

ČESKÁ ZEMĚDĚLSKÁ UNIVERZITA V PRAZE

Fakulta agrobiologie, potravinových a přírodních zdrojů

Katedra veterinárních disciplín



**Úloha regulace translace specifických mRNA a
fosforylačně=defosforylačních mechanismů během meiotického
zrání savčích oocytů a časného embryonálního vývoje.**

.....

doktorská disertační práce

Autor: Ing. Barbora Procházková

Školitel: prof. Mgr. Ing. Markéta Sedmíková, Ph.D.

Konzultant: Ing. Michal Kubelka, CSc., ÚŽFG AV ČR

Praha 2018

Prohlášení

Prohlašuji, že jsem disertační práci na téma „Úloha regulace translace specifických mRNA a fosforylačně=defosforylačních mechanismů během meiotického zrání savčích oocytů a časného embryonálního vývoje“ vypracovala samostatně a použila jen pramenů a literatury, které cituji a uvádím v příloženém Seznamu použité literatury.

V Praze dne

.....

Ing. Barbora Procházková

Poděkování

Ráda bych touto cestou poděkovala své školitelce prof. Ing. Mgr. Markétě Sedmíkové, Ph.D., za vedení mého doktorského studia, ochotu a rovněž za to, že mi umožnila vykonávat experimentální část této práce na Ústavu živočišné fyziologie a genetiky Akademie věd ČR, v. v. i. Mé další velké dík patří mému konzultantovi Ing. Michalovi Kubelkovi, CSc. za vedení a pomoc při plánování a realizaci experimentů, za sáhodlouhé konzultace a za vstřícný přístup. V neposlední řadě bych chtěla poděkovat kolektivu zaměstnanců ÚŽFG AV ČR, za příjemnou spolupráci a podporu během postgraduálního studia. Další dík patří ČZU za financování mého studijního pobytu na Institute for Research in Biomedicine v Barceloně, což bylo pro mé studium i profesní kariéru cennou zkušeností. Poděkovat bych chtěla také své rodině a přátelům za psychickou podporu během celého mého studia.

Úloha regulace translace specifických mRNA a fosforylačně=defosforylačních mechanismů během meiotického zrání savčích oocytů a časného embryonálního vývoje.

Souhrn

Meotické zrání oocytů a embryogeneze patří k nejdůležitějším fyziologickým procesům, které hrají zásadní roli v zachování všech živočišných druhů. V průběhu zrání oocytů je potlačena transkripce a exprese genů je tak řízena na úrovni translace. Pro správný průběh a kontrolu zrání oocytů a časnou embryogenezi jsou rozhodující posttranskripční regulace mateřských mRNA a posttranslační regulace proteinů. Translační kontrola ovlivňuje základní mechanismus syntézy bílkovin a pro pochopení její regulace je nutná znalost všech klíčových komponent, které jsou součástí tohoto mechanismu. Translace maternálních mRNA se odvíjí od jejich časově specifické cytoplazmatické polyadenylace a od jejich interakce s RNA-vazebnými proteiny, zejména pak s proteiny z rodiny CPEB. Cytoplazmatické polyadenylační elementy vázající proteiny (CPEB) se váží na 3'-konec mRNA a regulují její lokalizaci a translaci a jsou tak nezbytné pro správný vývoj.

Průběh meiotického zrání je však řízen celou kaskádou regulačních molekul a komplexů. Důležitými regulačními proteiny meiotického zrání jsou také členové Emi/Erp rodiny – proteiny Emi1 a Emi2. Jejich hlavní úlohou je regulace meiotického (ale i mitotického) dělení přímou inhibicí APC/C (anaphase promoting komplex/cyclosome), který má za úkol spouštění rozestupu chromosomů do dceřiných buněk. Emi1 i Emi2 jsou důležitou součástí CSF (cytostatic factor), který má za úkol stabilizaci a udržení MPF (metaphase promoting factor), během anafáze II, která je nezbytná pro zastavení meiózy a vytvoření meiotického bloku.

Cílem mé disertační práce bylo zmapovat a porovnat expresi a aktivitu Emi1 a Emi2 proteinů a regulaci jejich genové exprese, která významně ovlivňuje správný průběh meiózy i mitozy. Dále bylo cílem práce doplnit chybějící informace o CPEB proteinech a zmapovat jejich expresi, fosforylaci a funkci v reprodukci savců. Zejména jsme se zaměřili na protein CPEB2, jehož funkce během těchto procesů nebyla doposud dobře zmapována. Cílem práce bylo také testování nových makrocyclických inhibitorů Emi2 na bázi pyrrolů, které byly vivinuty ve spolupráci s Dr. Bangem, Dr. Gunasekaranem a dalšími z KBSI (Korea Basic Science Institute).

Výsledky naší práce byla potvrzena hypotéza, že se exprese Emi1 a Emi2 proteinů liší mezi jednotlivými fázemi meiotického zrání myších a prasečích oocytů a že exprese Emi1 a Emi2 proteinů je v přímé korelaci s polyadenylací 3' konce jejich mRNA. Zásadními posttranskripčními úpravami, jež u nich regulují genovou expresi, je tedy právě polyadenylace.

Byly rovněž potvrzeny hypotézy, že exprese Emi1 proteinu přetrvává i po fertilizaci či parthenogenetické aktivaci oocytů a že proteinu Emi2 je po fertilizaci či parthenogenetické aktivaci oocytů degradován a k jeho reakumulaci dochází až během prvních cyklů mitózy. Zároveň bylo ověřeno, že zablokování Polo-box domény Plk1 malými makrocyclickými inhibitory zabrání fosforylaci Emi2 a sníží tak procento myších a prasečích oocytů maturovaných do MII fáze.

Co se týče výzkumu cytoplazmatické polyadenylační elementy vázajících proteinů, byla ověřena hypotéza, že se exprese CPEB2 mRNA i proteinu liší v jednotlivých fázích meiotického zrání prasečích oocytů a stádií ranných parthenogenetických embryí a je pro jejich zdárný vývoj nezbytná. Také byla ověřena hypotéza, že i v prasečích oocytech jsou dvě formy CPEB2 transkriptu – CPEB2A a CPEB2B. Nicméně hypotéza, že se po zablokování CPEB2 zvýší exprese ostatních cytoplazmatické polyadenylační elementy vázajících proteinů z CPEB2 subrodiny (CPEB3, CPEB4) a částečně tedy nahradí jeho funkci, byla vyvrácena, i když bylo potvrzeno, že CPEB3 a CPEB4 transkripty jsou přítomny ve všech fázích meiotického zrání. Rovněž náš výzkum potvrdil hypotézu, že jediným členem CPEB2 subrodiny, jehož inhibice nemá letální vliv na meiotické zrání myších oocytů, je CPEB4 a potvrdili jsme tak již dříve diskutovanou možnost, že je jeho funkce u deficientních buněk nahrazena jiným mechanismem, což bude otázkou budoucího výzkumu.

Výsledky této práce pomohly objasnit jeden z klíčových procesů významně ovlivňujících správný průběh meiózy a molekulární mechanismy ovlivňující výstup oocytů z MII bloku a bezchybné zahájení embryonálního vývoje. Naše poznatky mohou rovněž přispět ke zlepšení podmínek in vitro kultivace oocytů a potažmo in vitro produkce embryí u savců.

Klíčová slova: meiotické zrání, oocyt, ranná embryogeneze, polyadenylace mRNA, translace, Emi1, Emi2, inhibitory Emi2, CPEB2, CPEB3, CPEB4,

The role of regulation translation specific mRNA and phosphorylation-anphosphorylation mechanisms during meiotic maturation of mammalian oocyte and embryonic development.

Summary

Oocyte meiotic maturation and embryogenesis belong to the most important physiological processes, which play a crucial role for preservation of life in all species. Oocytes undergoing meiotic maturation are transcriptionally silent and gene expression is therefore regulated at the level of translation. The post-transcriptional regulation of maternal mRNAs and post-translational regulation of proteins are critical to control oocyte maturation and early embryogenesis. Translational control affects the basic mechanism of protein synthesis and the knowledge of the key components, which are included in this machinery, is necessary for understanding its regulation. Cytoplasmic polyadenylation element binding proteins (CPEBs) bind to 3'-end of mRNAs to regulate their localization and translation and are necessary for proper development.

However, a whole cascade of regulatory molecules and complexes controls the progression of meiotic maturation. Important regulatory proteins of meiotic maturation are also two members of Emi/Erp family – proteins Emi1 and Emi2. Their main role is the regulation of meiotic (and mitotic) division by direct inhibition of APC/C (anaphase Promoting Complex/cyclosome). APC/C is responsible for triggering separation of chromosomes into the daughter cells. Emi1 and Emi2 are important parts of CSF (cytostatic factor), their task is to stabilize and maintain MPF (Metaphase Promoting Factor) during anaphase II, which is essential for stopping meiosis and for the establishment of meiotic block.

The aim of my dissertation was to map and compare the expression and activity of Emi1 and Emi2 proteins and explain the mechanism of their gene expression regulation, which significantly influences the correct course of meiosis and mitoses. Furthermore, the aim of the work was to supplement missing information about CPEB proteins and to map out their expression, phosphorylation and function in mammalian reproduction. We especially focused on CPEB2 protein, whose function has not been well mapped during these processes. The aim of the work was also to test the new pyrrole-based macrocyclic inhibitors of Emi2, which were

create in collaboration with Dr. Bangem, Dr. Gunasekaran and others from the Korea Basic Science Institute (KBSI).

The results of our work confirmed the hypothesis that the expression of Emi1 and Emi2 proteins differs between the phases of meiotic maturation of mouse and pig oocytes and that the expression of Emi1 and Emi2 proteins is in direct correlation with polyadenylation of 3' end of their mRNA. The fundamental post-transcriptional modifications that regulate gene expression are polyadenylation. Also has been confirmed the hypothesis that expression of Emi1 protein persists even after fertilization or parthenogenetic activation of oocytes, and that Emi2 protein is degraded after fertilization or parthenogenetic oocyte activation and his reactivation occurs during the first cycles of mitosis. At the same time, it was verified that blocking the Polo-box domain of Plk1 with small macrocyclic inhibitors prevents the phosphorylation of Emi2 and thus reduce the percentage of mouse and pig oocytes mature in the MII phase.

Regarding the research of CPEBs, the hypothesis, that expression of CPEB2 mRNA and protein differs in the phases of meiotic maturation of pig oocytes and stage of early parthenogenetic embryos and is necessary for their successful development, was verified. The hypothesis that in porcine oocytes are also two forms of CPEB2 transcripts - CPEB2A and CPEB2B was also confirmed. However, the hypothesis that CPEB2 inhibition will increase the expression of other cytoplasmic polyadenylation element binding proteins from CPEB2 subfamily (CPEB3, CPEB4) and partially replace its function was refuted, although it was confirmed that CPEB3 and CPEB4 transcripts are present in all phases of the meiotic maturation. Also was confirmed that only member of CPEB2 subfamily whose inhibition does not have a lethal effect on the meiotic maturation of mouse oocytes is CPEB4. Confirming the previously discussed possibility that its function in deficient cells is replaced by another mechanism, which will be a question of future research .

The results of this work helped clarify one of the key processes significantly influencing the correct course of meiosis and the molecular mechanisms affecting the output of oocytes from the MII block and the flawless embryonic development. Our findings can also contribute to improving the conditions of in vitro oocyte culture and, consequently, in vitro mammalian embryo production.

Keywords: meiotic maturation, oocyte, early embryogenesis, mRNA polyadenylation, translation, Emi1, Emi2, inhibitors of Emi2, CPEB2, CPEB3, CPEB4

Obsah

1	Úvod	10
2	Přehled o současném stavu problematiky	11
2.	1 Oogeneze a folikulogeneze	11
2.	2 Meiotické zrání oocytů	13
2.	3 Fertilizace.....	17
2.	4 Ranná embryogeneze	18
2.	5 Transkripce a translace v savčích oocytech.....	20
2.	6 Fosforylačně-defosforylační mechanismy.....	22
2.	7 Regulace buněčného dělení	24
	2. 7. 1 Proteiny Emi/Erp rodiny	25
	2. 7. 2 Plk1	29
	2. 7. 3 Proteiny CPEB rodiny	31
3	Vědecké hypotézy a cíle práce	35
4	Materiál a metody	37
4.	1 Izolace a <i>in vitro</i> kultivace oocytů a embryí	37
4.	1. 1 Prasečí oocyty	37
4.	1. 2 Prasečí embrya	39
4.	1. 3 Myší oocyty.....	39
4.	1. 4 Myší embrya	40
4.	2 Kultivace a synchronizace HeLa buněk.....	41
4.	3 Malé makrocyclické inhibitory vázající PBD Plk1	41
4.	4 Příprava dsRNA a mikroinjekce	43
4.	5 Studium exprese proteinů.....	44
4.	6 Izolace RNA a příprava cDNA reverzní transkripcí	46
4.	7 PCR	47
4.	8 Poly(A)-test (PAT).....	47
4.	9 Elektroforéza nukleových kyselin	48
4.	10 qRT-PCR	48
4.	11 Imunocytochemie (ICC) a konfokální mikroskopie	50
4.	12 Statistická analýza dat	51
5.	Výsledky.....	52

5.	1	Expresa Emi1 proteinu	52
5.	2	Expresa a polyadenylace Emi1 mRNA.....	55
5.	3	Expresa Emi2 proteinu	56
5.	4	Expresa a polyadenylace Emi2 mRNA.....	59
5.	5	Testování efektu inhibitorů Emi2 na meiotické zrání oocytů	60
5.	6	Expresa CPEB2 proteinu.....	63
5.	7	Expresa CPEB2 mRNA	64
5.	8	Detekce CPEB2 transkriptů v prasečích oocytech.....	65
5.	9	Lokalizace CPEB2 proteinu.....	66
5.	10	Účinnost CPEB2 knockdownu v oocytech a embryích.....	69
5.	11	Vliv CPEB2 inhibice na meiózu oocytů a embryogenezi	70
5.	12	Expresa CPEB3 a CPEB4 mRNA v prasečích oocytech	73
5.	13	Vliv CPEB2 KD na expresi CPEB4 mRNA.....	74
5.	14	Vliv CPEB2 KD na expresi CPEB3 mRNA.....	75
5.	15	Vliv CPEB2, CPEB3 a CPEB4 KO na meiotické zrání myších oocytů.....	77
6		Diskuse.....	78
6.	1	Diskuse k experimentům s členy Emi/Erp rodiny	78
6.	2	Diskuse k experimentům s členy CPEB2 subrodiny	81
7		Závěr	87
8		Seznam zkratk.....	89
9		Seznam použité literatury	92
10		Seznam obrázků, tabulek, grafů	112

1 Úvod

V současné době, díky rozvoji chovu a šlechtění hospodářských zvířat, roste důležitost zdokonalování biotechnologií a genového inženýrství. Proto je nezbytné do detailu osvětlit mechanismy, které se těchto procesů týkají. Studium molekulárních mechanismů regulace reprodukčních procesů je pro zvýšení efektivity reprodukčních biotechnologií klíčovým faktorem. Velmi významná je především technologie *in vitro* produkce oplozeníschopných oocytů a životaschopných embryí, a to nejen v zemědělském, ale díky stále vzrůstajícím problémům v humánní reprodukci, i v biomedicínském výzkumu. Ke zkvalitnění této produkce je primárně důležité podrobné porozumění biochemických procesů podílejících se na vývoji, růstu a meiotickém zrání savčích oocytů a časném embryonálním vývoji. Pro správný vývoj vajíčka a následně i embrya je stěžejní, aby se v oocyту nahromadilo všechno potřebné množství RNA. A to především proto, že při meiotickém zrání oocytů dochází k úplnému potlačení transkripce, takže již nedochází k syntéze nové RNA. Regulace genové exprese se tedy odehrává pouze na úrovni posttranskripčních dějů, kde jedním z hlavních je translace.

Během meiotického i mitotického zrání obecně existují regulátory, které dělení buňky urychlují či naopak zpomalují, nebo zcela zastavují. Ve složitém mnohobuněčném organismu, jakým jsou právě savci, je přesná regulace buněčného dělení pro zdárný průběh meiotického zrání oocytů a embryonální vývoj závislá jednak na translaci maternálních mRNA kódujících klíčové faktory meiotického buněčného cyklu, jako jsou např. cyklin B1, c-mos, či Emi1 a Emi2, jednak na přesně regulované postupné aktivaci či inaktivaci důležitých M-fázních protein kináz, jako jsou Aurora A/B, Plk1, či Cdk1.

Translace maternálních mRNA se odvíjí od jejich časově specifické cytoplazmatické polyadenylace, která je pro oocyty specifická a od jejich interakce s RNA-vazebnými proteiny, zejména pak s proteiny z rodiny CPEB.

Vzhledem k řadě chybějících informací jsem se v rámci mé disertační práce zaměřila na výzkum proteinů Emi1 a Emi2 a na regulaci jejich genové exprese, která významně ovlivňuje správný průběh meiózy i mitózy. Dále jsem se pak zaměřila na málo zmapované členy z CPEB rodiny – zejména pak na protein CPEB2, jehož funkce během těchto procesů nebyla doposud dobře zmapována.

2 Přehled o současném stavu problematiky

2. 1 Oogeneze a folikulogeneze

Oogeneze je proces tvorby samičích pohlavních buněk (oocytů) v samičích gonádách - vaječnicích. Jak uvádějí Simmons et Snustad (2017), proces oogeneze sestává ze tří po sobě následujících fází: fáze množení zárodečných buněk, která se odehrává během ranného embryonálního vývoje, fáze růstu oocyty, která zahrnuje dlouhé období trvajících až do konce pohlavní činnosti a fáze zrání, ve které dochází k dokončení zrání vajíčka záhy po oplození. Během poslední fáze vzniká v jednom primárním folikulu pouze jeden oocyt a dvě pólová tělíska, tzv. pólocyty, což je odlišné od samčího meiotického zrání - spermatogeneze, při které z jednoho primárního spermatocyty vznikají 4 spermie (Marvan et al., 1992).

Proces oogeneze začíná již v prenatálním období, kdy se z proximálního epiblastu samčího embrya vydělí primordiální zárodečné buňky (PGC - primordial germ cells) (Saitou et al., 2002). PGC jsou založeny jako populace progenitorových buněk, a to jako první diferenciovaná embryonální buněčná linie (Buehr, 1997). Na počátku je důležité, aby se PGC oddělily od somatické linie, což je primárně kontrolováno působením jejich signálních drah (Ewen et Koopman, 2010). V prvopočátku studia PGS bylo uváděno, že vznikají přímo z entodermu žlutkového váčku (Chiquoine, 1954). Tento mylný předpoklad ve své studii vyvrací Ozdzenski (1967), který uvádí, že k formaci PGC dochází v extraembryonálním mezodermu, který se žlutkovým váčkem sousedí. PGC zde prodělávají několik cyklů mitotického dělení (M. Hunter, 2000) a pak následkem změn v uspořádání rostoucího embrya pasivně migrují přes prvostřevo do oblasti budoucích gonád na *mesonephros*, nazývané jako genitální (pohlavní) lišta (Fujimoto et al., 1977). Na řízení této migrace se podílí především protein podobný transformujícímu růstovému faktoru $\beta 1$ (TR $\beta 1$), který je v místě budoucích vaječníků sekretován (Eddy et al., 1981). PGC zde prodělávají další mitotická dělení, jejichž počet je druhově specifický a dávají tak základ výslednému počtu oogonií. Například u prasečího plodu je počet oogonií v průměru 1,1 milionů (Black et Erickson, 1968), u lidského embrya 1 - 2 miliony (Baker, 1963). Johnson et al. (2004) ve své práci prováděné na myším modelu dokazují, že výsledný počet oogonií není konečný, jak bylo uváděno dříve (Kliment et Kliment, 1989; Marvan et al., 1992), a že se mohou počty PMG zvyšovat i během pohlavní dospělosti.

Jak uvádějí, nové PMG mohou totiž vznikat ze zárodečných kmenových buněk (GSC - germline stem cells).

Oogonie jsou tvořeny ve formě provazců a zanořují se do korových vrstev vaječnicků. Ve vaječnicích jsou posléze z provazců uvolňovány a jsou obklopeny vrstvou pregranulóznicích buněk (prekurzory folikulárních buněk). Tento kulovitý útvar je označován jako primordiální folikul a spolu s oocytem se bude následně dále vyvíjet v procesu zvaném folikulogeneze (Wassarman, 1988).

Když se oogonie přestanou mitoticky dělit, vstoupí do diplotene profáze I meiotického dělení a stávají se z nich diploidní primární oocyty. Primární oocyty jsou charakteristické vytvořeným zárodečným váčkem (je viditelné velké jádro s výrazným jadérkem) – v angličtině geminal vesicle, proto jsou označovány jako oocyty GV fáze.

Během růstové fáze se mění morfologie primordiálních folikulů. Jejich ploché folikulární buňky se přemění na kubické folikulární buňky, a ty se začnou intenzivně dělit. Vznikne primární folikul (Fair, 2003). Primární folikuly jsou ve vaječnicích nejpočetněji zastoupené a jsou uloženy ve shlucích či jednotlivě v nejzevnější vrstvě kůry vaječnicku (Marvan et al., 1992).

V růstové fázi oogeneze mění svou morfologii i oocyt. Musí zvětšit svůj objem a velikost. K tomu dochází díky tomu, že musí nasyntetizovat potřebnou RNA (mRNA, rRNA, tRNA) a proteiny a nahromadit žlutkové inkluze a kortikální granula (Marvan et al., 1992). Rovněž se zvyšuje počet buněčných organel, jako jsou mitochondrie a endoplasmatické retikulum (Sládeček, 1986). Tento růst oocytu je nezbytný k dokončení jeho jaderného a cytoplazmatického zrání, pro které je právě proteosyntetická aktivita typická (Picton et al., 1998).

Primární folikuly se zvětšují a transformují v rostoucí sekundární folikuly, ve kterých jsou oocyty obaleny 2 – 4 vrstvami folikulárních buněk. Vrstva folikulárních buněk těsně přiléhající k oocytu, a tedy vrstva nejvnitřnější, se nazývá *corona radiata* a má cylindrický tvar. Folikulární buňky tvoří kolem oocytu průsvitnou blánu, složenou převážně z glykoproteinů, nazývanou jako *zona pellucida* (Marvan et al., 1992) Následně se mění ve folikuly antrální, které nesou svůj název podle utvořené antrální dutiny, která je naplněná folikulární tekutinou a posléze ve folikuly Graafovy, označované také jako

folikuly ovulační. Graafův folikul je tvořen murálními a thékálními buňkami a buňkami kumulárními, které tvoří tzv. kumulus (*cumulus oophorus*). Během zvyšujících se hladin luteinizačního hormonu (LH) dochází k masivní kumulární expanzi a kumulus, jež obaluje oocyt, je zachován až do doby fertilizace (Motlik et Fulka, 1984; Young et McNeilly, 2010).

Působením luteinizačního hormonu dojde v Graafově folikulu nejen ke zmiňované kumulární expanzi, ale rovněž se stimuluje sekrece řady proteolytických enzymů, které způsobují degradaci extracelulární matrix a především kolagenových vláken stěny folikulu (Tsafirri et Reich, 1999). Je zvýšen krevní průtok, takže dochází k překrvování folikulu. To má za následek zvyšování intrafolikulárního tlaku a prasknutí folikulu. Zralý oocyt je uvolněn a ovuluje z vaječníku do peritoneální dutiny (Brännström et Enskog, 2002). V místě prasklého folikulu se vytváří žluté tělísko (*corpus luteum*), které vzniká luteinizací murálních granulózních buněk, buněk thecy, kapilár a fibroblastů (Stocco et al., 2007).

2. 2 Meiotické zrání oocytů

GV oocyty jsou skladovány ve vaječných samice až do doby pohlavní dospělosti, kdy díky hormonálním stimulům dojde periodicky (s průběhem každého estrálního cyklu) k uvolnění GV oocytu z profázního bloku a znovuzahájení jejich meiotického zrání. Děje se tak díky zvyšování a klesání tonických hladin luteinizačního (LH) a folikulostimulačního hormonu (FSH) (Chappel et Howles, 1991). V *in vitro* podmínkách však k tomuto znovuzahájení meiotického zrání dochází pouhým vyjmutím oocytu z prostředí folikulu, který má inhibiční vlastnosti (Richard et Sirard, 1996). Zejména u myších oocytů je proces znovuzahájení meiózy poměrně rychlým procesem a tato skutečnost musí být zohledněna během izolace oocytů při přípravě experimentálního materiálu (viz metodická část této práce).

Z oocytu se musí pomocí meiotického (redukčního) dělení, zredukovat genetický materiál z diploidního (n) na haploidní ($2n$) a tyto haploidní buňky se pak diferencují do oplození schopných pohlavních gamet (Simmons et Snustad, 2017). Schopnost znovuzahájení a dokončení meiózy je nazýváno jako meiotická kompetence (Motlik et al., 1984).

Pro znovuzahájení meiozy je důležitá kondenzace chromozomů a následné rozpadnutí zárodečného váčku. Tuto fázi nazýváme jako GVBD, z anglického germinal vesicle break down. Než ke složitému procesu, jakým GVBD je dojde, musí oocyt projít čtyřmi dílčími fázemi, označovanými jako GV-0 až GV-4.

Stádium GV-0 je započato nepatrně viditelným vlněním jaderné membrány. Vlnění postupně zvyšuje svou intenzitu. Chromatin, nesoucí genetickou informaci, je rozptýlen po celé ploše zárodečného váčku. Ve fázi GV-1 se začíná chromatin kondenzovat a tvoří tak polokruhovitý útvar okolo jadérka. V zárodečném váčku se následně tvoří chromatinové shluky. Tyto shluky chromatinu jsou lokalizované především na jaderné membráně. Ve chvíli, kdy je polokruhovitý útvar kolem jadérka degradován, označujeme toto stádium jako GV-2. Ve stádiu GV3 již není tato struktura patrná a dochází zde k tvorbě husté filamentární sítě. V této fázi je jaderná membrána stále ještě zachována. Posledním stádiem je označováno GV-4, u kterého je již jadérko nedetekovatelné a v ooplasmě jsou patrné kondenzované chromozomální bivalenty. Jaderná membrána je rozptýlena do membránových dubletů spojených s endoplazmatickým retikulem (Lucas et al., 2002). Rozpad zárodečného váčku je dokončen.

