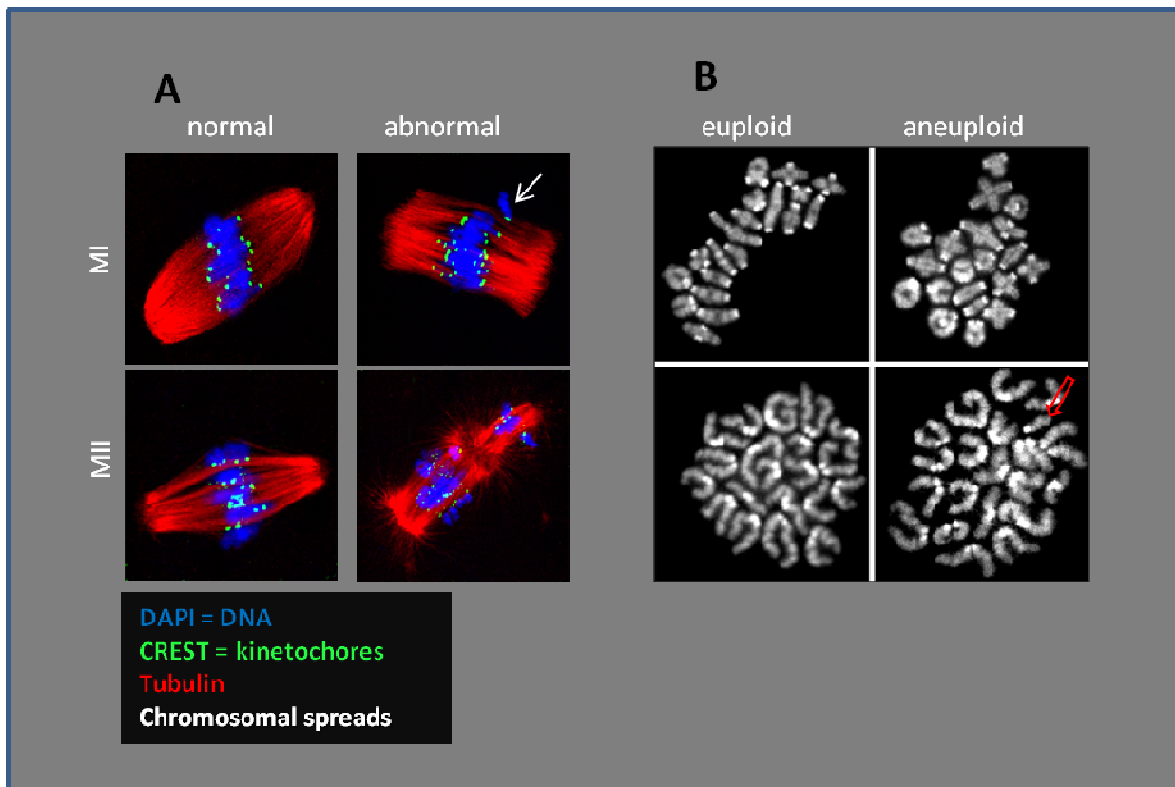
Nejčastěji z aneuploidií vznikají trizomie a monozomie. Většina aneuploidií je letální už v raných embryonálních stádiích, a pokud nejsou letální, narozený jedinec bývá postižen (Hassold et Hunt, 2001). K retardaci jedince dochází u trizomií 21, 18 a 13 chromozómu (Down, Edward a Patau syndromy), které většinou nebývají, ale mohou být pro embryo letální (Duncan, 2012; Jones et Lane, 2013).

Savčí oocyty s přibývajícím věkem matky jsou stále náchylnější k poruchám rozdělení chromozómů. Počet aneuploidií významně stoupá s věkem matky. (Jones et Lane, 2013).

Výskyt aneuploidie je u člověka 10 - 30 %, na rozdíl od člověka se u myši výskyt aneuploidie pohybuje mezi 1 - 5 %. U ostatních savců je procento výskytu aneuploidií vyšší než u myši, ale výrazně nižší než u člověka (Hassold et Hunt, 2001). U myši je znám markantní nárůst aneuploidie s věkem. Různé zdroje se v údajích liší: nárůst ze 4 % na 25 % v 8 týdnech oproti 70 týdnům věku (Pan et al., 2008), nárůst z 12 % na 30 % ve 3 měsících a v 12 měsících (Selesniemi et al., 2011) a ze 3 % na 60 % v 1 měsíci věku a v 15 měsících věku (Merriman et al., 2012).

Je možné, že vznik některých aneuploidií je způsoben chybou v procesu crossing over, nebo špatným napojením dělicího vřeténka (Hassold et Hunt, 2001).

**Obrázek 7. Abnormální dělicí vřeténko jako možný důvod aneuploidie u oocyty v meioze I**



*Poruchy v uspořádání chromozómů a výstavbě dělicího vřeténka jako možná příčina aneuploidie v meióze I. A) vlevo jsou vidět chromozómy, které v metafázi I nejsou srovnané v ekvatoriální rovině (bílá šipka). Dole MII normalní bipolární a abnormální multipolární vřeténko u MII oocyty. Nalevo kontrola, vpravo knockdown RNA vazebného proteinu.*

*B. Nahoře je vidět normální počet chromozómů v MI a dole po vydělení PB1. Na obrázcích, kde došlo k aneuploidii, je červenou šipkou označena přebývající chromatida. Vlevo control a vpravo knockdown RNA vazebného proteinu (A. Šušor; nepublikováno).*

### 3.3. Post-transkripční mechanismy regulace translace

Meiotické procesy v oocytu jsou často upravovány post-transkripční úpravou mRNA a post-translační úpravou proteinů. Post-transkripční a post-translační regulace poskytují buňce mechanismy k rychlé odpovědi na vnitřní a vnější změny prostředí. Oocyt využívá post-translační mechanismy jako fosforylaci, defosforylaci, ubikvitinilaci, sumoylaci (SUMO small ubiquitin-like modifier) k regulaci maturačních procesů. Některé klíčové proteiny jako cell cycle regulator, CDK1/cyklin B, jsou post-translačně modifikovány pro přesnou kontrolu meiotických procesů. Sekundární poslové (mesenger) jako cAMP, kinázy (PKA, AKT, MAPK, Aurora A, calmodulin-dependent protein kinase II) fosfatázy (CDC25, CDC14), receptor spřažený s G proteiny a fosfodiesterázy jsou závisle nebo nezávisle zapojeny v tomto procesu (Clancy, 2008; Kang et Han, 2011).

Rostoucí oocyty jsou silně transkripčně aktivní. Během fáze růstu si oocyt vytváří dostatek mRNA na období meiotického zrání a na období časně embryogeneze. Těsně předtím, než rostoucí oocyt doroste do plné velikosti, se aktivita jeho transkripce prudce sníží. Často až na nedetekovatelnou hladinu a tak to zůstane po celou dobu meiotického zrání (Latham et Schultz, 2001).

Maternální mRNA (vytvořená rostoucím oocytem) v embryu musí být degradována, aby se mohla tvořit nová embryonální mRNA. Pro stabilizaci transkribované mRNA jsou nutné posttranskripční úpravy jako je sestřih (splicing), capping a polyadenylace. Capping je proces, při kterém je připojena čepička tvořená 7 methylguanosem (m<sup>7</sup>GpppN; N je nukleotid), na 5' konec. Při sestřihu jsou z oocytu vystřiženy introny, protože kódující sekvence jsou umístěny jen v exonech. Polyadenylací je připojení několika adenylových skupin (AAUAAA) na 3' konec mRNA transkriptu (Clarke, 2012).

Během meiotického zrání jsou důležité post-transkripční úpravy, které regulují zránění přes již existující transkripty u plně dorostlého oocytu, protože ten má minimální transkripční aktivitu. Tyto mechanismy jsou tedy stěžejní při tvorbě samičích gamet u mnoha druhů (Kang et Han, 2011).

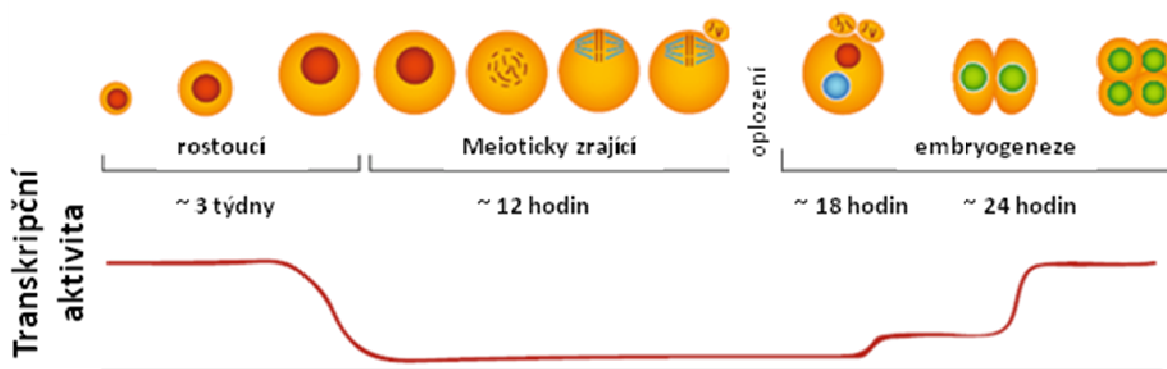
Po oplození oocytu spermií je transkripce stále nízká. K aktivaci transkripce dochází v závislosti na druhové příslušnosti u myši ve 2buněčném stádiu, u člověka ve 4buněčném stádiu, u skotu v 8 až 16buněčném stádiu a u králíka v 16buněčném stádiu. U myši dochází k transkripci malé části genů už na začátku 2buněčného stádia, ale velká část genů se

transkribuje až v pozdním 2buněčném stádiu včetně housekeeping genů, které jsou nezbytné pro udržení základní buněčné funkce a jsou obsaženy ve všech buňkách (Latham et Schultz, 2001).

Do této doby je oocyt závislý na maternální mRNA vytvořené v rostoucím oocytu. Plně dorostlý oocyt obsahuje skoro dvakrát více mRNA, než embryo ve stádiu blastocysty. Část této mRNA je translatována na podporu rostoucího oocytu, ale zbytek zůstává uchovávan v RNPs a P-bodies a je využíván během meiotického zrání a časně embryogeneze (Clarke, 2012).

Asociace mRNA s polysomy koreluje s jejich aktivní translací (Chen et al., 2011). Vitale al. (2008) zjistili, že oocyty během jejich zrání obsahují tzv. cytoplazmic lattices (CLPs), jejichž matrix obsahuje proteinové komponenty a RNA. CLPs pravděpodobně obsahují ribozomy, které se aktivně účastní translace. Jejich výskyt je nejspíše velmi důležitý pro překonání dvoubuněčného stádia u myši (Vitale et al., 2008).

**Obrázek 8. Aktivita transkripce v oocytu a v rané embryogenezi**



Na obrázku je vidět, že embryogeneze probíhá v rostoucím oocytu a je znovuobnovena v rané embryogenezi. V průběhu meiotického zrání je transkripce velmi nízká (Clarke, 2012).

### 3.3.1. Připojení Poly(A) signálu na 3' konce

Poly(A) signál je vytvořen na 3' konci mRNA ještě před tím, než opustí jádro. Díky poly(A) signálu a m<sup>7</sup>GpppN čepičce je mRNA stabilizovaná a schopna translace (Millevoi et Vagner, 2010). Pro připojení poly(A) konce *in vitro* podmínkách stačí pouze cleavage and polyadenylation specificity factor (CPSF), poly(A) polymeráza (PAP) a poly(A) binding protein (PABP). Poly(A) binding protein stimuluje PAP, která katalyzuje připojování adenosinových residuí a kontroluje délku přes interakci mezi CPSF a PAP (Kühn et al., 2009; Millevoi et Vagner, 2010). PABPN1 (poly(A) binding protein 2, nebo také poly(A) binding nuclear protein 1) se váže na rostoucí poly(A) konec a spolu s CPSF, který váže polyadenylační signál AAUAAA, stimulují poly(A) polymerázu, aby syntetizovala poly(A) konec najednou a v délce přibližně 250 nukleotidů. CPSF je potřebný pro celé prodloužení poly(A) konce a jeho stimulace je přerušena při délce 250 nukleotidů. PABNP1 hlídá délku poly(A) konce a je zodpovědný za přerušování interakce CPSF a PAP (Kühn et al., 2009).

mRNA transkript po vystřížení intronů a obsahující poly(A) konec na 3' UTR oblasti a 7 methylguaninovou čepičku na 5' UTR oblasti může být transportován z jádra do cytoplazmy (Clarke, 2012).

Cirkularizace molekuly mRNA vzniká spojením PABP (poly(A) binding protein), který se váže na poly(A) konec, s N-terminálním regionem eIF4G. Protože eIF4G je součástí cap-binding komplexu eIF4F připojeném na 5' konci vytvoří se pseudo cirkulární molekula (closed loop). Délka poly(A) konce koreluje s translační aktivitou dané mRNA. Ale jsou i mRNA, jejichž translace je spojena s odstraněním poly(A) konce (deadenylace) nebo jsou nezávislé na polyadenylaci (Kleen et al., 1984).

DAZL (deleted in azoospermia-like) a CPEB (cytoplasmatic polyadenylation element-binding) jsou významnými modulátory translace během zrání oocyty. CPEB podporuje translaci mRNA, která koduje protein DAZL (deleted in azoospermia-like). Protein DAZL je potom schopen pomocí pozitivní zpětné vazby následně podporovat translaci vlastní mRNA (Collier et al., 2005).

Pokud se netvoří protein DAZL, nedokáže oocyt vytvořit dělicí vřetenko, protože dochází k porušení mikrotubulů (Sánchez et Smítz, 2012). Chen et al. (2011) dokázali zásadní roli proteinu DAZL v pozdním stádiu meiózy oocyty. V oocytech byla úloha proteinu DAZL snížena injekcí specifické MOS (antisense morpholino oligonukleotid), většina oocytů nebyla

schopna obnovit meiotické zrání a ty oocyty, co vytvořily první polární tělísko, měly poškozené dělicí vřeténko. Také bylo zjištěno, že protein DAZL reguluje translaci transkriptů nezbytných pro vytvoření dělicího vřeténka v přechodu z metafáze I do metafáze II (Chen et al., 2011; Sánchez et Smitz, 2012).

### 3.3.2. Cap dependentní translace

Cap-dependentní translace je aktivována při navázání komplexu eIF4F na 5'čepičkovou strukturu mRNA. eIF4F komplex je tvořen proteiny eIF4G, eIF4A, a eIF4E, který se přímo váže na čepičkovou strukturu mRNA na 5'konci a specificky rozpoznává čepičkovou strukturu (Matsuo et al., 1997). eIF4A má helikázovou aktivitu a váže se na jednořetězcovou mRNA a eIF4G propojuje proteiny eIF4E a eIF4A (Pyronnet et al., 2001). eIF4E se v králíčích retikulocytech vyskytuje velmi hojně, ale v některých buňkách je jeho výskyt omezený (Rau et al., 1996; Poulin et al., 1998).

U eukaryot je navázání malé ribozomální podjednotky (40S) zprostředkováno přes Met-tRNA<sub>i</sub>, ty spolu tvoří preiniciační komplex (PIC) (Sonenberg et Hinnebusch, 2009). Met-tRNA<sub>i</sub> je methylovaná tRNA tvořící komplex s eIF2, který se váže na GTP jako první krok iniciace translace. Preiniciační komplex se skládá z malé ribozomální podjednotky (40S), eIF3 a eIF2, který váže iniciační tRNA s methioninem a spolu dohromady tvoří 43S ribozomální podjednotku PIC (Pestova et Hellen, 2000). PIC se váže na mRNA blízko 5'konce, nejdříve projde 5'UTR oblast a naváže se na AUG kodon, nebo výjimečně na blízce příbuzný kodon. PIC navázaný na mRNA má velikost 48S a když najde kodon AUG, tak se k němu připojí velká ribozomální podjednotka (60S). mRNA je aktivována pro navázání PIC eukariotickými iniciačními faktory (eIF), které rozeznávají 7-methyl-guanosinovou čepičku na 5'konci a poly(A) na 3'konci. (Sonenberg et Hinnebusch, 2009).

Komplex eIF4F iniciuje translaci mRNA, která je senzitivní na eIF4E a je charakteristická dlouhým 5'UTR regionem a nebo 5'terminal oligopyrimidine (TOP) motivem (Thoreen et al., 2012).

Regulace translace přes IRES (internal ribosome entry site) není závislá na čepičkové struktuře. Tento způsob aktivace translace je běžně pozorována u řady virů, které nemají

čepičkovou strukturu a poprvé byl pozorován u picornavirů (Pelletier et Sonenberg, 1988). Regulace translace přes IRES probíhá i u některých eukaryotických mRNA. Při této regulaci translace ribozom nasedá přímo na IRES (internal ribosome entry site), který tvoří sekundární strukturu na 5' UTR oblasti mRNA poblíž kodonu AUG (Pyronnet et al., 2001; Ellederová et al., 2006).

### 3.3.3. Fosforylace proteinu eIF4E

Mitogeny a stresem indukovaná fosforylace eIF4E na serinu 209 zvyšuje jeho afinitu k čepičkové struktuře mRNA a k asociaci s proteinem eIF4G (Morley, 1997; Waskiewicz et al., 1999). U somatických buněk je eIF4E fosforylován na S209 poblíž místa, kterým se váže na čepičkovou strukturu mRNA, což má vliv na jeho vazbu. Dalšími fosforylačními místy jsou serin 53 a threoni 210 (Ellederová et al., 2006).

Mnoho studií ukazuje, že zvýšení hladiny fosforylovaného eIF4E zvyšuje i hladiny translace po mitogenní stimulaci u savčích buněk. (Haghighat at Sonenberg, 1997).

Fosforylace eIF4E je u somatických buněk regulována mnoha MAP kinázovými signálními drahami. Nejčastěji přes aktivaci MAP kinase-interacting kinase (MNK), MNK1 a MNK2. Fosforylace eIF4E přes MNKs *in vivo* vyžaduje spolupráci obou molekul s proteinem eIF4G (Pyronnet, 2000; Waskiewicz et al., 1999).

*In vitro* MNK1 fosforyluje eIF4E na fyziologickém místě na S209. MNK1 patří do skupiny myších serin/threonin kináz, které se pevně váží na regulátor růstového faktoru MAP kinázu (Waskiewicz et al., 1997).

Z pokusu Pyronnet et al., (2001) vyplývá, že MNK1(MAP kinase-interacting kinase 1) je během mitózy oddělena od proteinu eIF4E a ten z toho důvodu není fosforylován.

Snížením fosforylace 4E-BP1 přes inhibitor mTORu (PP242) snižuje fosforylaci také eIF4E. Fosforylace S209 je usnadněná, když je eIF4E navázán na eIF4G. N terminální konec MNK interaguje s C-terminálním koncem eIF4G, fosforylace je zprostředkována v případě, že se spolu váže protein eIF4G a MNK a oba dva jsou navázány i na eIF4E. To naznačuje, že kontrola fosforylace může být závislá na interakcích mezi eIF4E a eIF4G-MNK subkomplexu a na interakcích ovlivněných 4E-BP proteiny (Müller et al., 2013).