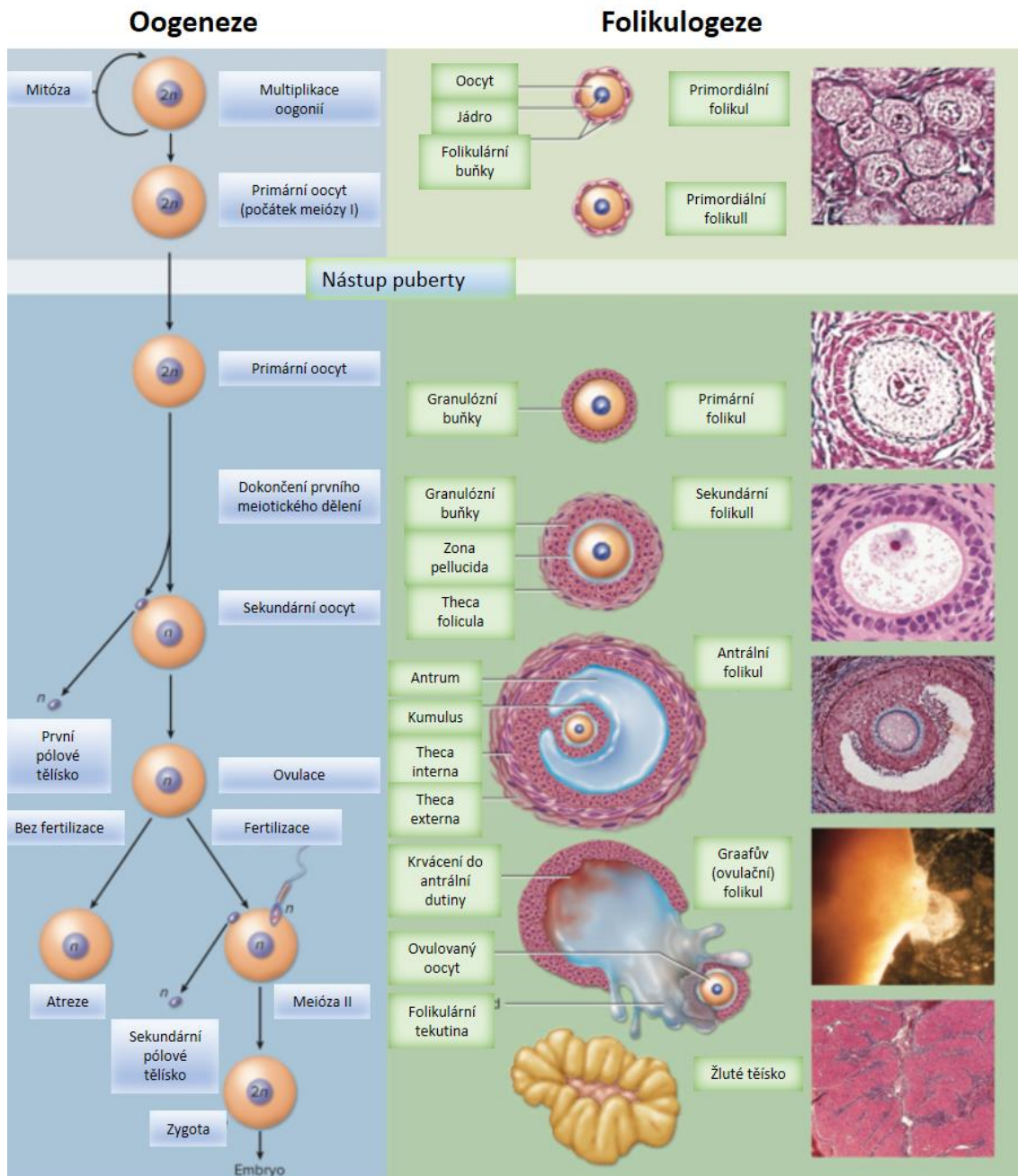
Po GVDB následuje fáze MI, neboli metafáze I, během které dochází ke kongresi chromozomů a jejich řazení v ekvatoriální rovině dělicího vřeténka. Poté chromozomy segregují (Homa et al., 1993).

Oocyt ovuluje a vstupuje do profáze druhého meiotického dělení (MII). Je vyděleno první pólové tělísko, obsahující část nepotřebné genetické informace v podobě chromozomů a oocyt je v této fázi znovu zastaven v tzv. MII bloku. Z tohoto bloku je uvolněn až po stimulech spuštěných fertilizací. Prvním meiotickým dělením je sice zredukován počet chromozomů z diploidního na haploidní, ale počet genů zůstává stále diploidní. Z tohoto důvodu musí v oocytu proběhnout ještě druhé meiotické dělení, během kterého je vyděleno druhé pólové tělísko a meióza je dokončena (Sun et Nagai, 2003).

Jak bylo zmíněno výše, schopnost oocytů projít celým procesem meiotického zrání je nazýváno jako meiotická kompetence a stěžejním je, aby oocyty překonaly druhý meiotický blok a dokončily tak meiózu (Fulka, 1983). Tento meiotický blok, mající za následek pozastavení meiotického zrání, nastává ve fázi MII v důsledku aktivace MPF

(metafázi podporující faktor), který je tvořen komplexem cyklinu B s cyklin dependentní kinázou 1 (Cdk1). Jeho aktivace je řízena složitou kaskádou fosforylačně-defosforylačních mechanismů (Kańska-Książkiewicz, 2006), kde je stěžejní jeho stabilizace pomocí cytostatického faktoru (CSF) (Kishimoto, 2003). Jak je však uváděno Motlíkem et al. (1984), ne všechny plně dorostlé oocyty jsou schopny vývoje do MII fáze a řada z nich zaniká.

K dokončení meiózy dochází až po dalším aktivačním stimulu, což je v podmínkách *in vivo* zajištěno právě procesem fertilizace. Podrobněji bude řízení těchto procesů popsáno v následujících kapitolách. Proces oogeneze a folikulogeneze shrnuje Obr. 1.).



Obr. 1. Schéma oogeneze a k němu korespondující folikulogeneze. Ogonie se mitoticky dělí a vznikají z nich primární oocyty. Primární oocyt vstupuje do meiózy, kde je zablokován v prvním meiotickém bloku až do hormonálního stimulu v pubertě samice. Dokončením prvního meiotického dělení je vyděleno první pólóvé tělísko a vzniká oocyt sekundární. Ten je ovulován. Když nedojde k fertilizaci, podléhá oocyt atrezi. V případě jeho oplození je dokončena druhá meióza a je vyděleno druhé pólóvé tělísko. Vzniká zygota a počíná embryonální vývoj. Stejně jako se vyvíjí oocyt, vyvíjí se spolu s ním i folikul, v němž je uložen. Z primordiálního folikulu vzniká folikul primární, u kterého se zvětšuje jeho obal z granulózních buněk. Postupně je formována zona pellucida a *Theca follicula* a vzniká tak

sekundární folikul. V antrálním folikulu vzniká antrální dutina a *Theca follicula* se rozděluje na vnitřní (interna) a vnější (externa). Kolem oocytu se tvoří kumulus, který je poté spolu s ním ovulován z Graafova folikulu. Ze zbytků Graafova folikulu vzniká žluté tělísko. Upraveno podle Saladina et al. (2018).

2. 3 Fertilizace

Dokončení meiotického zrání nastává procesem oplození, nebo parthenogenetické aktivace, kdy je vyděleno druhé pólóvé tělísko (Sun et Nagai, 2003).

Spermie získává fertilizační schopnost až v pohlavních cestách samice, kdy dojde k její kapacitaci. Během procesu kapacitace dochází k odstranění glykoproteinového povlaku a seminálních plazmatických proteinů z povrchu akrozomu spermie (Sadler, 2011).

Spermie ve vajíčku vyvolá oscilace intracelulárních hladin volných Ca^{2+} iontů (Swann, 1996). Tyto vápenaté oscilace jsou reakcí na vazbu spermie-oocyt, která aktivuje řadu intracelulárních signálních drah spouštějících indukci exocytózy kortikálních granul do perivitellinního prostoru oocytu následovanou biochemickou modifikací vnější extracelulární matrix, kterým je *zona pellucida* (ZP). ZP prodělává tzv. tvrdnutí (*zona pellucida hardening*) a tvoří tzv. polyspermický blok, neprostupný pro další spermie (Ducibella, 1996).

Během penetrace do oocytu musí spermie překonat několik jeho ochranných bariér - vnější vrstvu koronových buněk (*corrona radiata*) a zonu pellucidu. To je umožněno jak pomocí enzymů akrozomu spermie (především hyaluronidázy), tak pomocí jejího aktivního pohybu (Primakoff et Myles, 2002). Primární navázání spermie a vajíčka je zajištěno pomocí specifických glykoproteinů, jež jsou obsaženy právě v zoně pellucidě (ZP) oocytu a tvoří podstatnou část její hmoty. Jsou to u myši tři, u člověka, skotu a prasete čtyři glykoproteiny - ZP1, ZP2, ZP3 a ZP4 (Gupta et al., 2007). Glykoproteiny ZP2 a ZP3 tvoří heterodimer, který je propojen pomocí glykoproteinu ZP1. Samotné primární navázání spermií umožňuje glykoprotein ZP3, který je spouštěčem jejich akrozomální reakce (Brewis et Wong, 1999). Interakce mezi spermií a zonou pellucidou je založena právě na rozpoznání konkrétních sacharidových složek glykoproteinů ZP proteiny na povrchu spermie a je druhově specifická (Yonezawa et al., 2007). Hlavní funkcí ZP2 je vazba se spermií a její udržení na ZP po dobu akrozomální reakce

(Hoodbhoy et Dean, 2004). Funkce glykoproteinu ZP4 je vyvolání akrozomální reakce (Wassarman et al., 1999).

Po oplození dojde k dekonduzaci jaderného spermatického chromatinu a k výměně protaminů spermie za histony oocyty, což je zprostředkováno cytoplazmatickými proteiny chaperony (Philpott et al., 2000). Je formováno interfázní samčíh prvojádro, čemuž předchází chromatinová rekondenzace. Stejně tak dochází ve vajíčku k formování maternálního genomu a tvorbě samčího prvojádra a následně k vzájemné integraci s prvojádrem samčím (Gioia et al., 2005). Splnutím spermie a vajíčka vzniká zygot s diploidním počtem chromozomů a začíná embryogeneze.

2. 4 Ranná embryogeneze

Embryonální vývoj patří k nejkomplicovanějším biologickým procesům, které jsou striktně regulovány složitou sítí signálních drah. Je řízen komplikovanými procesy morfogeneze, které jsou výsledkem vysoce koordinovaných dějů účastnicích se růstu a formování tkání (Delsol, 1977).

Ranná embryogeneze je nazývána jako blastogeneze a trvá až do doby před implantací embrya. Na počátku embryogeneze se zygot mitoticky dělí. Tento proces je označován jako rýhování, dle toho, že na povrchu embrya vznikají buněčným dělením blastomer rýhy (Vacek, 2006). Rýhování trvá 3-4 replikační cykly. Během nich se velikost embrya nemění, ale vznikající blastomery se během dělení postupně zmenšují. Tak je tomu až do stádia moruly.

V osmibuněčném stádiu začíná buněčná diferenciace blastomer, která je závislá na jejich poloze a polarizaci (Ziomek et Johnson, 1980). Pokud je rovina dělení paralelní s apikálním povrchem, vnější blastomery budou polarizovány a stanou se součástí trofoblastu, kdežto vnitřní blastomery zůstanou nepolarizovány a budou tvořit vnitřní buněčnou masu. V této chvíli jsou však buňky stále nedeterminovány (Jelínek et al., 2013).

Mezi osmi až šestnáctibuněčným stádiem dochází ke kompakci moruly a formuje se v ní blastocel. Dochází ke změně permeability zony pellucidy a činností sodnodraselné pumpy vniká do moruly Na^+ a voda (děložní tekutina) a začne se prolínat do mezibuněčných

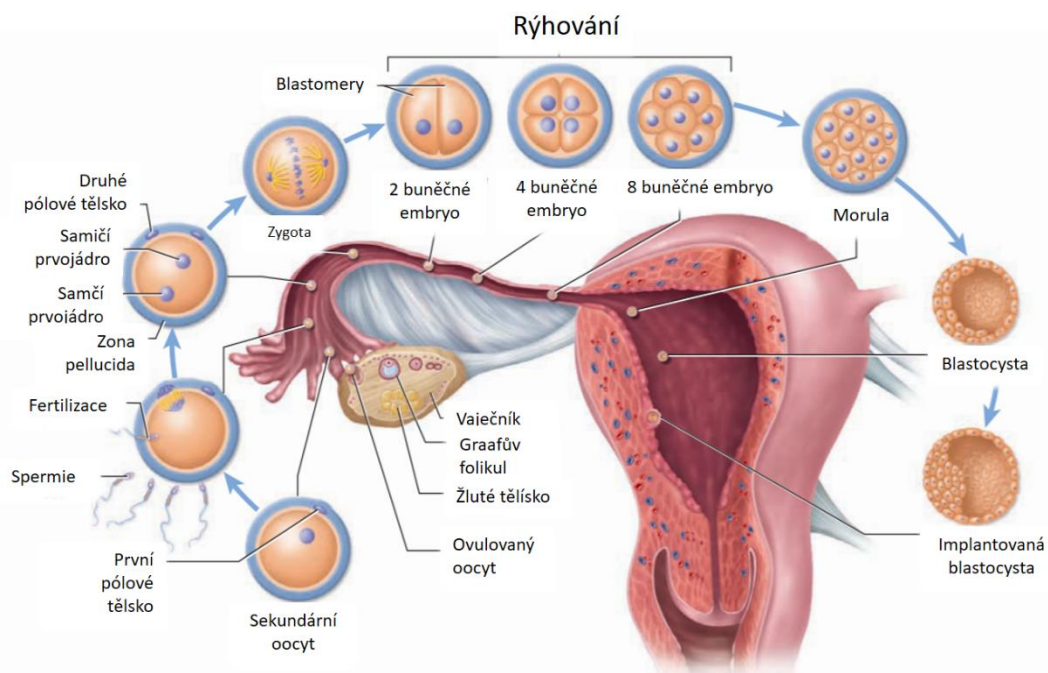
prostor vnitřní buněčné masy. Zvětšující se mezibuněčné prostory blastomer splývají a nakonec vytvoří dutinu (Carlson, 2014).

Po dokončení této formace vzniká z moruly blastocysta. V blastocystě je již vnější a vnitřní buněčná masa determinována a vzniká tak trofoblast (z vnější buněčné masy) sloužící pro vývoj placenty a embryoblast (z vnitřní buněčné masy), z něhož se bude dále vyvíjet samotné embryo (Thomson et al., 1998).

Po zhruba dvanácti replikačních cyklech obsahuje expandující blastocysta kolem 2^{12} (tj. 4096) buněk. Mitotická aktivita se výrazně zpomaluje a začíná transkripce DNA za účasti RNA polymeráz II a III a o něco později i RNA polymerázy I. To má za důsledek syntézu vlastních cytoplazmatických komponent každé z blastomer (Jelínek et al., 2013; Gosden, 2002).

Po rozpadu zony pellucidy se z ní blastocysta uvolní (tzv. hatching) a začne implantace buček jejího trofoblastu do endometria děložní sliznice (Carson et al., 2000).

Zde preimplantační fáze embryogeneze končí. Celý proces ranné embryogeneze je znázorněn na Obr. 2.



Obr. 2. Ovulace a ranná embryogeneze. Zralý oocyt je ovulován z Graafova folikulu ve vaječníku. Po ovulaci se Graafův folikul přetváří na žluté tělísko a začne produkovat

progesteron, jež navozuje sekreční fázi estrálního cyklu a připravuje tak dělohu na nidaci embrya. Ovulovaný MII oocyt je oplozen spermií a je dokončen jeho meiotický vývoj – vydělí se druhé pólóvé tělísko. Formují se samčí a samičí prvojádra a vzniká zygota. Ta se dále mitoticky dělí až do kompaktní moruly, kdy se tvoří dutina blastomel a vzniká tak blastocysta. Po uvolnění blastocysty ze zony pellucidy dojde k její implantaci v endometriu dělohy a preimplantační vývoj zde končí. Upraveno podle Saladina et al. (2018).

2. 5 Transkripce a translace v savčích oocytech

Během meiotického zrání oocytu dochází k potlačení transkripce a není syntetizována nová RNA. Pro správný vývoj vajíčka a následně i embrya je tedy důležité, aby se v oocytu nahromadilo všechno potřebné množství RNA ještě před ovulací a následným oplozením. Z tohoto důvodu je genová exprese regulována na úrovni posttranskripčních dějů (Reimann et al., 2001) .

Od puberty až do zániku pohlavní aktivity je z primordiálních folikulů kontinuálně vybírán malý počet oocytů, které vstupují do růstové fáze (Miyano, 2005). Jakmile folikul započne růstovou fází, dochází v oocytu k zahájení transkripce (Gosden, 2002). Transkripčně aktivní rostoucí oocyt syntetizuje heterogenní jaderné RNA (hnRNA, heterogeneous nuclear RNA) a rRNA (ribosomální RNA) (Hyttel et al., 1997). Transkripční aktivita ustává až s nástupem GVBD (Tomek et al., 2002). Na konci růstové fáze folikulu je jádérko oocytu, kde tyto procesy primárně probíhají, transformováno do neaktivního zbytku (Luciano et al., 2012). Nejintenzivnější exprese genů v oocytu tedy probíhá před tím, než je znovuzahájena meióza (Moor et Dai, 2001).

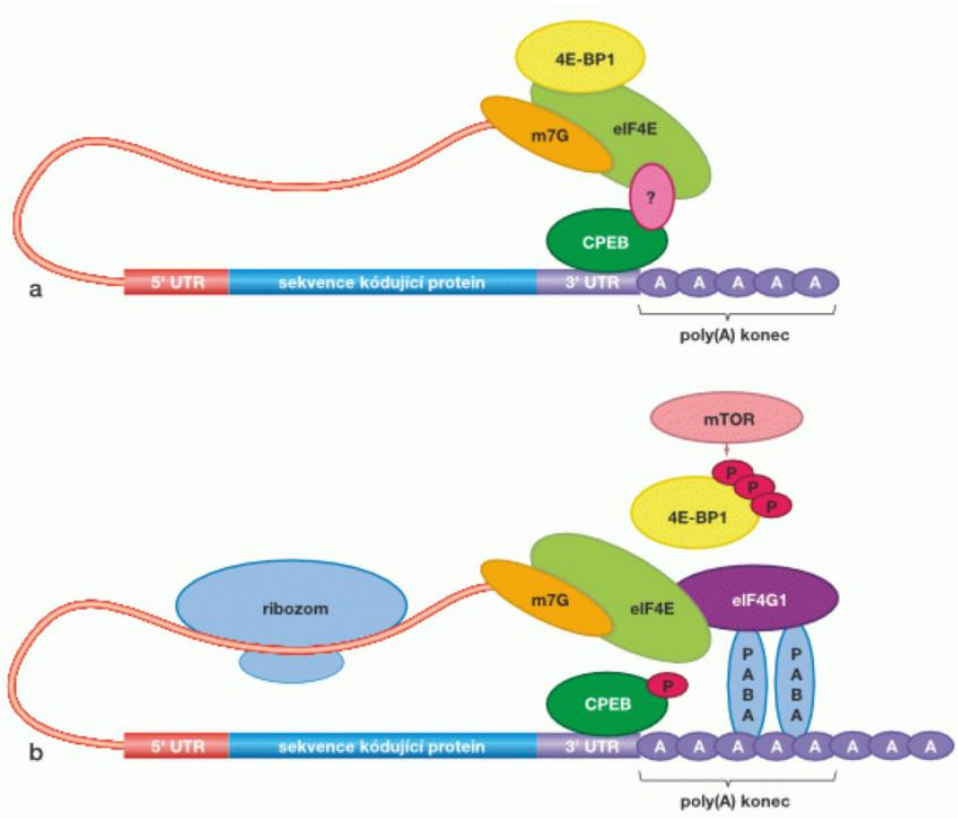
Naopak se v GVBD oocytu zvyšuje translační aktivita (Ellederova et al., 2006). Nasyntetizovaná mRNA oocytu je během maturace uskladněna jako deadenylované transkripty spojené s proteiny, translatována nebo degradována (Moore et al., 2013). Tato mRNA je označována jako maternální a její degradace nastává kolem období aktivace embryonálního genomu (EGA, embryonic genome activation), kdy si embryo začíná syntetizovat vlastní mRNA. K cílené degradaci mRNA při přechodu z maternálního na embryonální genom jsou využívány krátké nekódující jednořetězcové RNA vázající se na nepřekládané úseky transkriptů (Hamatani et al., 2004).

Do aktivace takto inaktivní RNA jsou zapojeny různé mechanismy jako fosforylace translačních faktorů, ribozomové podjednotky, defosforylace polymerázy a především polyadenylace mRNA, o které bude hovořeno dále (Bachvarova, 1992; Colgan et al., 1996).

Poté, co je DNA přepsaná do struktury pre-mRNA (prekurzorová mRNA), dochází k několika důležitým krokům, označovaným jako posttranskripční úpravy. Mezi tyto děje patří přidání 7-metylguanosinová (m7G) čepičky k 5' konci mRNA (jejíž funkce spočívá hlavně v ochraně mRNA před degradací 5' endonukleázami), vystřížení nekódujících sekvencí (intronů) z RNA-transkriptu (tzv. splicing), editace (změna informačního obsahu v molekulách mRNA) a námi zkoumaná polyadenylace 3' konce mRNA (Korf, 2007; Ohno 1987; Simmons et Snustad, 2017).

Jak uvádí (Zhao et al., 1999) k polyadenylaci dochází těsně po ukončení transkripce. Na 3' konec je navázána dlouhá sekvence adeninů (AAAAA...), která se označuje jako poly(A) konec. Role poly(A)-konce mRNA v cytoplazmě spočívá především ve zvyšování účinnosti translace a stability mRNA. To je zprostředkováno poly(A)-vazebnými proteiny (PABP), které se na poly(A)-konec váží (Brook et Gray, 2012).

Podrobněji je celý proces aktivace a inaktivace translace popsán na Obr. 3.



Obr. 3. Schéma inaktivní a aktivní translace. a) Inaktivní translace: k inhibici translace dochází díky tvorbě komplexu CPEB-eIF4E. CPEB se váže na eIF4E prostřednictvím doposud neznámé molekuly. Inhibitorem translace je protein 4E-BP1, který se váže na eIF4E a brání jeho vazbě na další iniciační faktor eIF4G1. b) Aktivní translace: Díky eukaryotickému iniciačnímu faktoru 4E-BP1, který se váže na čepičku (m7G), dojde k rozpoznání 5 konce mRNA, jež má být translatována. Fosforylací CPEB je degradována jeho vazba na eIF4E. Pro započetí translace je však nutná i fosforylace 4E-BP1, k čemuž dochází pomocí kinázy mTOR. Inaktivací 4E-BP1 se může eIF4E navázat na eIF4G1. Na tento faktor se dále váží poly(A) vazebné protein PABP a propojí ho tak s poly(A) koncem, čímž může být translace na ribozomu zahájena. „P“ značí fosforylované formy proteinů. (Procházková et Šušor, 2016).

2. 6 Fosforylačně-defosforylační mechanismy

Reverzibilní fosforylace pomocí zbytků kyseliny fosforečné (PO_4^{3-}) je důležitým regulačním mechanismem během meiotického zrání i mitózy, protože má přímý vliv na aktivitu enzymů. Adice fosfátových skupin mění strukturu enzymů a tím většinou dochází ke změně jejich funkce. Fosforylace a defosforylace se často používá jako přepínač mezi aktivní a inaktivní formou enzymu (Hunter, 1995). Porucha fosforylace aminokyselin vede k nekontrolovanému buněčnému dělení, tedy ke vzniku rakoviny (Fusek et al., 2008).

Je možné fosforylovat více substrátů, ale pro regulace signálních kaskád, účastnících se meiotického a mitotického dělení, jsou stěžejními fosforylace proteinů fosforylujícími enzymy - kinázami a fosfatázami (Hunter, 1995). K fosforylaci může docházet na několika různých aminokyselinách. U eukaryot jsou nejběžnější fosforylace tyrosinu, serinu a threoninu. U prokaryot byla popsána i fosforylace histidinu, aspartinu a glutaminu. Proteinkinázy můžeme rozdělit, podle aminokyslein jež fosforylují, na několik skupin - kinázy fosforylující na serinech a threoninech a kinázy fosforylující na tyrosinu. Mimo to existuje i skupina tzv. duálních proteinkináz, které jsou schopny fosforylace na serinu/threoninu i tyrosinu. Fosfatázy jsou proteiny provádějící defosforylace. Tyto enzymy mají také různou míru specifity. (Fusek et al., 2008).

Princip fosforylace je založen na přenosu fosfátové skupiny z vysokoenergetického donoru (např. ATP) na cílové proteiny. U donoru je rozrušena vazba mezi fosforem γ fosfátového zbytku a kyslíkem β fosfátového zbytku. Fosfát donoru se váže na hydroxylovou skupinu postranních řetězců aminokyselin proteinu za vzniku kovalentní esterové vazby. Vodíková vazba indukuje podjednotkové změny, umožňující přístup substrátu k aktivnímu místu kinázy. Fosfátová skupina se však může vázat na ligand i bez konformačních změn. Během defosforylace dochází k hydrolýze vazby mezi fosfátem a proteinem za vzniku anorganického fosfátu (Cheng, et al., 2011; Nishi et al., 2011; Pinna et Ruzzene, 1996).