Jsou 3 varianty eIF4G a to eIF4GI, eIF4GII a eIF4GIII. Müller et al. (2013) testovali jaký význam má jejich odstranění na fosforylaci eIF4E. Odstranění eIF4GI způsobilo prudký pokles fosforylace, zatímco odstranění eIF4GII nemělo na fosforylaci eIF4E žádný efekt, nejspíše pro to, že jeho hladina je v savčích buňkách i normálně velmi nízká. eIF4G je nejspíše zapojen v regulaci IRES translace. Fosforylace eIF4E je zrušena i v případě, že se použijí inhibitory MNK. Ovšem nedostatek aminokyselin fosforylaci eIF4E nesnižoval, a ta tedy nejspíše nebude ovlivněna inhibicí mTORC1, protože mTORC1 je inhibován nedostatkem aminokyselin (Müller et al., 2013).

Některé studie ukazují, že fosforylace eIF4E není nutná pro jeho navázání na čepičkovou strukturu. Jiné naopak ukazují, že jeho fosforylace snižuje schopnost eIF4E vázat se na čepičkovou strukturu (Morley et Naegele, 2002). Zuberek et al. (2003) dokonce ukazují, že fosforylace je nutná pro uvolnění proteinu eIF4E z čepičkové struktury. Fosforylace eIF4E může být alternativně zapojena i do přeprogramování translace přes uvolnění eIF4F pro to, aby došlo k translaci málo zastoupené mRNA (Morley et Naegele, 2002; Zuberek et al., 2003).

U oocytů skotu docházelo k fosforylaci eIF4E po rozpadu jaderné membrány (NEBD) spolu s fosforylací docházelo i k aktivaci CDC2 spolu s MAP kinázou až do MII kdy byl plně fosforylován (Tomek et al., 2002).

Ellederová et al., (2006) zjistili, že u prasečích oocytů se zvýší množství proteinu eIF4E 5 hodin po začátku kultivace a pak se jeho hladina v průběhu zrání nemění. Během zrání stoupá i fosforylace eIF4E a nejvyšší fosforylace je dosaženo v metafázi druhého meiotického dělení. Tím stoupá i aktivita eIF4E a jeho schopnost vázat se na mRNA (Ellederová et al., 2006).

*In vitro* bylo zjištěno, že dochází ke zvýšení fosforylace eIF4E během meiotického zrání oocytů u myší (Gavin et Schorderet-Slatkine, 1997; Šušor et al., 2015), skotu (Tomek et al., 2002) a u prasečích oocytů (Ellederová et al., 2006).



### 3.3.4. Fosforylace proteinu 4E-BP1

Regulaci cap-dependentní translace ovlivňují proteiny vázající eukariotní iniciační factor 4E (eIF4E-BPs/4E-BPs): 4E-BP1 a 4E-BP2 a 4E-BP3 přes inhibici proteinu eIF4E (Poulin et al., 1998). 4E-BPs jsou malé proteiny o velikosti 12-20 kDa (Pause et al., 1994). Výskyt proteinu 4E-BP1 byl zjištěn v ledvinách, tukové tkáni, střevě, játrech, svalech, vaječnicích, slinivce a slezině (Rong et al., 2008).

eIF4E připojený na 5'UTR oblast mRNA usnadňuje vazbu ribozómu na mRNA. Proteiny 4E-BP soutěží o vazbu na eIF4E s proteinem eIF4G. Inaktivace eIF4E je závislá na fosforylaci 4E-BP. V oocytech je hlavní inhibice cap-dependentní translace přes eIF4E protein 4E-BP1. Pokud je protein 4E-BP1 hypofosforylován, váže a inhibuje eIF4E, ale jeho hyperfosforylovaná forma protein eIF4E neinhibuje (Poulin et al., 1998).

Vazba 4E-BP1 na eIF4E je vyloučená, pokud dojde k fosforylaci 4E-BP1 proteinu přes dráhu mTOR a PI3K/AKT kináz (Müller et al., 2013). Protein eIF4E je inhibován proteinem 4E-BP1, který blokuje vazebné místo pro protein eIF4G. Protein eIF4G se tím pádem nemůže vázat na eIF4E. eIF4E tedy není schopen tvořit komplex eIF4F a tím iniciovat translaci. (Matsuo et al., 1997). Protein 4E-BP1 interaguje s proteinem eIF4E na vazebném místě mezi 54. a 60. zbytkem v centru jeho sekvence, která obsahuje 118 aminokyselin (Wang et al., 2003).

U oocytů prasat a skotu v průběhu meiotického zrání stoupá fosforylace 4E-BP1. Tedy u oocytů v *in vitro* dochází k hyperfosforylaci proteinu 4E-BP1 a tím k iniciaci translace. (Tomek et al., 2002; Ellederová et al., 2006; Mayer et al., 2014).

Fosforylační místa 4E-BP1 u myší jsou T36, T45, S64, T69, S82, S100 a S111. Prvních pět fosforylačních míst je konzervativních u většiny organismů. U člověka jsou jednotlivá fosforylační místa posunuta o číslo výše (Hay et Sonenberg, 2004).

Gingras et al. (1999) zjistili, že fosforylace na T36/T45 má malý nebo žádný efekt na inhibici proteinu eIF4E. Fosforylace na T36 a T45 je relativně nevnímavá k sérové deprivaci a rapamycinu. Jako první dochází k fosforylaci na T36/T45, následně pak fosforyluje T69 a jako poslední dochází k fosforylaci na S64. Z jejich experimentu vyplývá, že fosforylace na S64 a na T69 samy nejsou schopny blokovat vazbu 4E-BP1 na protein eIF4E (Gingras et al., 2001).

Jako první je fosforylován 4E-BP1 na T36/45 a tato fosforylace je potřebná pro to, aby mohl být fosforylován threonin 69. Pokud je fosforylován threonin 69, může dojít k fosforylaci S64. Za uvolnění eIF4E z vazby je odpovědná nejspíše fosforylace na T69. A fosforylace na S64 brání opětovnému navázání eIF4E na 4E-BP1 (Lin et al., 1994; Karim et al., 2001).

Nedostatek výživy, stres a infekce způsobují defosforylaci 4E-BP1 a tím dojde k nárůstu inhibice translace (Gingras et al., 1999). Naopak při stimulaci buněk sérem, růstovými faktory nebo hormony se 4E-BP1 stává hyperfosforylovaný a není tedy schopen vázat eIF4E a tím inhibovat translaci (Lazaris-Karatzas et al., 1990; Gingras et al., 2001).

Rong et al. (2008) zjistili, že u buněk pěstovaných v *in vitro* (MEFs, NIH 3T3, RAT 1A, COS-7, HeLa S3) snížení obsahu séra a přidání rapamycinu (inhibitor mTOR) způsobí snížení fosforylace 4E-BP. A v případě, že se buňky nechají bez séra a následně se jim přidá rapamycin, je represe translace snížena ještě více (Rong et al., 2008).

Protein 4E-BP1 je hypofosforylován ve stádiu GV (zárodečného vajíčku) a vrchol jeho fosforylace je v MII stádiu u oocytů skotu (Siemer et al., 2009) prasat (Ellederová et al., 2006) a myší (Romasko et al., 2013; Šušor et al., 2015).

Tomek et al. (2002) zjistili, že u oocytů skotu v 10 hodinách kultivace (NEBD) je mnohem méně proteinu 4E-BP1 vázaného na eIF4E než tomu je na začátku kultivace (0 h) a po 24 hodinách v metafázi II. Tedy v době NEBD je protein 4E-BP1 hyperfosforylován (Tomek et al., 2002).

Hypofosforylovaný protein 4E-BP1 je exprimován v prasečím oocytu během celého zrání. Postupem času dochází k jeho fosforylaci a poklesu vazby na eIF4E. Vazba eIF4E na 4E-BP1 klesá ve fázi MI a další pokles byl ve fázi MII. V MII fázi byla hladina vazby eIF4E na 4E-BP1 sice velmi nízká, ale ne nulová. Tvorba komplexu eIF4F se zvyšuje při *in vitro* maturaci prasečích oocytů i přesto, že celková tvorba proteinu klesá. Protein 4E-BP1 je silně fosforylován v MI a ještě více je fosforylován v MII fázi u prasečích oocytů a jeho vazba na eIF4E je v těchto stádiích více redukována než ve stádiu GV (Ellederová et al., 2006).

Při nedostatku AA (amino kyselin nebo při použití inhibitorů mTOR, nebude 4E-BP1 fosforylován, a tím bude inhibována proteosyntéza (Müller et al., 2013).

Romasko et al. (2013) zjistili, že jednotlivé fosforylace 4E-BP1 jsou lokalizovány v různých oblastech dělicího vřeténka v jednotlivých fázích zrání oocyty. Regulace 4E-BP1 fosforylace v oblasti dělicího vřeténka může pomáhat s koordinací dělicího vřeténka a s progresí během buněčného cyklu. Lokalizace celkového 4E-BP1 je rozptýlena v celé cytoplazmě oocyty ve fázi GV. Expres fosforylovaných forem v GV oocyty byla oproti celkovému 4E-BP1 velmi nízká. Protilátka S64 jim tvořila u Romasko et al. (2013) v cytoplazmě oocyty výrazné body, což ovšem může být způsobeno nespecifickou vazbou. Po NEBD S64 a T69 je vidět signál hlavně v oblasti chromozómů a v MI a MII se signál posouvá směrem k pólům dělicího vřeténka (Romasko et al., 2013; Šušor et al., 2015).

Wang et al. (2003) zjistili, že fosforylace 4E-BP1 na serinu 111 je nejspíše zodpovědná za uvolnění 4E-BP1 z vazby na eIF4E. Romasko et al. (2013) u myších oocytů také zkoumali fosforylaci na serinu 111. V GV stádiu byla exprese této fosforylace velmi nízká. Po rozpadu jaderné membrány (NEBD) byla lokalizována v oblasti chromozómů a dělicího vřeténka. Ve fázích MI a MII je fosforylace S111 lokalizovaná hlavně v oblastech pólů dělicího vřeténka. V MII fázi popisují nižší expresi fosforylace S111, než v MI (Romasko et al., 2013).

Globální syntéza proteinů u myších oocytů během spontánní maturace v *in vitro* podmínkách klesá v době znovuoobnovení meiózy od diplotene do stádia MII. Stejně výsledky byly zjištěny u *in vivo* dozrálých oocytů. To ukazuje, že na iniciaci cap-dependentní translace se podílí exprese meioticky specifických genů a že snížení celkové syntézy proteinů má fyziologickou roli (Schultz et al., 1978).

Translace v savčím oocyty je během meiotického zrání postupně snižována. Ale aktivátory účastníci se translace specifických meiotických regulátorů zůstávají během tohoto období aktivní (Šušor et al., 2015; Ellederová et al., 2006; Tomek et al., 2002).

### **3.3.5. Faktory ovlivňující fosforylaci 4E-BP1**

Zdá se, že mTOR má velmi významný vliv na tvorbu aktivního komplexu eIF4F a translaci mRNA, která je aktivována přes navázání eIF4E na čepičkovou strukturu (Thoreen et al., 2012).

mTOR tvoří dva velké, složením i funkčně odlišné, komplexy: mTORC1 (mammalian target of rapamycin complex 1) a mTORC2 (complex 2). Fosforylace 4E-BP1 na mnoha serin/threonin reziduích je regulována přes mTORC1 (Guertin et Sabatini, 2007). mTORC1 kontroluje mnoho buněčných procesů, které jsou určující pro buněčný růst, jako jsou: proteosyntéza, biogeneze ribozomů, transport živin a autofágie. Zatímco mTORC2 se účastní kontroly uspořádání aktinového cytoskeletu (Sabassov et al., 2005).

mTORC1 se u savců skládá z mTOR, RAPTOR (Regulatory-associated protein of mTOR), PRAS40 (proline-rich AKT substrate 40kDa), mLST8 (mamalian lethal with sec-13 protein 8; GβL) a DEPTOR (DEP domain-containing mTOR-interacting protein). mTOR complex 1 je citlivý na rapamycin (Yip et al., 2010).

mTORC2 se skládá z proteinu RICTOR (rapamycin-insensitive companion of mTOR), mSIN1(mammalian stress-activated protein kinase interacting protein 1), PRR4/protor (proline rich 4 renal/ protein observed with RICTOR-1), mLST8 (mamalian lethal with sec-13 protein 8; GβL) a DEPTOR (DEP domain-containing mTOR-interacting protein) (Kogasaka et al., 2013).

Inhibitor rapamycin inhibuje protein mTOR, jednou z drah mTORu je aktivován ribosomal protein S6 kinase beta-1 (S6K1). Při inhibici rapamycinem nedochází k fosforylaci S6K1. Ale zdá se, že se S6K1 nepodílí na regulaci translace (Von Manteuffel et al., 1997).

Dowling et al. (2010) ukazují, že efekt mTORC1 zprostředkovaný 4E-BPs podporuje buněčnou proliferaci, ale nepodporuje buněčný růst u savčích buněk. Tyto výsledky ukazují na možnou pravdivost teorie, že savci mají vytvořené separované mechanismy jak regulovat buněčnou proliferaci a buněčný růst (Dowling et al., 2010).

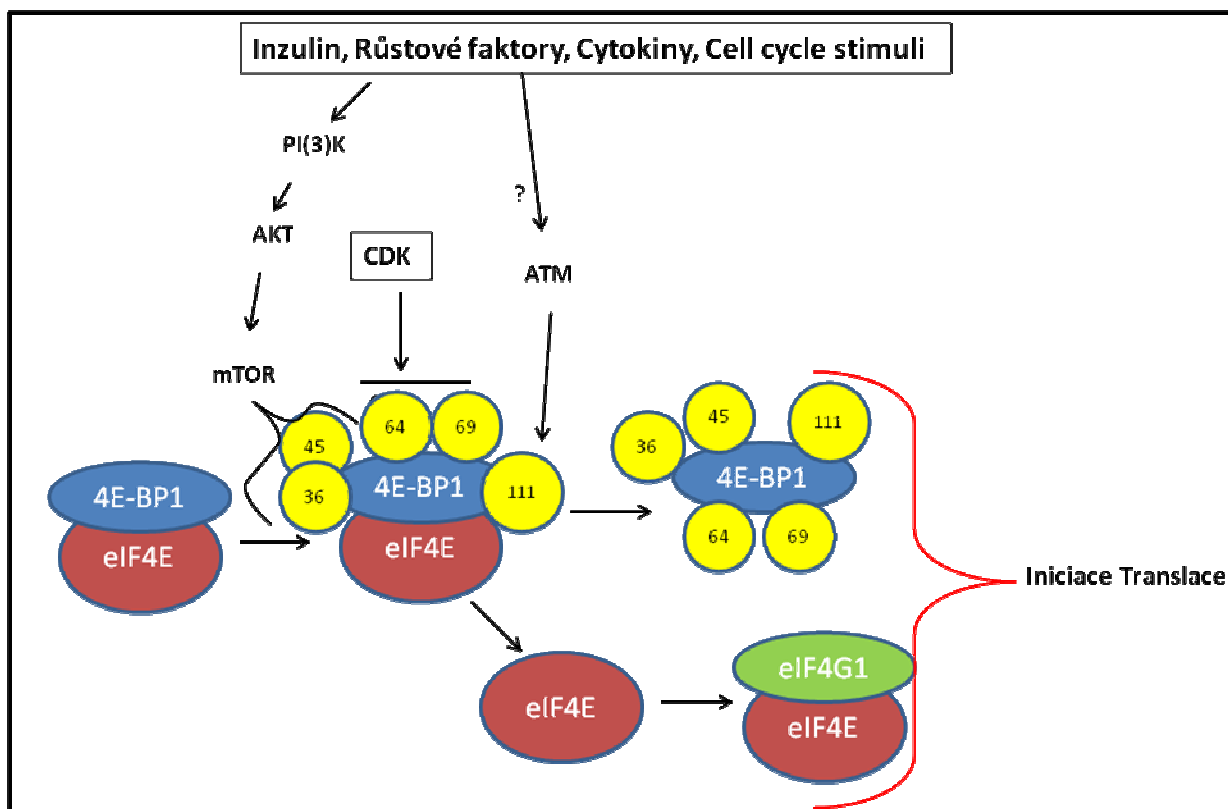
Knockout genu *Rptor*, který kóduje protein RAPTOR (Regulatory-associated protein of mTOR), je u myši letální už v embryonálních stádiích (Guertin et al., 2006). Gorre et al. (2014) vytvořili myši, kterým chyběl gen *Rptor* pouze v oocytech, a zjistili že jeho delece v oocytech vede ke ztrátě mTORC1 signálu. Ovšem vývoj folikulů a plodnost myši nebyla ovlivněna ztrátou mTORC1 signálu (Gorre et al., 2014).

Kogasaka et al. (2013) zjistili, že mTOR a RAPTOR jsou kolokalizovány v oblasti dělicího vřeténka a fosforylovaný mTOR je silně exprimován v oblasti dělicího vřeténka jak u kumulárních buněk, tak u myších oocytů. Protein RICTOR je výrazně lokalizován okolo pólů

dělicího vřeténka myších oocytů v metafázi I. Což ukazuje, že mTORC2 nejspíše kontroluje migraci meiotického dělicího vřeténka (Kogasaka et al., 2013).

Lee et al. (2012) zjistili podobnou lokalizaci mTOR v oblasti dělicího vřeténka a ještě také v cytoplazmě myšího oocyty. Expres mTOR mRNA byla nalezena v GV a přetrvala až do stádia MI a stoupala během metafáze II. Použití rapamycinu u myších oocytů snížilo množství jak mRNA pro mTOR, tak proteinu mTOR. Rapamycin také inhiboval migraci dělicího vřeténka a tímbyl změněn průběh asymetrickému dělení (Lee et al., 2012). Už dříve bylo zjištěno, že proteosyntéza není nutná pro oocyt ve stádiu NEBD, ale je potřeba pro formování dělicího vřetena a pro metafázi II v myších oocytech (Hashimoto et Kishimoto, 1988).

**Obrázek 9. Průběh fosforylace proteinu 4E-BP1**



Na obrázku je vidět že fosforylace jednotlivých fosforylačních míst je ovlivněna různými faktory.

Kultivace oocytů s inhibítorem proteinu mTOR Rapamycinem, který zamezuje vazbě eIF4E a eIF4G1, vede k defektnímu uspořádání chromosomů a poškození dělicího vřeténka v MI i MII u 79 % oocytů bez zastavení meiotického zrání. Oocyty s narušenou dráhou

mTOR a eIF4F jsou schopny vydělit první polární tělísko, ale dochází k mnoha chybám v rozdělení chromosomů. Data ukazují, že dráha proteinu mTOR a eIF4F je aktivována asi po NEBD (Šušor et al., 2015).

Mayer et al. (2014) u oocytů skotu zjistili, že Torin2 (inhibitor aktivního místa proteinu mTOR) je schopen inhibovat fosforylaci 4E-BP1, a nevratně zastaví zrání až 60 % oocytů ve stádiu MI. Efekt Torinu2 působil na protein AKT (protein kinaza B, PKB) a CDK1 (Cyclin-dependent kinase 1), ovšem jen malé účinky měl na protein kinazy A a C, ATM/ATR (Ataxia telangiectasia mutated/AT a Rad3-related protein), MAPK a ERK1,2 (Mayer et al., 2014).

I v případě, že byly oocyty vyjmuty z Torinu2 a inkubovány v médiu bez Torinu2, zůstaly v MI. Je možné, že některé zastavené buněčné procesy oocyt nedovede znovu obnovit (Mayer et al., 2014).

Z výsledků Karim et al. (2001) vyplývá, že by fosforylace 4E-BP1 na T45 a na S64 mohla být ovlivněna serin/threonin kinázou ERK2 (mitogen-activated protein kinase 1).

Shang et al. (2012) zjistili, že PLK1 (Pololike kinase 1) je kolokalizována spolu s fosforylací 4E-BP1 na T36/45 v centrozómech během mitózy. Pokud byla u buněk HeLa a HepG2 způsobena deprese 4E-BP1, docházelo ke chromozomálním aberacím, polyploidii, k tvorbě multipolárního dělicího vřeténka a několika centrozómů. Bylo zjištěno že PLK1 interaguje s 4E-BP1 v mitotických buňkách jak v podmínkách *in vivo*, tak *in vitro*. Interakce mezi PLK1 a 4E-BP1 je zprostředkována přes C-terminální AA 77-118 4E-BP1 (Shang et al., 2012).

PI3K (phosphatidylinositol-3-kinase) hraje významnou roli v přenosu signálu potřebného pro mnoho buněčných procesů jako je cytoskeletální přestavba, ochrana před apoptózou a mitogeny. AKT, také známá jako protein kinaza B, je ovlivňována PI3K. Aktivace AKTu je kritickým krokem v dráze PI3K pro regulaci růstu buněk a jejich diferenciaci. U oocytů potkana a žáby rodu *Xenopus* hraje dráha PI3K/AKT významnou roli při znovuoobnovení meiózy. U myších oocytů bylo také zjištěno, že dráha PI3K aktivovaná FSH (folikulostimulační hormon) se účastní meiotického zrání (Hoshino et al., 2004).

Nedávno bylo zjištěno, že PI3K/AKT signální kaskáda v oocytech má důležitou roli v kontrole aktivace a vývoji ovariálních folikulů a plodnosti (Reddy et al., 2005).

Serin/threonin kináza AKT (protein kináza B) se účastní procesů jako je buněčný růst, přežívání buňky a regulace buněčného růstu. (Tomek et Smiljakovic, 2005).

Tomek et Smiljakovic (2005) zjistili, že celková exprese proteinu AKT se během zrání oocyty skotu významně nemění. Zatímco exprese fosforylovaných forem proteinu AKT na T308 a S473 je maximální v metafázi I u oocytů skotu, ve fázi GV a MII je jejich exprese velmi nízká. Použití SH-6 inhibitoru proteinu AKT po 24 hodin způsobilo, že více jak 65 % oocytů skotu bylo blokováno ve fázi MII (Tomek et Smiljakovic, 2005).

## 4. Metodika a materiál

Oocyty byly izolovány pod binokulární lupou (Stemi 2000 a 2000-C, Oberkochen, Německo, Zeiss) z myších ovarii (*Mus musculus domesticus*, kmen CD1). Myši jsou využívány ve stáří 6 a více týdnů. Ovaria byla odebrána *post mortem* myším stimulovaným 5 IU eCG (equine chorionic gonadotropin; Folligon; Merck animal health, Kirkland, Kanada; distributor: Intervet ) 46 hodin před izolací oocytů. Izolace oocytů byla prováděna v transfer médiu (NaCl, KCl, CaCl<sub>2</sub>.2H<sub>2</sub>O, KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, MgSO<sub>4</sub>.7H<sub>2</sub>O, glukóza, 4-(2-hydroxyethyl)-1-piperazin-enthansulfonová (HEPES) kyselina, polyvinylalkohol (PVA), destilovaná voda, bovinní sérový albumin) se 100 μM IBMX (3-isobutyl-1-methylxanthine, inhibitor fosfodiesterázy (Essayan, 2001); Sigma-Aldrich, St. Louis, Missouri, USA) a oocyty maturovaly *in vitro* v CO<sub>2</sub> inkubátoru v M16 médiu (Millipore, Billerica, Massachusetts, USA). Popřípadě oocyty dozrálé *in vivo* do stádia MII z myší stimulovaných 5 IU eCG s následnou aplikací 5 IU hCG (Sigma-Aldrich) po 48 hodinách od aplikace eCG. Tyto oocyty jsou odebrány do 16 hodin po podání hCG z oviduktů myší *post mortem*. Oocyty byly po následné kultivaci do různých stádií zrání mraženy ve zkumavkách (0,5-1 ml Eppendorf, Hamburg, Německo). Izolovány byly i kumulární buňky, které obklopují oocyty ve stádiu GV a *in vivo* MII oocyty (stimulace eCG a následně hCG). V těchto vzorcích byly stanovovány proteiny pomocí metody western blot. Metodou western blot (WB) byl sledován i vývoj fosforylace proteinu 4E-BP1 v průběhu zrání oocytů. Výsledky z WB byly kvantifikovány pomocí programu ImageJ (<http://rsbweb.nih.gov/ij/>). Oocyty byly také imunocytochemicky barveny a vizualizovány konfokálním mikroskopem (Leica SP5, Leica Microsystems, Wetzlar, Německo).

### 4.1. Izolace oocytů

Pro izolaci oocytů byla všechna média předeřtá na ploténce vytemperované na přibližně 37°C. Myši byly usmrceny cervikální dislokací. Po usmrcení jim byl desinfikován abdomen 70% ethanolem a následně byla otevřena břišní dutina. Vaječníky se nacházejí v břišní dutině nad ledvinami, kde jsou obaleny tukem a vejcovodem jsou napojeny na dvojitou dělohu. Ovaria byla odebírána s vejcovodem, částí dělohy a částí tuku do transfer média se 100 μM IBMX. Pod binokulární lupou byla ovaria na Petriho misce (GAMA group a.s., České Budějovice, Česká republika) očištěna od vejcovodu a zbytku tuku. Jednotlivé



folikuly byly propíchnuty jehlou injekční stříkačky (tuberculin B. Braun, Melsungen, Německo) a tím se z nich uvolnily oocyty (GV). Ty pak byly vybrány z transfer média (TM) s IBMX skleněnou kapilárou a přendány do kultivační misky (Greenpia technolog, Yeosu, Jižní Korea) do média M16 se 100  $\mu$ M IBMX umístěného v CO<sub>2</sub> inkubátoru (Hera cell 150, Termo Science). Inkubátor pro myší oocyty byl nastaven na 37,5 °C a na 5% CO<sub>2</sub>.

Po 15 - 30 minutách v inkubátoru byly oocyty propipetováním 100 $\mu$ l pipetou (Eppendorf, Hamburg, Německo) zbaveny kumulárních buněk a vráceny zase na 15 - 30 minut do inkubátoru. Po této době se mohou zamrazit oocyty ve stádiu GV. Pro další zrání byly oocyty vybírány z média M16 s IBMX, propláchnuty v čistém transfer médiu bez IBMX a vráceny do inkubátoru v médiu M16 bez IBMX, kde byly ponechány ke zrání *in vitro*, buď 70 minut do stádia NEBD (nuclear envelope breakdown) nebo 7 hodin od začátku zrání do stádia MI. Do stádia MII se oocyty *in vitro* nechávají dozrát 14 až 16 hodin.

Pokud byly použity inhibitory, byly z oocytů zbavených kumulárních buněk a vyndaných z média M16 s IBMX vytvořeny 2 skupinky se stejným počtem oocytů. Jedna skupina byla použita jako kontrola a k druhé byl přidán inhibitor, tyto skupiny byly ponechány zrát v inkubátoru 3 hodiny zrát. Byl použit inhibitor mTORu rapamycin v koncentraci 100nM (R0395, Sigma-Aldrich) a BI 2536 inhibitor PLK1 v koncentraci 100nM (Axon Medchem, Groningen, Holandsko).

Oocyty ve stádiu **III** *in vivo* byly získány z vejcovodů samic 14 - 16 hodin po stimulaci hCG (eCG a za 48 hodin hCG) po propíchnutí vejcovodu v místě, kde se oocyty nacházejí, a tím byly samovolně vytlačeny. Oocyty i s kumulárními buňkami přeneseny do transfer média. Potom byly oocyty pipetou odebrány a přendány se do média M16 (800 $\mu$ l) s 10 $\mu$ l hyaluronidázy (80 : 1) (Sigma-Aldrich), která štěpí kyselinu hyaluronovou v cumulus oophorus. Oocyty byly v médiu M16 umístěny v kultivačních miskách do inkubátoru. Po 15 až 30 minutách byly oocyty pomocí 100 $\mu$ l pipety (Eppendorf, Hamburg, Německo) zbaveny zbytků kumulárních buněk a následně byly zamrazeny. Pro získání **zygot** *in vivo* byly myši stimulovány stejně jako u získávání oocytů MII *in vivo*, a po dávce hCG byla každá samice umístěna k jednomu samci. Izolace zygot byla do 16 hodin po podání hCG z ooviduktů (vejcovodů) usmrcené myši.

Oocyty a zygoty byly před mražením opakovaně propláchnuty v médiu PVA/PBS (polyvinilalkohol v phosphate buffered saline; Sigma-Aldrich). Po přenesení do zkumavky

typu eppendorf jim bylo odsáto přebytečné médium a byly okamžitě zamrazeny na -20°C a následně na -80 °C. Takto zamražené oocyty i zygoty byly následně použity na western blot.

## 4.2. Izolace kumulárních buněk z oocytů ve stádiu GV a MII

Kumulární buňky (CCs z **GV**) byly izolovány z oocytů ve stádiu GV, které obsahovaly kumulus oophorus. Oocyty byly izolovány stejným postupem jako je popsán v kapitole 4.1. Byly vybrány oocyty s cumulem oophorem a přesunuty do kultivační misky s TM bez IBMX. Z těchto oocytů byly po 10 minutách propipetováním odstraněny kumulární buňky. Kumulární buňky ( CCs z *in vivo* **III**) byly získány z oocytů MII *in vivo* po rozpadu kumulu oophoru působením hyázy. Z jamky kultivační misky (Greenpia technology) byly vybrány všechny oocyty a zbylé transfer médium s kumulárními buňkami bylo odsáto pipetou (Eppendorf) do 1ml zkumavky (Eppendorf). Kumulární buňky byly sedimentovány stočením na centrifuze 12100x g na 3 minuty (Minispin Ependorf) a 3x opakovaně promyty PVA/PBS a znovu stočeny. Zmrazena byla peleta kumulárních buněk bez média nejdříve na -20°C a pak na -80°C.

## 4.3. Imunocytochemie (ICC)

Oocyty byly fixované pomocí 4 % paraformaldehydu (PFA; Alfa Aesar, Ward Hill, Massachusetts, USA) v PBS s PVA po dobu 15 minut a následně byly permeabilizovány 15 minut v 0,1% Tritonu X-100 (Sigma- Aldrich) v PBS. Přes noc byly tyto oocyty inkubovány s primární protilátkou (1 : 150) při teplotě 4 °C. Jako primární protilátky byly použity tyto protilátky od Cell signaling technology: 4E-BP1(rabbit, 9452), 4E-BP1( T69) (rabbit, 9455S), 4E-BP1 (T36/45) (rabbit, 9459), 4E-BP1(S64) (rabbit, 9451S), AKT (S473) (rabbit, 9271) a mTOR (S2448) (rabbit, 2971S) a od firmy Sigma-Aldrich Tubulin (mouse, T6793) a lamin A/C (mouse, LMN A/C, SAB4200236).

Další den po promytí 2 x 15 minut v PVA/PBS jsou inkubovány se sekundární protilátkou. Sekundární protilátky byly použity v koncentraci 1 : 250 Alexa Fluor: Anti mouse červená 594 goat (A-11005), Anti-mouse zelená 488 donkey (A-21202) a Anti-Rabbit 488

donkey (A-21206) (Thermo Fisher Scientific, Waltham, Massachusetts, USA). Se sekundárním protilátkami byly oocyty inkubovány jednu hodinu v pokojové teplotě.

Na podložní sklíčko (Fisherfinest Premium Microscope Slides, Thermo Fisher Scientific, Waltham, Massachusetts, USA) byly oocyty fixovány pomocí média Vectashield (Vector laboratories INC) obsahujícího fluorescenční barvu DAPI (4',6-diamidino-2-phenylindole), a zakryty krycím sklíčkem (Cover Glasses thickness No. 1, Paul Marienfeld GmbH & Co. KG, Lauda-Königshofen, Německo). Fluorescenční barva DAPI (4',6-diamidino-2-phenylindole) barví DNA.

Vzorky byly vizualizovány invertním konfokálním mikroskopem Leica TCS SP5 (Leica Microsystems, Wetzlar, Německo) nebo epifluorescenčním mikroskopem Leica DMI 6000 B (Leica Microsystems). Obrázky byly upravovány v Adobe Photoshopu SC3 (Adobe Systems Software, Ireland) a kvantifikovány v Image J software (<http://rsbweb.nih.gov/ij/>).

#### **4.4. Western blot**

Vzorky jak oocytů tak, kumulárních buněk byly rozděleny na polyakrylamidovém gradientovém gelu 4 - 12% (Novex, Thermo Fisher Scientific, Waltham, Massachusetts, USA) v elektroforetické soustavě 10 minut na 125V a pak na 175-200V. Oocyty byly lyzovány po přidání 2,5 $\mu$ l 4x koncentrovaného LDS (lithium dodecyl sulfate) Sample bufferu NP 0007, 1 $\mu$ l redukce NP 0004 (Novex, Thermo Fisher Scientific, Waltham, Massachusetts, USA) a 6 $\mu$ l millipore H<sub>2</sub>O, 5 minut na 100 °C. Z gelu byly vzorky blotovány po dobu 25 minut a při 5mA/cm<sup>2</sup> na Imobilon P membránu (PVDF; Millipore, Merck KGaA, Darmstadt, Německo) v semidry blotting systému (Biometra GmbH, Göttingen, Německo). Přeblovaná membrána byla blokována po dobu 1 hodiny v roztoku 1 - 5 % mléka v 0,05 % tween-tris buffer saline (TTBS) (tween Sigma-Aldrich) s pH 7,4 dle druhu protilátky. S primární protilátkou byla membrána inkubována přes noc při teplotě 4 °C. Byly použity tyto protilátky od Sigma-Aldrich GAPDH a Tubulin (mouse T6793), a od Cell signaling technology 4E-BP1 (rabbit, 9452), 4E-BP1( T69) (rabbit, 9455S), 4E-BP1 (T36/45) (rabbit, 9459), 4E-BP1(S64) (rabbit, 9451S), AKT (S473) (rabbit, 9271), mTOR (S2448) (rabbit,

2971S), mTOR (rabbit, 2972) a survivin (71G4B7) (rabbit, 2808P)s. Protilátky byly naředěny v 1 % mléku.

Ředění jednotlivých protilátek: 4E-BP1 (total), 4E-BP1 (T69), 4E-BP1 (T36/45), 4E-BP1 (S64) a AKT (S473) byly ředěny 1 : 500. mTOR (S2448) a mTOR byl ředěn 1 : 8000. Survivin byl ředěn 1 : 2000 a Tubulin s GAPDH byly ředěny 1 : 30 000 (Sigma-Aldrich).

Po primární protilátce byly vzorky 3 x 10 minut promývány v TTBS. A membrána byla inkubována 1 hodinu při pokojové teplotě se sekundárními protilátkami Peroxidase Anti-Rabbit Donkey (711-035-152) a Peroxidase Anti-mouse Donkey (715-035-151) (Jackson immunoresearch, West Grove, Pennsylvania, USA). Sekundární protilátky byly ředěny 1 : 7500 v 1 % mléku. Membrána byla poté vyvolána v temné komoře na film (CL-Xposure Film, Thermo Scientific, Waltham, Massachusetts, USA) pomocí ECL kitu (Amersham, GE Health care life science, Little Chalfont, Velká Británie). Filmy byly vyvolány ve vývojce Foma LP-T a ustáleny v ustalovači Foma Fix (Foma Bohemia, Hradec Králové, Česká republika). Vyvolané filmy byly naskenovány na denzitometru GS-800 (Bio-Rad, Hercules, California, USA) v programu Quantity one. Výsledky byly kvantifikovány pomocí programu Image J softwaru (<http://rsbweb.nih.gov/ij/>).

## 5. Výsledky

V této práci jsem se zaměřila speciálně na cap-dependentní translaci. Cap-dependentní translace je regulována mechanismy přes 7 methylguanidinovou čepičkovou strukturu na 5' konci mRNA. Zaměřila jsem se na 4E-BP1, který je represorem cap-dependentní translace.

Byla pozorována lokalizace proteinu eIF4E-BP1 (eukaryotic initiation factor 4E-binding protein1) a jeho fosforylace. Protein 4E-BP1 je u myši fosforylován na threoninu 36/45, serinu 64 a threoninu 69, ty se nacházejí poblíž motivu, na který se váže protein eIF4E. Také byla sledována lokalizace aktivních proteinů mTOR a AKT. Ty jsou pokládány za hlavní aktivátory fosforylace 4E-BP1. A vliv inhibice mTOR a PLK1 kináz na fosforylaci 4E-BP1.

U myši je 4E-BP1 fosforylován na T36/45, S64 a T69 a dále na serinu 111, který je poblíž C-terminálního konce 4E-BP1. Tato fosforylační místa jsou u lidí posunuta o jednu aminokyselinu výš, a 4E-BP1 je tedy fosforylován na T37/46, S65, T70, S112. U oocytů dochází k transkripci ve fázi růstu oocytu.

### 5.1. Lokalizace globálního 4E-BP1 a jeho fosforylovaných forem v oocytu pomocí imunocytochemie

V prvním experimentu byla sledována lokalizace globálního neboli celkového proteinu 4E-BP1, tedy jak fosforylovaných, tak nefosforylovaných forem značených protilátkou proti celkové 4E-BP1 (total 4E-BP1). Také byly pozorovány jednotlivé fosforylované formy proteinu 4E-BP1 T36/45, S64 a T69. Kdy dochází k fosforylaci proteinu 4E-BP1 a kde je tato fosforylace lokalizována souvisí s lokalizací volného proteinu eIF4E, který je schopen účastnit se iniciace translace.

Oocyty byly imunocytochemicky barveny a vizualizovány invertním konfokálním mikroskopem Leica TCS SP5 (Leica Microsystems) nebo epifluorescenčním mikroskopem Leica DMI 6000 B (Leica Microsystems) a upravovány v Adobe Photoshopu SC3 (Adobe Systems Software) a kvantifikovány v Image J software (<http://rsbweb.nih.gov/ij/>).

V oocytu ve stádiu GV je celkový 4E-BP1 lokalizován v cytoplasmě se silnějším signálem v nukleoplasmě, mimo jádérko. V jádérku se protein 4E-BP1 vůbec nevyskytuje. Ve stádiích NEBD, Pro-MI a MII je vidět jeho poměrně rovnoměrná lokalizace v celém oocytu. U celkového 4E-BP1 nedochází ke změnám lokalizace během zrání oocytu (obrázek 10).

4E-BP1 je lokalizován v oocytu ve stádiu GV v celém oocytu. Na obrázku 11 je jádro vizualizováno červeně obarveným markerem jaderné membrány, Laminem (LMN A/C). Je vidět, že velké množství celkového 4E-BP1 je lokalizováno v nukleoplasmě, která je ohraničena pomocí barvení na Laminovou strukturu jaderné membrány. V cytoplasmě je vidět menší lokalizace celkového proteinu 4E-BP1, než je tomu v nukleoplasmě (obrázek 11).