Tyto posttranslační modifikace (izoformy) proteinů jsou detekovatelné pomocí 2D elektroforézy (2DE), v některých případech je pak možné je detekovat i jako posun v proteinu pomocí jeho elektroforetické pohyblivost na jednorozměrných SDS-PAGE gelech.

Pro bezchybnou regulaci buněčného cyklu je důležitá správná funkce všech signálních kaskád a molekul v nich působících. Nezastupitelnou roli zde sehrávají cyklin-dependentní kinázy (Cdk), pro jejichž aktivitu je nutná fosforylace threoninu (pomocí Cdk aktivačních kináz), nacházejícího se v jejich aktivační smyčce a také vytvoření komplexu s jejich regulačními jednotkami – cykliny. V těchto komplexech je Cdk fosforylována na dvou místech vazebné domény (na threoninu 14 a tyrosinu 15) pomocí dalších kináz, a proto je k regulaci Cdk nutná také činnost fosfatázy CDC25, která tato

místo defosforyluje. Inhibice CDC25 poté vede opět k poklesu Cdk aktivity (Pines, 1999; Solomon et Kaldis, 1998).

Roli fosforylace a defosforylace klíčových komponent signálních kaskád účastnících se meiotického zrání shrnuje ve své práci Kubiak (2011). Pro vytvoření a udržení prvního meiotického bloku v GV fázi zrání oocyty je stěžejní, aby byla cyklin dependentní kináza defosforylována (pomocí kinázy MYT1 a tyrosin kinázy Wee1). K udržení tohoto bloku je nutná aktivace Wee2 fosforylací serin/threonin cAMP dependentní kinázy (PAK). PAK dále fosforyluje fosfatázu CDC25B, čímž je zabráněno jejímu hromadění v jádře oocyty a zabraňuje se aktivaci Cdk1. Blok v profázi I ovlivňuje také APC/C, což bude podrobněji rozebráno v další kapitole.

Pro znovuzahájení meiotického zrání je nutná defosforylace Cdk1 pomocí fosfatázy CDC25. Na to je zapotřebí zvýšení množství CDC25 hydrolýzou cAMP, což je docíleno aktivací fosfodiesterázy PDE3A pomocí serin/threonin kinázy PKB. Meiotické zrání pokračuje a hladina Cdk1 opět pozvolna klesá, což je zapříčiněno pomalým nahromaděním cyklinu B. K udržení oocyty v druhém meiotickém bloku, ve kterém čeká oocyt na oplození, je nutná opětovná aktivita Cdk1, která opět klesá po dokončení meiózy II (Kubiak, 2011).

2. 7 Regulace buněčného dělení

Během meiotického i mitotického zrání existují regulátory, které dělení buňky urychlují či naopak zpomalují, nebo zcela zastavují. Ve složitém mnohobuněčném organismu, jakým jsou savci, je přesná regulace buněčného dělení pro správný vývoj nezbytnou. Obecně se jedná o již zmiňované cykliny, cyklin dependentní kinázy, fosfatázy a signální molekuly, které jsou zpravidla propojeny ve složité signální kaskády.

Během meiotického zrání jsou sekretovány primárně oocytem, ale rovněž se na jejich produkci podílejí i somatické buňky. Somatické buňky se podílejí na regulaci buněčného cyklu oocyty, mění v něm signální transdukční cesty a ovlivňují například expresi MPF (M-fázi podporující faktor) a CSF (cytostatický faktor), které tvoří fosforylačně-defosforylační regulační kaskádu zajišťující schopnost oocytů dokončit správně meiózu (Stojkovic et al., 1999).

Během mitotického i meiotického dělení je přechod z metafáze do anafáze řízen řadou regulačních procesů. Před započítím samotného buněčného dělení, čeká mateřská buňka, dokud nejsou všechny chromozomy správně napojeny na dělicí vřeténko. Toto napojení je zprostředkováno proteinovými komplexy zvanými kinetochory, které se nacházejí na každé chromatidě v oblasti centromery. Kinetochory, které nejsou navázány na mikrotubuly, vysílají do okolí signály, které nástup anafáze inhibují. Správné napojení chromozomů na dělicí vřeténko hlídá kontrolní bod dělicího vřeténka SAC („spindle assembly checkpoint“) (Rieder, 1995).

Když dojde ke správnému navázání všech kinetochor na dělicí vřeténko, je aktivován anafázi podporující komplex APC/C (anaphase promoting complex/cyclosome). Jedná se o komplex proteinů, který se podílí na polyubikvitinaci sekurinu, proteinu inhibujícího aktivitu enzymu separázy. Polyubikvitinace sekurinu vede k jeho degradaci v proteazomu a aktivní separáza může rozštěpit kohesiny – proteiny, které drží pohromadě sesterské chromatidy. APC/C je aktivován dvěma kofaktory, Cdc20 a Cdh1, které aktivují APC/C v různých fázích buněčného cyklu a určují také jeho substrátovou specifitu.

V důsledku snížené aktivity cyklinu B-Cdk1 kinázy dochází k aktivaci APC/C v anafázi a jeho aktivita opět klesá na konci G1-fáze. Po celou G1-fázi je jeho aktivita závislá na proteinu Cdh1/Hct1, který plní funkci analogickou k F-box proteinům (proteiny Emi/Erp rodiny) u SCF (E3-ubiquitin ligáza) (Vodermaier, 2004). Mechanismem, který vede k inaktivaci APC/C-Cdh1 v G1-fázi je E2F dependentní exprese inhibitoru APC/C - Emi1 proteinu. Aktivní APC/C-Cdh1 na začátku G1-fáze indukuje degradaci Skp2, F-box proteinu nezbytného pro degradaci p21, p27 a p57. Inaktivace APC/C na konci G1-fáze tak vede ke zvýšení exprese Skp2, který umožní pokles CDK-inhibitorů p21, p27 a p57, což výstí v nárůst Cdk2 aktivity nezbyté pro S-fázi (Bashir et al., 2004; Hsu et al., 2002).

2. 7. 1 Proteiny Emi/Erp rodiny

Jako proteiny Emi/Erp rodiny jsou označovány Emi1 (FBXO5 - F box only protein 5) a Emi2 (FBXO43 - F box only protein 43, Erp1 – Emi-related protein 1). Jsou to regulátory proteinového komplexu APC/C, který se podílí na polyubikvitinaci důležitých meiotických faktorů, což v konečném důsledku vede k jejich degradaci proteasomem. Ovlivněním aktivity APC/C se tak Emi1 a Emi2 proteiny podílí na časové koordinaci

a správném průběhu meiotického zrání a řídí také průchod buněk první mitózou po oplodnění či aktivaci oocytu (Wu et Kornbluth, 2008).

Emi1 je označován také jako ranný mitotický inhibitor, protože jeho hlavní funkce je během mitotického dělení, kde je důležitý pro zachování integrity genomu a buněčné proliferace. Jeho hlavní úlohou je blokování replikace. Při narušení jeho funkce a předčasné aktivaci APC/C dochází re-replikaci genomu, která proběhne více než jedenkrát během buněčného cyklu a jež je pro buňku letální. Zpravidla končí její apoptosou (Machida et Dutta, 2007).

K expresi Emi1 dojde v odezvě na zvýšenou hladinu transkripčního faktoru E2F, který řídí přechod mez G1 a S fází buněčného cyklu. Díky expresi Emi1 dojde v G1 fázi k zablokování funkce komplexu APC/C-Cdh1 (Bashir et al., 2004). APC/C zůstane nadále inaktivní po dobu působení Emi1 (v S a G2 fázi). Až během prometafáze dochází k degradaci Emi1, což opět aktivuje APC/C-Cdc20 vůči časným mitotickým substrátům jako je např. cyclin A. Aktivita APC/C-Cdc20 vůči cyklinu B je inhibována působením SACu. V okamžiku, kdy dojde k správnému seřazení chromozomů na dělicí vřeténko, dojde k aktivaci APC/C-Cdc20 a degradaci cyklinu B a sekurinu, aktivaci separázy, která drží pohromadě sesterské chormatidy v chromozomech a ty jsou následně rozděleny (Tung et Jackson, 2005).

Během meiotického zrání oocytů inhibuje Emi1 komplex APC/C-Cdh1 během profáze I. Díky tomu se může začít hromadit MPF, který je nezbytný pro vstup do meiózy I (Marangos et al., 2007). Hladina Emi1 se potom výrazně nemění a přetrvává až do druhé metafáze, kde se účastní utvoření a udržení druhého meiotického bloku, rovněž nazávaného jako CSF blok (Schmidt et al., 2006).

CSF komplex sestává právě z Emi1 a Mos a jeho aktivita se objevuje již po přechodu meiózy I (Takakura et al., 2005). Vazba Emi1 k APC/C je v MII oocytech zesilována pomocí fosforylace p90rsk (ribosomal protein S6 kinase). Fosforylace pomocí p90rsk stabilizuje a zesiluje vazbu Emi1 na Cdc20 (Paronetto et al., 2004).

Důležitá je také degradace Emi1, protože nadbytek zabráňuje uvolnění oocytu z CSF bloku a blokuje tak dokončení meiotického zrání (Tung et al., 2005). Na mechanismus a načasování inaktivace Emi1 ovšem převládají rozličné názory Paronetto et al. (2004)

tvrdí, že se koncentrace Emi1 v myších oocytech po oplození nesnižuje, ale naopak se v prvních dvou embryonálních mitotických cyklech zvyšuje zhruba jeden a půlkrát. Jejich experimenty dokonce ukazují, že je protein Emi1 zachován v nízkých koncentracích až do implantace blastocysty. To je v rozporu s výzkumem Reimanna et al. (2001), kteří uvádějí, že k degradaci Emi1 dochází v ranné mitóze v závislosti na Cdk fosforylaci. dále demonstují, že nadbytek Emi1 mikroinjekcí do jedné buňky dvoubuněčného embrya mělo za následek blok v injektované buňce. Nadbytek Emi1 blokuje buňku v mitóze, tím, že inhibuje destrukci cyklinu B. Podle Tunquista et Mallera (2003) zůstává Emi1 stabilní i po oplození, ale pouze do prvního mitotického dělení. Degradace Emi1 v anafázi není tedy závislá na aktivitě CaMKII (Ca²⁺/kalmodulin dependentní protein kináza II), která je aktivována vápníkovým signálem indukovaným vstupem spermie do oocyty (Eldridge et al., 2006). S tímto tvrzením se ztotožňuje také (Peters, 2003), který píše, že je degradace proteinu Emi1 zprostředkována β -Trcp1 vazbou na SCF.

Stejně tak jako protein Emi1, je důležitou složkou CSF i protein Emi2, jež má podobnou funkci. Brání replikaci DNA mezi meiózou I a II (inhibicí APC/C-Cdc20) a umožňuje akumulaci cyklinu B (Madgwick et al., 2006). Schmidt et al. (2006) uvádějí, že Emi2 podstupuje své posttranslační modifikace během přechodu mezi meiózou I a meiózou II.

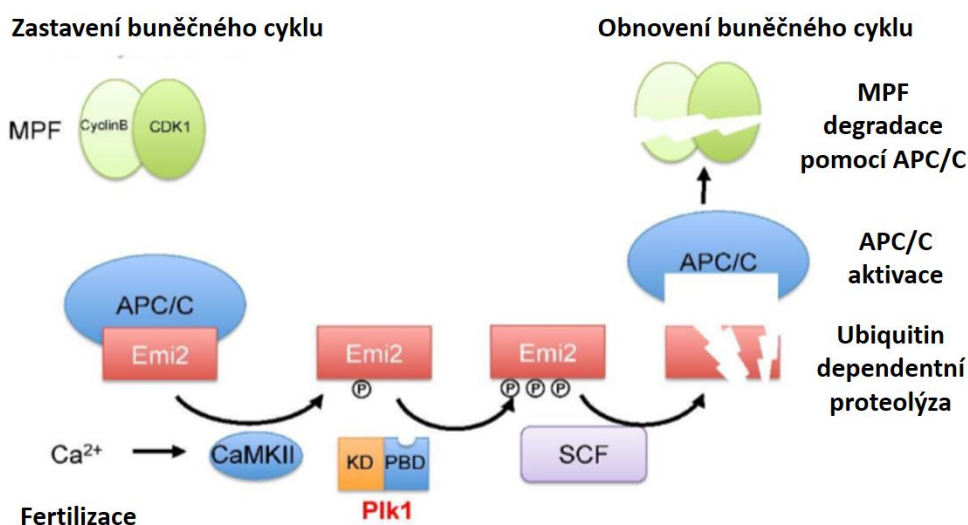
Emi2 je specifický pro meiotické buňky a je syntetizován až po GVBD. Jeho hlavní úloha spočívá především v udržování MII bloku, právě jako součást CSF (Madgwick et al., 2006). Aktivita Emi2 je regulována fosforylací, ať už pozitivně (c-mos, MAPK kinázová signální dráha), či negativně – Cdk1 fosforylace brání interakci Emi2 s APC/C, fosforylace CaMKII a Plk1 vede k destrukci Emi2 a inaktivaci CSF a vstupu oocyty do mitotického cyklu (Tunquist et Maller, 2003). Během druhé metafáze hraje důležitou roli v udržení exprese Emi2 také proteinová fosfatáza 2A (PP2A), která ho defosforyluje na T545/T551 (Suzuki et al., 2010).

Degradace Emi2 je, na rozdíl od Emi1, závislá na aktivitě CaMKII, která je jejím spouštěčem. Tento mechanismus vysvětlují ve své práci Liu a Maller (2005), kteří demonstují, že v odezvě na signalizaci Ca²⁺ se zvyšuje hladina CaMKII, která fosforyluje místa na N-terminálním konci Emi2. K těmto fosforylacím dochází na treoninu 195. Poté může být fosforylovaný threonin rozpoznán pomocí Polo-box domény Plk1, která se záhy s Emi2 naváže a udržuje jeho fosforylaci (Hansen et al., 2006; Isoda

et al., 2011). Tyto fosforylační místa jsou potom rozpoznávána SCF a v SCF β TrCP-dependentním procesu během fertilizace či aktivace oocytů, což vede k degradaci Emi2. To následně inaktivuje CSF, takže může dojít k aktivaci APC/C-Cdc20 a následné degradaci cyklinu B (Marangos, et al., 2007; Tunquist et Maller, 2003). Tím je oocyt uvolněn z druhého meiotického bloku a může dojít k dokončení meiózy. Mechanismus regulace meiotického zrání skrze Emi2 shrnuje Obr. 4.

Protože jsem ve své práci testovala inhibitory Emi2, uvedu zde i více podrobností o jeho struktuře a regulačních mechanismech. Emi2 protein má regulační oblast na svém N-terminálním konci a funkční oblast na C-terminálním konci. Jeho funkční oblast obsahuje tzv. destrukční box (D-box), který komunikuje se substrátem APC/C komplexu, tedy cyklinem B, a tím je na APC/C navázán. D-box rovněž obsahuje zinek vázající oblast (ZBR - zinc binding region) a RL-konec, které mohou konkurovat vazbě s APC/C jako pseudo-substráty a tím chránit Cdk1 (Suzuki et al., 2010). Sako et al. (2014) zmiňují důležitost C-terminálního konce Emi2 také proto, že váže Ube2S (Ubiquitin-conjugating enzyme E2 S), a tím přímo potlačuje degradaci cyklinu B. C-terminální konec zesiluje vazbu s Cdc27, komponentou APC/C. Aktivita APC/C je inhibována pomocí defosforylace T545 a T551. Emi2 je stabilizován defosforylací na S213-T267 (Suzuki et al., 2010).

Co se týče N-terminálního konce Emi2, je mnohonásobně fosforylován Cdk1, což vede k destabilizaci a deaktivaci Emi2 (Isoda et al., 2011). N-terminální konec Emi2 je fosforylován také pomocí Plk1 na T170/195 (Jia et al., 2016).



Obr. 4. Schéma ilustrující molekulární pochody během obnovení buněčného cyklu po oplození. U maturovaných savčích oocytů je udržována vysoká aktivita MPF tím, že je pomocí Emi2 inhibován komplex APC/C. Po oplození aktivuje zvýšená hladina Ca^{2+} proteinkinázu CaMKII a ta dále fosforyluje Emi2 na N-terminálním konci. Další vlnu Emi2 fosforylace zajišťuje Plk1, která se na Emi2 naváže svou Polo-box doménou (PBD). Fosforylovaný Emi2 se stává substrátem SCF ligázy a je následně degradován pomocí ubiquitin-proteazomu. Degradaci Emi2 je aktivován APC/C komplex a dojde ke snížení hladiny MPF. V reakci na tyto změny může být buněčný cyklus obnoven a je dokončeno meiotické zrání. Upraveno z Jia et al. (2015).

2. 7. 2 Plk1

Plk1 je členem serine/threonine kinazové rodiny a podílí se na mnoha procesech buněčného cyklu, jako je tvorba bipolárního dělicího vřeténka, segregace chromozomů a cytokineze (Strebhardt, 2010). Plk1 fosforyluje centrosomální NLP (nine-like protein), který je exprimován v interfázi a podílí se na nukleaci mikrotubulů. Fosforylace NLP vede k inhibici jeho transportu na centrosomy, závislém na dynein-dynaktinu, což způsobuje agregaci dalších centrosomálních proteinů (Casenghi et al., 2005).

Plk1 je také důležitá v regulacích poškození DNA, tím, že inaktivuje Chk1 (checkpoint kináza 1), Wee1 a p53Bp1 (p53-binding protein 1) (Strebhardt, 2010). Při reparacích DNA poškození dojde zpravidla k zvýšení hladiny Plk1 a tím dojde k restartování buněčného cyklu (van Vugt et Medema, 2005). Polo-like kináza 1 také zajišťuje vstup

buňky do M fáze, a to na mnoha na úrovních regulace, zejména pak regulací konzervovaných oscilačních enzymatických aktivit, které řídí buněčné dělení (Barr et al., 2004).

Po akumulaci proteinu BORA, dojde k jeho navázání na Plk1 a umožňuje tak její aktivaci pomocí fosforylace Aurora kinázou A (Macůrek et al., 2008; Seki et al., 2008). Plk1 následně aktivuje Cdc25 fosfatázu a tím dochází k aktivaci CDK1. Je utvořena autokatalycké smyčka mezi Cdc25 a MPF komplexem, což je nezbytné pro aktivaci MPF a rozpad zárodečného váčku v oocyty, či nastartování mitózy v somatických buňkách a embryích. Změny Plk1 enzymové aktivity korelují s MPF. Mikroinjekce Plk1 inhibitorů způsobily zpoždění GVBD. Jak již bylo zmiňováno výše, Plk1 se také podílí na aktivaci APC/C (Anger et al., 2004). tato aktivace je zprostředkována fosforylací Emi1, čímž je Emi1 rozpoznán a degradován ubiquitylací, (Hansen et al., 2004). Rovněž během meiotického dělení reguluje Plk1 funkci Emi2 pomocí jeho fosforylace a tím dojde k aktivaci APC/C (Rauh et al., 2005).

Nelze vyloučit, že samotná aktivace Plk1 je následkem malého, ale nedetekovatelného zvýšení MPF aktivity. Plk1 je v oocytech s MPF kolokalizována. U oocytů v profázi I (GV) je Plk1 difúzně rozprostřena v cytoplazmě i v jádře, po fázi GVBD se následně soustředí do okolí kondenzovaných chromozomů a v metafázi se kondenzuje na pólech dělicího vřetenka. Od anafáze do telofáze je Plk1 lokalizovaná v ekvatoriální rovině oocyty (Wianny et al., 1998). Aktivita Plk1 během zrání oocyty kontinuálně roste (Anger et al., 2004).

Co se týče struktury, je Plk1 složena ze serin/threoninové katalytické domény a dvou Polo-box domén na regulačním karboxyterminálním konci (Jana et al., 2012; Kothe et al., 2007). Strukturní analýza, kterou provedli Lowery et al. (2005) ukázala, že Polo-box doména vytváří intramolekulární heterodimer, který má tendenci vázat fosforylované serinové nebo threoninové zbytky cílených proteinů. Tyto proteiny mohou být fosforylovány přímo Plk1, nebo, ve větší míře případů, jinými kinázami, jako například CaMKII, Cdk1, a MAPK (Qi et al., 2006).

Dalšími důležitými komponentami buněčného cyklu, které svou fosforylací Plk1 reguluje, jsou proteiny z CPEB rodiny (Reverte et al., 2001), o nichž bude hovořeno v následující kapitole.

2. 7. 3 Proteiny CPEB rodiny

CPEB jsou cytoplazmatické polyadenylační elementy vázající proteiny, vázající specifické úseky konkrétních mRNA., což má důležitou úlohu v regulaci translace.

U savců, žab rodu *Xenopus* a *C. elegans* existují čtyři CPEB geny – CPEB1 – CPEB4, kdežto u *Drosophila* pouze dva – Orb1 a Orb2. CPEB1 a Orb1 jsou řazeny do samostatné CPEB subrodiny. Ostatní členové – CPEB2, CPEB3, CPEB4 a Orb2 tvoří CPEB2 subrodinu a jsou to paralogní proteiny, navzájem si velice podobné. Jejich N-terminální regulační konce jsou rozdílné, homologie mezi těmito proteiny je tedy výhradně na jejich C-terminálních koncích. Na C-terminálních koncích CPEB proteinů se nacházejí dva motivy rozpoznávající RNA (RRM - RNA recognition motifs) a dva strukturní motivy zinkového prstu (Huang et al., 2006; Luitjens, 2000; Mendez et Richter, 2001; Theis et al., 2003; Wang et Cooper, 2010). Zinkový prst CPEB proteinům umožňuje vazbu na mRNA a je složen z paralelně vedle sebe uspořádaných struktur alfa-helixu a beta-skládaného listu, které mezi sebou vytváří vazebné místo pro zinek navázaný na cysteinový a histidinový zbytek (Lennarz et Lane, 2013).

Jak již bylo zmiňováno, specifické zkracování a prodlužování poly(A) konce je řízeno interakcí s RNA-vazebnými proteiny se specifickými elementy, především pak s cytoplazmatickým polyadenylačním elementem (CPE) a podobnými sekvencemi blízko 3' konce regulovaných mRNA (Paynton et Bachvarova, 1994). Z CPE-vazebných proteinů je jedním z nejlépe prostudovaných protein CPEB1, který je důležitým polyadenylačním promotorem. CPEB1 protein byl poprvé objeven v oocytech žab rodu *Xenopus* a bylo prokázáno jeho zapojení do meiotického zrání (Hake et Richter, 1994). Záhy na to byla jeho důležitost demonstrována také pro správné fungování postsynaptické denzity myšího mozku (Wu et al., 1998). Což potvrzuje Groisman et al. (2006), který dokládá, že u myší se zablokovaným CPEB1 genem (knockout) dochází k poruchám v synaptické plasticitě neuronů a vykazují anomálie ve svém chování.

Důležitost CPEB-řízené translace pro regulaci meiotického zrání oocytů a spermií u myší bylo demonstrováno rovněž pomocí zablokování CPEB1 genu. Myši se zablokovaným CPEB1 genem vykazovaly normální životaschopnost i fenotyp, ale jejich reprodukční orgány byly redukovány. Vaječníky těchto myší nebyly vůbec vyvinuté a varlata byla o

30% menší než u kontrolní skupiny myší. CPEB1 deficiencie zapříčinila sterilitu u obou pohlaví (Tay et Richter, 2001).

Během meiózy hraje CPEB1 důležitou roli ve formaci synaptonemálního komplexu tím, že reguluje mRNA pro SCP1 (synaptonemal complex protein 1) a SCP3 (synaptonemal complex protein 3), což je také důležitým regulačním mechanismem během progresu mitotického buněčného cyklu (Novoa et al., 2010). mRNA kódující tyto proteiny obsahuje cytoplazmatické polyadenylační elementy, které CPEB1 polyadenyluje, takže po zablokování funkce CPEB1 zůstávaly jejich poly(A) konce zkrácené a jejich translace tím byla blokována (I. Groisman et al., 2006).

Kim et al. (2011) ve svém výzkumu na myších oocytech objevili, že CPEB1 reguluje také translaci mRNA cyklinu B1. Nicméně u oocytů prasečích, jak publikuje Komrskova et al. (2014), polyadenylaci mRNA cyklinu B1 a její translaci pravděpodobně předchází fosforylace CPEB1 pomocí Cdk1 a po tom následující CPEB1 destrukce. Což naznačuje, že mechanismus regulace polyadenylace mRNA cyklinu B1 je u prasat odlišný. Stebbins-Boaz et al. (1996) uvádějí, že u žabích vajíček injektovaných anti-CPEB1 selhala polyadenylace a aktivace c-mos mRNA.

Regulační mechanismus CPEB1 je řízen jeho fosforylací. Defosforylovaný CPEB1 pak interaguje s dalšími faktory (např. pumilio a maskin), které pak blokují translaci (Nakahata et al., 2001; Stebbins-Boaz et al., 1996). Tento proces je nezbytný pro navození cytoplazmatické polyadenylace těch mRNA, které obsahují dva a více CPE ve svých 3'UTR (Mendez et al., 2002). K fosforylaci CPEB1 dochází krátce před GVBD (Hodgman et al., 2001). Jak uvádí Mendez et al. (2002) k pokračování meiotického zrání a přechodu z metafáze I do metafáze II je nezbytná hyperfosforylace CPEB1 a jeho následná degradace. To potvrzují rovněž Komrsková et al. (2014), kteří ve své práci uvádějí, že k fosforylaci CPEB1 byla detekována již kolem fáze GVBD u prasečích oocytů, ale že k jeho degradaci dochází pravděpodobně až po samotné MI fázi.