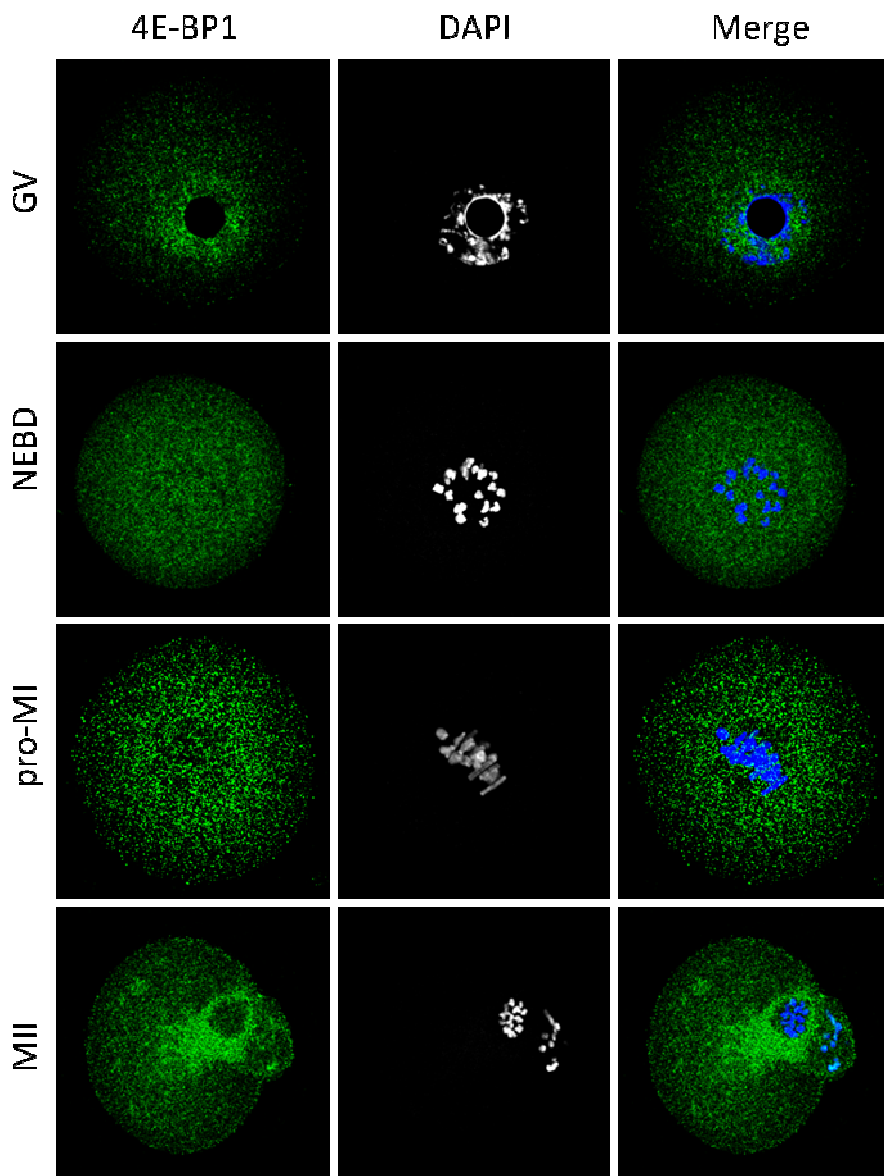
Fosforylace 4E-BP1 (T36/45) se nevyskytuje u oocytů ve stádiu zárodečného váčku (GV), na rozdíl od globálního 4E-BP1. V ostatních stádiích zrání NEBD, pro-MI a MII je fosforylace 4E-BP1 (T36/45) lokalizována rovnoměrně v celém oocytu. T36/45 je tedy lokalizována velmi podobně jako celkový 4E-BP1, až na to že se nevyskytuje v oocytu ve stádiu GV (obrázek 12).

Fosforylace na S64 4E-BP1 není přítomna u oocytů myši ve stádiu GV. V NEBD je fosforylace S64 výrazně lokalizována hlavně v oblasti rozpadlého zárodečného váčku poblíž chromozómů. V pro-MI je fosforylace S64 lokalizovaná v oblasti dělicího vřeténka a posouvá se směrem k pólům dělicího vřeténka. V MII fázi je S64 lokalizována na pólech bipolárního dělicího vřeténka. Méně výrazná lokalizace této fosforylace 4E-BP1 je vidět i v cytoplasmě oocytu (obrázek 13).

U myšího oocytu ve stádiu GV není vidět přítomnost fosforylace 4E-BP1 na threoninu 69. Po rozpadu jaderné membrány (NEBD) je tato fosforylace lokalizována výhradně v okolí chromozómů v oblasti, kde se formuje dělicí vřeténko. V prometafázi I se lokalizace této fosforylace posouvá směrem k pólům dělicího vřeténka. A v metafázi II je lokalizována na pólech dělicího vřeténka (obrázek 14).

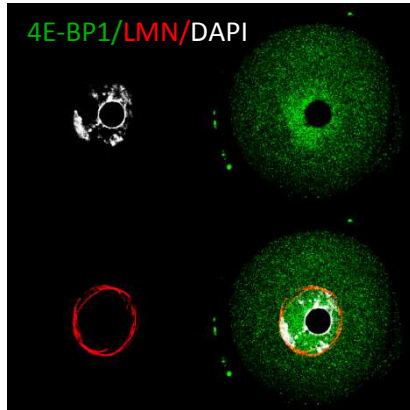
Fosforylace 4E-BP1 T69 u oocytu v NEBD je vidět hlavně na okrajích formujícího se dělicího vřeténka, pro nějž byl jako marker použit Tububulin. Jak je vidět na obrázku 15, Tubulinová vlákna jsou obklopena 4E-BP1 fosforylovaným na T69. Na detailním obrázku 16 je vidět fosforylace T69 na jednom z pólů bipolárního dělicího vřeténka oocytu v pro-MI.

**brázek 10. Lokalizace globálního 4E-BP1**



*Na obrázku je zeleně viditelný celkový 4E-BP1, bíle a modře je vizualizována DNA (Dapi = 4',6-diamidino-2-phenylindole).*

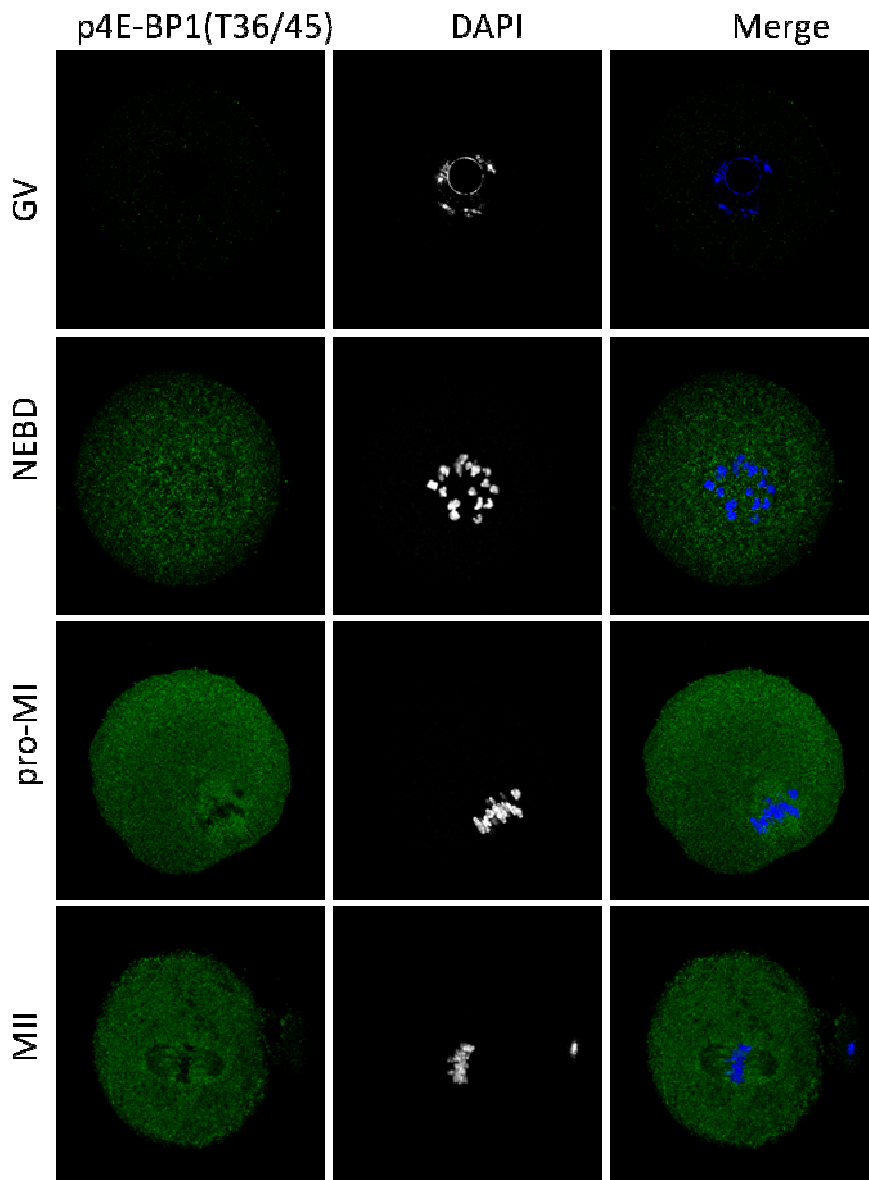
**Obrázek 11. Lokalizace globálního 4E-BP1 v GV stádiu**



*Na obrázku je oocyt v GV stádiu, tentýž oocyt na všech 4 obrázcích. Bíle je vizualizována DNA (DAPI = 4',6-diamidino-2-phenylindole), červeně je vizualizován Lamin A/C (jaderná membrána), a zeleně je značen celkový protein 4E-BP1.*

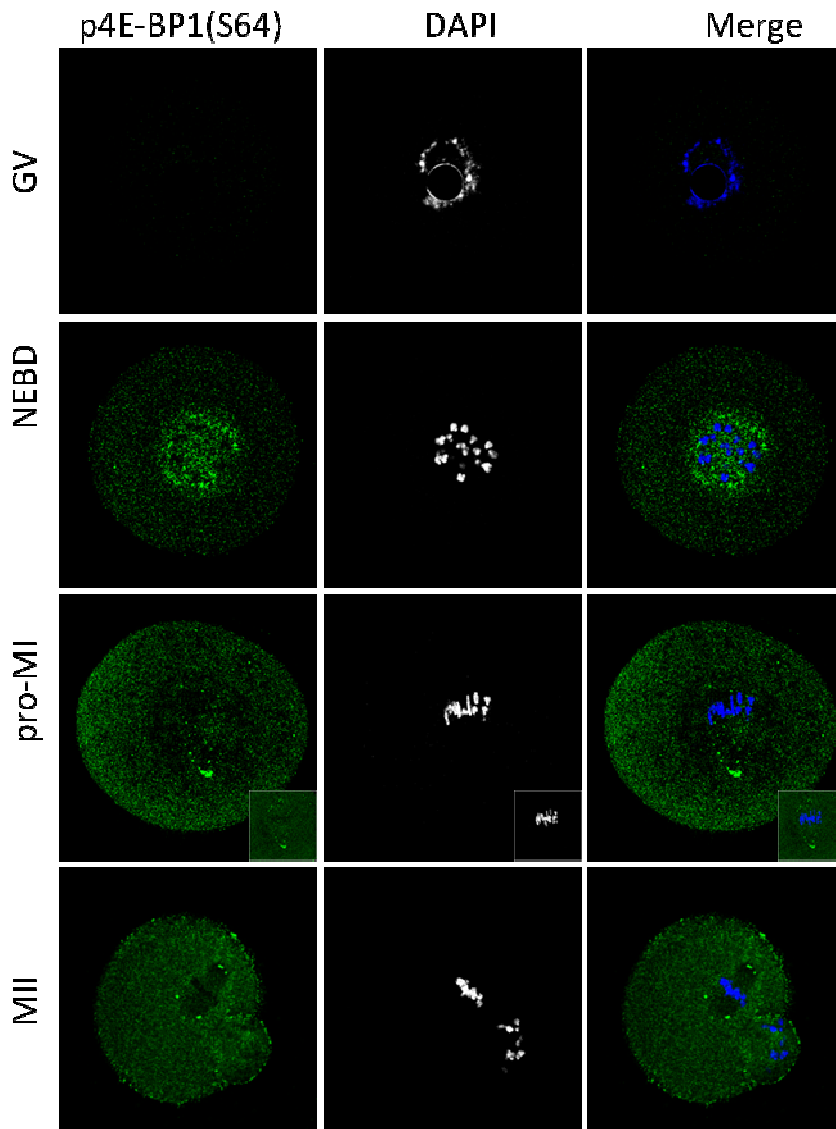


Obrázek 12. Lokalizace fosforylace 4E-BP1 na threoninu 36/45



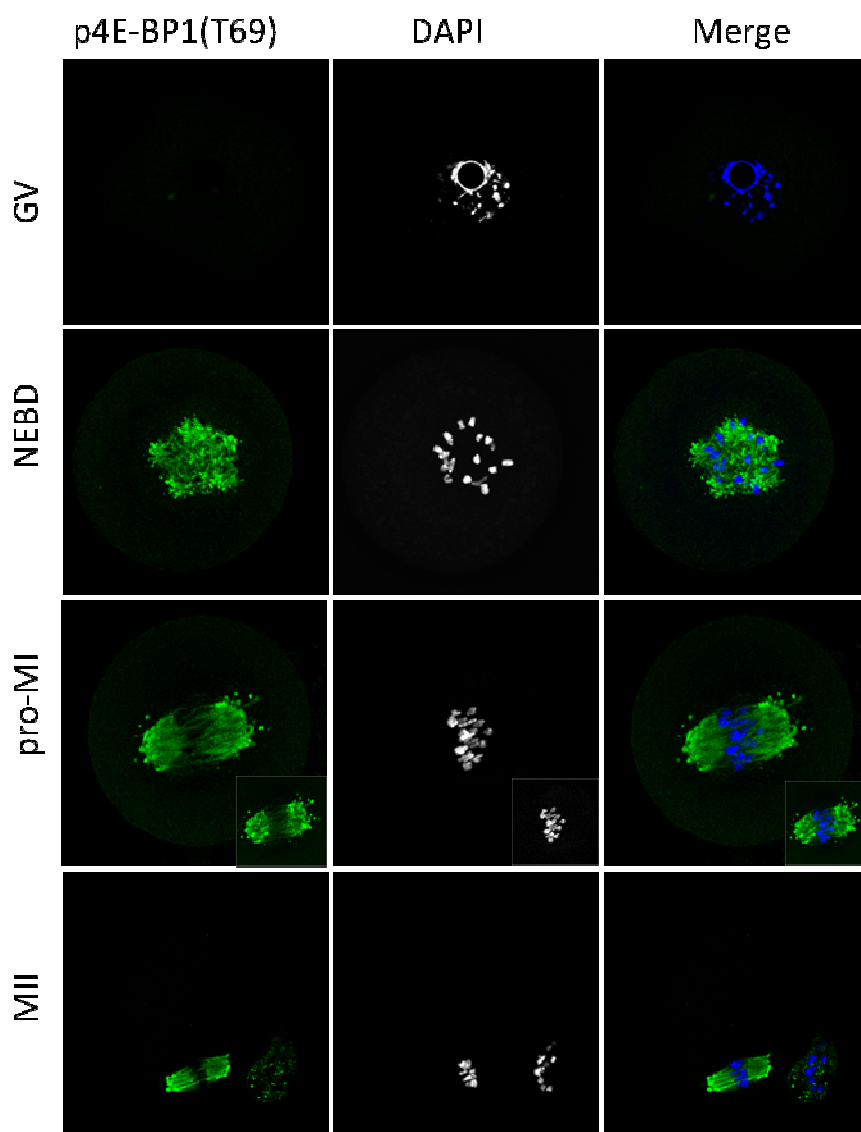
Na obrázku jsou oocyty (od shora) v GV, NEBD, pro-MI a MII stádiích zrání. Zeleně je zviditelněny protein Phospo4E-BP1 (T36/45), bíle a modře je vizualizována DNA (DAPI = 4',6-diamidino-2-phenylindole).

Obrázek 13. Lokalizace fosforylace 4E-BP1 na serinu 64



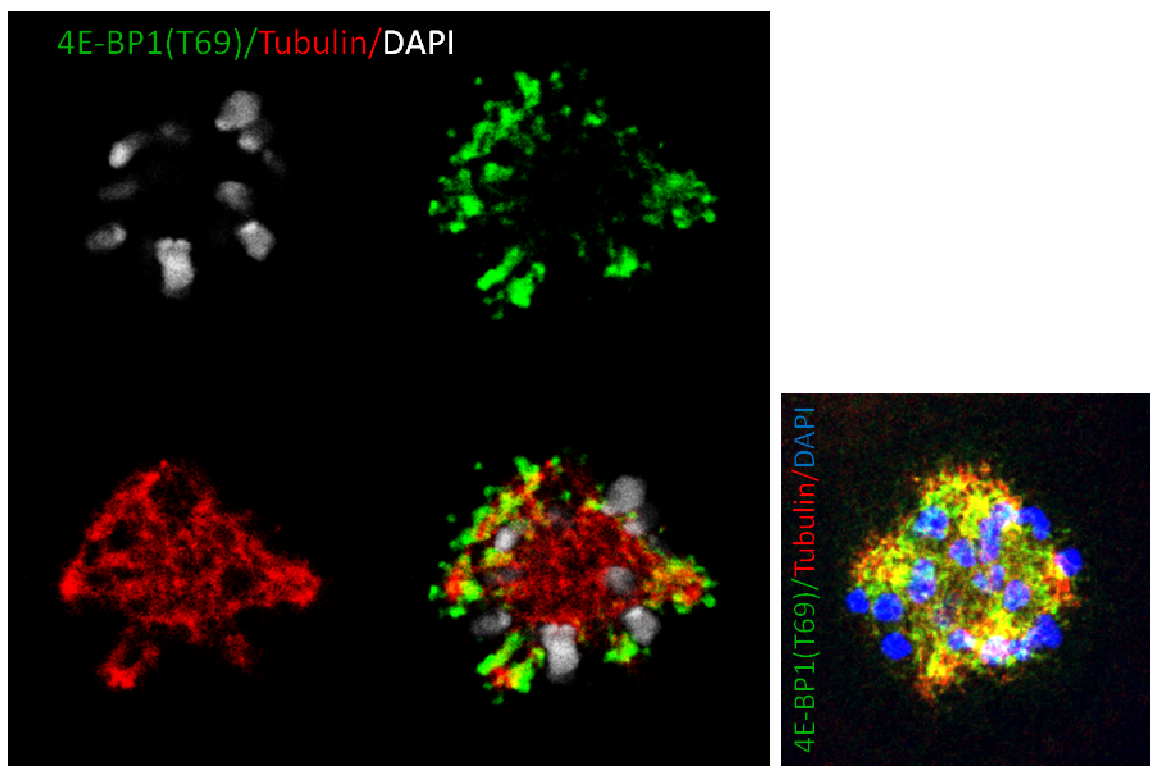
Na obrázku jsou myšší oocyty (od shora) v GV, NEBD, pro-MI a MII stádiích zrání. Zeleně je viditelný protein Phospo4E-BP1 (S64), bíle a modře je vizualizována DNA (DAPI = 4',6-diamidino-2-phenylindole).

Obrázek 14. Lokalizace fosforylace 4E-BP1 na threoninu 69



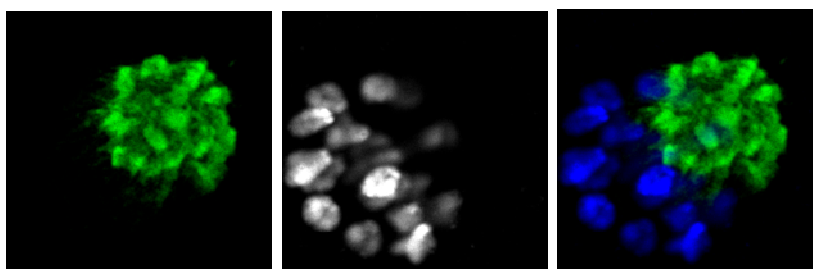
Na obrázku jsou myší oocyty (od shora) v GV, NEBD, pro-MI a MII stádiích zrání. Zeleně je viditelný protein Phospo4E-BP1 (T69), bíle a modře je vizualizována DNA (DAPI = 4',6-diamidino-2-phenylindole).

**Obrázek 15. Detail fosforylace (T69) kolem dělicího vřeténka u oocytů v NEBD**



*Na obrázku je vizualizován detail myšního oocytu ve stádiu NEBD. Zeleně je viditelná kolokalizace fosforylovaného 4E-BP1 (T69) a tubulinu (červeně), bíle a modře je vizualizována DNA (DAPI = 4',6-diamidino-2-phenylindole).*

**Obrázek 16. Detail fosforylace (T69) v pólech dělicího vřeténka u oocytů pro-MI**



*Na obrázku je vidět detail pólu dělicího vřeténka a chromozómy v prometafázi I. Zeleně je viditelný protein Phospo 4E-BP1 (T69) na pólu bipolárního vřeténka v prometafázi I, bíle a modře je vizualizována DNA (DAPI = 4',6-diamidino-2-phenylindole).*

## **5.2. Průběh fosforylace 4E-BP1 a aktivace proteinu mTOR během zrání oocyty na western blotu**

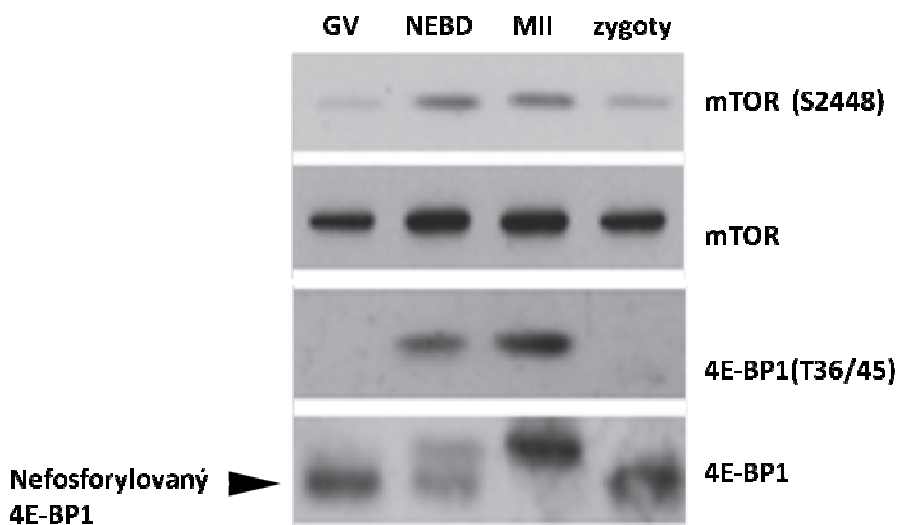
Sledovány byly změny fosforylace proteinu 4E-BP1 a mTOR během zrání oocyty a v zygotách. Oocyty zamražené v určitém stádiu zrání byly lyzovány a následně separovány na gradientovém polyakrylamidovém gelu (4 - 12 %, Novex, Thermo Fisher Scientific) pomocí metody SDS page. Gel byl následně přebloťován v bloteru (Biometra GmbH) na PVDF membránu a značen primární a následně sekundární protilátkou. Membrána byla vyvolána na CL-Xposure film (Thermo Fisher Scientific) pomocí ECL kitu (Amersham, GE Healthcare life science).

Protein mTOR se stává aktivní, pokud dojde k fosforylaci na serinu 2448. U kinázy mTOR (S2448) je na WB vidět, že dochází k zvýšení její aktivace v NEBD a MII. Tato aktivace je nízká u oocytů ve stádiu GV a na podobnou hladinu se vrací po oplození u zygot.

Na obrázku 17 je vidět, že po NEBD dochází k fosforylaci 4E-BP1, kdy se na WB objevuje shift bandu. Protilátka proti 4E-BP1 značí jak fosforylované tak nefosforylované formy. Šipkou je označen spodní band, který reprezentuje nefosforylovanou formu 4E-BP1. Fosforylace 4E-BP1 T36/45 je na western blotu viditelná jen v NEBD a v MII stádiu oocyty v GV ani v zygotách nedochází k této fosforylaci.

Tyto výsledky z WB pozitivně korelují s výsledky z ICC (kapitola 5.1), kdy je vidět, že protein 4E-BP1 začíná být fosforylován po NEBD.

**Obrázek 17. Western blot fosforylace 4E-BP1 a aktivace proteinu mTOR**



*Western blot myší zygot a oocytů ve stádiu GV, NEBD (nuclear-envelope breakdown) a MII. Značený protilátkami mTOR (S2448), mTOR, 4E-BP1, 4E-BP1 (T36/45).*

### **5.3. Lokalizace aktivní formy AKT a mTOR v oocytu**

Pro fosforylaci 4E-BP1 je důležitá regulace upstream drah. Mezi dráhy ovlivňující fosforylaci 4E-BP1 patří dráha proteinů AKT a mTOR (obrázek 18). Jako další možný aktivátor fosforylace 4E-BP1 by mohl být protein PLK1. Tyto dráhy mohou ovlivňovat fosforylaci 4E-BP1 a přes uvolnění proteinu eIF4E aktivovat cap-dependentní translaci. Sledovala jsem průběh aktivace mTOR a AKT kináz a vliv inhibice proteinů mTOR a PLK1 na fosforylaci 4E-BP1.

Lokalizace proteinů AKT (S473) a mTOR byla sledována u oocytů ve stádiu NEBD, pro-MI a MII, pomocí imunocytochemického barvení oocytů.

Protein mTOR byl inhibován rapamycinem (R0395, Sigma-Aldrich) a pro inhibici proteinu PLK1 byl použit inhibitor BI 2536 (Axon Medchen, Groningen, Holandsko). Inhibitory byly přidány k oocytům po vyndání z média M16 s IBMX a následně zrály v inkubátoru 3 hodiny. Kontrolní oocyty zrály stejnou dobu v médiu M16 bez inhibitorů. Tyto vzorky byly po zamražení použity na western blot.

Protein AKT je aktivovaný, pokud je fosforylovaný na serinu 473. Na obrázku je vidět, že aktivovaný protein AKT (S473) je lokalizován ve fázi NEBD v oblasti rozpadlé jaderné membrány. A v prometafázi I se jeho aktivace posouvá směrem k pólům dělicího vřeténka (obrázek 19).

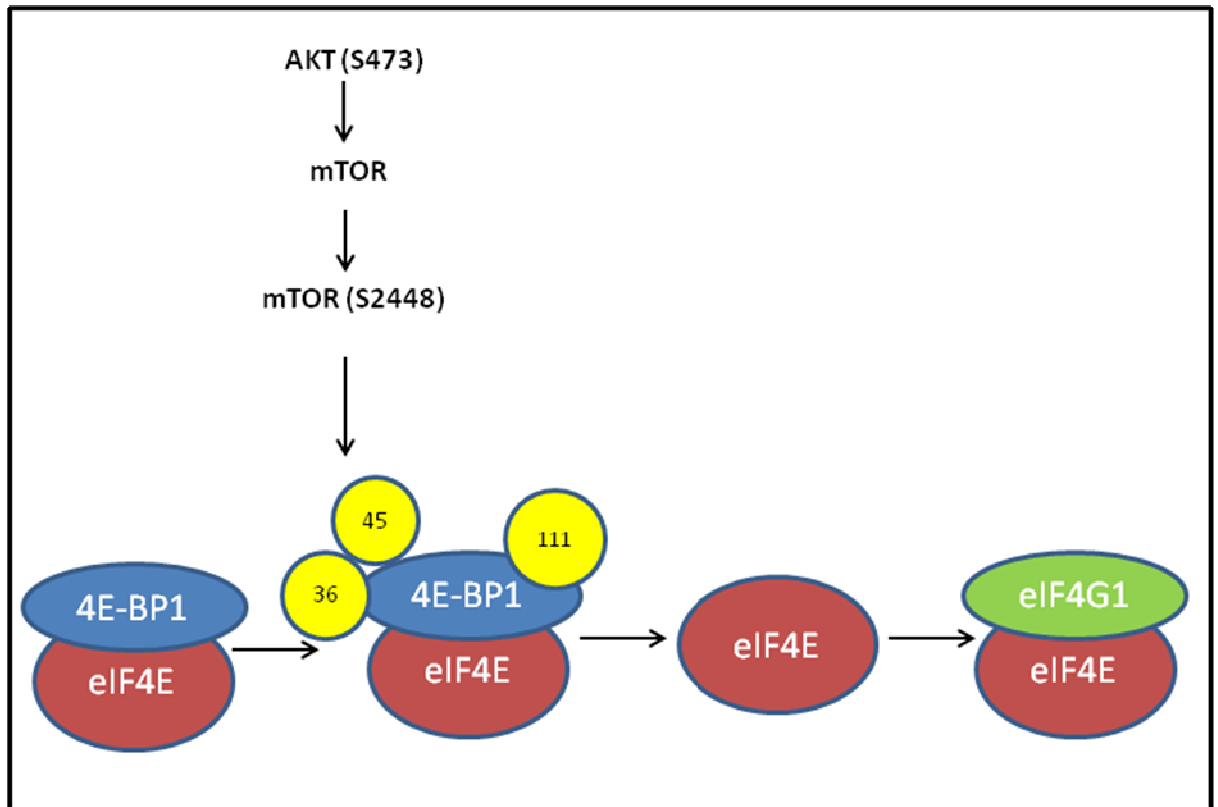
Pokud je mTOR kináza fosforylována na serinu 2448, je aktivní. Aktivní mTOR (S2448) se u oocytů ve fázi NEBD vyskytuje hlavně v oblasti rozpadu jaderné membrány. V prometafázi I se lokalizace posouvá po vznikajícím dělicím vřeténku směrem k jeho pólům (viz detail pro-MI; obrázek 20).

Jak AKT (S473), tak mTOR (S2448) mají velmi podobnou lokalizaci během zrání myšího oocytu. Lokalizace aktivní mTOR (S2448) a AKT (S473) je také velmi podobná lokalizaci fosforylovaných forem 4E-BP1.

Rapamycin je inhibitor mTORu a BI 2536 je inhibitorem PLK1. Na obrázku 21 vlevo je vidět, že při použití inhibitoru mTORu (rapamycinu) dojde k výraznému snížení fosforylace 4E-BP1 oproti kontrole. Při použití inhibitoru PLK1 (BI 2536) není vidět oproti kontrole žádná změna ve fosforylaci 4E-BP1. U použití BI 2536 je fosforylace proteinu 4E-BP1 větší (šipka) než při inhibici mTOR dráhy rapamycinem.

Translace mRNA pro protein Survivin je regulována mTOR dráhou. Proto byl protein Survivin použit pro detekci změn aktivace této dráhy, způsobené použitím inhibitorů rapamycinu a BI 2536. Detekce proteinu Survivinu na WB nám ukazuje změny v aktivaci dráhy proteinu mTOR v porovnání s kontrolou. Pokud jsou oocyty maturovány spolu s inhibitorem mTOR dráhy rapamycinem je exprese Survivinu výrazně snížena oproti oocytům zrajícím bez inhibitoru (kontrola). Na obrázku vpravo, kde byl použit inhibitor BI (2536) je vidět, že odstranění proteinu PLK1 nezměnilo expresi proteinu Survivinu. A jeho exprese je srovnatelná s kontrolou (obrázek 22).

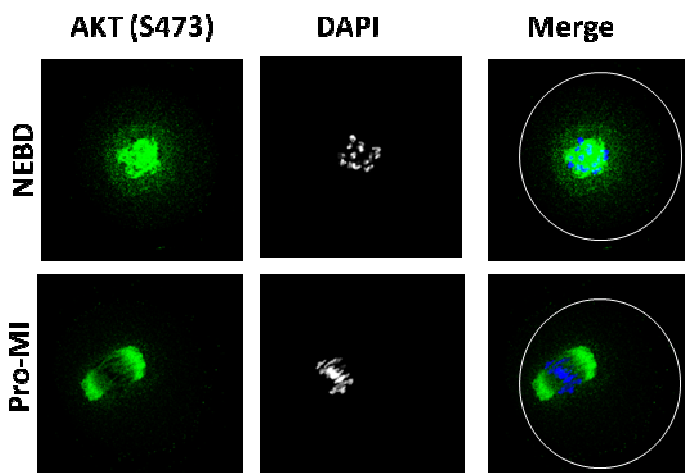
Obrázek 18. Vliv aktivace mTOR na fosforylaci 4E-BP1



*Pokud je protein 4E-BP1 hyperfosforylován dochází k uvolnění jeho vazby na eIF4E a tím pádem je eIF4E volný pro navázání proteinu eIF4G. Hyperfosforylace proteinu 4E-BP1 je ovlivněna aktivací proteinů AKT (S473) a mTOR (S2448).*

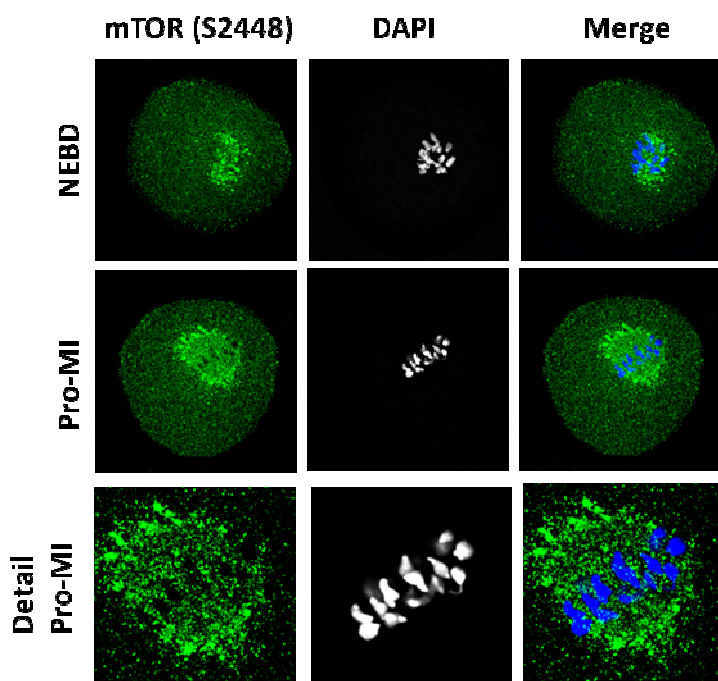


Obrázek 19. Lokalizace aktivní fosforylované AKT (S473)



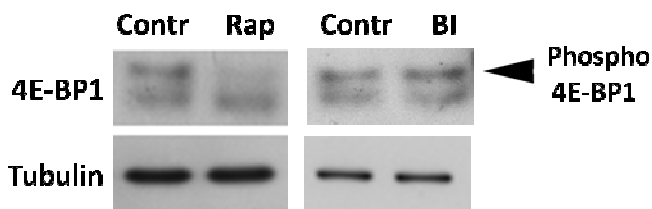
Na obrázku jsou myší oocyty ve stádiu NEBD a pro-MI. Zeleně je nabarvena aktivovaná AKT (fosforylace S473), bíle/modře je barvena DNA a bílá čára znázorňuje cytoplazmatickou membránu.

Obrázek 20. Lokalizace aktivní fosforilované mTOR (S2448)



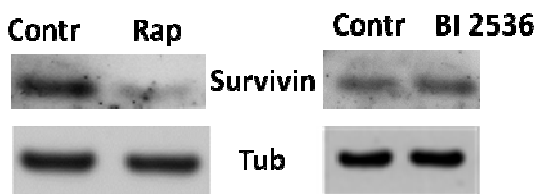
Na obrázku jsou oocyty ve stádiu NEBD, pro-MI a detail pro-MI. Zeleně je nabarven aktivovaný mTOR (fosforylace S2448) a bíle/modře DNA.

**Obrázek 21. Změna fosforylace 4E-BP1 u oocytů při inhibici rapamycinem a BI**



Na obrázku je western blot oocytů 3 hodiny od začátku zrání. Tyto oocyty byly kultivovány s inhibitory rapamycinem (100nM) a BI 2536 (100nM). Šipka ukazuje fosforylovanou formu 4E-BP1 band pod tím je nefosforylovaná forma 4E-BP1 . Tubulin je na WB pro porovnání nanášky (loading control).

**Obrázek 22. Vliv inhibitorů rapamycinu a BI na dráhu mTOR**



Na obrázku jsou myší oocyty, které zrály 3 hodiny. Contr jsou označeny kontrolní skupiny oocytů, které zrály bez inhibitorů. Rap jsou označeny vzorky, ke kterým byl přidán inhibitor mTOR dráhy rapamycin (100nM) a BI 2536 jsou oocyty zrající s inhibitorem BI 2536 (100nM). Tubulin byl nanesen pro kontrolu nanášky (loading control). Survivin ukazuje změny v aktivaci mTOR dráhy.

## 5.4. Fosforylace 4E-BP1 u kumulárních buněk

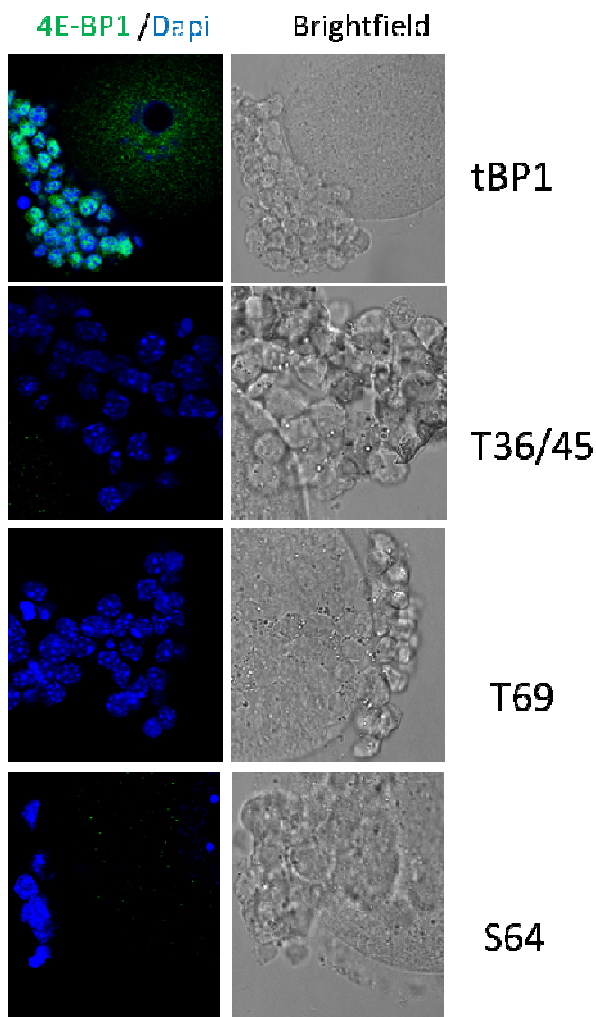
U oocytů dochází k aktivaci fosforylace proteinu 4E-BP1 po zahájení zrání oocyty ve fázi NEBD. Proto byly izolovány kumulární buňky a zkoumán průběh fosforylace 4E-BP1.