Degradace CPEB1 nastává tedy po jeho fosforylaci. Před započítím meiotického zrání je nutná interakce CPEB1 s Pin1 (peptidylprolyl-cis-trans-izomeráza), která řídí jeho konformaci (Nechama et al. 2013). CPEB1 je nejprve fosforylován pomocí Cdk1 kinázy a následně pomocí Polo-like kinázy na motivu TGS, který je rozpoznáván, stejně jako je

tomu u Emi1 a Emi2, pomocí SCF- β TrCP a následně tak dojde k jeho ubikvitinaci a degradaci (Scheper et al., 2001; Setoyama et al., 2007).

Co se týče ostatních členů CPEB rodiny, není o nich prozatím tolik informací. Stejně jako CPEB1 byly detekovány především v nervové soustavě. Exprese CPEB3 byla detekována napříč všemi myšimi tkáněmi, včetně ovárií, ale obzvláště vysoká byla právě v mozku (Huang et al., 2006; Theis et al., 2003). CPEB3 deficientní myši vykazovaly rovněž poruchy procesů spojených s pamětí. Snížená byla ale i jejich reprodukční schopnost (Chao et al., 2013). V nervových buňkách CPEB3 inhibuje translatování vázaných specifických mRNA a k započatí translace pak dochází až po jeho degradaci pomocí E3 ubikvitin-ligázou NEURL1 (neuralized-like 1) (Pavlopoulos et al., 2011). Mechanismus se tedy jeví podobný jako u CPEB1, ale jak uvádí Huang et al. (2006), narozdíl od CPEB1 se CPEB3 neváže k CSF, takže regulace bude probíhat nejspíše jiným mechanismem, než je polyadenylace. CPEB3 se od dalších zástupců CPEB2 subrodiny nepatrně liší, a to svou glutaminovou doménou na N-terminálním konci (Salehi-Ashtiani et al., 2006). Jako jediný je podle Giangarrà et al. (2015) postradatelný pro mitotické buněčné dělení, zatímco ostatní členové jsou pro bezchybnou mitózu nezbytní. Autoři uvádějí, že CPEB1 je potřebný pro vstup do profáze, CPEB2 pro stádium metafáze a CPEB4 pro buněčnou cytokinezi.

Stejně jako exprese CPEB3, i exprese CPEB4 je ve velké míře zaznamenána v nervovém systému (Huang et al., 2006), ale rovněž v oocytech a ranných embryích (Jansova et al., 2018). Dle Igei a Méndeze (2010) má CPEB4 velmi podobnou funkci jako CPEB1, a to především v jeho regulaci aktivace cytoplazmatické polyadenylace. To demonstrují na experimentech s oocyty žab rodu *Xenopus*, kde poukazují na stěžejní roli CPEB4 během druhého meiotického dělení, během kterého je CPEB4 masivně akumulován a váže poly(A)-polymerázu GLD2 na mRNA obsahující CPE, což je v oocytech nezbytné pro přechod z první (MI) do druhé metafáze (MII). Rovněž naznačují, že právě CPE4 pravděpodobně nahrazuje funkci CPEB1 po jeho degradaci v GVBD. CPEB4 je tak zodpovědný za regulaci cytoplazmatické polyadenylace tzv. pozdních mRNA během druhé meiózy. Tuto hypotézu potvrzují rovněž Novoa et al. (2010) svými experimenty na buněčných liniích HeLa. To, zda se CPEB4 váže na CPE je však dle výsledků Huang et al. (2006) spekulativní.

Experimenty na CPEB4 knockout myších poukazují, že zřejmě existuje i u CPE4 nějaký mechanismus, který zajišťuje nahrazení jeho funkce. CPEB4 deficientní myši vykazovaly normální fenotyp i genotyp a jejich plodnost byla zachována (Tsai et al., 2013). Lze tedy předpokládat, že je nefunkční CPEB4 nahrazen jiným CPEB.

U posledního člena CPEB2 subrodiny – CPEB2, byla jeho vazba na CPE ověřena tím, že se na fragment mRNA s chybějícím CPE nenařádal. Rovněž bylo zjištěno, že se rekombinantní CPEB2 váže na úseky poly(U), ale ne na úseky poly(A), poly(G) ani poly(C) (Hägelle et al., 2009). Sekvence v 3' UTR, ke které se CPEB2 pravděpodobně váže, je UUUUCAU (Chen et Huang, 2012).

CPEB2 byl poprvé detekován v myších spermatidách. Následně byla jeho exprese pomocí RT-PCR detekována ve skoro všech myších tkání, vaječníky nevyjímaje (Kurihara et al., 2003). V samotných oocytech byl CPEB2 detekován o něco později výzkumným týmem Lin et al. (2009), kteří ho detekovali v žábách vajíčkách. CPEB2 byl rovněž lokalizován v cytoplazmě HeLa buněk (Kurihara et al., 2003).

Úloha CPEB2 v regulaci translace není však prozatím dobře prostudována. Jedinou mRNA, u které byla demonstrována přímá regulace translace pomocí CPEB2 je faktor indukovatelný hypoxií (HIF-1 α - hypoxia-inducible factor-1 α ,). Tato regulace spočívá v tom, že CPEB2 zpomaluje elongační fázi translace svou vazbou s eukaryotickým elongačním faktorem 2 (eEF2) (Chen et Huang, 2012). Johnson et al. (2015) uvádějí, že právě regulace CPEB2 mRNA je klíčovým mechanismem v rezistenci anoikis, což je druh programované buněčné smrti a je hnací silou v TBCN (triple-negative breast cancer).

Nicméně role CPEB2 v samičí reprodukci a embryogenezi nebyla prozatím objasněna, proto jsme se v našem výzkumu zaměřili především na něj.

3 Vědecké hypotézy a cíle práce

V rámci výzkumu důležitých meiotických regulátorů Emi1 a Emi2 a subrodiny CPEB2 byly stanoveny následující hypotézy:

- 1 Exprese Emi1 a Emi2 proteinu se liší mezi jednotlivými fázemi meiotického zrání myších a prasečích oocytů a zásadními posttranskripčními úpravami, jež u nich regulují genovou expresi, je polyadenylace.
- 2 Exprese Emi1 a Emi2 proteinu je v přímé korelaci s polyadenylací 3' konce jejich mRNA.
- 3 Exprese Emi1 proteinu přetrvává i po fertilizaci či parthenogenetické aktivaci oocytů.
- 4 Emi2 protein je po fertilizaci či parthenogenetické aktivaci oocytů degradován, záhy však dojde k jeho reakumulaci.
- 5 Zablokování Polo-box domény Plk1 malými makrocyclickými inhibitory zabrání fosforylaci Emi2 a sníží tak procento myších a prasečích oocytů maturovaných do MII fáze.
- 6 Exprese CPEB2 se liší v jednotlivých fázích meiotického zrání prasečích oocytů a vývoje ranných parthenogenetických embryí a je pro jejich zdárný vývoj nezbytná.
- 7 V prasečích oocytech jsou dvě formy CPEB2 – CPEB2A a CPEB2B.
- 8 CPEB3 a CPEB4 transkripty jsou přítomny ve všech fázích zrání prasečích oocytů.
- 9 Po zablokování CPEB2 se zvýší exprese ostatních CPEB z CPEB2 subrodiny (CPEB3, CPEB4) a částečně tedy nahradí jeho funkci.
- 10 Jediným členem z CPEB2 subrodiny, jehož inhibice nemá letální vliv na meiotické zrání myších oocytů, je CPEB4.

Cílem mé disertační práce bylo jednak navázat na mou předešlou experimentální práci a kvantitativně zmapovat a porovnat expresi a aktivitu Emi1 a Emi2 proteinů a dále míru polyadenylace jejich mRNA v průběhu meiotického zrání savčích oocytů a embryí. Jednak doplnit chybějící informace o cytoplazmatické polyadenylační elementy vazebných proteinech a zmapovat jejich expresi, fosforylaci a funkci v meióze a mitóze. Cílem práce bylo také testování funkce nových makrocyclických inhibitorů Emi2 na bázi pyrrolů, které byly vivinuty ve spolupráci s Dr. Bangem, Dr. Gunasekaranem a dalšími z KBSI (Korea Basic Science Institute).

Byla zmapována a porovnána exprese, fosforylace a aktivita sledovaných proteinů a jejich funkce a byly ověřovány stanovené hypotézy na základě sledování průběhu meiotického zrání prasečích a myších oocytů a časných embryí kultivovaných in vitro.

4 Materiál a metody

4. 1 Izolace a *in vitro* kultivace oocytů a embryí

K provedeným experimentům byly využity dva modelové organismy - prase domácí (*sus scrofa forma domestica*) a myš domácí (*Mus musculus*, var. *alba*, kmen CD-1, není-li uvedeno jinak).

4. 1. 1 Prasečí oocyty

Vaječníky prasat byly získány z prasniček v neznámém stádiu estrálního cyklu z místních jatek (Jatky Český Brod a.s., Český Brod, Česká republika). Do laboratoře byly transportovány ve fyziologickém roztoku (0,9 % chloridu sodného) při teplotě 36 až 37 °C, řádově do max. 3 hodin od porážky zvířat. Ovária byla třikrát promyta v teplém fyziologickém roztoku. V čerstvém fyziologickém roztoku, zahřátém na 38 °C, byla následně ponechána 15 minut na zotavení. Folikulární tekutina obsahující komplexy oocytů s kumulárními buňkami (COCs) byla následně izolována z folikulů o průměru 3 – 6 mm pomocí aspirace injekční stříkačkou (10 ml, Lauer solo, B. Braun) s jehlou (0,80 x 50 mm, Sterican, B. Braun). Následně byla takto vyizolovaná folikulární tekutina vstříknuta do 14 ml zkumavky (SPL, BioLab, Singapur) a vložena na 15 min do vodní lázně o teplotě 37 °C. Během této doby došlo k sedimentování COCs na dno. Přebytná folikulární tekutina byla odsáta pomocí plastové pasterové pipety (3 mm, 88337, Kartell s.p.a). Po trojnásobném promytí v manipulačním médiu (6,4 g NaCl (Carl Roth), 0,4 g KCl (Penta), 0,3 g CaCl₂.2H₂O (Penta), 0,7 g KH₂PO₄ (Penta), 0,97 g MgSO₄.7H₂O (Penta), 2 g glukóza (G8270, Sigma-Aldrich), 2 g HEPES (H3375, Sigma-Aldrich), 1 g PVA (341584, Sigma-Aldrich), 15 ml 7,5% NaHCO₃(Penta), 0,045 g penicilin (Biotika Bohemia), 0,065 g streptomycin (ICN Galenika), 1 ml amfotericin B (25 µg/ml, Y0000005, Sigma-Aldrich), 0,2 g pyruvát sodný (Serva), dH₂O doplněno do 1l) byl sediment ze zkumavky vypláchnut na Petriho misku o průměru 90 mm (400974, Gama group a.s.). Pro snadnější vybrání oocytů bylo přidáváno libovolné množství manipulačního média.

Oocyty byly vybírány pod mikroskopem (WP 10x/23, 455043, Carl Zeiss) sterilní ruční, nebo ústní skleněnou pipetou. Pro experimenty byly vybírány poze kvalitní, plně dorostlé oocyty s granulovanou cytoplazmou a kompaktními kumulárními buňkami. Vybrané

oocyty byly následně buď kultivovány, nebo z nich byly udělány vzorky GV, jak bude popsáno v následujícím textu.

Oocyty určené k *in vitro* kultivaci byly promyty třikrát v kultivačním médiu M199 (Life Technologies, Carlsbad, CA, USA) doplněném 10% fetálním hovězím sérem a 0,8 IU / ml P.G. 600 (Intervet international GmbH, Unterschleißheim, Německo) a následně kultivovány v plastové 4 jamkové kultivační misce (Nunc) s výše uvedeným kultivačním roztokem, překrytým minerálním olejem (M8410, Sigma-Aldrich). Před samotnou kultivací byl kultivační roztok vysycen v termostatu (HERA cell 150, Thermo Elector Corporation) při 38.5 °C a ve směsi 5 % CO₂ se vzduchem, po dobu minimálně 30 min. Oocyty byly následně kultivovány za stejných podmínek po dobu 20 hodin (GVBD), 28 hodin (MI) a 44 hodin (MII).

Oocyty požadované fáze zrání byly vloženy opět do zkumavky s přídavkem manipulačního média a pomocí vertexu (Vortex techno kartel TK3S, 2241, Elisabeth Pharmacon) z nich byly odstraněny kumulární buňky. Oocyty MII fáze, určené na parthenogenetickou aktivaci, byly holeny manuálně pomocí pipety v roztoku manipulačního média s přídavkem 1mg/ml hyaluronové kyseliny (H1136).

Evaluace fáze zrání prasečích oocytů bylo prováděno pomocí dvou metod. Oocyty určené na izolaci RNA, imunocytochemii a pro statistickou analýzu byly 3x promyty v PBS (P5493, Sigma-Aldrich) s přídavkem 0.1% BSA (A9418, Sigma-Aldrich) (PBS-BSA) a barveny 5 min v 5 µg/µl DAPI (D9542, Sigma-Aldrich) v PBS-BSA. Poté opět promyty v PBS-BSA. Fáze zrání takto obarvených oocytů byla sledována pod UV světlem. Z oocytů určených na vzorky pro metodu WB byl z každé maturace vybrán reprezentativní vzorek 20 kusů a ty byly fixovány v roztoku ethanolu a kyseliny octové v poměru 3:1, po dobu 48 hodin. Barvení bylo prováděno ve vodném roztoku 1% orceinu (O7380 Sigma-Aldrich) s 50% kyselinou octovou (A6283, Sigma-Aldrich) a 1% sodium citrátu (xxx). Následně byly oocyty promyty v 40% kyselině octové. Oocyty byly hodnoceny za použití mikroskopu s fázovým kontrastem (Carl Zeiss, Jena, Germany). Pouze vzorky z kultivací dosahujících minimálně 85% oocytů požadované fáze byly použity pro následující experimenty.

4. 1. 2. Prasečí embrya

Prasečí embrya byla připravována parthenogenetickou aktivací oocytů MII fáze po důkladné selekci. Vybrány byly pouze oocyty s viditelným prvním pólovým tělískem (Pb), uniformní ooplazmou a kvalitním kumulem. Denudované oocyty byly třikrát promyty v HEPES médiu, následně 3x v PBS-BSA a poté v roztocích 33% Activačního mannitol média (ACT, 280 mM roztok mannitolu obsahující 0.001 mM CaCl₂ a 0.05 mM MgSO₄, Penta XXX) ředěném v PBS-BSA, 66% ACT v PBS-BSA a 100% ACT. Pro promytí byla u oocytů v 100% ACT navozena membránová fúze pomocí dvou 60 μsec pulzů o intenzitě 160 V/mm za využití Electro Cell Manipulatoru 2001 (BTX, Inc., San Diego, CA, USA). Poté byly oocyty opět promyty v 66% ACT v PBS-BSA, 33% ACT v PBS-BSA, 3x v roztoku PBS-BSA a na závěr v kutivačním médiu PZM-5 (zygote medium-5, XXX). Po 3 hodinách kultivace v PZM-5 s přidavkem 7.5 μg/mL cytochalasinu B (XXX) byla embrya 3x promyta v PMZ-5 obsahujícím 0.4% BSA a poté kultivována v čistém PMZ-5 překrytým minerálním olejem po dobu jednoho dne (2-buněčné embrya), 2 dnů (4-buněčné embrya), 4 dnů (8-buněčné embrya), 5 dnů (morula) a 7 dnů (blastocysta) v termostatu při 38.5 °C a v 5 % CO₂ ve vzduchu.

4. 1. 3 Myší oocyty

Myší ovária byla izolována z myší chovaných v Ústavu živočišné fyziologie a genetiky, AV ČR a některé z myší zakoupených od společnosti AnLab s.r.o. Pro vzorky CPEB2-4 knockout myších oocytů byly použity vaječníky z KO myší C57BL6 nebo C57BL6/129 (KO linie byly získány od Dr. Raula Mendeze z IRB Barcelona) a pro kontrolní vzorky byly použity k nim korespondující wild-type jedinci.

Fáze estrálního cyklu myší, stejně jako v případě prasnic, nebyla známa, avšak pro kvalitnější a lepší estrus byly samice od věku 4 týdnů umísťovány na podestýlku s přidavkem podestýlky ze samčích klecí. Samice byly po dosažení 6 týdnů věku usmrceny mechanickým způsobem a následně z nich byly vyjmuty vaječníky.

Pro izolaci oocytů z vaječnicků bylo používáno manipulačním médiem M2 (M7167, Sigma-Aldrich) zahřáté na teplotu cca 37 °C. Pro blokaci předčasné maturace po vyjmutí oocytů z folikulů byl do média přidán v poměru 10 000 : 1 inhibitor IBMX (3-isobutyl-1-methylxanthine, I5879, Sigma-Aldrich) rozpuštěný v DMSO (dimethyl sulfoxide, D2650, Sigma-Aldrich). Vaječníky byly propláchnuty v manipulačním médiu a následně

umístěny do jeho kapky na Petriho misce o průměru 60 mm (Nunc). Oocyty byly z vaječníků izolovány jejich mechanickým rozrušením pomocí dvou inzulinových injekčních stříkaček (0,5 mm x 16 mm, Omnifit-F, B. Braun) pod mikroskopem (WP 10x / 23, 455043, Carl Zeiss). Pomocí ústní skleněné pipety (230 mm, 747720, Brand) byly poté plně dorostlé oocyty v GV fázi vybírány.

Před samotnou kultivací byly oocyty propláchnuty v kapce kultivačního média M16 (M7292, Sigma-Aldrich), opět vysyceném cca 30 minut před použitím v termostatu (HERA cell 150, Thermo Elector Corporation) při 37.5 °C a ve směsi s 5 % CO₂ se vzduchem. Kultivace probíhala následně za stejných podmínek v malých Petriho miskách o průměru 3,5 cm (Nunc), ve kterých bylo 5 kapek média M16, přelitých minerálním olejem (M8410, Sigma-Aldrich). Před samotnou kultivací byly oocyty nechány hodinu v kultivačním mediu s přísadkou IBMX, opět v poměru 10 000 : 1 (regenerace oocytů). Následně byly pomocí ruční skleněné tenkostěnné pipety opakovaným nasáváním a vysáváním denudovány a 3x promyty v čistém kultivačním mediu. Následovala kultivace do požadované fáze zrání - 2,5 hodiny (GVBD), 8 hodin (M1) a 16 hodin (MII) při 37.5 °C a ve směsi s 5 % CO₂ se vzduchem.

4. 1. 4 Myší embrya

Myší zygoty byly izolovány z oviduktů březích samic po in vivo fertilizaci. U samic byla před fertilizací hormonálně navozena superovulace injekcí 5 UI PMSG (HOR-272, ProSpec) a poté po 46 hodinách injekcí 5 UI hCG (C1063, Sigma-Aldrich). Po dalších 17 hodinách byly samice s vytvořenou poševní zátkou manuálně usmrceny a byly jim vyjmuty vejcovody. Vejcovody byly umístěny do kapky M2 média a mechanicky rozrušeny. Ruční skleněnou pipetou byly poté zygoty vybrány a 3x propláchnuty v kultivačním mediu M16 (opět vysyceným 30 min před použitím v termostatu). Embrya byla následně kultivována v kultivačních miskách se stejným médiem s přísadkou 100 U/ml penicilinu a pod minerálním olejem do požadovaného stupně embryonálního vývoje. Přibližně 20 hodin pro 2-buněčná embrya, 35 hodin pro 4-buněčná, 45 hodin pro 8-buněčná, 65 hodin pro stádium moruly a 80 hodin pro stádium blastocysty.

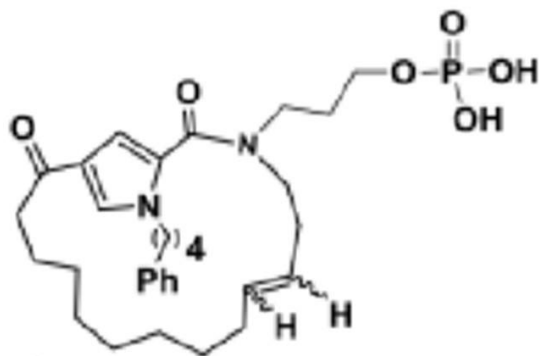
4. 2 Kultivace a synchronizace HeLa buněk

Lyzáty HeLa buněk, ředěné na koncentraci proteinů 1 µg/µl, byly používány pro optimalizaci ředění a podmínek inkubace specifických protilátek a jako kontrolní vzorky pro western blot. HeLa buňky byly kultivovány při 37 °C a 5% CO₂ v Dulbecco's Modified Eagle's médiu (D5796, Sigma-Aldrich) s přidavkem 10% fetálního bovinního séra, 4mM alanyl-glutaminu (A8185, Sigma-Aldrich) a 1% penicilinu. Synchronizace buněk byla prováděna pomocí thymidin-nokodazolového bloku. Buňky se kultivovaly 18 hodin s 2 mM thymidinem (T1895, Sigma-Aldrich), poté byly promyty v PBS a dále byly kultivovány 6 hodin v médiu bez thymidinu a následně dalších 18 hodin v médiu se 40 ng/ml nokodazolu. Po přechodu buněk přes G2/M fázi byly sbírány mitotické buňky, které se uvolnily z povrchu kultivační nádoby v důsledku mírného třepání.

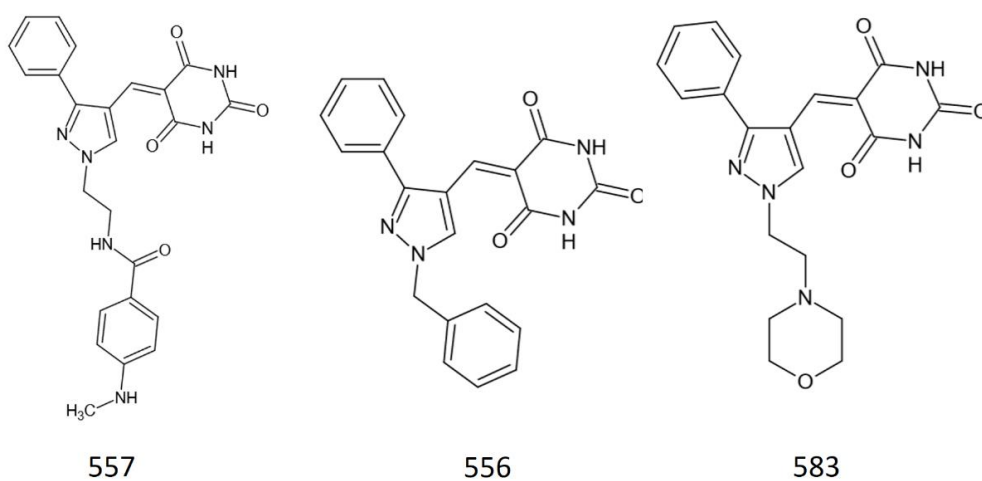
4. 3 Malé makrocyclické inhibitory vázající PBD Plk1

Jako inhibitory funkce Emi2 byly v KBSI (Korea Basic Science Institute) Dr. Bangem, Dr. Gunasekaranem a dalšími nasyntetizovány malé makrocyclické molekulové komponenty vázající polo-box doménu Plk1. Byl znovu testován již publikovaný inhibitor C-4 (Gunasekaran et al., 2017), jeho struktura viz. Obr. 5. Dále byly poprvé testovány nově nasyntetizované inhibitory 556, 576 a 583. Jejich struktury jsou zobrazeny na Obr. 6. Tyto struktury byly překresleny autorkou práce v programu ACD/ChemSketch (Advanced Chemistry Development, Inc., Toronto, Canada).

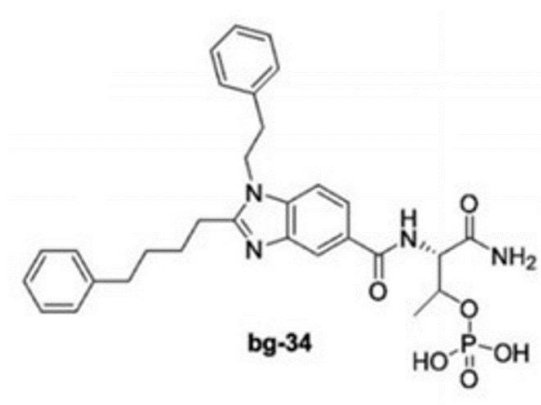
Inhibitory byly rozpouštěny v DMSO a přidávány do kultivačního média (viz. kapitola 4. 2 Izolace a in vitro kultivace oocytů a embryí) ve výsledné koncentraci 3mM, v případě C-4 potom 10 mM. Pro negativní kontrolu byla použita malá molekula bg34 (Srinivasrao et al., 2014), která neobsahuje fosfor-threonin, takže není schopná vázat Polo-box doménu Plk1, jako navržené inhibitory, v koncentraci rovněž 10mM. Struktura bg34 je zobrazena na Obr. 7. Prasečí a myší GV oocyty (minimálně 200 prasečích a 100 myších oocytů/kultivace) byly následně kultivovány za standardních podmínek.



Obr. 5. Struktura inhibitoru C-4. Převzato z Gunasekaran et al. (2017)



Obr. 6. Struktura nově nasyntetizovaných inhibitorů 557, 556 a 583.