Kumulární buňky (CCs) byly izolovány z oocytů ve stádiu GV a *in vivo* MII. Centrifugací byly kumulární buňky sedimentovány a po odsátí přebytečného média byla zamražena peleta. Tyto vzorky kumulárních buněk byly použity na western blot. Pro ICC byly oocyty fixovány ve 4 % PFA i s částí cumulus oophorus. A barveny na fosforylované formy 4E-BP1 (T36/45, S64, T69).

Na výsledcích z imunocytochemie je vidět, že v kumulárních buňkách se vyskytuje celkový protein 4E-BP1, ovšem fosforylovaný protein 4E-BP1 nebyl v kumulárních buňkách oocytů ve stádiu GV nalezen. V kumulárních buňkách není vidět exprese ani jednoho z těchto fosforylačních míst T36/45, T69 ani S64 (obrázek 23).

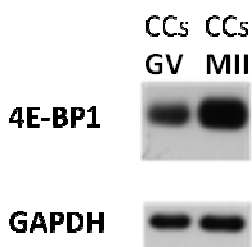
Na western blotu kumulárních buněk (obrázek 24) je vidět že nedošlo k posunu bandu směrem nahoru jako tomu je na WB (obrázek 17) oocytů po rozpadu jaderné membrány. Bandy jak u kumulárních buněk z oocytů ve stádiu GV tak z oocytů MII *in vivo* jsou na WB v jedné úrovni. U CCs z *in vivo* MII oocytů je vidět vyšší exprese celkového proteinu 4E-BP1, přičemž ale nedochází k jeho fosforylaci (obrázek 24). U oocytů dochází v období NEBD k nárůstu translace, což u kumulárních buněk nejspíš neprobíhá.

Obrázek 23. 4E-BP1 a jeho fosforylace v kumulárních buňkách



Na obrázku jsou 4 myší oocyty ve stádiu GV, které mají kumulus oophorus. Tyto oocyty byly barveny na celkový 4E-BP1, PhospoT36/45, T69 a S64 (zeleně). Modře je vidět DNA (Dapi). V pravém sloupci jsou ty samé oocyty vizualizovány v průchozím světle (Brightfield).

Obrázek 24. Detekce 4E-BP1 v CCs na western blotu



Western blot kumulárních buněk (CCs) získaných z oocytů myši ve stádiu GV a MII *in vivo*. Vzorky byly značeny protilátkou proti celkovému 4E-BP1 a protilátkou proti proteinu GAPDH (loading control).

## 6. Diskuze

Lokalizace fosforylovaných forem proteinu 4E-BP1 je důležitá, protože je velmi pravděpodobné, že v místech lokalizace dochází k iniciaci cap-dependentní translace. Hyperfosforylovaný protein 4E-BP1 uvolňuje z inhibiční vazby protein eIF4E a ten je tedy volný k vytvoření komplexu eIF4F a následně k iniciaci cap-dependentní translace.

Celkový protein 4E-BP1 je na ICC lokalizován v GV, NEBD, pro-MI a MII v celém oocytu (obrázek 10). Romasko et al. (2013) a Šušor et al. (2015) došli ke stejným závěrům, že nedochází k výrazným změnám lokalizace celkového 4E-BP1 během zrání myšního oocytu. Stejně tak i u fosforylací S64 a T69 4E-BP1 jejich výsledky korelují s našimi. Fosforylace S64 a T69 nejsou lokalizovány v oocytu ve stádiu GV a po NEBD jsou lokalizovány v oblasti rozpadlé jaderné membrány a formujícího se dělicího vřeténka. V pro-MI se tyto fosforylace posouvají směrem k pólům dělicího vřeténka. Ve fázi MII jsou lokalizovány v oblasti centriol dělicího vřeténka (obrázky 13 a 14). Lokalizace těchto fosforylací v oblastech, kde vzniká dělicí vřeténko, ukazuje na to, že jsou pro koordinaci dělicího vřeténka klíčové (Romasko et al., 2013). Fosforylace T69 je považována za stěžejní pro uvolnění eIF4E z inhibice. Po ní dochází ještě k fosforylaci na S64 která má zabraňovat opětovnému navázání eIF4E (Lin et al., 1994; Karim et al., 2001).

Gingras et al. (1999) zjistili, že jako první dochází k fosforylaci na T36/45 a že toto místo má jen velmi malý vliv na uvolnění eIF4E z inhibice. Pro hyperfosforylaci proteinu 4E-BP1 a zrušení jeho inhibice eIF4E jsou potřeba fosforylace na dalších fosforylačních místech. U myších oocytů není fosforylace T36/45 viditelná ve fázi GV a po zahájení zrání ve fázích NEBD, pro-MI a MII je lokalizována v celé cytoplazmě oocytu (obrázek 12) podobně jako celkový 4E-BP1 (obrázek 10).

T36/45 byl na WB detekován jen u oocytů ve fázi NEBD a MII. A vytvářel pouze horní band, zatímco protilátka proti celkovému 4E-BP1 tvořila i spodní band. Pomocí western blotu bylo detekované, že celkový 4E-BP1 je exprimován během celého zrání oocytu myši (obrázek 17), prasete (Ellederová et al., 2006) a skotu (Tomek et al., 2002). Na WB spodní band prezentuje hypofosforylovanou formu 4E-BP1.

Ellederová et al. (2006) u prasečích oocytů pozorovali i vazbu 4E-BP1 na eIF4E která postupně klesala ve fázi MI a následně v MII. Tomek et al. (2002) u oocytů skotu pozorovali,

že vazba 4E-BP1 na eIF4E je nižší v NEBD než v GV a MII fázi. U našich výsledků (western blot; obrázek 17) je vidět, že k fosforylaci části 4E-BP1 dochází už v NEBD a v MII je většina proteinu fosforylována. V GV a zygotách se vyskytuje hlavně nefosforylovaný 4E-BP1 a dochází tedy k jeho vazbě na eIF4E. Už dříve bylo zjištěno, že fosforylace 4E-BP1 během zrání oocytů prasat a skotu stoupá (Tomek et al., 2002; Ellederová et al., 2006; Mayer et al., 2014).

Protein 4E-BP1 je u myších oocytů v GV hypofosforylovaný což ukazují jak výsledky z ICC (obrázek 12, 13 a 14), tak na western blotu (obrázek 17). Ke stejným závěrům došli i Siemer et al. (2009) u skotu, Ellederová et al. (2006) u prasat a Romasko et al. (2013) u myší.

Během MII je většina 4E-BP1 v myším oocytu hyperfosforylována a tedy nezpůsobuje inhibici proteinu eIF4E. Hyperfosforylovaný 4E-BP1 není schopen inhibovat eIF4E a tedy nepůsobí jako represor iniciace cap-dependentní translace (Poulin et al., 1998).

Výsledky z WB ukazují, že k fosforylaci 4E-BP1 dochází po NEBD. To samé vyplývá i z výsledků imunocytochemického barvení myších oocytů na fosforylované formy 4E-BP1 (obrázek 12, 13 a 14).

Kináza AKT je aktivní, když je fosforylována na serinu 473. Aktivní mTOR kináza je fosforylována na serinu 2448. Ve výsledcích je vidět že AKT a mTOR jsou v NEBD lokalizovány v oblasti rozpadlého zárodečného váčku a v pro-MI je vidět posun jejich lokalizace směrem k pólům dělicího vřeténka (obrázek 19 a 20). Je známo, že fosforylace mTOR na serinu 2448 a serinu 2481 jsou markery vnitřní katalytické aktivity mTOR kinázy (Yonezawa et al. 2004). Kogasaka et al. (2013) a Lee et al. (2012) u myších oocytů zjistili, že mTOR (S2448; S2481) je lokalizována v NEBD kolem chromozómů. V MI a MII je u myších oocytů aktivní mTOR lokalizována v oblasti dělicího vřeténka. Fosforylace mTORu u oocytů stoupá po zahájení meiotického zrání (Lee et al., 2012; Kogasaka et al., 2013). Podle Lee et al. (2012) se mTOR mRNA vyskytuje v myším oocytu během celého meiotického zrání a je přítomna již ve stádiu GV.

Ve výsledcích je vidět, že lokalizace aktivní AKT a mTOR u myších oocytů je shodná s lokalizací fosforylací T36/45, S64 a T69. U oocytů skotu je největší nárůst fosforylací AKT ve fázi MI a její hladina v GV a MII je velmi nízká (Tomek et Smiljakovic, 2005). Kalous et al. (2009) publikovali, že u prasečích oocytů je AKT dynamicky distribuována v průběhu celého meiotického zrání. K její dramatické fosforylaci dochází v NEBD u oocytů prasat.

V metafázi I a metafázi II je aktivní AKT lokalizována v oblasti meiotického vřeténka v podobných místech jako mTOR (Hoshino et Sato, 2008; Kalous et al., 2009). Obě fosforylace AKTu (T308, S473) jsou důležité pro připojení dělicího vřeténka v MII a pro dokončení meiózy po oplození. Fosforylace na serinu 473 se podílí na vydělení druhého pólového tělíska (Hoshino et Sato, 2008).

Použití inhibitoru mTOR, rapamycinu, výrazně snižuje fosforylaci 4E-BP1 v porovnání s kontrolou (obrázek 21). Stejně tak má inhibice rapamycinem vliv na Survivin (SVV) (obrázek 22). Při jeho použití u myších oocytů výrazně klesla exprese Survivinu. Je známo, že dráha PI3K/AKT a mTOR je důležitá pro translaci SVV mRNA. V případě, že je tato dráha bloková inhibitory, výrazně se snižuje exprese Survivinu (Kim et al., 2004). Také bylo zjištěno že inhibitor rapamycin snižuje u myších oocytů množství mTORu i mRNA pro mTOR (Lee et al., 2012; Šušor et al., 2015).

Ovšem při použití inhibitoru BI 2536, který inhibuje PLK1, není na WB vidět žádná výrazná změna fosforylace 4E-BP1 oproti kontrole. Nedochozí tedy k poklesu fosforylace tak jako při použití inhibitoru rapamycinu, který blokuje přímo dráhu mTOR. Na western blotu, kde byl použit protein Survivin jako marker pro aktivaci mTOR dráhy je vidět, že inhibitor BI 2536 nesnížil expresi SVV oproti kontrole. Tedy exprese Survivinu je srovnatelná s kontrolou.

U nádorových buněk HCT116 indukovaná exprese aktivní formy PLK1 během mitózy vede k aktivaci mTOR dráhy a dochází ke zvýšení fosforylace 4E-BP1 (Renner et al., 2010). Ovšem u myšších oocytů PLK1 nezvyšovala ani aktivaci mTOR dráhy, ani fosforylaci 4E-BP1. Což ukazuje, že PLK1 se nejspíše regulace fosforylace 4E-BP1 u myších oocytů neúčastní a nemá vliv na aktivaci mTOR dráhy u myšších oocytů.

Šolc et al. (2015) zjistili, že PLK1 se stává aktivní při zahájení meiotického zrání v MTOCs (microtubule organizing centers) a později v oblasti kinetochor. PLK1 je potřeba pro účinné obnovení meiózy a pro podporu rozpadu zárodečného váčku. Inhibice vede k zastavení meiózy v metafázi I PLK1 kontroluje obnovení meiotického zrání v oocyту přes autoamplifikaci smyčky CDK1. Aktivita PLK1 je při znovuoobnovení meiózy nejspíše závislá na aktivaci CDK1. Účast PLK1 nezávislé na CDK1 nebyla experimentálně potvrzena (Šolc et al., 2015). U buněk HeLa a HepG2 v průběhu mitózy byla objevena kolokalizace PLK1 a fosforylace T36/45 proteinu 4E-BP1 (Shang et al., 2012).

Imunocytochemie oocytů ukazuje, že u kumulárních buněk oocytů v GV se vyskytuje jen celkový nefosforylovaný 4E-BP1. Fosforylované formy 4E-BP1 (T36/45), (S64) a (T69) se v kumulárních buňkách nevyskytují (obrázek 23).

Na western blotu (obrázek 24) z kumulárních buněk oocytů *in vivo* MII je vidět, že nedochází k fosforylaci 4E-BP1. U oocytů v této fázi je protein 4E-BP1 již plně fosforylován (obrázky 12 až 14). Také u kumulárních buněk z oocytů v GV stádiu není 4E-BP1 fosforylován (obrázek 24). U oocytů v GV fázi je protein 4E-BP1 hypofosforylován a k jeho fosforylaci dochází až při zahájení meiotického zrání v NEBD. Průběh fosforylace 4E-BP1 a aktivace translace v kumulárních buňkách je tedy nejspíše nezávislý na průběhu fosforylace 4E-BP1 v oocytu a naopak.



## 7. Závěr

K fosforylaci proteinu 4E-BP1 dochází zároveň se zahájením meiotického zrání myšního oocyty, tedy v NEBD. U myších oocytů ve fázi GV je většina proteinu 4E-BP1 nefosforylována a jeho fosforylace opět klesá po oplození u zygot. Protein 4E-BP1 je výrazně fosforylován v NEBD, pro-MI a MII. Fosforylace proteinu 4E-BP1 je ovlivněna dráhami AKT a mTOR. Aktivní formy kináz AKT a mTOR jsou během NEBD a pro-MI lokalizovány v oblasti vytvářejícího se dělicího vřeténka a postupně se posouvají k pólům dělicího vřeténka, podobný jev je vidět i u fosforylaci proteinu 4E-BP1 na (S64) a (T69), zatímco celkový 4E-BP1 je lokalizován v celém oocyty i ve stádiu GV. Fosforylace T36/45 je považována za první fosforylační místo a jeho fosforylace tedy nejspíš ještě nestačí k hyperfosforylaci a uvolnění eIF4E z inhibice a je lokalizována v celé cytoplazmě oocyty mimo oocyt ve fázi GV, kdy se tato fosforylace v oocyty nevyskytuje vůbec. Zda se, že inaktivace 4EBP1 je závislá na stádiu buněčného cyklu, přičemž moje data ukazují na jeho roli při vstupu do meiózy/mitózy.

Inhibice proteinu PLK1 pomocí inhibitoru BI 2536 ukázala, že tato kináza nejspíš není zapojena do aktivace dráhy mTOR. Inhibitor BI nijak nesnižoval expresi proteinu Survivinu, o němž je známo, že je regulován mTOR dráhou. A stejně tak inhibice PLK1 měla minimální vliv na fosforylaci proteinu 4E-BP1, která byla srovnatelná s kontrolou. Ovšem inhibice mTOR kinázy inhibitorem rapamycinem výrazně snižovala fosforylaci 4E-BP1. Stejně tak inhibitorem rapamycinem byla snížena i translace Survivin transkriptu.

Na rozdíl od oocytů, u kumulárních buněk nedochází během zrání oocyty k fosforylaci proteinu 4E-BP1. Nefosforylovaný protein 4E-BP1 se vyskytoval v kumulárních buňkách ve všech fázích zrání oocyty, které jsem testovala, tedy GV a MII.

Mechanismy regulace translace jsou stěžejní pro oocyt během meiotického zrání, kdy je regulace na úrovni transkripce velmi nízká. Tyto mechanismy ovlivňují expresi proteinů nutných pro správný průběh meiotického zrání. Chyby vzniklé během meiotického zrání mohou způsobovat aneuploidii a výrazně ovlivňují plodnost savců.

## 8. Seznam použité literatury

- Abrieu, A., Dorée, M., Fisher, D. 2001. The interplay between cyclin-B-Cdc2 kinase (MPF) and MAP kinase during maturation of oocytes. *Journal Cell Science*. 114. 257-267.
- Aktas, H., Wheeler, M. B., Rosenkrans, C. F., First, N. L., Leibfried-Rutledge, M. L. 1995. Maintenance of bovine oocytes in prophase of meiosis I by high [cAMP]. *Journal of Reproduction Fertility*. 105 (2). 227-235.
- Baker, T. G., 1971. Oogenesis and ovarian development. In: Balin, H., Glasser, S. R. *Reproductive Biology, Excerpta med.*, Amsterdam. p. 398-437.
- Brar, G. A., Hochwagen, A., Ee, L. S., Amon, A. 2009. The multiple roles of cohesin in meiotic chromosome morphogenesis and pairing. *Molecular Biology of the Cell*. 20 (3). 1030-1047.
- Bukovsky, A., Svetlikova, M., Caude, M. R. 2005. Oogenesis in cultures derived from adult human ovaries. *Reproductive Biology and Endocrinology*. 3 (17). 1-13.
- Byskov, A. G., Hoyer, P. E. 1988. Embryology of mammalian gonads and ducts. In: Knobil, E., Neill, J. D. (ed). *Physiology of Reproduction*. New York: Raven Press. p. 265-302.
- Clancy, S. 2008. DNA Transcription. *Nature Education*. 1 (1):41
- Clarke, H. J. 2012. Post-transcriptional control of gene expression during mouse oogenesis. In: Kubiak, J. Z. (ed.). *Mouse Development from oocyte to stem cells*. Springer-Verlag. Berlin. Heidelberg. p. 1-21. ISBN: 9783642304067
- Collier, B., Georgoni, B., Loveridge, C., Cooke, H. J., Gray, N. K. 2005. The DAZL family proteins are PABP-binding proteins that regulate translation in germ cells. *The EMBO journal*. 24 (14). 2656-2666.
- Cook, R. R. 1997. The transcriptional basis of chromosome pairing. *Journal of Cell Science*. 110. 1033-1040.
- David, G. F. X., Kumar, T. C. A., Baker, T. G. 1974. Uptake of tritiated thymidine by primordial germinal cells in the ovaries of the adult slender loris. *Journal of Reproduction and Fertility*. 41 (2). 447-451.
- Dekel, N., Lawrence, T. S., Gilula, N. B., Beers, W. H. 1981. Modulation of cell-to-cell communication in the cumulus-oocyte complex and the regulation of oocyte maturation by LH. *Developmental Biology*. 86 (2). 356-362.

- Di Carlo, A., De Felici, M. 2000. A role for E-cadherin in mouse primordial germ cell development. *Developmental Biology*. 226. 209-219.
- Dolci, S., Pesce, M., De Felici, M. 1993. Combined action of stem cell factor, leukemia inhibitory factor, and cAMP on in vitro proliferation of mouse primordial germ cells. *Molecular Reproduction and Development*. 35 (2). 134-139.
- Dowling, R. J., Topisirovic, I., Alan, T., Bidinosti, M., Foneseca, B. D., Petroulakis, E., Wang, X., Larsson, O., Selvaraj, A., Liu, Y., Kozma, S. C., Thomas, G., Sonenberg, N. 2010. mTORC1-mediated cell proliferation, but not cell growth, controlled by the 4E-BPs. *Science*. 328. 1172-1176.
- Duke, K. L. 1967. Ovogenetic activity of the fetal-type in the ovary of the adult slow loris, *nycticebus coucang*. *Folia Primatologica*. 7 (2). 150-154.
- Duncan, A. W., Hanlon Newell, A. E., Smith, L., Wilson, E. M., Olson, S. B., Thayer, M. J., Strom, S. C., Grompe, M. 2012. Frequent aneuploidy among normal human hepatocytes. *Gastroenterology*. 142 (1). 25-28.
- Ellederova, Z., Kovarova, H., Mělo-Sterza, F., Licingstone, M., Tomek, W., Kubelka, M. 2006. Suppression of translation during in vitro maturation of pig oocytes despite enhanced formation of cap-binding protein complex eIF4F and 4E-BP1 hyperphosphorylation. *Molecular Reproduction and Development*. 73 (1). 68-76.
- Essayan, D. M. 2001. Cyclic nucleotide phosphodiesterases. *The Journal of Allergy and Clinical Immunology*. 108. 671-180.
- Ferrell, J. E. 1999. Xenopus oocyte maturation: new lessons from a good egg. *Bio Essays*. 21. 833-842.
- Fleischman, R. A. 1993. From white spots to stem cells: the role of the Kit receptor in mammalian development. *Trends in Genetics*. 9 (8). 285-290.
- Fulka, J. 2007. Savčí oocyt- nový pohled na staré dogma? *Živa*. 4. 148-150.
- Fülöp, C., Szántó, S., Mukhopadhyay, D., Bárdos, T., Kamath, R. V., Rugg, M. S., Day, A. J., Salustri, A., Hascall, V. C., Glan, T. T., Mikecz, K. 2003. Impaired cumulus mucification and female sterility in tumor necrosis factor-induced protein-6 deficient mice. *Development*. 130 (10). 2253-2261.
- García-Cruz, R., Brieño, M. A., Roug, I., Velilla, E., Pujol, A., Cabero, L., Pessarronda, A., Barbero, J. L., García Caldés, M. 2010. Dynamics of cohesin proteins REC8, STAG3, SMC1 beta and SMC3 are consistent with a role in sister chromatid cohesion during meiosis in human oocytes. *Humann Reproduction*. 25. 2316-2327.

- Gavin, A. C., Schorderet-Slatkine, S. 1997. Ribosomal S6 kinase p90rsk and mRNA cap-binding protein eIF4E phosphorylations correlate with MAP kinase activation during meiotic reinitiation of mouse oocytes. *Molecular Reproduction and Development*. 46 (3). 383-391.
- Gilbert, S. F. 2000. *Developmental Biology*. Palgrave Macmillan. P. 749. ISBN: 0878932437.
- Gingras, A. C., Gygi, S. P., Raught, B., Polakiewicz, R. D., Abraham, R. T., Hoekstra, M. F., Aebersold, R., Sonenberg, N. 1999. Regulation of 4E-BP1 phosphorylation: A novel two-step mechanism. *Genes & Development*. 13 (11). 1422-1437.
- Gingras, A. C., Raught, B., Gygi, S. P., Niedzwiecka, A., Miron, m., Burley, S. K., Polakiewicz, R. D., Wyslouch-Cieszynska, A., Aebersold, R., Sonenberg, N. 2001. Hierarchical phosphorylation of the translation inhibitor 4E-BP1. *Genes & Development*. 15 (21). 2852-2864.
- Godin, I., Wylie, C., Heasman, J. 1990. Genital ridges exert long-range effects on mouse primordial germ cell numbers and direction of migration in culture. *Development*. 108. 357-363.
- Gorre, N., Adhikari, D., Lindkvist, R., Brännströmm, M., Liu, K., Shen, Y. 2014. TORC1 signaling in oocytes is dispensable for the survival of primordial follicles and for female fertility. *PLoS One*. 9 (10). e110491. 1-5.
- Guertin, D. A., Sabatini, D. M., 2007. Defining the role of mTOR in cancer. *Cancer cell*. 12 (1). 9-22.
- Guertin, D. A., Stevens, D. M., Thoreen, C. C., Burds, A. A., Kalaany, N. Y., Moffat, J., Brown, M., Fitzgerald, K. J., Sabatini, D. M. 2006. Ablation in mice of the mTORC components raptor, rictor, or mLST8 reveals that mTORC2 is required for signaling to Akt-FOXO and PKCalpha, but not S6K1. *Developmental Cell*. 11 (6). 859-871.
- Haghghat, A., Sonenberg, N. 1997. eIF4G Dramatically Enhances the Binding of eIF4E to the mRNA 5'-Cap Structure. *The Journal of Biological Chemistry*. 272 (35). 21677-21680.
- Harman, S. M., Louvet, J. P., Ross, G. T., 1975. Interaction of estrogen and gonadotropins on follicular atresia. *Endocrinology*. 96 (5). 1145-1152.
- Hashimoto, N., Kishimoto, T. 1988. Regulation of meiotic metaphase by a cytoplasmic maturation-promoting factor during mouse oocyte maturation. *Developmental Biology*. 126 (2). 242-252.

- Hassold, T., Hunt, P. 2001. To err (meiotically) is human: the genesis of human aneuploidy. *Nature Reviews Genetics*. 2. 280-291.
- Hay, N., Sonenberg, N., 2004. Upstream of mTOR. *Genes & Development*. 18. 1926-1945.
- Hernández-Hernández, A., Hernández, R. O., Vázquez-Nin, G. H. 2012. Epigenetics of the synaptonemal complex. In: Swan, A., Meiosis-molecular mechanisms and cytogenetic diversity. In Tech. Rijeka. p. 3-15. ISBN: 978 9535101185.
- Holt, J. E., Tran, S. M., Stewart J. L., Minahan, K., García-Higuera, I., Moreno, S., Jones, K. T. 2011. The APC/C activator FZR1 coordinates the timing of meiotic resumption during prophase I arrest in mammalian oocytes. *Development*. 138 (5). 905-913.
- Hoshino, Y., Sato, E. 2008. Protein kinase B (PKB/Akt) is required for the completion of meiosis in mouse oocytes. *Developmental Biology* 314. 215-223.
- Hoshino, Y., Yokoo, M., Yoshida, N., Sasada, H., Matsumoto, H., Sato, Eimei, S. 2004. Phosphatidylinositol 3-kinase and Akt participate in the FSH-induced meiotic maturation of mouse oocytes. *Molecular Reproduction and Development*. 69. 77-86.
- Hotchkiss, C. The Process of Meiosis - SP14. OpenStax CNX. [online]. 3. 1. 2014. [cit. 2015-2-10]. Dostupné z [http://cnx.org/contents/741c9253-25a7-4537-900c-652a16f1777d@1/The\\_Process\\_of\\_Meiosis\\_-\\_SP14](http://cnx.org/contents/741c9253-25a7-4537-900c-652a16f1777d@1/The_Process_of_Meiosis_-_SP14)
- Chen, J., Melton, C., Suh, N., Oh, J. J., Horner, K., Xie, F., Sette, C., Bielloch, R., Conti, M. 2011. Genome-wide analysis of translation reveals a critical role for deleted in azoospermia-like (*Dazl*) at the oocyte-to-zygote transition. *Genes & Development*. 25 (7). 755-766
- Cho, W. K., Stern, S., Biggers, J. D. 1974. Inhibitory effect of dibutyryl cAMP on mouse oocyte maturation in vitro. *Journal of Experimental Zoology*. 187 (3). 383-386.
- Jagarlamudi, K., Rajkovic, A. 2012. Oogenesis: Transcriptional regulator and mouse model. *Molecular and Cellular Endocrinology*. 356. 31-39.
- Johnson, J., Bagley, J., Skaznik-Wikiel, M., Lee, H. J., Adams, G. B., Niikura, Y., Tschudy, M. L., Tilly, J. C., Cortes, M. L., Forkert, R., Spitzer, T., Iacomini, J., Scaddeln D. T., Tilly, J. L. 2005. Oocyte generation in adult mammalian ovaries by putative germ cells in bone marrow and peripheral blood. *Cell*. 122 (2). 303-315.

- Johnson, J., Canning, J., Kaneko, T., Pru, J. K., Tilly, J. L. 2004. Germline stem cells and follicular renewal in the postnatal mammalian ovary. *Nature*. 428 (6979). 145-150.
- Jones, K. J., Lane, S. I. R., 2013. Molecular causes of aneuploidy in mammalian eggs. *Development*. 140. 3719-3730.
- Kalous, J., Kubelka, M., Šolc, P., šušor, A., Motlik, J. 2009. AKT (protein kinase B) is implicated in meiotic maturation of porcine oocytes. *Reproduction (Cambridge, England)*. 138 (4). 645-654.
- Kang, M. K., Han, S. J. 2011. Post-transcriptional and post-translational regulation during mouse oocyte maturation. *BMB reports*. 44 (3). 147-157.
- Karim, M. M., Hughes, J. M. X., Warwicker, J., Scheper, G. C., Proud, C. G., McCarthy, J. E. G. 2001. A quantitative molecular mechanism for modulation of mammalian translation by the eIF4E-binding protein 1. *Journal of Biological Chemistry*. 276. 20750-20757.
- Kim, S., Kang, J., Qiao, J., Thomas, R. P., Evers, B. M., Chung, D. H. 2004. Phosphatidylinositol 3-kinase inhibition down-regulates Survivin and facilitates TRAIL-mediated apoptosis in neuroblastomas. *Journal of Pediatric Surgery*. 39 (4). 516-521.
- Kleen, K. C., Distel, R. J., Hecht, N. B. 1984. Translational regulation and deadenylation of a protamine mRNA during spermiogenesis in the mouse. *Developmental Biology*. 1. 71-79.
- Kogasaka, Y., Hoshino, Y., Hiradate, Y., Tanemura, K., Sato, E. 2013. Distribution and association of mTOR with its cofactors, raptor and rictor, in cumulus cells and oocytes during meiotic maturation in mice. *Molecular Reproduction and Development*. 75. 356-366.
- Kühn, U., Grundel, M., Knoth, A., Krewitz, Y., Rudel, S., Wahle, E. 2009. Poly(A) tail length is controlled by the nuclear poly(A)-binding protein regulating the interaction between poly(A) polymerase and the cleavage and polyadenylation specificity factor. *Journal of Biological Chemistry*. 284 (34). 22803-22814.
- Latham, E. K., Schultz, M. R. 2001. Embryonic genome activation. *Frontier in Bioscience*. 6. 748-759.

- Lazaris-Karatzas, A., Montine, K. S., Sonnenberg, N. 1990. Malignant transformation by a eukaryotic initiation factor subunit that binds to mRNA 5' cap. *Nature*. 345 (6275). 544-547.
- Lee, J., Iwai, T., Yokota, T., Yamashita, M. 2003. Temporally and spatially selective loss of Rec8 protein from meiotic chromosomes during mammalian meiosis. *Journal of Cell Science*. 116 (13). 2781-2790.
- Lee, S. E., Sun, S. C., Choi, H. Y., Uhm, S. J., Kim, N. H. 2012. mTOR is required for asymmetric division through small GTPases in mouse oocytes. *Molecular Reproduction and Development*. 75. 356-366.
- Lin, T. A., kong, X., Haystead, T. A., Pause, A., Belsham, G., Sonenberg, N., Lawrence, J. C. 1994. PHAS-I as a link between mitogen-activated protein kinase and translation initiation. *Reproduction*. 266 (5185). 653-656.
- Lincoln, A. J., Wickramasinghe, D., Stein, P., Schultz, R. M., Palko, M. E., De Miguel, M. P., Tessarollo, L., Donovan, P. J. 2002. Cdc25b phosphatase is required for resumption of meiosis during oocyte maturation. *Nature Genetics*. 30 (4). 446-449
- Marston, A. L., Amon, A. 2004. Meiosis: cell- cycle control shuffle and deal. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*. 5. 983-997.
- Matsuo, H., Li, H., MCGuire, A. M., Fletcher, C. M., Gingras, A-C., Sonenberg, N., Wagner, G. 1997. Structure of translation factor eIF4E bound to m7GDP and interaction with 4Ebinding protein. *Nature Structural Biology*. 4 (9). 717-724.
- Mayer, S., Wrenzycki, C., Tomek, W. 2014. Inactivation of mTor Arrests Bovine Oocytes in the Metaphase-I Stage, Despite Reversible Inhibition of 4E-BP1 Phosphorylation. *Molecular Reproduction and Development*. 81. 363-375.
- Merriman, J. A., Jennings, P. C., McLaughlin, E. A., Jones, K. T. 2012. Effect of aging on superovulation efficiency, aneuploidy rates, and sister chromatid cohesion in mice aged up to 15 months. *Biology of Reproduction*. 86 (49). 1-6.
- Millevoi, S., Vagner, S. 2010. Molecular mechanisms of eukaryotic pre-mRNA 3' end processing regulation. *Nucleic Acids Research*. 38 (9). 2757-2774.
- Molyneaux, K. A., Zinsner, H., Kunwar, P. S., Schaible, K., Stebler, J., Sunshine, M. J., O'Brien, W., Raz, E., Littman, D., Wylie, C., Lehmann, R. 2003. The chemokine SDF1/CXCL12 and its receptor CXCR4 regulate mouse germ cell migration and survival. *Development* 130. 4279-4286.

- Molyneaux, K., Wylie, C. 2004. Primordial germ cell migration. *International Journal of Developmental Biology*. 48. 537-544.
- Morita, Y., Manranaro, T. F., Tao, X. J., Martimbeau, S., Donahoe, P. K., Tilly, J. L. 1999. Requirement for phosphatidylinositol-3'-kinase in cytokiny-mediated germ cell survival during fetal oogenesis in the mouse. *Endocrinology*. 140 (2). 941-949
- Morley, S. J. 1997. Intracellular signalling pathways regulating initiation factor eIF4E phosphorylation during the activation of cell growth. *Biochemical Society Transaction*. 25 (2). 503-509.
- Morley, S. J., Naegele, S. 2002. Phosphorylation of eukaryotic initiation factor (eIF) 4E is not required for de novo protein synthesis following recovery from hypertonic stress in human kidney cells. *The Journal of Biological Chemistry*. 277 (36). 32855-32859.
- Müller, D., Lasfargues, C., El Khawand, S., Alard, A., Schneider, R. J., Bousquet, C., Pyronnet, S., Martineau, Y. 2013. 4E-BP restrains eIF4E phosphorylation. *Translation*. 1 (2). e25819-e25819-7.
- Norris, R. P., Freudzon, M., Mehlmann, L. M., Cowan, A. E., Simon, A. M., Paul, D. L., Lampe, P. D., Jaffe, L. A. 2008. Luteinizing hormone causes MAP kinase-dependent phosphorylation and closure of connexin 43 gap junctions in mouse ovarian follicles: one of two paths to meiotic resumption. *Development*. 135 (19). 3229-3238.
- Norris, R. P., Ratzan, W. J., Freudzon, M., Mehlmann, L. M., Krall, J., Movsesian, M. A., Wang, H., Ke, H., Nikolaev, V. O., Jaffe, A. L. 2009. Cyclic GMP from the surrounding somatic cells regulates cyclic AMP and meiosis in the mouse oocyte. *Development*. 136. 1869-1878.
- Ovaries: differentiation. In: Online course in embryology for medicine students. Universities of Fribourg Lausanne and Bern (Switzerland). [online]. [cit. 2015-2-10]. Dostupné z <http://www.embryology.ch/anglais/ugenital/diffmorpho03.html#anchaut>
- Pan, H., Ma, P., Zhu, W., Schultz, R. M. 2008. Age-associated increase in aneuploidy and changes in gene expression in mouse eggs. *Developmental Biology*. 316 (2). 397-407.
- Pause, A., Belsham, J. G., Gingras, A. C., Donzé, O., Lin, T., Lawrence, J. C., Sonenberg, N. 1994. Insulin-dependent stimulation of protein synthesis by phosphorylation of a regulator of 5'-cap function. *Nature*. 371. 762-767.



- Pelletier, J., Sonenberg, N. 1988. Internal initiation of translation eukaryotic mRNA directed by a sequence derived from poliovirus RNA. *Nature*. 334 (6180). 320-325.
- Pestova, T, V., Hellen, C. U. T. 2000. The structure and function of initiation factors in eukaryotic protein synthesis. *Cellular and Molecular Life Science* 57 (4). 651-674.
- Poulin, F., Gingras, A-C., Olsen, H., Chevalier, S., Sonenberg, N., 1998. *The Journal of Biological Chemistry*. 273 (22). 14002-14007.
- Prieto, I., Tease, C., Pezzi, N., Buesa, J. M., Ortega, S., Kremer, L., Martínez, A., Martínez-A, C., Hultén, M. A., Barbero, J. L. 2004. Cohesin component dynamics during meiotic prophase I in mammalian oocytes. *Chromosome Research*. 12 (3). 197-213.
- Pyronnet, S., Dostie, J., Sonenberg, N. 2001. Supresion of cap-dependent translation in mitosis. *Genes and Development*. 15 (16). 2083-2093.
- Pyronnet, S., Pradayrol, L., Sonenberg, N. 2000. A cell cycle-dependent internal ribosome entry site. *Molecular Cell*. 5 (4). 607-616.
- Racowsky, C. 1985. Effect of forskolin on the spontaneous maturation and cyclic AMP content of hamster oocyte-cumulus complexes. *Journal of Experimental Zoology*. 234 (1). 87-96.
- Rau, M., Ohlmann, T., Morley, S. J., Pain, V. M. 1996. A Reevaluation of the Cap-binding Protein, eIF4E, as a Rate-limiting Factor for Initiation of Translation in Reticulocyte Lysate. *The Journal of Biological Chemistry*. 271 (15). 8983-8990.
- Reddy, P., Shen, L., Ren, C., Boman, K., Lundin, E., Ottander, U., Lindgren, P., Liu, Y. X., Sun, Q. Y., Liu, K. 2005. Activation of Akt (PKB) and suppression of FKHRL1 in mouse and rat oocytes by stem cell factor during follicular activation and development. *Developmental Biology*. 281 (2). 160-170.
- Renner, A. G., Créancier, L., Santos, C. D., Fialin, C., Recher, C., Bailly, C., Kruczynski, A., Payrastre, B., Manenti, S. 2010. A functional link between polo-like kinase 1 and the mammalian target-of-rapamycin pathway? *Cell Cycle*. 9 (9). 1690-1696.
- Romasko, E. J., Amarnath, D., Midic, U., Latham, E. 2013. Association of maternal mRNA and phosphorylated EIF4EBP1 variants with the spindle in mouse oocytes: localized translational control supporting female meiosis in mammals. *Genetics* 195 (2). 349-358.