Obr. 7. Struktura bg34 použitého jako negativní kontrola. Převzato z Srinivasrao et al. (2014)

4. 4 Příprava dsRNA a mikroinjekce

Pro experimenty ověřující funkci a důležitost CPEB2 během meotického zrání prasečích oocytů a během ranné parthenogenetické embryogeneze byly připravovány vzorky CPEB2 deficientních oocytů a embryí, pomocí genového knockdownu za užití mikroinjekcí dsRNA. V každém experimentu byla rovněž mikroinjekována korespondujícím objemem sterilní nuclease-free H₂O i kontrolní skupina oocytů/embryí. Prasečí CPEB2 dsRNA byla amplifikována *in vitro* z CPEB2 mRNA. Po navrhnutí a komerční syntéze primerů (dsCPEB2 forward primer: 5'- TAA TAC GAC TCA CTA TAG GGA GAC CAC GAG CTA TCC CAC CCA GGA A-3' a reverse primer: 5'-TAA TAC GAC TCA CTA TAG GGA GAC CAC GGA GAA AGC AAC TCG ACC AG-3', více informací viz Tab. 2), byla pomocí Phusion High-Fidelity DNA PCR Kitu (F553L, Thermo Scientific) připravována cDNA. V dalším kroku byla tato cDNA purifikována pomocí DNA Gel extraction kitu (GeneAll Biotechnology) a PCR produkty byly transkribovány pomocí MEGAscript T7 kitu (Ambion, Austin, TX, USA) vše dle protokolů uváděných výrobcí. Poté byla vzniklá dsRNA purifikována od DNA templátu a ssRNAs pomocí DNase I (04716728001, Roche) a RNase A (EN0531, Thermo Scientific). Takto přečištěná dsRNA byla naředěna, v koncentraci závislé na naměřených hodnotách optické denzity na 260 nm (Nanodrop, Thermofisher, Deutsch, Germany) na finální koncentraci final 1 µg/µl. dsRNA alikvoty byly skladovány v -80 ° C.

5–10 pl dsRNA (nuclease-free H₂O v případě kontrolních skupin) byla mikroinjekována do cytoplazmy prasečích denudovaných oocytů v GV fázi a do prasečích zygot 8 hodin po partenogenetické aktivaci. Pro mikroinjekce byl použit Eppendorf FemtoJet microinjector (Eppendorf, Hamburg, Germany) s invertovaným mikroskopem Nikon TE2000-U (Nikon Corporation, Tokyo, Japan).

Po mikroinjekci byly oocyty kultivovány 24 hod v kultivačním médiu s přídavkem 1 mM dbcAMP (N6,2'-O-Dibutyryladenosine 3',5'-cyclic monophosphate sodium salt, D0260, Sigma-Aldrich), poté byly oocyty 3x propláchnuty v čistém médiu a dále kultivovány za standartních podmínek. Kultivace embryí probíhala za neměnných podmínek.

Efektivnost CPEB2 knockdownu byla ověřována pomocí qRT-PCR, dle standartního protokolu, který bude popsán v následujícím textu. V každém experimentu bylo

injekováno minimálně 100 oocytů/zygot v experimentální i kontrolní skupině a experiment byl čtyřnásobně opakován.

4. 5 Studium exprese proteinů

Proteinová exprese byla studována pomocí metody 1DE Western blot. Vzorky oocytů (50 myších oocytů a zygot/vzorek, 100 prasečích oocytů a zygot/vzorek) a ostatních vývojových fází embryí (25 myších embryí/vzorek a 50 prasečích parthenogenetických embryí/vzorek) byly po kultivaci propláchnuty v zahřáté Nuclease-free vodě (3098, Sigma-Aldrich) a zmrazeny v -80 °C. Před použitím byly vzorky lyzovány pomocí 10 µL 1 x Reducing SDS Loading Bufferu (Cell Signaling Technology, Danvers, MA, U.S.A.), krátce zvortexovány, stočeny na centrifuze (Micro centrifuga, 050710, Carl Roth) a povařeny v destilované vodní lázni po dobu 5 min. Po povaření se vzorky opět zvortexovaly a stočily na centrifuze.

Takto připravené vzorky byly rozdělovány pomocí SDS-PAGE. Byl používán polyakrylamidový gel s 5% startovací a 10% rozdělovací částí. Startovací část (2 ml) byla složena z 1,9 ml destilované vody (dH₂O), 0,34 ml Bis-acrylamide 30% (A3699, Sigma-Aldrich), 0,5 ml 0,5 M Tris pH 6,8 (2010644, Carl Roth), 20 µl 10% SDS (sodium dodechl sulfate, L6026, Sigma-Aldrich), 20 µl 10% APS (peroxosíran amonný, 30154-AP0, Lach-Ner), 2 µl Temed (Temed electrophoresis reagent, V1-LP-RC-102-EA Biosciences). Rozdělovací část (5 ml) byla složena z 1,9 ml dH₂O, 1,7 ml Bis-acrylamide 30 %, 1,3 ml 1,5 M Tris pH 8,8, 50 µl 10 % SDS, 50 µl 10% APS, 2 µl Temed. Elektroforéza byla prováděna v aparatuře Mini-Protean 3 Cell (67S/04859, Bio-Rad) a v případě, že byly do aparatury vkládány dva gely současně, bylo zapnuto chlazení (Multi Temp III, Pharmacia Biotech). Jako pufr byl používán 1x koncentrovaný Running buffer (byl připravován v podobě zásobního 10x koncentrovaného se složením - 30,3 g Tris base, 144 g Glycin (2002722, Carl Roth), 10 g SDS, dH₂O doplnit do 1 l). Nanáška vzorků byla obvykle 10 µl. Jako markery byly použity Prestained Protein Marker, Broad Range („NEB“) (6 – 175 kDa, P7708L, New England Biolabs) a Precision Plus Protein Dual Color standards („DUAL“) (350000231, Bio-Rad). Nanáška markerů byla 3 µl. Aparatura byla připojena ke zdroji (Power Pack 1000, Bio-Rad) a bylo nastaveno 25 mA a 180 V, v případě, že byl v aparatuře jeden gel a 40 mA a 180 V, v případě dvou gelů.

Po skončení elektroforézy byl polyakrylamidový gel vložen přední stranou nahoru do 20% Towbinu (5,82 g Tris, 2,93 g Glycin, 750 ml dH₂O, tento roztok byl pomocí 10 M NaOH (S8045, Sigma-Aldrich) nebo HCl (H1758, Sigma-Aldrich) upraven na pH 9,2, dále bylo přidáno 200 ml methanolu (603-001-00-x, Lach-Ner) a doplněno dH₂O do 1 l) a 10 min se nechal třepat na třepačce (Laboratory shaker type 3583, ELPAN). Mezitím byla PVDF membrána (IPVH00010, Immobilon Transfer Membranes) aktivována přelitím methanolu a rovněž dána do 20% Towbinu. K membráně byl přidán 2x filtrační papír Extra hic blot (1703969/A, Bio-Rad) a nechal se i s membránou 2 min třepat.

Rozdělená proteinová frakce byla poté transferována z gelu na membránu pomocí polosuchého blotting systému (Biometra GmbH, Goettingen, Germany), bylo nastaveno 5 mA na cm² velikosti membrány, 18 W a nastaven čas blotování na 35 min. V případě málo otisklého markeru bylo přidáno dalších 10 min.

Pro kontrolu řádného transferu byl gel barven 20 min na třepačce v roztoku Coomassie Blue (400 ml methanolu, 100 ml kyseliny octové (457401, Penta), 1 g Coomassie Brilliant Blue R (27816, Sigma-Aldrich), dH₂O doplněno do 1 l) a následně byl odbarvován dle potřeby Destainem (800 ml methanolu, 200 ml kyseliny octové, dH₂O doplněno do 1 l) a na závěr třepán 10 min v dH₂O.

Membrána byla blokována jednu hodinu na překlápěčce (Profile Maker, M1241-4001, New Brunswick Scientific CO., INC) v blokačním roztoku (viz. Tab. 1). Poté byla 3x promyta v TTBS (8 g NaCl, 0,5 ml Tween 20 (Polyoxyethylenesorbitan monolaurate, P-1379, Sigma-Aldrich), 10 ml 2 M Tris pH 7,6, doředit dH₂O do 1 l) a inkubována s primární protilátkou (viz. Tab. 1) přes noc na překlápěčce ve 4 °C. Po inkubaci byla membrána třepána 3x 10 min v TTBS a inkubována se sekundární protilátkou (viz. Tab. 1) 1 hodinu na překlápěčce při pokojové teplotě.

Proteiny byly vizualizovány pomocí chemiluminiscenčního detekčního systému ECL-plus (2132, GE Healthcare, Chalfont St Giles, Bucks, UK) a RTG filmu (CL-X Posure film, 34091, Pierce) v X-ray film kazetě (Hypercassette amersham, 23649, Pharmacia Biotech). Doba expozice byla závislá na intenzitě signálu - od několika sekund po několik hodin. Poté byl film umístěn na 2 min do vývojky (Foma LP-T, 1010, Foma Bohemia, s.r.o), opláchnut v dH₂O a vložen na 2 min do ustalovače (Foma Fix, 0511, Foma Bohemia). Na závěr byl opět opláchnut v dH₂O a po oschnutí byl skenován pomocí

kalibrovaného denziometru GS-800 (Bio-Rad, Hercules, CA, U.S.A). Výsledky byly kvantifikovány za použití Quantity One 1-D Analysis Softwaru (Bio-Rad).

Membrána byla 3x 15 minut promývána na třepačce v TTBS, nebo tzv. stripována (odmytí všech navázaných protilátek) a dále dle potřeby přeznačována jinou protilátkou. Stripování bylo prováděno inkubací membrány ve stripovacím roztoku (3,13 ml 0,5 M Tris (pH 6,8), 5 ml 10% SDS, dH₂O doplnit 25 ml, 180 µl merkaptoethanol) v zatavené folii 15 minut ve vodní lázni o teplotě 50 °C na třepačce. Poté byla membrána opět 3x promyta v TTBS, rehydratována methanolem a znovu blokována.

Tabulka 1: Protilátky a podmínky inkubace

Protein	Zdroj	Blokace	Ředění	Sekundární AB ředění	Katalogové číslo, výrobce
β-Tubulin	Myš	2,5% M	1:60000, 5% M	1 : 7500, 2,5% M	T4026, Sigma-Aldrich
CPEB2	Králík	5% M	1:500, 5% M	1 : 7500, 2,5% M	ARP41186, Aviva System Biology
GAPDH	Králík	2,5% M	1:50000, 5% M	1 : 7500, 2,5% M	G9545, Sigma-Aldrich
Emi1	Králík	10% Ž	1 : 1 000, T	1 : 7500, T	LS-C80548, LifeSpan Biosciences
Emi2	Králík	5% M	1 : 500, 5% M	1 : 7500, 2,5% M	Sc-68894, SantaCruz Biotechnology

M – odtučněné 1,3 % sušené mléko (Laktino, Promyl) rozpuštěné v TTBS; T – TTBS;

Ž – želatina (G-7765) rozpuštěná v TTBS

4. 6 Izolace RNA a příprava cDNA reverzní transkripcí

Celková RNA byla izolována ze vzorků 50 myších a 100 prasečích oocytů/vzorek a 25 myších a 50 prasečích embryí/vzorek s použitím RNeasy Micro Kitu (74004; Qiagen) dle protokolu výrobce. Výtěžek z izolace byl 12 µl total RNA/vzorek.

Pro syntézu cDNA reverzní transkripcí byl použit SuperScript III First-Strand Synthesis System (18080051, Invitrogen) dle protokolu doporučeného výrobcem a Oligo(dT)12-18

Primer (18418012, Invitrogen). Takto vytvořená jednořetězcová komplementární DNA (cDNA) byla použita jako templát pro další experimenty.

4. 7 PCR

K PCR premixu o objemu 18 μ l/reakce (4 μ l 5x Phusion Buffer (F518L, Thermo Scientific), 0,4 μ l 10 mM dNTPs (Deoxynucleotide solution MIX, N0447S, BioLabs), 1 μ l 10 μ M specifický forward primer (viz. Tab. 2), 1 μ l 10 μ M specifický reverse primer (viz. Tab 2), 11,4 μ l RNase free H₂O, 0,2 μ l Phusion Polymeráza (F530S, Thermo Scientific), byla přidána cDNA (2 μ l/vzorek) a vzorek byl dále amplifikován v termocykleru, dle následujících kroků: 1. 94 °C 2 min, 2. 94 °C 45 sec, 3. 57/60 °C (dle specifických primerů) 45 sec, 4. 72 °C 1 min, následně byl nastaven cyklus kroků 2. – 4. s 29x opakováním, 5. 72 °C 5 min, 6. 4 °C

4. 8 Poly(A)-test (PAT)

Poly(A)-test byl prováděn dle modifikovaného protokolu Sallése et Stricklanda (1995) a to dle následujícího postupu: k vzorku 5 μ l total RNA byl přidán 1 μ l Oligo(dT) primeru a byl zahřát na 65 °C (termocykler - T3 Thermoblock, 1712115, Biometria) a dále byl k vzorku napipetováno 14 μ l předeřátého PAT premixu (4 μ l 5x First-Strand Buffer, 1 μ l 0,1 M DTT, 1 μ l RNaseOut Inhibitor (574752, Invitrogen), 1 μ l 10 mM dNTPs, 1 μ l 10 mM ATP (P0756S, BioLabs), 5 μ l RNase free H₂O, 1 μ l 10 U/ μ l T4 DNA ligasy (M0202S, BioLabs). Vzorek byl poté ponechán ve 42 °C 30 min. Dále byly ke vzorku přidány 2 μ l Oligo(dT)-anchoru (200 ng/ μ l) a byl přenesen na 2 hodiny do 12 °C. Poté byl zahřát opět na 42 °C a byl k němu přidán 1 μ l SuperScript III reverzní transkriptázy (200 U/ μ l) a vzorek se ponechal 1 hodinu inkubovat (reverzní transkripce). V následujícím kroku se vzorek zahřál na teplotu 70 °C po dobu 30 min a došlo tak k inaktivaci enzymů. S takto vytvořenou cDNA byla dále prováděna PAT-PCR za použití specifických primerů a oligo(dT)-anchor primeru (dle Tab. 2.). PAT-PCR premix byl dle následujícího složení (20 μ l/reakce): 2 μ l 10x Thermo pol. Buffer (B9004S, NEB), 0,6 μ l dNTP, 1 μ l specifický primer (forward), 1 μ l oligo(dT)-anchor primer (revers), 0,1 μ l Taq polymeráza (E5000S, NEB), 13,3 μ l RNase free H₂O, 2 μ l PAT-cDNA. Vzorek byl dále

amplifikován v termocykleru, dle následujících kroků: 1. 94 °C 2 min, 2. 94 °C 45 sec, 3. 57/60 °C (Emi1/Emi2) 45 sec, 4. 72 °C 1 min, následně byl nastaven cyklus kroků 2. – 4. s 29x opakováním, 5. 72 °C 5 min, 6. 4 °C.

4. 9 Elektroforéza nukleových kyselin

K výsledným produktům z PCR a PAT-PCR amplifikace byly přidány 4 µl/vzorek vzorkovacího pufru 6x Loading Dye (R0611, Fermentas). Vzorky byly rozdělovány v případě PAT-PCR produktů vertikální elektroforézou v 5% polyakrylamidovém gelu nebo v případě PCR produktů horizontální elektroforézou v 2% agarózovém gelu (UltraPure Agarose, 16500500, Invitrogen) a dále značeny 20 minut v rozoku 1 mg/ml barviva GelRed (Biot41002, LabMark) a 1x TBE (10,8 g Tris, 5,5 g Kyselina boritá (005-007-00-2, Penta), 20 ml 0,5 M EDTA (kys. Ethylendiamintetraoctová, pH 0,8, 03610 2, Penta), doplnit do 1 l dH₂O). Složení polyakrylamidového gelu bylo následující: 6 ml 5x TBE, 5 ml Acrylamide (30%, 29:1, A3574, Sigma-Aldrich), dH₂O 18,8 ml, 300 µl 10% APS, 30 µl Temed.

Gely byly vizualizovány za použití UV světla pomocí Kodac Gel Logic 100/200 Camera (C00289, Carestream Health, Inc.), K. G. L. integrated iluminátor cabinet (C98063, Carestream Health, Inc.) a KODAK MI SE softwaru (standard edition r. 4. 5. 0, 1994 – 2007, Carestream Health, Inc.).

4. 10 qRT-PCR

mRNA byla izolována z 50 oocytů, pro každou sledovanou fázi meiotického zrání a z 25 embryí, pro sledovanou fázi ranné embryogeneze, pomocí Dynabeads mRNA Direct Kitu (61011, Ambion, Life Technologies, USA). cDNA byla posléze syntetizována HyperScrip First-Strand Synthesis Kitem (601-005, GeneAll Biotechnology, South Korea) dle protokolu výrobce. Pro experimenty byly použity minimálně tři replikáty izolované mRNA pro každou fázi.

Pro kvantifikaci sledovaných genů v reálném čase byl použit WizPure qPCR Master mix (Super Green) (W1731, Wizbiosolutions, Seongnam, South Korea). Jako housekeeping gen byl používán GAPDH. Sledované geny byly amplifikovány pomocí specifických

primerů, viz. Tab. 2, které byly designované v programu Primer Premier 5 (PREMIER Biosoft, CA, USA). qRT-PCR byla realizována pomocí CFX96 Touch Real-time PCR Detection System (Bio-Rad, CA, USA) dle následujícího protokolu: denaturace při 95 °C 10 min; 40 cyklů amplifikace a kvantifikace - 94 °C 10 sec, 60 °C 30 sec a 72 °C 30 sec s jednoduchým fluorescenčním měřením; tání při 65 - 95 °C se zahříváním 0.2 °C/sec and kontinuálním fluorescenčním měřením. Relativní genová exprese byla kvantifikována s normalizací na hladiny GAPDH s využitím metody 2- $\Delta\Delta C_t$ (Livak et Schmittgen, 2001). Pro každý sledovaný gen byly použity čtyři nezávislé experimenty, vždy se třemi replikáty pro každý vzorek.

Tabulka 2: Sekvence primerů

Primer			Sekvence	Číslo sekvence v NCBI
mEmi1	F	PAT	AGAGCGAGCAGTCTGCAAACGGGA	NM_025995.2
pEmi1	F	PAT	ATGGGTCCTCTGCCAGGTACTAAGAAAAGC	XM_003121138.1
mEmi2	F	PAT	TGGGCTGGGCAGAAATGATGGGTT	NM_001081253.1
pEmi2	F	PAT	GGGACTATGTAGCCGCACAGCCTGT	XM_001925334.1
Oligo(dT)-anchor			GCGAGCTCCGCGGCCGCGTTTTTTTTTTTTT	(Sallés et Strickland,1995)
pCPEB2	R	RT	GCACTAGTGTTCCAGCGGAAGTGGAT	HM_037344.1
pCPEB2	F	RT	TCACTAGTTCCTGGGGAGCAATGCAT	HM_037344.1
pCPEB2	R	Q	GGAGAAAGCAACTCGACCAG	HM_037344.1
pCPEB2	F	Q	G TTCAGATCCGTCCTTGAA	HM_037344.1
pCPEB2	R	DS	TAATACGACTCACTATAGGGAGACCACGGAGA AAGCAACTCGACCAG	HM_037344.1
pCPEB2	F	DS	TAATACGACTCACTATAGGGAGACCACGAGCT ATCCCACCCAGGA A	HM_037344.1
pCPEB3	R	O	CTCCTGGAACACAGCAGAAAGG	XM_021073492.1

pCPEB3	F	O	TTTCCGGACCGATAATGGTA	XM_021073492.1
pCPEB4	R	O	CATCGATGAGAGCCTGAACA	XM_003134043.5
pCPEB4	F	O	CCACTGCTTCACTCACCAGA	XM_003134043.5
pGAPDH	R	Q	AAGCAGGGATGATGTTCTGG	NM_001206359.1
pGAPDH	F	Q	GGGCATGAACCATGAGAAGT	NM_001206359.1

m -primer na myší sekvenci; p - primer na prasečí sekvenci; R- reverse primer; F – forward primer, RT – primer na RT-PCR, Q – primer na qRT-PCR; PAT – primer na poly(A) test; O – primer na RT-PCR i qRT-PCR; DS – primers use for dsRNA preparation

4. 11 Imunocytochemie (ICC) a konfokální mikroskopie

Oocyty/embrya byly po dobu 5 – 10 sec ošetřeny kyslinou tyrodovou (T1788) pro odstranění zony pellucidy a poté fixovány 30 min v 3.7% paraformaldehydu. Poté byly 3x promyty v PVA a 0,3% PBS (dále jen PVA-PBS) a permeabilizovány v roztoku PVA-PBS obsahující 0.5% Triton (X100) 30 minut. Poté byly 3x 5 min propláchnuty v promývacím roztoku (0,1% Triton, 0,01% Tween 20 v PBS). Oocyty a embrya byly blokovány v PBS-1% BSA po dobu 1 hodiny a následně přes noc inkubovány ve 4 °C s primární protilátkou proti CPEB2 (ARP41186, Aviva System Biology) či α -Tubulinu (F2168, Sigma-Aldrich) ředění 1:50 v PBS-1% BSA. Po inkubaci byly 5 min promývány v promývacím roztoku a následně inkubovány se sekundární protilátkou v PBS-1% BSA, s ředěním 1:200 po dobu 1,5 hod při pokojové teplotě. Oocyty a embrya byly promyty v promývacím roztoku a inkubovány s 10 mg/mL DAPI v PVA-PBS 10 min ve tmě, promyty 3x v čistém roztoku PVA-PBS a zamontovány mezi podložní a krycí sklo pomocí media Vectashield (94010, Vector Laboratories, Burlingame, CA).

Připravené vzorky byly skenovány na konfokálních mikroskopech (Zeiss LSM 710 META, Jena, Germany; Leica DM2500; Leica TCS SP5 (Leica, Microsystem AG, Wetzlar, Německo) pomocí softwaru Zen (version 8.0, Zeiss, Jena, Germany), nebo LAS AF Lite (Leica).

4. 12 Statistická analýza dat

Provedené experimenty byly opakovány nejméně čtyřikrát, není-li uvedeno jinak. Data byla analyzována pomocí softwaru SPSS (verze 11.0, SPSS Inc., Chicago, IL). Rozdíly v normalizovaných datech mezi odlišnými fázemi meiotického zrání a časného embryonálního vývoje byly determinovány pomocí jedno-výběrovho testu ANOVA a dále pomocí Fisher least significant difference (LSD) metody. Jako další statistický nástroj byl použit Studentův t-test. Data ze všech měření byla zprůměrována a jsou uvedena se střední chybou průměru (\pm SEM). Statistické rozdíly jsou indikovány rozdílnými písmeny a hvězdičkami (*P < 0.05, **P < 0.01 and ***P < 0.001).

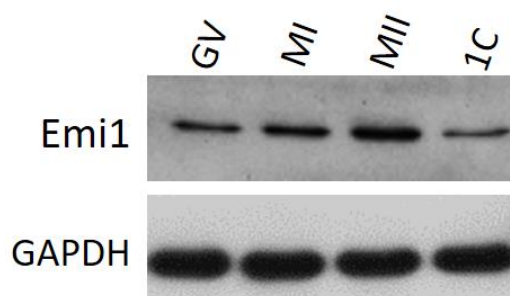
5. Výsledky

5. 1 Expresse Emi1 proteinu

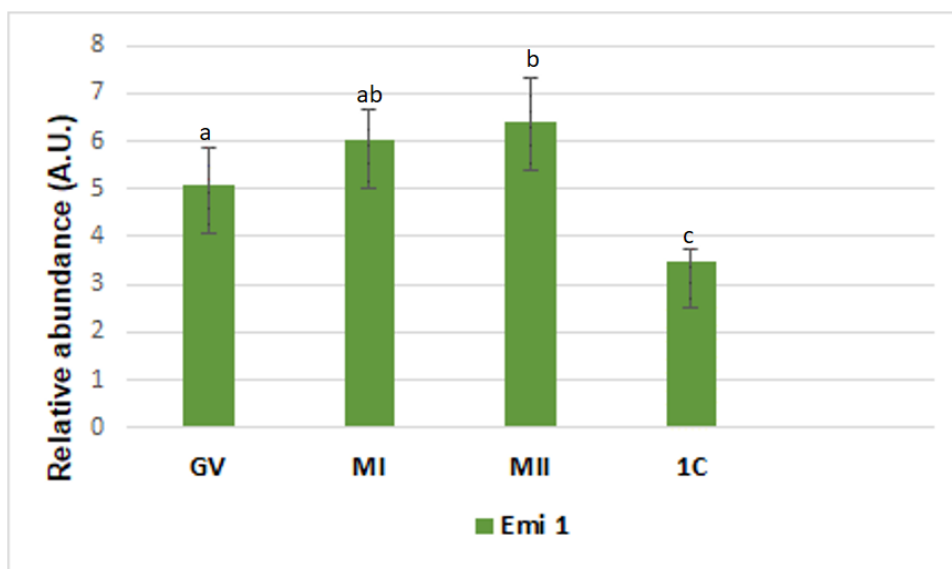
Expresse Emi1 proteinu byla detekována pomocí SDS-PAGE s následným Western blotem. U prasečích oocytů byla expresse detekována ve všech sledovaných fázích meiotického zrání a přetrvávala i po parthenogenetické aktivaci oocytů.

Expresse proteinu vzrůstala z GV fáze až do druhé metafáze (MII), kde dosahovala svého maxima. Zde byl pozorován statisticky významný rozdíl ($P < 0.05$) mezi expresí proteinu v GV fázi a MII fází. Po aktivaci oocytů byla pozorována degradace proteinu a expresse Emi1 klesla na své minimum (stádium zygoty). Expresse Emi1 ve stádium zygoty byla statisticky rozdílná ($P < 0.05$) od všech pozorovaných stádií meiotického zrání oocytů (GV, MI, MII).

Reprezentativní výsledek expresse Emi1 proteinu v prasečích oocytech a zygotách zobrazuje Obr. 8. Průměrné hodnoty relativní optické denzity (A.U.) v jednotlivých fázích zrání zobrazuje Graf 1.



Obr. 8. Expresse Emi1 proteinu u prasečích oocytů a zygot. Reprezentativní obrázek Western blotu s použitou protilátkou proti Emi1 a GAPDH (kontrola nanášky). Vzorky byly rozděleny pomocí SDS-PAGE na 10 % gelu a přeneseny na PVDF membránu. Sledovanými stádii bylo stadium profáze I (GV), metafáze I (MI), metafáze II (MII) a stadium zygoty (1C). Experiment byl proveden třikrát a bylo použito 100 oocytů/zygot na vzorek.