- Rong, L., Livingstone, M., Sukarieh, R., Petroulakis, E., Gingras, A-C. crosby, K., Smith, B., Polakiewicz, R. D., Pelletier, J., Ferraiuolo, M. A., Sonenberg, N. 2008. Control of eIF4E cellular localization by eIF4E-binding proteins, 4E-BPs. *RNA*. 14 (7). 1318-1327.
- Rucker, E. B., Dierisseau, P., Wagner, K. U., Garrett, L., Wynshaw-Boris, A., Flaws, J. A., Hennighausen L. 2000. Bcl-x and Bax regulate mouse primordial germ cell survival and apoptosis during embryogenesis. *Molecular Endocrinology*. 14 (7). 1038-1052.
- Sabassov, D. D., Ali, S. M., Sabatini, D. M. 2005. Growing roles for the mTOR pathway. *Current opinion in cell biology*. 17 (6). 596-603.
- Sánchez, F., Smitz, J. 2012. Molecular control of oogenesis. *Biochimica et Biophysica Acta*. 1822. 1896-1912.
- Sela-Abramocich, S., Chorev, E., Galiani, D., Dekel, N. 2005. Mitogen-activated protein kinase mediates luteinizing hormone-induced breakdown of communication and oocyte maturation in rat ovarian follicles. *Endocrinology*. 146 (3). 1236-1244.
- Selesniemi, K., Lee, H. J., Muhlhauser, A., Tilly, J. L. 2011. Prevention of maternal aging-associated oocyte aneuploidy and meiotic spindle defects in mice by dietary and genetic strategies. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 108 (30). 12319-12324.
- Shang, Z. F., Yu, L., Li, B., Tu, W. Z., Wang, y., Liu, X. D., Guan, H., Huang, B., Rang, W. Q., Zhou, P. K. 2012. 4E-BP1 participates in maintaining spindle integrity and genomic stability via interacting with PLK1. *Cell Cycle*. 11 (18). 3463-3471.
- Schramm, S., Fraune, J., Naumann, R., Hernandez-Hernandez, A., Höög, C., Cooke, H. J., Alsheimer, M., Benavente, R. 2011. A novel mouse synaptonemal complex protein is essential for loading of central element proteins, recombination, and fertility. *PLoS Genet*. 7 (5). e1002088.
- Schultz, R. M., LaMarca, M. J., Wassarman, P. M. 1978. Absolute rates of protein synthesis during meiotic maturation of mammalian oocytes in vitro. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 75 (9). 4160-4164.
- Siemer, C., Smijakovic, T., Bhojwani, M., Leiding, c., Kanitz, W., Kubelka, M., Tomek, W. 2009. Alalysis of mRNA associated factors during bovine oocyte maturation and early embryonic development. *Molecular Reproduction and Development*. 76. 1208-1219.

- Šolc, P., Kitajima, T. S., Yoshida, S., Brzakova, A., Kaido, M., Baran, V., Mayer, A., Samalova, P., Motlik, J., Ellenberg, J. 2015. Multiple requirements of PLK1 during mouse oocyte maturation. *PLoS One*. 10 (2). e0116783.
- Sonenberg, N., Hinnebusch, A. G. 2009. Regulation of Translation Initiation in Eukaryotes: Mechanisms and Biological Targets. *Cell*. 136 (4). 731-745.
- Sorensen, R. A., Wasserman, P. M., 1976. Relationship between growth and meiotic maturation of the mouse oocyte. *Developmental Biology*. 50 (2). 531-536.
- Soyal, S. M., Amleh, A., Dean, J. 2000. FIGalpha, a germ cell-specific transcription factor required for ovarian follicle formation. *Development*. 127 (21). 4645-4654.
- Székvölgyi, L., Nicolas, A. 2010. From meiosis to postmeiotic events: homologous recombination is obligatory but flexible. *The FEBS Journal*. 277 (3). 571-589.
- Šušor, A., Jansova, D., Černa, R., Danylevska, A., Anger, M., Toralova, T., Malik, R., Supolikova, J., Cook, M. S., Oh, J. S., Kubelka, M. 2015. Temporal and spatial regulation of translation in the mammalian oocyte via the mTOR–eIF4F pathway. *Nature Communications*. 6 (6078). 1-12.
- Taieb, F., Thibier, C., Jesus, C. 1997. On cyclins oocytes, and eggs. *Molecular Reproduction and Development*. 48 (3). 397-411
- Tam, P. P. L., Snow, M. H. L. 1981. Proliferation and migration of primordial germ cells during compensatory growth in mouse embryos. *Journal of Embryology and Experimental Morphology*. 64. 133-147-
- Thoreen, C. C., Chantranupong, L., Keys, H. R., Wang, T., Gray, N. S., Sabatini, D. M. 2012. A unifying model for mTORC1-mediated regulation of mRNA translation. *Nature*. 485 (7396). 109-113.
- Tilly, J. L., Telfer, E. E. 2009. Purification of germline stem cells from adult mammalian ovaries: a step closer towards control of the female biological clock? *Molecular Human Reproduction*. 5 (7). 393-398.
- Tomek, W., Smiljakovic, T. 2005. Activation of Akt (protein kinase B) stimulates metaphase I to metaphase II transition in bovine oocytes. *Reproduction*. 130 (4). 423-430.
- Tomek, W., Sterza, M., Kubelka, M., Wollenhaupt, H., Torner, H., Anger, M., Kanitz, W. 2002. Regulation of Translation During In Vitro Maturation of Bovine Oocytes:

The Role of MAP Kinase, eIF4E (Cap Binding Protein) Phosphorylation, and eIF4E-BP1. *Biology of Reproduction*. 66 (5). 1274-1282.

- Vaccari, S., Horner, K., Mehlmann, L. M., Conti, M. 2008. Generation of mouse oocytes defective in cAMP synthesis and degradation: endogenous cyclic AMP is essential for meiotic arrest. *Developmental Biology*. 316 (1). 124-134.
- Van den Hurk, R., Zhao, J. 2005. Formation of mammalian oocytes and their growth, differentiation and maturation within ovarian follicles. *Theriology*. 63. 1717-1751.
- Vanderhyden, B. 2002. Molecular basis of ovarian development and function. *Frontiers in Bioscience*. 7. 2006-2022.
- Varani, S., Elvin, J. A., Yan, C., DeMayo, J., DeMayo F. J., Horton, M. C., Byrne, M. C., Matzuk, M. M. 2002. Knockout of pentraxin 3, a downstream target of growth differentiation factor-9, causes female subfertility. *Molecular Endocrinology*. 16 (6). 1154-1167.
- Vázquez-Nin, G. H., Echeverria, O. M., Ortiz, R., Scassellati, C., Martín, T. E., Ubaldo, E., Fakan, S. 2003. Fine structural cytochemical analysis of homologous chromosome recognition, alignment, and pairing in guinea pig spermatogonia and spermatocytes. *Biology of Reproduction*. 69 (4). 1362-1379.
- Vitale, A. M., Yurtas, P., Fitzhenry, R. J., Cohen-Gould, L., Wu, W., Gossen, J. A., Coonrod, S. A. 2008. Role for PADI6 and the CPLs in ribosomal storage in oocytes and translation in early embryo. *Development*. 135 (15). 2627-2636.
- Vivarelli, E., Conti, M., De Felici, M., Siracusa, G. 1983. Meiotic resumption and intracellular cAMP levels in mouse oocytes treated with compounds which act on cAMP metabolism. *Cell Differentiation*. 12 (5). 271-276.
- Von Manteuffel, S. R., Dennis, P. B., Pullen, N., Gingras, A. C., Sonenberg, N., Thomas, G. 1997. The insulin-induced signalling pathway leading to S6 and initiation factor 4E binding protein 1 phosphorylation bifurcates at a rapamycin-sensitive point upstream of p70S6k. *Molecular and Cellular Biology*. 17 (9). 5426-5436.
- Wang, X., Li, W., Parra, J. L., Beugnet, A., Proud, C. G. 2003. The C terminus of initiation factor 4E-Binding protein 1 contains multiple regulatory features that influence its function and phosphorylation. *Molecular and Cellular Biology*. 23 (5). 1546-1557.

- Waskiewicz, A. J., Flynn, A., Proud, C. G., Cooper, A., 1997. Mitogen-activated protein kinases activate the serine/threonine kinases Mnk1 and Mnk2. *EMBO journal*. 16 (8). 1909-1920
- Waskiewicz, A. J., Johnson, J. C., Penn, B., Mahalingam, M., Kimball, S. R., Cooper, J. A. 1999. Phosphorylation of the cap-binding protein eukaryotic translation initiation factor 4E by protein kinase Mnk1 in vivo. *Molecular and Cell Biology*. 19 (3). 18071-1880.
- Winkel, K., Alsheimer, M., Benavente, R. 2009. Protein SYCP2 provides a link between transverse filaments and lateral elements of mammalian complexes. *Chromosoma*. 118 (2). 259-267.
- Winslow, T., Duckwall, C. 2001. Figure A.5. Development of mouse Embryonic primordial germ cells. In: Appendix A: National Institute of Health, U.S. Department of Health and Human Services, [online]. 2009. [cit. 2015-3-31]. Dostupné z <http://stemcells.nih.gov/info/scireport/pages/appendixA.aspx>.
- Yip, C. K., Murata, K., Walz, T., Sabatini, D. M., Kang, S. A. 2010. Structure of the human mTOR complex I and its implications for rapamycin inhibition. *Molecular Cell*. 38 (5). 768-774.
- Yonezawa, K., Yoshino, K. I., Tokunaga, C., Hara K. 2004. Kinase activities associated with mTOR. *Current topics in microbiology and immunology*. 279. 271-282.
- Zhang, H., Zheng, W., Shen, Y., Adhikari, D., Ueno, H., Liu, K. 2012. Experimental evidence showing that no mitotically active female germline progenitors exist in postnatal mouse ovaries. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 109 (31). 12580-12585.
- Zou, K., Yuan, Z., Lou, H., Sun, K., Zhou, L., Xiang, J., Shi, L., Yu, Q., Zhang, Y., Hou, R., Wu, J. 2009. Production of offspring from a germline stem cell line derived from neonatal ovaries. *Nature Cell Biology*. 11 (5). 631-636.
- Zuberek, J., Wyslouch-Ceszynska, A., Niedzwiecka, A., Dadlez, M., Stepinski, J., Augustyniak, W., Gingras, A. C., Zhang, Z., Burley, S. K., Sonenberg, N., Stolarski, R., Darzynkiewicz, E. 2003. Phosphorylation of eIF4E attenuates its interaction with mRNA 5' cap analogs by electrostatic repulsion: Intein-mediated protein ligation strategy to obtain phosphorylated protein. *RNA* 9. 52-61.

- Zuckerman, S., Baker, T. G., 1977. The development of ovary and the process of oogenesis. In: Zuckerman, S., Weir, B., J. The ovary. New York, Academic press. 2 vydání. p. 41-67. ISBN: 9780127826035.

## 9. Seznam použitých zkratk

4E-BP1- eIF4E binding protein 1

4E-BPs- eukaryotic translation initiation factor- binding proteins

5' TOP- 5' terminal oligopyrimidine motivem

AA- amino kyseliny

AHR- aryl-hydrocarbonovými receptory

APC/C- anaphase-promoting complex/cyclosome

ATM/ATR- ataxia telangiectasia mutated/AT a Rad3-related protein

BAX- B-cell lymphoma 2 associated X protein

BCL-2- B-cell lymphoma 2

BCL-X- B-cell lymphoma x

BMP-4, BMP-8b, BMP-2- Bone morfogenetic protein 4, 8b a 2

cAMK- cyklický adenosin monofosfát

CCNB1- G2/mitotic-Specific Cyclin B1

CDC14- cell division cycle 14

CDC25B- cell division cycle 25B

CDH1- Katherin 1

CE- centrální element synaptonemálního komplexu

cGMP- cyklický guanosin monofosfát

c-KIT- KIT ligand/Steel factor /stem cell factor/ KL

CLPs- cytoplazmic lantices

CNP- C-type natriuretic peptide

CPEB- cytoplasmatic polyadenylation element-binding

CPSF- cleavage and polyadenylation specificity factor

CR- jedním centrálním regionem synaptonemalního komplexu

*Cxcr4* - gen pro chemokine receptor type 4

DAZL- deleted in azoospermia-like

DDX4- DEAD (Asp-Glu-Ala-Asp) box polypeptide 4/vasa/MVH

DEPTOR- DEP domain-containing mTOR-interacting protein

DMC1- disrupted meiotic cDNA1

DPPA3 - developmental Pluripotency Associated 3

eCG- equine chorionic gonadotropin

EGF-like - epidermal growth factor- like

eIF2- eukaryotic initiation factors 2

eIF3- eukaryotic initiation factors 3

eIF4A- eukaryotic initiation translation factor 4A

eIF4E- eukaryotic initiation translation factor 4E

eIF4F- eukaryotic translation initiation factor 4Fcomplex

eIF4G- eukaryotic initiation translation factor 4G

eIF4GI, eIF4GII a eIF4GIII- podjednotky proteinu eIF4G

*ErbB2, ErbB3*- geny pro epidermal growth factor 2 a 3

ERK- extracellular-signal-regulated kinases

ERK/MAPK- dráha přes extracellular-signal-regulated kinases a Mitogen-activated protein kinases

FAS ligand- ligand pro FAS receptory (FASL/CD95L/CD178)

FBF-basic - basic fibroblast growth factor

FGF-2- fibroblast growth factor



FIG-alfa- factor in the germline alpha

FIGLA- folliculogenesis Specific Basic Helix-Loop-Helix

FOXL2- forkhead box L2

FOXO3- forkhead box O3

FRSK- forskolin

FSH- folikuly stimulační hormon

GFP- green fluorescent protein

GSCs- female germline stem cells

GV- germinal vesicle (stádium oocyty)

HAS2- hyaluronan synthase 2

hCG- humane chorionic gonadotropine

IFITM3- interferon-induced transmembrane protein 3/fragilis

GTP- guanosine-5'-triphosphate

IBMX- 3-isobutyl-1-methylxanthine

IGF-I- insulin-like growth factor 1

IL-4 - interleukine 4

IRES- internal ribosome entry site

KLU- klumpfuss

LE -laterálními elementy synaptonemálního komplexu

LH - luteinizační hormon

LHX8- LIM homeobox 8

LIF- leukemia inhibiting factor

LIF- leukemia inhibitory factor

LMN- Lamín

M16- kultivační medium

MI- metafáze prvního meiotického dělení

MII- metafáze druhého meiotického dělení

MIS- müllerian-inhibiting substance

mLST8- mamalian lethal with sec-13 protein 8; GβL

MNK1- MAP kinase-interacting kinase 1

MNK2- MAP kinase-interacting kinase 2

MOS- antisense morpholino oligonukleotid

MPF- maturation promotin factor

MSH5- mutS protein homologue 5 (Escherichia coli)

mSIN1- mammalian stress-activated protein kinase interacting protein 1

mTOR - mamalian target of rapamycin

mTORC1- mTOR complex1

mTORC2- mTOR complex2

NEBD- nuclear envelope breakdown

NOBOX- ogenesis homeobox

NPR2- natriuretic peptide receptor 2

OSCs- oogonial stem cells

OSE- ovariálního povrchového epitelu)

p34CDC2/CDK1- cell division cycle protein 2 homolog/cyclin dependent kinase

PABP- poly(A) binding protein

PABPN1- poly(A) binding protein 2/poly(A) binding nuclear protein 1

PACAP- pituitary adenylate cyclase activating peptide

PAP- poly(A) polymeraza

PB- pólóvé tělísko

PBS- phosphate buffered saline

PDE3A- phosphodiesterase 3A

PGCs – primordial germ cell

PI3K- phosphatidylinositol-3-kinases

PI3K/AKT- dráha přes phosphatidylinositol-3-kinases a protein kinazu B

PIC- preiniciační komplex

PK- protein-kináza A

PIK1- pololike kinase 1

PRAS40- proline-rich AKT substrate 40kDa

Pro-MI- prometafáze i meiotického dělení

PRR4/protor- proline rich 4 renal/ protein observed with rictor-1

PTX3- pentraxin 3

PVA- polyvinylalkohol

RAPTOR- regulatory-associated protein of mTOR

REC8- meiotic recombination protein

RICTOR- rapamycin-insensitive companion of mTOR

RN- rekombinační uzel (nodus) synaptonemálního komplexu

RNPs- ribonucleoprotein

S6K1- ribosomal protein S6 kinase

SCC1/RAD21- sister chromatid cohesion protein 1/double-strand-break repair protein

SCF- stem cell factor

SCF- stem cell factor

SDF-1 - stromal cell derived factor 1

SMC1beta- structural maintenance of chromosomes 1 beta

SMC3- structural maintenance of chromosomes 3

SOHLH1- spermatogenesis and oogenesis specific basic helix-loop-helix 1

SOHLH2- spermatogenesis and oogenesis specific basic helix-loop-helix 2

SPO11- sporulation-specific protein 11

SPO13- sporulation-specific protein 13

STAG3- stromal antigen 3

SUMO- small ubiquitin-like modifier

SYCE1- synaptonemal complex central element protein 1

SYCE2- synaptonemal complex central element protein 2

SYCE3- synaptonemal complex central element protein 3

SYCP1- synaptonemal complex protein 1

SYCP2- synaptonemal complex protein 2

SYCP3- synaptonemal complex protein 3

TEX12- testis expressed 12

TGF $\beta$  - transforming growth factor  $\beta$

TGF- $\beta$ 1-like- protein transforming growth factor  $\beta$ 1- like

TM- transfer médium

TNFAIP6- tumor necrosis factor appha-induced protein 6

TNF-beta1 - tumor necrosis factor beta1

TNF-beta2 - tumor necrosis factor beta2

TNF $\alpha$ - tumor necrosis factor

WB- western blot

## 10. Seznam obrázků

- Obrázek 1. Migrace primordiálních zárodečných buněk u embrya myši (str. 11)
- Obrázek 2. Raný vývoj ženských pohlavních orgánů (str. 13)
- Obrázek 3. Připojení telomer k jaderné membráně během fáze zygotene (str. 17)
- Obrázek 4. Synaptonemální komplex (str. 18)
- Obrázek 5. Vytváření chiasmat a proces crossing over (str. 19)
- Obrázek 6. Redukce genetické informace během meiotického dělení myšního oocyty (str. 24)
- Obrázek 7. Abnormální dělicí vřeténko jako možný důvod aneuploidie u oocyty v meioze I (str. 26)
- Obrázek 8. Aktivita transkripce v oocyty a v rané embryogenezi (str. 28)
- Obrázek 9. Průběh fosforylace proteinu 4E-BP1 (str. 37)
- Obrázek 10. Lokalizace globálního 4E-BP1 (str. 47)
- Obrázek 11. Lokalizace globální 4E-BP1 v GV stadiu (str. 48)
- Obrázek 12. Lokalizace fosforylace 4E-BP1 na threoninu 36/45 (str. 49)
- Obrázek 13. Lokalizace fosforylace 4E-BP1 na serinu 64 (str. 50)
- Obrázek 14. Lokalizace fosforylace 4E-BP1 na threoninu 69 (str. 51)
- Obrázek 15. Detail fosforylace (T69) kolem dělicího vřeténka u oocytů v NEBD (str. 52)
- Obrázek 16. Detail fosforylace (T69) v pólech dělicího vřeténka u oocytů pro-MI (str. 52)
- Obrázek 17. Western blott fosforylace 4E-BP1 a aktivace proteinu mTOR (str. 54)
- Obrázek 18. Vliv aktivace mTOR na fosforylaci 4E-BP1 (str. 56)
- Obrázek 19. Lokalizace aktivní fosforylovaného AKT (S473) (str. 57)
- Obrázek 20. Lokalizace aktivní fosforilované mTOR (S2448) (str. 57)
- Obrázek 21. Změna fosforylace 4E-BP1 u oocytů při inhibici Rapamycinem a BI (str. 58)
- Obrázek 22. Vliv inhibitorů rapamycinu a BI na dráhu mTOR (str. 58)

Obrázek 23. 4E-BP1 a jeho fosforylace v kumulárních buňkách (str. 60)

Obrázek 24. Detekce 4E-BP1 v CCs na western blotu (str. 60)