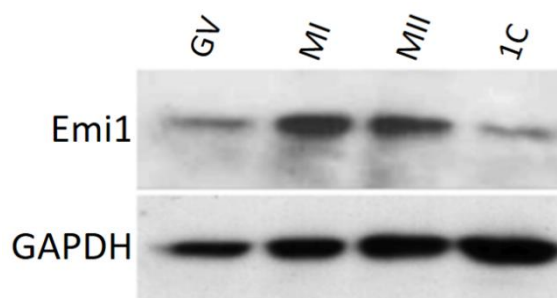


Graf 1 Relativní exprese Emi1 proteinu u prasečích oocytů a zygot. Exprese Emi1 proteinu ze tří nezávislých experimentů byla kvantifikována pomocí softwaru Quantity one. Optická denzita signálů jednotlivých vzorků byla normalizována na celkovou optickou denzitu a na individuální optickou denzitu GAPDH. Sledovanými stádii bylo stadium profáze I (GV), metafáze I (MI), metafáze II (MII) a stadium zygoty (1C). Experiment byl proveden třikrát a bylo použito 100 oocytů/zygot na vzorek. Znáznorněny jsou průměry měření \pm SEM. Rozdílná písmena indikují statisticky významný rozdíl ($P < 0.05$).

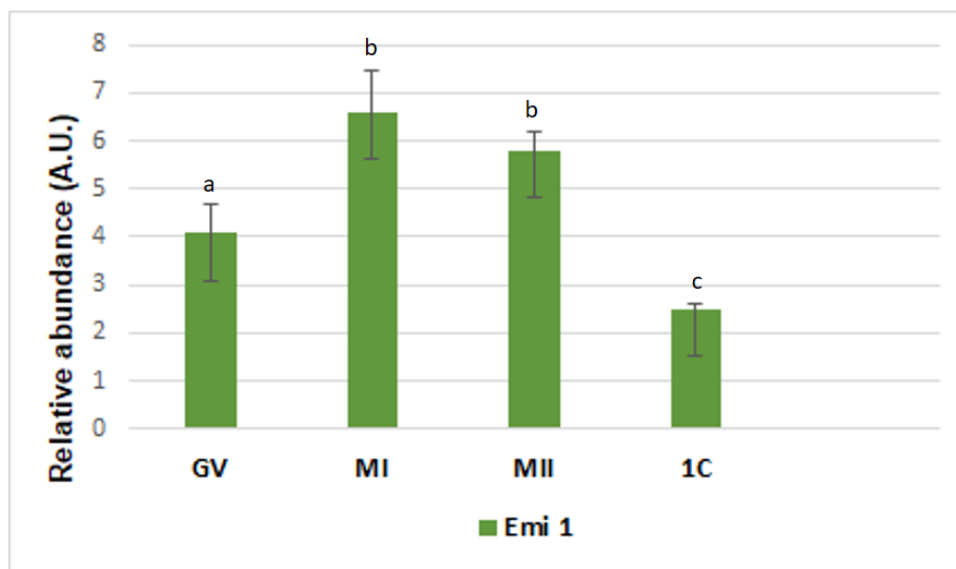
U myších oocytů byla exprese Emi1 proteinu rovněž detekována ve všech sledovaných fázích meiotického zrání a také přetrvávala i po *in vivo* fertilizaci ve stádiu zygoty.

Exprese myšího Emi1 proteinu statisticky významně ($P < 0.05$) vzrůstala z GV fáze do první metafáze (MI), kde dosahovala svého maxima. Potom lehce klesla do MII fáze (statisticky bezvýznamný rozdíl, P). Svého minima dosahovala exprese Emi1 po parthenogenetické aktivaci. Ve fázi zygoty byl pozorován statisticky významný rozdíl ($P < 0.05$) exprese proteinu v porovnání s expresí proteinu ve všech ostatních fázích meiotického zrání (GV, MI, MII).

Reprezentativní výsledek exprese Emi1 proteinu v myších oocytech a zygotách zobrazuje Obr. 9. Průměrné hodnoty relativní optické denzity (A.U.) v jednotlivých fázích zrání zobrazuje Graf 2.



Obr. 9 Expresse Emi1 proteinu u myších oocytů a zygot. Reprezentativní obrázek Western blotu s použitou protilátkou proti Emi1 a GAPDH (kontrola nanášky). Vzorky byly rozděleny pomocí SDS-PAGE na 10 % gelu a přeneseny na PVDF membránu. Sledovanými stádii bylo stadium profáze I (GV), metafáze I (MI), metafáze II (MII) a stadium zygoty (1C). Experiment byl proveden čtyřikrát a bylo použito 50 oocytů/zygot na vzorek.



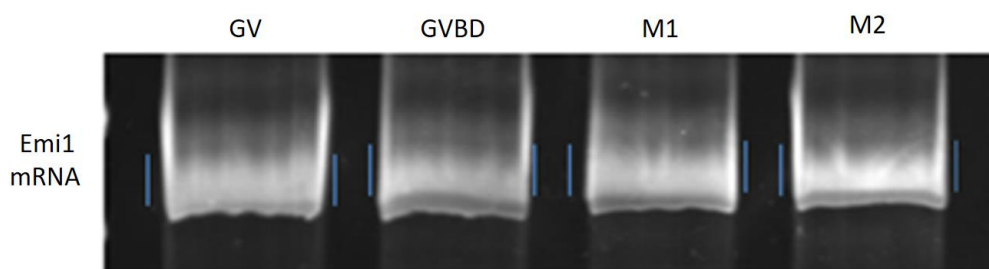
Graf 2. Relativní exprese Emi1 proteinu u myších oocytů a zygot. Expresse Emi1 proteinu ze čtyř nezávislých experimentů byla kvantifikována pomocí softwaru Quantity one. Optická denzita signálů jednotlivých vzorků byla normalizována na celkovou optickou denzitu a na individuální optickou denzitu GAPDH. Sledovanými stádii bylo stadium profáze I (GV), metafáze I (MI), metafáze II (MII) a stadium zygoty (1C). V každém experimentu bylo použito 50 oocytů/zygot na vzorek. Znázorněny jsou průměry měření \pm SEM. Rozdílná písmena indikují statisticky významný rozdíl ($P < 0.05$).

5. 2 Exprese a polyadenylace Emi1 mRNA

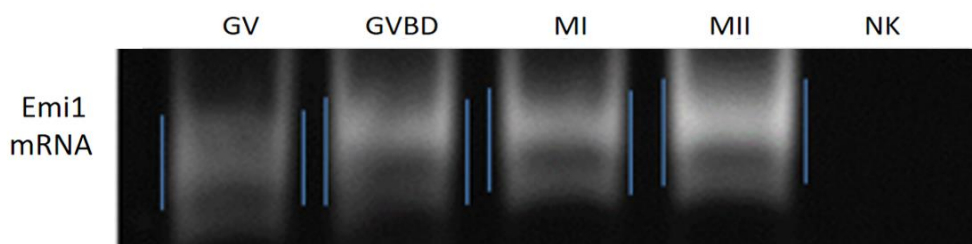
Pro studium exprese a polyadenylace mRNA Emi1 byla využita metoda poly(A) testu s následnou PCR. Pro větší citlivost byly PCR produkty rozděleny na polyakrylamidovém gelu.

Exprese mRNA Emi1 v prasečích i myších oocytech byla detekována ve všech fázích meiotického zrání – profáze I (GV), rozpad zárodečného váčku (GVBD), první a druhá metafáze (MI a MII).

U všech fází meiotického zrání byla detekovaná mRNA polyadenylována. U prasečích oocytů byla míra polyadenylace ve všech fázích zrání shodná (Obr. 10). U myších oocytů byl nejslabší polyadenylační signál v GV oocytech a následně lehce rostl až do MII fáze (Obr. 11).



Obr. 10. Exprese a polyadenylace prasečí Emi1 mRNA. Z 100 prasečích oocytů ve sledovaných fázích meiotického zrání – profáze I (GV), rozpad zárodečného váčku (GVBD), metafáze I (MI) a metafáze II (MII) byla vyizolována celková RNA. Pomocí poly(A) testu byla tato RNA přepsána do cDNA a ta použita jako templát pro PCR se specifickými primery navrženými na sekvenci prasečí Emi1 a oligo(dT)-anchor primerem. Výsledné PCR produkty byly rozděleny na 5% polyakrylamidovém gelu pomocí elektroforézy (DNA PAGE). Gely byly následně značeny pomocí GelRedu. Polyadenylované produkty jsou zvýrazněny modrými úsečkami. Experiment byl čtyřikrát opakován.



Obr. 11. Expres a polyadenylace myší Emi1 mRNA. Z 50 myších oocytů ve sledovaných fázích meiotického zrání – profáze I (GV), rozpad zárodečného váčku (GVBD), metafáze I (MI) a metafáze II (MII) byla vyizolována celková RNA. Pomocí poly(A) testu byla tato RNA přepsána do cDNA a ta použita jako templát pro PCR se specifickými primery navrženými na sekvenci myší Emi1 a oligo(dT)-anchor primerem. Výsledné PCR produkty byly rozděleny na 5% polyakrylamidovém gelu pomocí elektroforézy (DNA PAGE). Gely byly následně značeny pomocí GelRedu. Polyadenylované produkty jsou zvýrazněny modrými úsečkami. Experiment byl čtyřikrát opakován. NK značí negativní kontrolu.

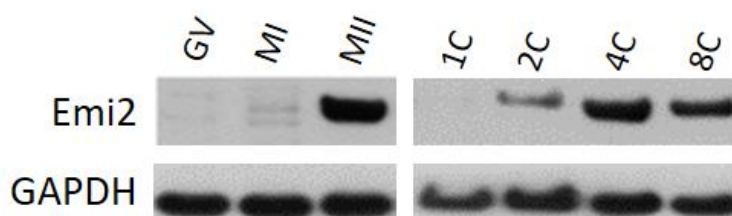
5. 3 Expres Emi2 proteinu

Expres Emi2 proteinu byla detekována, stejně jako tomu bylo u Emi1 proteinu, pomocí SDS-PAGE s následným Western blotem.

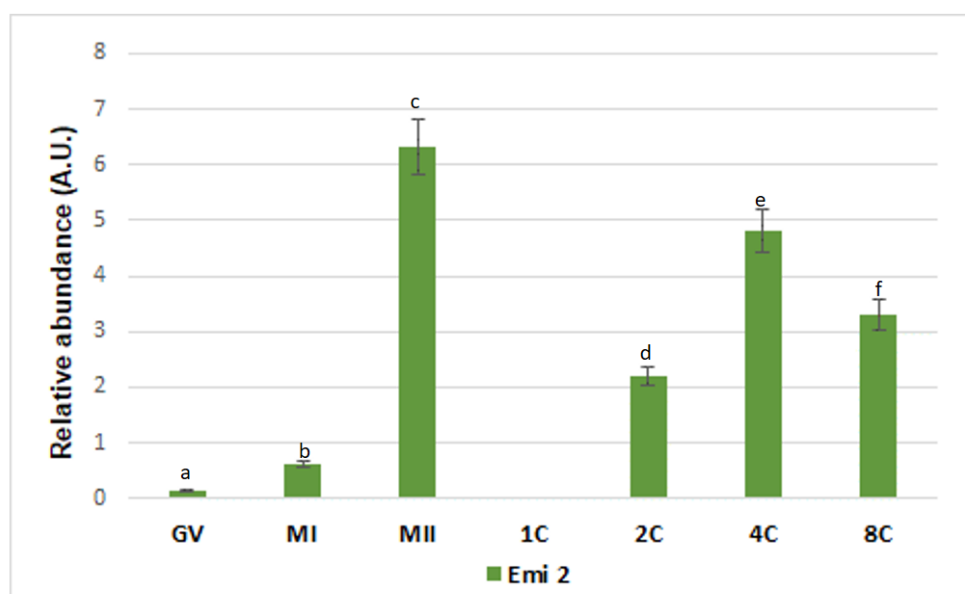
U prasečích oocytů byla expres detekována ve všech sledovaných fázích meiotického zrání, nicméně v GV oocyttech byla expres na hranici detekce. Ve fázi první metafáze (MI) se expres Emi2 proteinu lehce zvýšila, ale stále byla na velmi nízkých hladinách. Ve fázi druhé metafáze (MII) došlo k masivní expresi proteinu, která zde dosahovala maxima. Po parthenogenetické aktivaci oocytů došlo k degradaci Emi2 proteinu a ve fázi zygoty nebyl detekovaný žádný signál. Během embryogeneze se protein Emi2 opět reakumuloval a ve fázi dvoubuněčného embrya byl již dobře detekovatelný. Expres Emi2 se následně ve fázi čtyřbuněčného embrya zvýšila, načež ve fázi osmibuněčného embrya opět lehce klesla.

Mezi všemi porovnávanými fázemi meiotického zrání prasečích oocytů i časné parthenogenetické embryogeneze byly pozorovány statisticky významné rozdíly ($P < 0.05$).

Reprezentativní výsledek exprese Emi2 proteinu v prasečích oocytech a ranných embryích zobrazuje Obr. 12. Průměrné hodnoty relativní optické denzity (A.U.) v jednotlivých fázích zrání a embryonálního vývoje zobrazuje Graf 3.



Obr. 12. Expresse Emi2 proteinu u prasečích oocytů a ranných embryí. Reprezentativní obrázek Western blotu s použitou protilátkou proti Emi2 a GAPDH (kontrola nanášky). Vzorky byly rozděleny pomocí SDS-PAGE na 10 % gelu a přeneseny na PVDF membránu. Sledovanými stádii bylo stadium profáze I (GV), metafáze I (MI), metafáze II (MII), stadium zygoty (1C), stádium dvoubuněčného embrya (2C), stádium čtyřbuněčného embrya (4C), stádium osmbuněčného embrya (8C). Experiment byl proveden čtyřikrát a bylo použito 100 oocytů/zygot a 50 ostatních vývojových stádií embryí na vzorek.



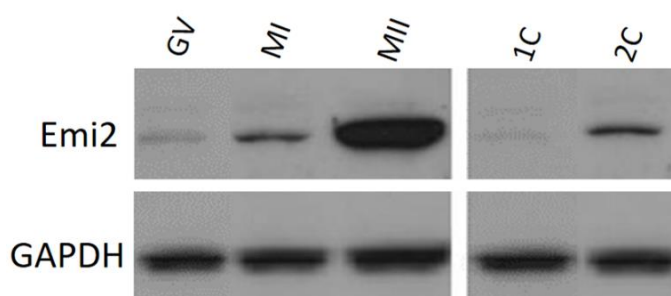
Graf 3. Relativní xprese Emi2 proteinu u prasečích oocytů a ranných embryí. Expresse Emi2 proteinu ze čtyř nezávislých experimentů byla kvantifikována pomocí softwaru Quantity one. Optická denzita signálů jednotlivých vzorků byla normalizována na celkovou optickou denzitu a na individuální optickou denzitu GAPDH. Sledovanými stádii bylo stadium profáze I (GV), metafáze I (MI), metafáze II (MII) a stadium zygoty (1C). V každém experimentu bylo použito 50 oocytů/zygot a 25 embryí ostatních vývojových stádií na vzorek. Znázorněny jsou průměry měření \pm SEM. Rozdílná písmena indikují statisticky významný rozdíl ($P < 0.05$).

U myších oocytů byla exprese Emi2 detekována ve všech sledovaných fázích meiotického zrání i ranné *in vivo* embryogeneze. Exprese proteinu rostla z GV fáze až do MII, kde dosahovala svého maxima.

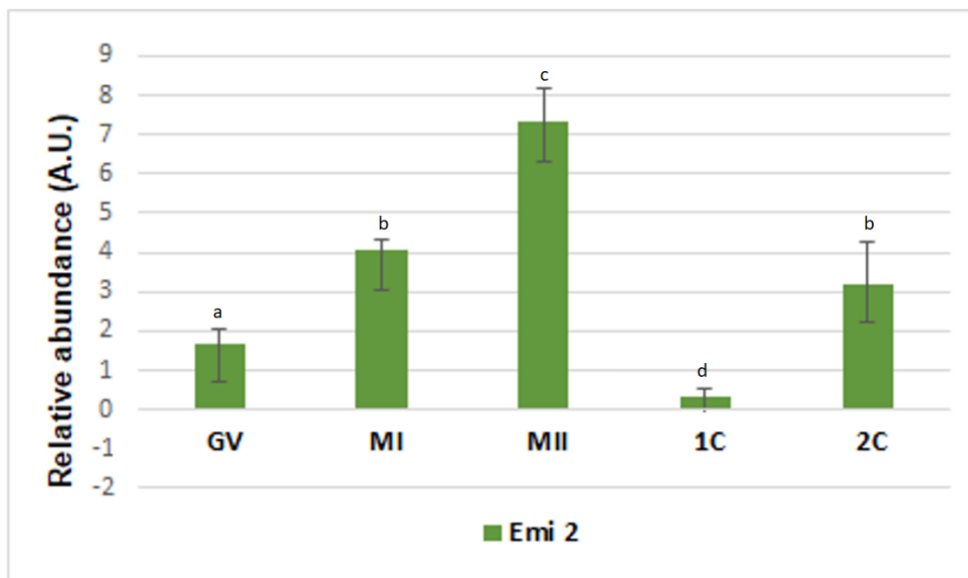
Po fertilizaci došlo k markantní degradaci Emi2 proteinu, nicméně ve fázi zygoty byl stále nepatrně detekovatelný. Po započetí mitotického buněčného dělení se exprese Emi2 proteinu opět zřetelně zvýšila (fáze čtyřbuněčného embrya).

Mezi všemi porovnávanými fázemi meiotického zrání myších oocytů i ranné embryogeneze se hladiny exprimovaného Emi2 proteinu statisticky významně lišily ($P < 0.05$).

Reprezentativní výsledek exprese Emi2 proteinu v myších oocytech a ranných embryích zobrazuje Obr. 13. Průměrné hodnoty relativní optické denzity (A.U.) v jednotlivých fázích zrání a embryonálního vývoje zobrazuje Graf 4.



Obr. 13. Expresa Emi2 proteinu u myších oocytů a ranných embryí. Reprezentativní obrázek Western blotu s použitou protilátkou proti Emi2 a GAPDH (kontrola nanášky). Sledovanými stádii bylo stadium profáze I (GV), metafáze I (MI), metafáze II (MII), stadium zygoty (1C), stádium dvoubuněčného embrya (2C). Experiment byl proveden čtyřikrát a bylo použito 50 oocytů/zygot a 25 dvoubuněčných embryí na vzorek.



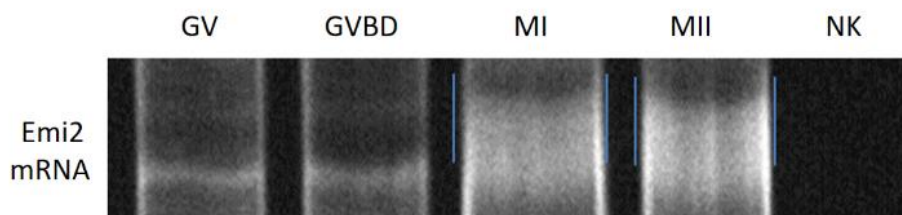
Graf 4. Relativní xprese Emi2 proteinu u myších oocytů a ranných embryí. Expresse Emi2 proteinu ze čtyř nezávislých experimentů byla kvantifikována pomocí softwaru Quantity one. Optická denzita signálů jednotlivých vzorků byla normalizována na celkovou optickou denzitu a na individuální optickou denzitu GAPDH. Sledovanými stádii bylo stadium profáze I (GV), metafáze I (MI), metafáze II (MII), stadium zygoty (1C), stádium dvoubuněčného embrya (2C). Experiment byl proveden čtyřikrát a bylo použito 100 oocytů/zygot a 50 dvoubuněčných embryí na vzorek. Znázorněny jsou průměry měření \pm SEM. Rozdílná písmena indikují statisticky významný rozdíl ($P < 0.05$).

5. 4 Expresse a polyadenylace Emi2 mRNA

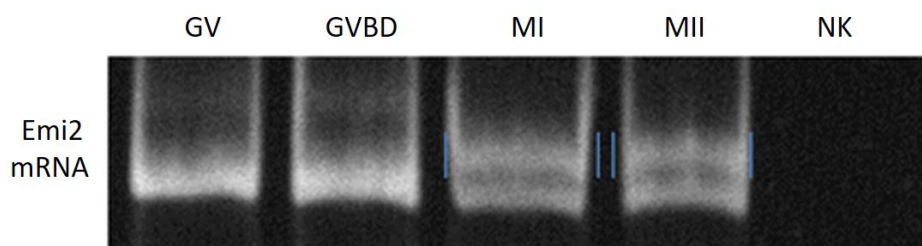
Pro studium exprese a polyadenylace mRNA Emi2 byla, stejně jako v případě Emi1, využita metoda poly(A) testu s následnou PCR. Pro větší citlivost byly PCR produkty následně rozděleny na polyakrylamidovém gelu.

Expresse mRNA Emi2 v prasečích i myších oocytech byla detekována ve všech fázích meiotického zrání – profáze I (GV), rozpad zárodečného váčku (GVBD), první a druhá metafáze (MI a MII).

mRNA Emi2 byla polyadenylována u prasečích i myších oocytů ve fázi MI a MII. Fáze GV a GVBD byly bez prokazatelného polyadenylačního smíru (Obr. 14. a 15.).



Obr. 15. Expres a Polyadenylace prasečí Emi2 mRNA. Z 100 prasečích oocytů ve sledovaných fázích meiotického zrání – profáze I (GV), rozpad zárodečného váčku (GVBD), metafáze I (MI) a metafáze II (MII) byla vyizolována celková RNA. Pomocí poly(A)-testu byla tato RNA přepsána do cDNA a ta použita jako templát pro PCR se specifickými primery navrženými na sekvenci prasečí Emi2 a oligo(dT)-anchor primerem. Výsledné PCR produkty byly rozděleny na 5% polyakrylamidovém gelu pomocí elektroforézy (DNA PAGE). Gely byly následně značeny pomocí GelRedu. Polyadenylované produkty jsou zvýrazněny modrými úsečkami. Experiment byl čtyřikrát opakován. NK značí negativní kontrolu.



Obr. 15. Expres a Polyadenylace myší Emi2 mRNA. Z 50 myších oocytů ve sledovaných fázích meiotického zrání – profáze I (GV), rozpad zárodečného váčku (GVBD), metafáze I (MI) a metafáze II (MII) byla vyizolována celková RNA. Pomocí poly(A)-testu byla tato RNA přepsána do cDNA a ta použita jako templát pro PCR se specifickými primery navrženými na sekvenci myší Emi2 a oligo(dT)-anchor primerem. Výsledné PCR produkty byly rozděleny na 5% polyakrylamidovém gelu pomocí elektroforézy (DNA PAGE). Gely byly následně značeny pomocí GelRedu. Polyadenylované produkty jsou zvýrazněny modrými úsečkami. Experiment byl čtyřikrát opakován. NK značí negativní kontrolu.

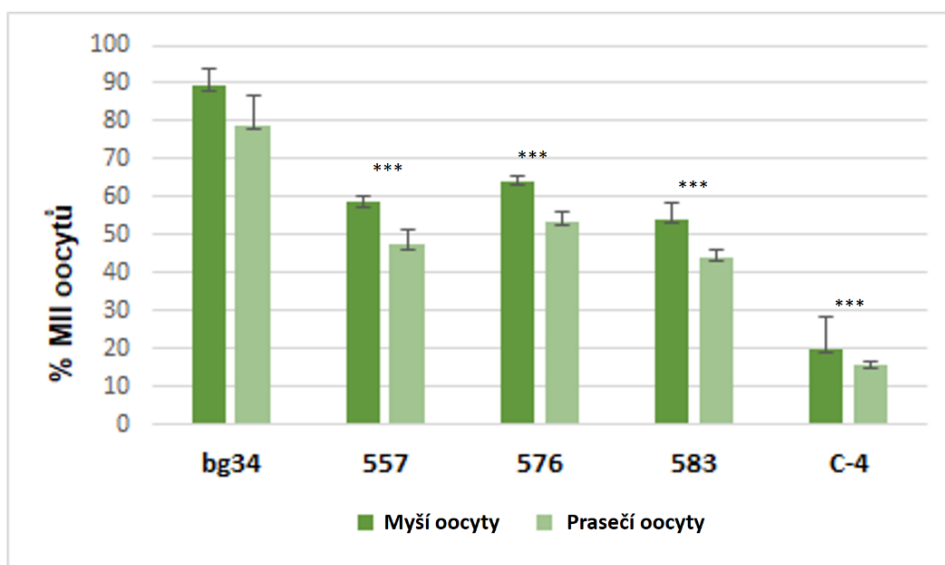
5. 5 Testování efektu inhibitorů Emi2 na meiotické zrání oocytů

Byla testována účinnost malých molekulových inhibitorů vázajících se na Polo-box doménu (PBD) Plk1. Zablokováním PBD Plk1 je dále znemožněna fosforylace Emi2 a tím pádem nemůže být dokončeno meiotické zrání.

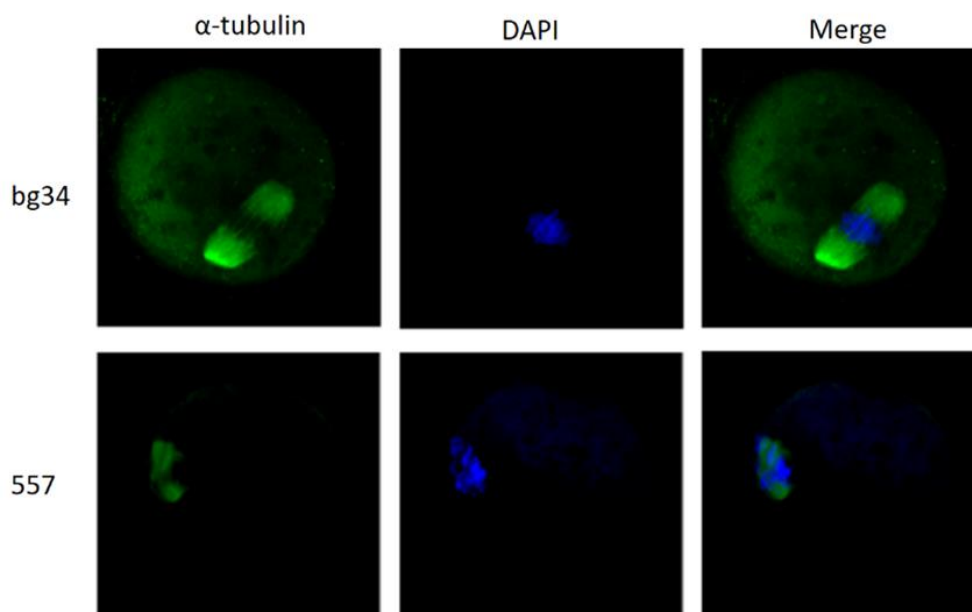
Jako negativní kontrola byl využit bg34, který neobsahuje fosfor-threonin, takže není schopen vázat Polo-box doménu Plk1, jako ostatní testované inhibitory. V kontrolních skupinách s bg34 maturovalo do MII fáze 89% myších oocytů a 79% oocytů prasečích.

Z testovaných inhibitorů měl nejvyšší účinnost inhibitor C-4, u kterého maturovalo do MII pouze 20% myších a 16% prasečích oocytů. Ostatní inhibitory neměly sice až tak markantní účinnost (557 – 58% myších a 47% prasečích MII oocytů, 576 – 64% myších a 53% prasečích MII oocytů, 583 - 54% myších a 43% prasečích MII oocytů), nicméně jejich efekt byl statisticky průkazný ($P < 0.01$, Graf 5.).

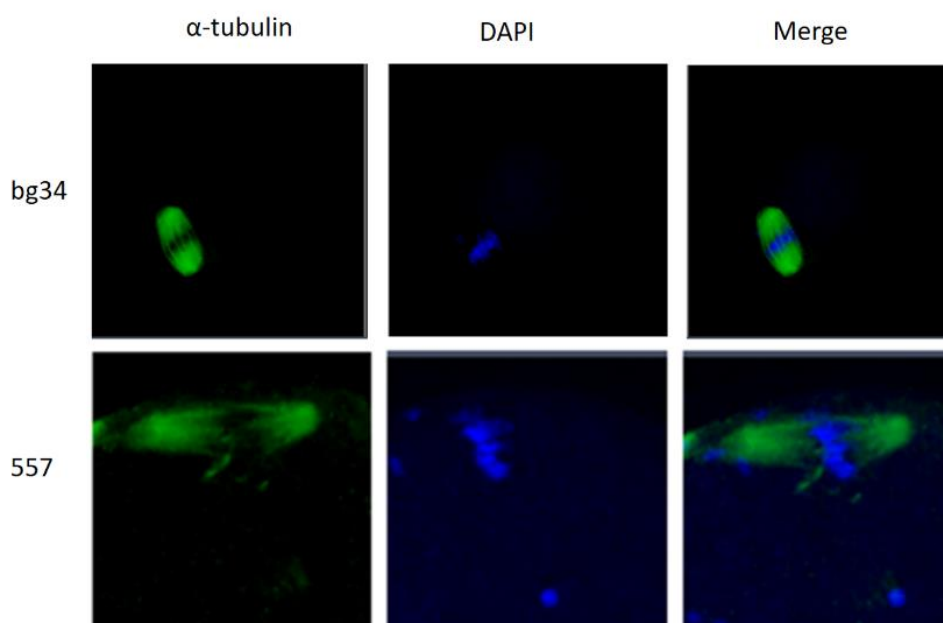
Kromě zhodnocení efektivity inhibitorů byl dále sledován jejich vliv na tvorbu dělicího vřeténka. Vzhledem k tomu, že v této práci bylo stěžejní především otestovat inhibitory nově nasyntetizované (557, 576, 583), zaměřila jsem se dále na nejúčinnější z nich – a to inhibitor 557. Tento inhibitor měl prokazatelně destruktivní efekt na tvorbu dělicího vřeténka u myších i prasečích oocytů, jak ukazují Obr. 16. a Obr. 17.



Graf 5. Efektivnost malých molekulových inhibitorů Emi2 na meiotické zrání oocytů. Selektované GV myší a prasečí oocyty byly kultivovány v médiu obohaceném o bg34 (negativní kontrola) a testované inhibitory 557, 576, 583 a C-4. Byly zaznamenány počty oocytů maturovaných do MII fáze po 16 hodinách u myších vzorků a 44 hodinách u prasečích vzorků. Experiment byl proveden čtyřikrát a bylo použito 200 prasečích a 100 myších oocytů av každé kultivaci. Znázorněny jsou průměry měření \pm SEM. Hvězdičky indikují statisticky významný rozdíl v procentu maturovaných oocytů testovaných inhibitorů vůči negativní kontrole ($P < 0.01$).



Obr. 16. Formace dělicího vřeténka u myších oocytů ošetřených inhibítoem 557. Reprezentativní konfokální snímky oocytů MII fáze (metafáze II). Jako negativní kontrola byl použit bg34. Experiment byl proveden ve čtyřech nezávislých opakováních s minimem 30 oocytů v každém z nich. Na snímcích je zachycena ICC detekce dělicího vřeténka pomocí α -tubulinu (zeleně) a DNA (DAPI, modře), MERGE zachycuje sloučení obou snímků.



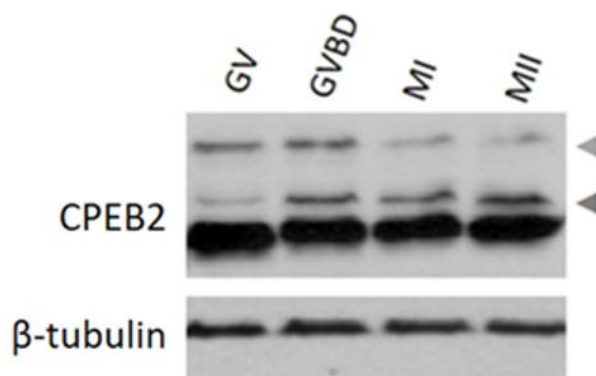
Obr. 17. Formace dělicího vřeténka u prasečích oocytů ošetřených inhibítoem 557. Reprezentativní konfokální snímky oocytů MII fáze (metafáze II). Jako negativní kontrola byl použit bg34. Experiment byl proveden ve čtyřech nezávislých opakováních s minimem 30 oocytů v každém z nich. Na snímcích je zachycena ICC detekce dělicího vřeténka pomocí α -tubulinu (zeleně) a DNA (DAPI, modře), MERGE zachycuje sloučení obou snímků

5. 6 Expresa CPEB2 proteinu

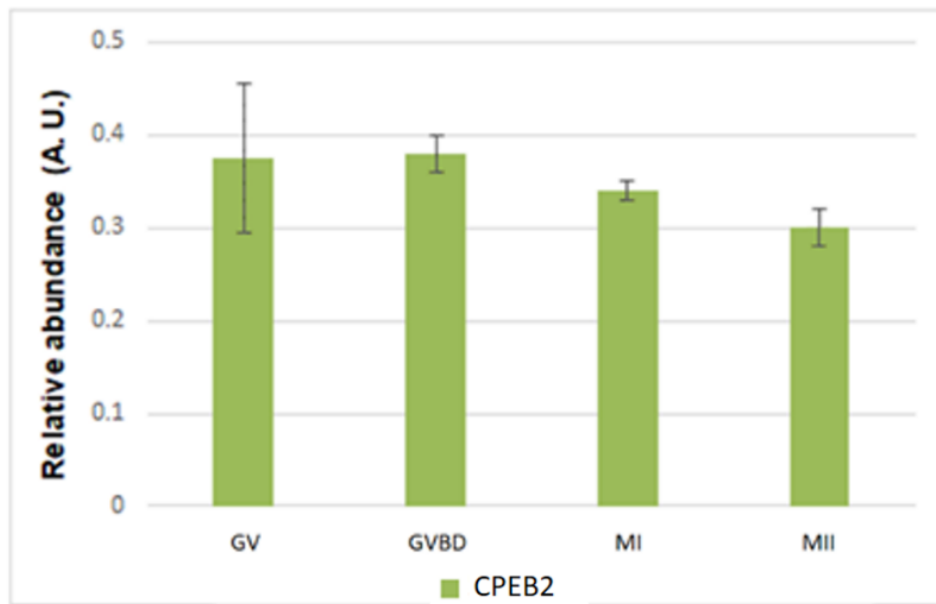
Pomocí metody western blot se specifickými protilátkami byl CPEB2 protein detekován ve všech sledovaných fázích meiotického zrání. Expresa proteinu lehce vzrůstala z GV fáze do GVBD a následně klesala až do MII fáze. Nicméně rozdíly v hladinách exprese CPEB2 mezi jednotlivými fázemi zrání byly na podobné úrovni a nebyl prokázán statisticky významný rozdíl mezi žádnou z nich.

Mimoto byly ve všech fázích meiotického zrání detekovány další dva signály CPEB2 proteinu naznačující buď možné fosforylace jakožto posttranslační modifikace proteinu, či přítomnost dalších forem CPEB2 proteinu.

Reprezentativní výsledek exprese CPEB2 proteinu v prasečích oocytech zobrazuje Obr. 19. Průměrné hodnoty relativní optické denzity (A.U.) v jednotlivých fázích zrání zobrazuje Graf 6.



Obr. 19. Expresa CPEB2 proteinu u prasečích oocytů a ranných embryí. Reprezentativní obrázek Western blotu s použitou protilátkou proti CPEB2 a β -tubulinu (kontrola nanášky). Vzorky byly rozděleny pomocí SDS-PAGE na 10 % gelu a přeneseny na PVDF membránu. Sledovanými stádii bylo stadium profáze I (GV), rozpad zárodečného váčku (GVBD), metafáze I (MI) a metafáze II (MII). Šipky ukazují možné další fosforylované formy CPEB2 proteinu. Experiment byl proveden třikrát a bylo použito 100 oocytů na vzorek.

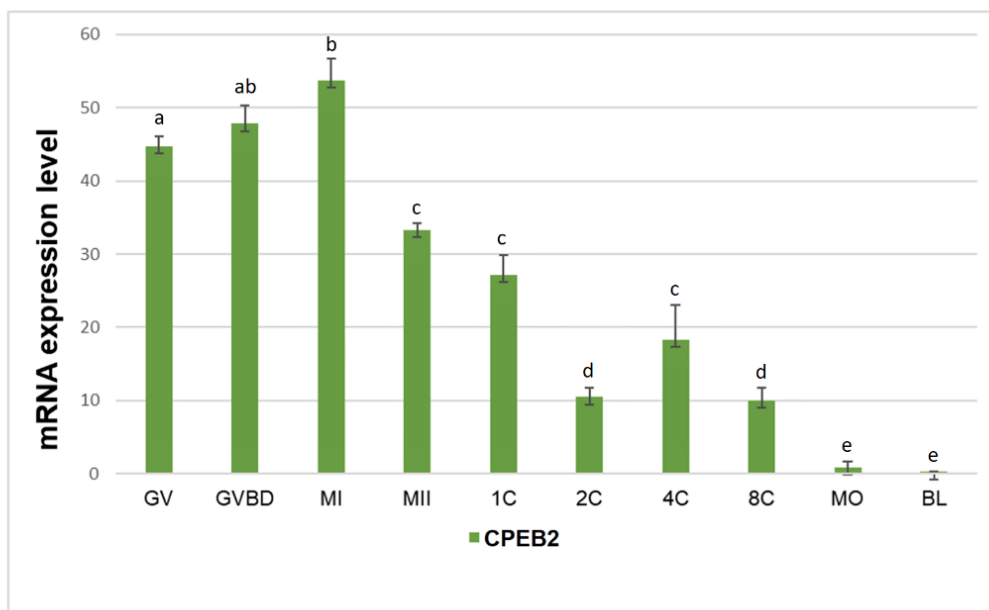


Graf 6. Relativní exprese CPEB2 proteinu u prasečích oocytů. Exprese CPEB2 proteinu ze tří nezávislých experimentů byla kvantifikována pomocí softwaru Quantity one. Optická denzita signálů jednotlivých vzorků byla normalizována na celkovou optickou denzitu a na individuální optickou denzitu β -tubulinu. Sledovanými stádii bylo stadium profáze I (GV), stadium rozpadu zárodečného váčku (GVBD), metafáze I (MI) a metafáze II (MII). Experiment byl proveden třikrát a bylo použito 100 oocytů na vzorek. Znázorněny jsou průměry měření \pm SEM. Nebyl pozorován žádný statistický rozdíl mezi jednotlivými vzorky.

5. 7 Exprese CPEB2 mRNA

Exprese CPEB2 mRNA během meiotické maturace prasečích oocytů a parteongenických embryí byla studována pomocí kvantitativní PCR v reálném čase (qRT-PCR). Hladina exprese CPEB2 mRNA lehce vzrůstala z GV fáze až do MI fáze. Nicméně rozdíly exprese mezi GV a GVBD nebyly statisticky průkazné, až mezi fázemi GV a MI byl staticky významný rozdíl ($P < 0.05$) a exprese zde dosahovala svého maxima. Po první meióze došlo k prudkému poklesu exprese CPEB2 mRNA a v MII fázi zrání tak dosáhla v oocytech svého minima.

Po parthenogenetické aktivaci exprese CPEB2 mRNA ve stádiu zygoty opět lehce, statisticky bezvýznamně, klesla a intenzivnější pokles následoval až ve dvoubuněčném embryu. Nicméně ve čtyřbuněčném embryu se CPEB2 mRNA exprese opět výrazně zvýšila. V osmibuněčném embryu se exprese opět snížila a tento trend pokračoval až do stadia blastocysty, kde byla již jen nezatelně detekována (Graf. 7.).

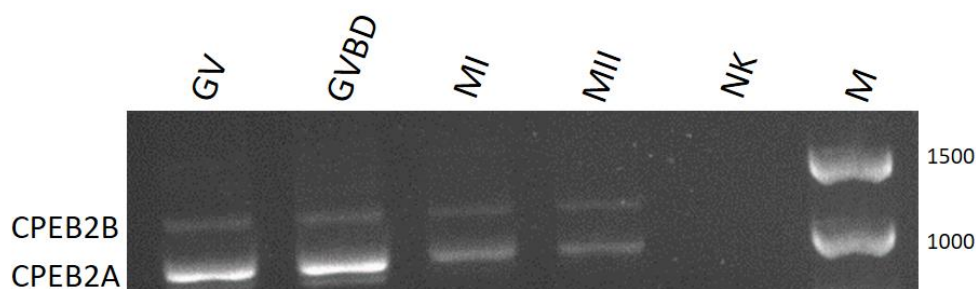


Graf 7. Expresce CPEB2 mRNA během meiotického zrání prasečích oocytů a časného embryonálního vývoje. Relativní hladiny exprese CPEB2 mRNA byly determinovány pomocí qRT-PCR. Sledovanými fázemi meiotického zrání byly GV (germinal vesicle), GVBD (germinal vesicle breakdown), MI (metafáze I) and MII (metafáze II) a během parthenogenetického embryonálního vývoje bylo sledováno stadium zygoty (1C), dvoubuněčné embryo (2C), čtyřbuněčné embryo (4C), osmibuněčné embryo (8C), morula (MO) a blastocysta (BL). Expresce CPEB2 byla normalizována na hladinu transkriptu GAPDH (jakožto exogenní kontroly). Data jsou zobrazena jako průměr ze 4 nezávislých biologických experimentů ($n = 4$) a pomocí úseček je zobrazena střední chyba průměru (\pm SEM). Rozdílná písmena indikují statisticky významné rozdíly ($P < 0.05$).

5. 8 Detekce CPEB2 transkriptů v prasečích oocytech

Pomocí reverzní transkripce a následné PCR se specifickými primery byly detekovány dva transkripty prasečího CPEB2 genu. Dle velikosti odpovídají CPEB2 formám CPEB2A (krátká forma) a CPEB2B (dlouhá forma) již dříve publikovaným v NCBI (Fang, 2010a, 2010b).

Z oocytů profáze I (GV), rozpadu zárodečného váčku (GVBD), metafáze I a metafáze II byla vyizolována celková RNA a pomocí reverzní transkripce byla přepsána do cDNA. Pomocí PCR se specifickými primery byly detekovány CPEB2 transkripty obou délek ve všech fázích meiotického zrání (Obr. 20.).

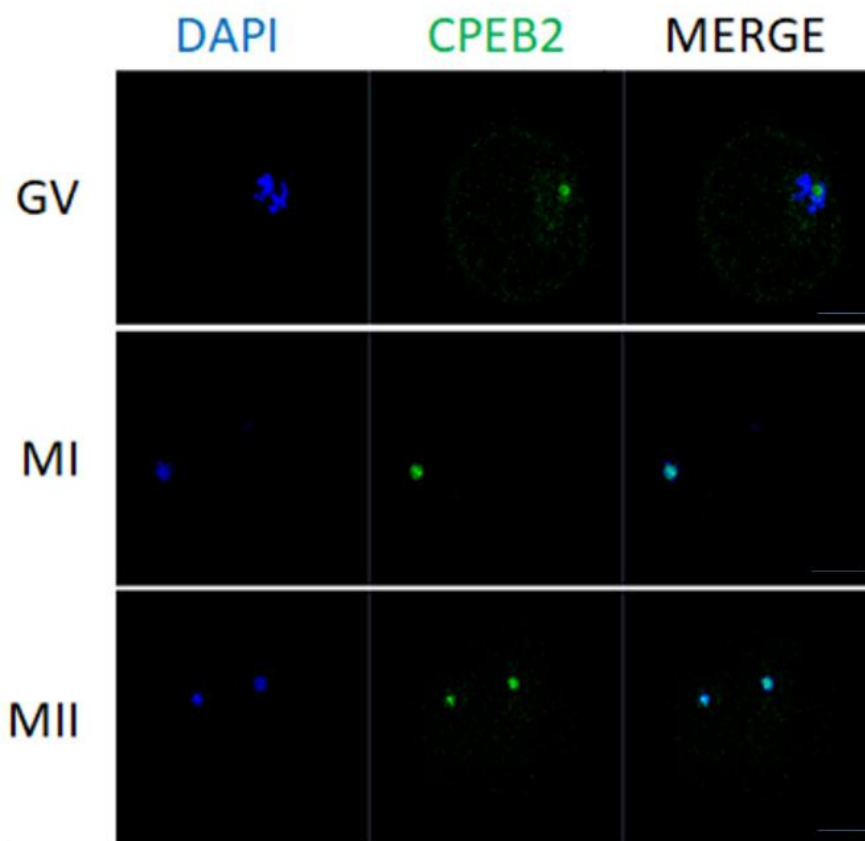


Obr. 20. Dvě formy CPEB2 transkriptu – CPEB2A a CPEB2B v prasečích oocytech. Ze 150 prasečích oocytů ve sledovaných fázích meiotického zrání – profáze I (GV), rozpad zárodečného váčku (GVBD), metafáze I (MI) a metafáze II (MII) byla vyizolována celková RNA. Dále byla provedena reverzní transkripce a PCR se specifickými primery pro CPEB2. Výsledné PCR produkty byly rozděleny na 2% agarózovém gelu pomocí elektroforézy. Gely byly následně značeny pomocí GelRedu. Experiment byl třikrát opakován. NK značí negativní kontrolu. M značí marker udávající počty bází.

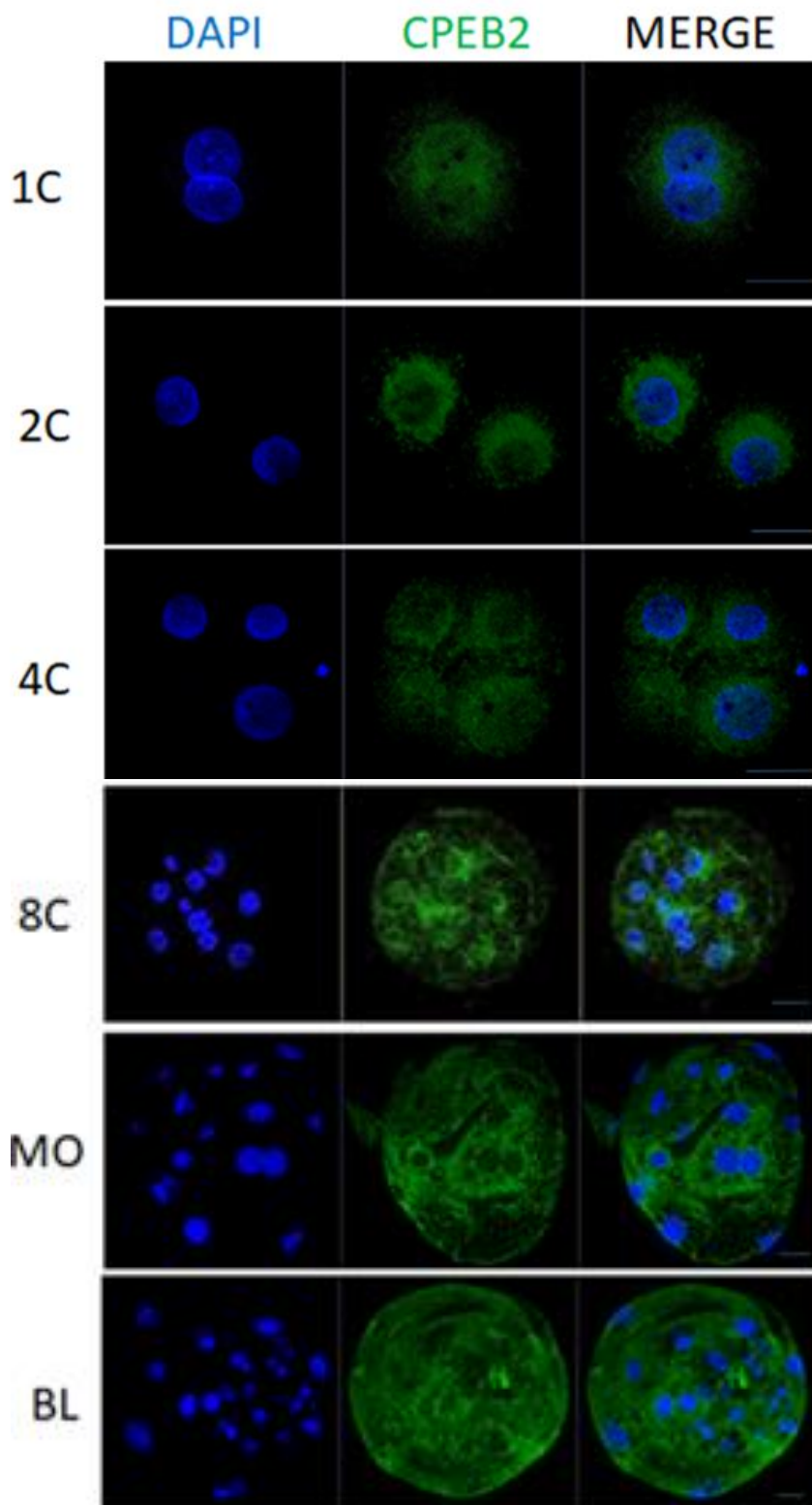
5. 9 Lokalizace CPEB2 proteinu

Pro sledování lokalizace CPEB2 proteinu během meiotického zrání a ranné embryogeneze bylo užito metody imunocytochemie (ICC) s následnou vizualizací pomocí konfokální mikroskopie.

Tyto výsledky ukázaly, že protein CPEB2 migruje z jaderka do cytoplazmy. V nezralých prasečích GV oocytech byl CPEB2 protein lokalizován právě do oblasti jaderka a během maturace během MI a MII fáze byl kolokalizován s DNA (Obr. 21). Po parthenogenetické aktivaci se CPEB2 protein přemístil do cytoplazmy, kde byl lokalizován v blízkosti jádra. Tento trend přetrvával až do stadia osmibuněčného embrya, kdy se protein začal přesouvat do cytoplazmy nejen v blízkosti jader. Ve stádiu moruly a blastocysty byla exprese CPEB2 signifikantně silnější a trend byl opačný než v případě meiotického zrání oocytů. Protein zde byl detekovatelný všude v cytoplazmě, nicméně bez lokalizace v oblasti jader (Obr. 22)



Obr. 21. Imunocytochemická detekce CPEB2 proteinu v prasečích oocytech. Reprezentativní konfokální snímky oocytů profáze I (GV), MI (metafáze I) a MII (metafáze II). Měřítka = 50 μm . Experiment byl proveden ve čtyřech nezávislých opakováních s minimem 50 oocytů v každém z nich. Na snímcích je zachycena ICC detekce proteinu CPEB2 (zeleně) a DNA (DAPI, modře), MERGE zachycuje sloučení obou snímků.

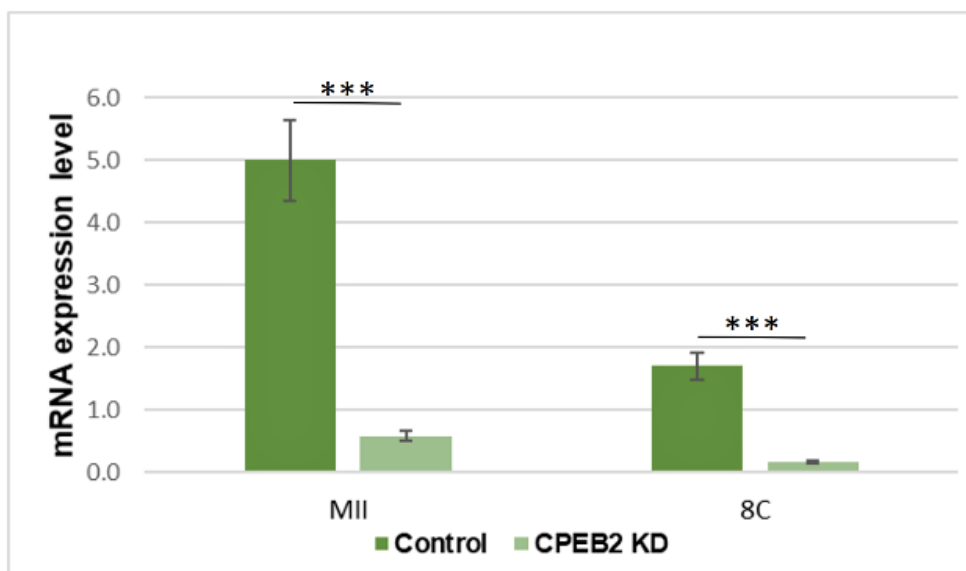


Obr. 22. Imunocytochemická detekce CPEB2 proteinu v prasečích embryích. Reprezentativní konfokální snímky stádií ranné embryogeneze - zygota (1C), dvoubuněčné embryo (2C), čtyřbuněčné embryo (4C), osmibuněčné embryo (8C), morula (MO), a blastocysta (BL). Měřítka = 100 μ m. Experiment byl proveden ve čtyřech nezávislých opakováních s minimem 50 embryí v každém z nich. Na snímcích je zachycena ICC detekce proteinu CPEB2 (zeleně) a DNA (DAPI, modře), MERGE zachycuje sloučení obou snímků.

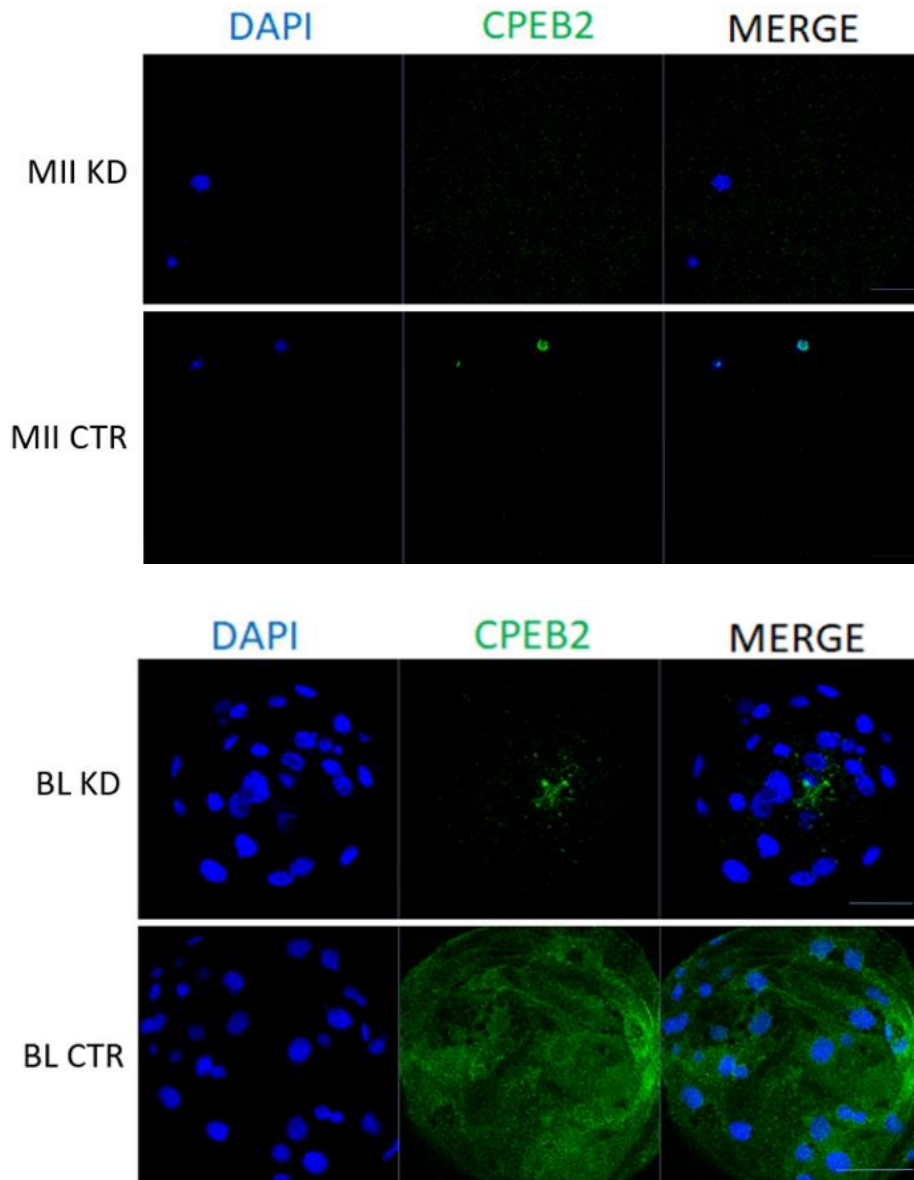
5. 10 Účinnost CPEB2 knockdownu v oocytech a embryích

K objasnění důležitosti a funkce CPEB2 během meiotického zrání prasečích oocytů a ranné parthenogenetické embryogeneze bylo využito genového knockdownu (KD). CPEB2 KD byl proveden pomocí mikroinjekcí dsRNA do GV oocytů a zygot. Účinnost tohoto KD byla ověřována pomocí měření exprese CPEB2 mRNA metodou qRT-PCR a porovnávána s kontrolními vzorky, injektovanými Rnease-free vodou.

Výsledky měření ukázaly 88% a 93% úspěšnost CPEB2 KD v MII fázi meiotického zrání a v osmibuněčném embryu (Graf 8). Efektivita CPEB2 KD byla rovněž potvrzena pomocí metody ICC, kde v MII oocytech a osmiuněčných embryích nebyla exprese CPEB2 proteinu téměř detekována (Obr. 23).



Graf 8. Účinnost dsRNA CPEB2 knockdownu (KD) během maturace oocytů a ranného embryonálního vývoje. Relativní hladiny CPEB2 mRNA byly determinovány pomocí qRT-PCR v prasečích MII oocytech a parthenogenetických osmibuněčných embryích (8C). Exprese CPEB2 byla normalizována na hladinu transkriptu GAPDH (jakožto exogenní kontroly). Data jsou zobrazena jako průměr ze 4 nezávislých biologických experimentů ($n = 4$) a pomocí úseček je zobrazena střední chyba průměru (\pm SEM). Hvězdičky indikují statisticky významné rozdíly (** $P < 0.001$).



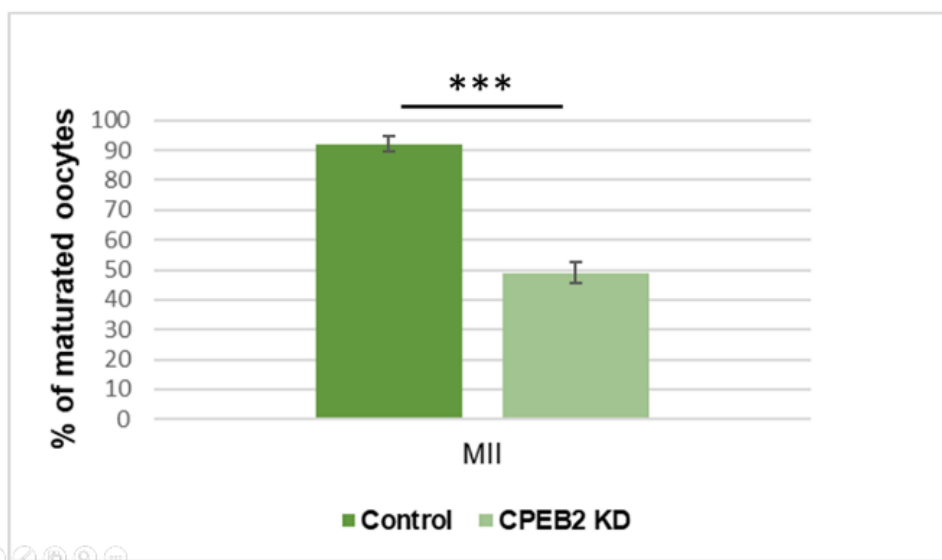
Obr. 23 Účinnost CPEB2 KD na expresi CPEB2 proteinu během meiotického zrání oocytů a ranné embryogeneze. Reprezentativní konfokální snímky zachycují expresi CPEB2 proteinu v kontrolních (CTR) a CPEB2 knockdown (KD) MII oocytech a blastocystách (BL). Měřítka = 100 μ m. Experiment byl proveden ve 4 nezávislých opakováních s minimem 30 oocytů/embryí v každém z nich. Na snímcích je zachycena ICC detekce proteinu CPEB2 (zeleně) a DNA (DAPI, modře), MERGE zachycuje sloučení obou snímků.

5. 11 Vliv CPEB2 inhibice na meiózu oocytů a embryogenezi

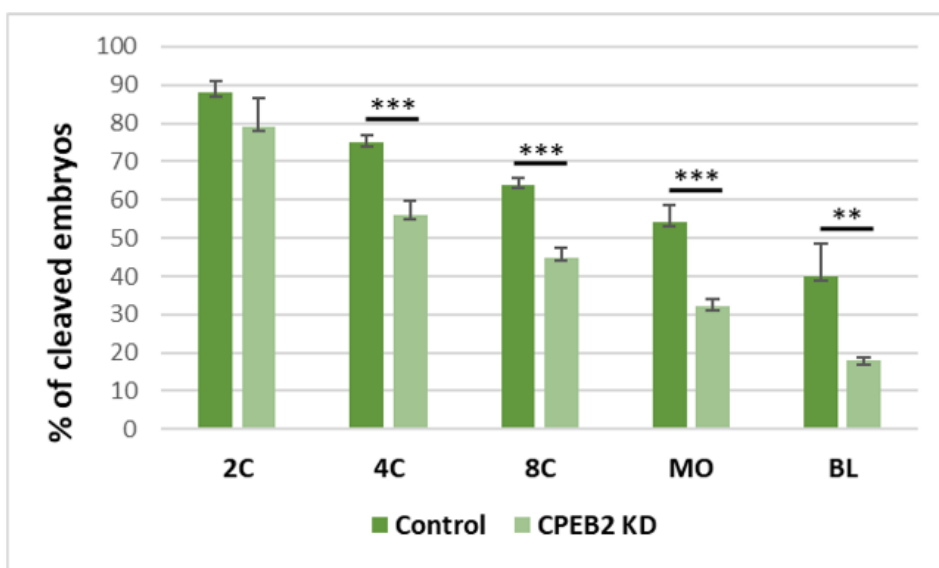
Pro vyhodnocení efektu CPEB2 knockdownu na meiotické zrání prasečích oocytů a ranný embryonální vývoj byly porovnány počty oocytů maturovaných do MII fáze a počty

embryí vyvinutých do požadovaných fází, a to vždy mezi kontrolní a experimentální (CPEB2 KD) skupinou.

Pouhých (43%) CPEB2 KD oocytů došlo až do MII fáze, což je signifikantně nižší ($P < 0.001$), než u kontrolní skupiny (92%, Graf. 9.). Na počátku embryogeneze, ve stádiu dvoubuněčného embrya, nebyl žádný statisticky významný rozdíl mezi vývojem embryí v kontrolních (88%) a experimentálních skupinách (85%). Nicméně již ve stádiu čtyřbuněčného embrya byl tento rozdíl statisticky významný ($P < 0.001$) a čítal 75% vyvinutých embryí v kontrolních skupinách versus 68% v CPEB2 KD skupinách. V osmibuněčném embryu a ve stádiu moruly byly tyto rozdíly dokonce ještě markantnější, a to 65% vs. 45% a 54% vs. 28%, v neprospěch CPEB2 KD, opět se statisticky významným rozdílem ($P < 0.001$). Ve stádiu blastocysty se kontrolní a experimentální skupiny rovněž lišily ($P < 0.01$). Do blastocysty se vyvinulo 40% kontrolních a and KD group 15% CPEB2 KD embryí (Graf 10.).

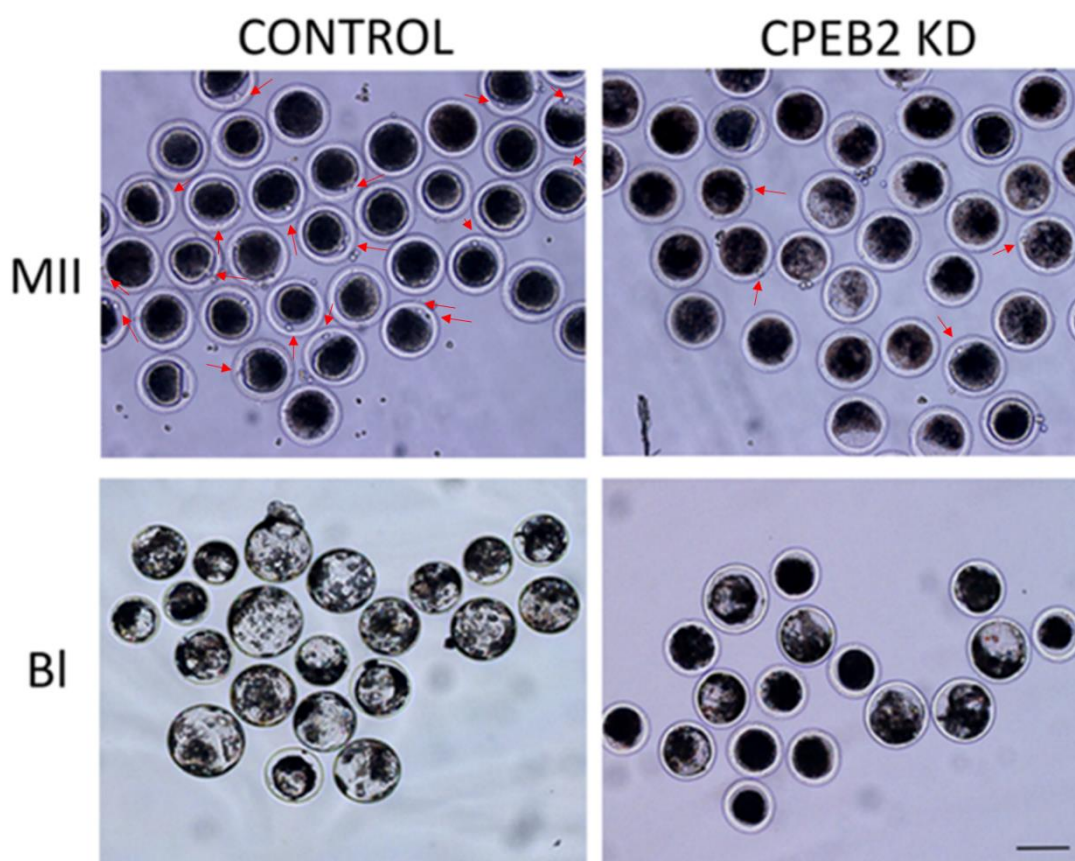


Graf 9. CPEB2 knockdown pomocí dsRNA vedl ke snížení počtu maturovaných oocytů. Efekt CPEB2 KD na meiotickou maturaci prasečích oocytů v metafázi II (MII). Data jsou zobrazena jako průměr ze 4 nezávislých biologických experimentů ($n = 4$) a pomocí úseček je zobrazena střední chyba průměru (\pm SEM). Hvězdičky indikují statisticky významné rozdíly (** $P < 0.001$).



Graf 10. CPEB2 knockdown pomocí dsRNA vedl ke snížení počtu vyvinutých embryí. Graf zachycuje stádium zygoty (1C), dvoubuněčné embryo (2C), čtyřbuněčné embryo (4C), osmibuněčné embryo (8C), stádium moruly (MO), stádium blastocysty (BL). Data jsou zobrazena jako průměr ze 4 nezávislých biologických experimentů ($n = 4$) a pomocí úseček je zobrazena střední chyba průměru (\pm SEM). Hvězdičky indikují statisticky významné rozdíly ($***P < 0.001$; $**P < 0.01$).

Mezi kontrolními a CPEB2 KD oocyty a blastocystami byly rovněž pozorovány morfologické rozdíly. MII oocyty z experimentální skupiny ve většině případů nedozrály do druhé metafáze a nevydělili tím pádem první pólové tělísko, rovněž jejich cytoplazma se nejevila tolik uniformní. V případě embryí skoro žádné z experimentální skupiny nevytvořily formaci blastocysty, a pokud ano, byly v průměru viditelně menší, než blastocysty z kontrolní skupiny (Obr. 24).



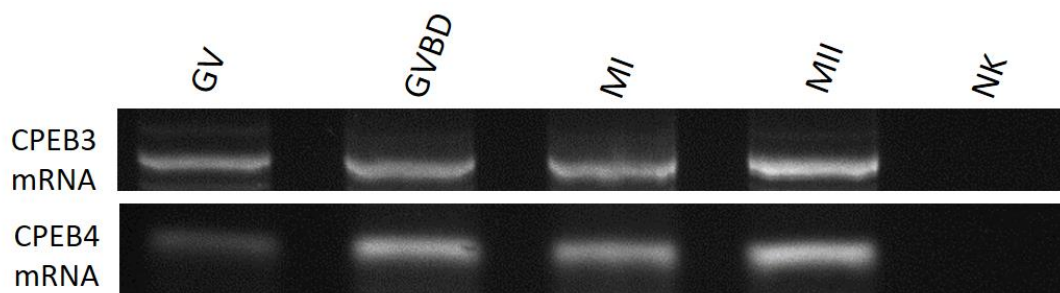
Obr. 24. Efekt CPEB2 knockdownu na morfologii MII oocytů a blastocyst. CPEB2 KD pomocí dsRNA vedl ke snížené schopnosti MII prasečích oocytů vydělit první pólové tělísko a ke snížené schopnosti formace prasečích blastocyst (BL), jež byly rovněž diametrálně menší (BL). Červené šipky značí vydělená pólová tělíska. Měřítko = 200 μ m.

5. 12 Expres CPEB3 a CPEB4 mRNA v prasečích oocytech

K ověření hypotézy, že po zablokování exprese CPEB2 nedochází k jeho nahrazení jinými CPEB ze CPEB2 subrodiny, bylo třeba nejprve ověřit přítomnost CPEB3 a CPEB4 transkriptů během meiotického zrání prasečích oocytů.

Z oocytů profáze I (GV), rozpadu zárodečného váčku (GVBD), metafáze I a metafáze II byla vyzolována celková RNA a pomocí reverzní transkripci byla přepsána do cDNA. Následně byly pomocí PCR se specifickými primery a následnou ELFO detekovány transkripty obou genů a to ve všech fázích meiotického zrání.

Expresi CPEB3 a CPEB4 mRNA v prasečích oocytech zobrazuje Obr. 25.



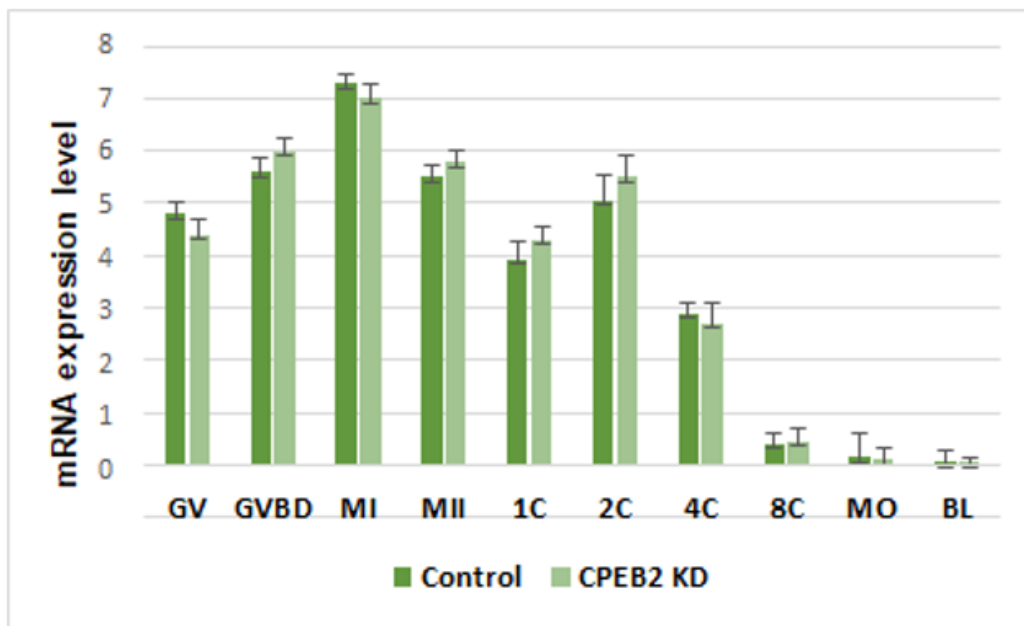
Obr. 25. Expresse CPEB3 a CPEB4 mRNA v prasečích oocytech. Ze 100 prasečích oocytů ve sledovaných fázích meiotického zrání – profáze I (GV), rozpad zárodečného váčku (GVBD), metafáze I (MI) a metafáze II (MII) byla vyizolována celková RNA. Dále byla provedena reverzní transkripce a PCR se specifickými primery pro CPEB3 a CPEB4. Výsledné PCR produkty byly rozděleny na 2% agarózovém gelu pomocí elektroforézy. Gely byly následně značeny pomocí GelRedu. Experiment byl třikrát opakován. NK značí negativní kontrolu.

5. 13 Vliv CPEB2 KD na expresi CPEB4 mRNA

Pro vyhodnocení efektu CPEB2 knockdownu na expresi CPEB4 mRNA během meiotického zrání prasečích oocytů a ranných parthenogeneticých embryí byly porovnány hladiny relativní mRNA exprese CPEB4 mezi kontrolními a CPEB2 KD skupinami. Experiment byl proveden pomocí kvantitativní PCR v reálném čase (qRT-PCR).

Hladina exprese CPEB4 mRNA v kontrolní a experimentální skupině vykazovala stejný trend a nebyl mezi nimi pozorován žádný statisticky významný rozdíl. Expresse CPEB4 mRNA nebyla tedy negativně ani pozitivně ovlivněna utlumením funkce CPEB2.

Expresse CPEB4 mRNA v obou skupinách kontinuálně vzrůstala z GV fáze až do MI fáze, kde dosahovala svého maxima. Poté expresse opět pozvolna klesala až do fáze zygoty. Po začátku mitotického dělení v dvoubuněčném embryu se expresse lehce zvýšila. Ve stádiu čtyřbuněčného embrya došlo k poklesu exprese a tento trend již přetrvával až do konce preimplantačního embryonálního vývoje. Pokles exprese ve čtyřbuněčném embryu byl opravdu markantní. Ve stádiu blastocysty byla již expresse lehce nad hranicí detekce a dosahovala zde svého minima. Expresse CPEB4 mRNA během meiotického zrání prasečích oocytů a časného embryonálního vývoje zachycuje Graf 11.



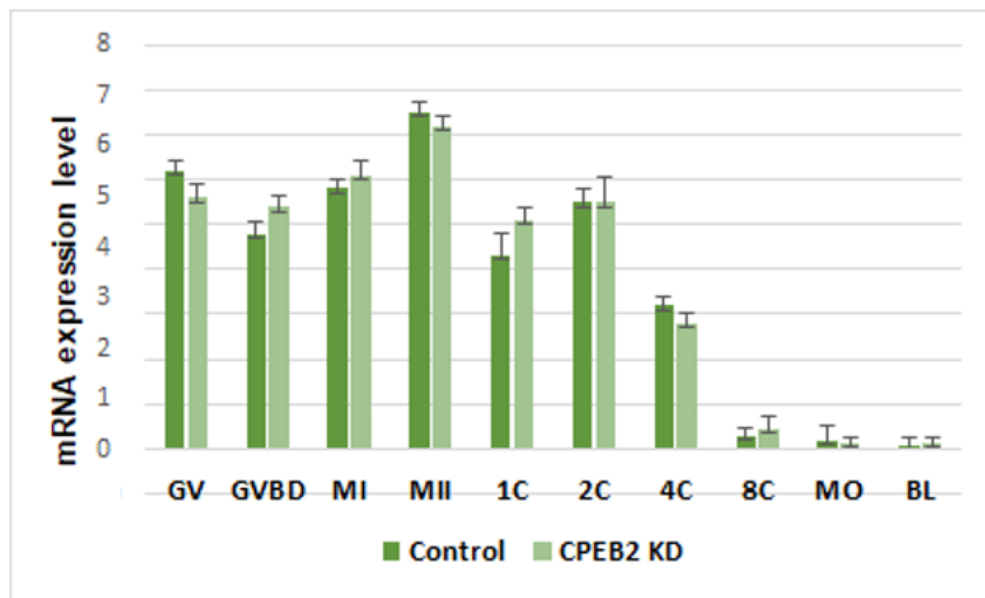
Graf 11. Expresse CPEB4 mRNA během meiotického zrání prasečích oocytů a časného embryonálního vývoje. Relativní hladiny exprese CPEB4 mRNA byly determinovány pomocí qRT-PCR. Byla porovnána exprese v normálních a v CPEB KD oocytech a embryích. Sledovanými fázemi meiotického zrání byly GV (germinal vesicle), GVBD (germinal vesicle breakdown), MI (metafáze I) and MII (metafáze II) a během parthenogenetického embryonálního vývoje bylo sledováno stadium zygoty (1C), dvoubuněčné embryo (2C), čtyřbuněčné embryo (4C), osmibuněčné embryo (8C), morula (MO) a blastocysta (BL). Expresse CPEB2 byla normalizována na hladinu transkriptu GAPDH (jakožto exogenní kontroly). Data jsou zobrazena jako průměr ze 4 nezávislých biologických experimentů (n = 4) a pomocí úseček je zobrazena střední chyba průměru (\pm SEM). Mezi kontrolními a experimentálními vzorky nebyly indikovány statisticky významné rozdíly.

5. 14 Vliv CPEB2 KD na expresi CPEB3 mRNA

Pro vyhodnocení efektu CPEB2 knockdownu na expresi CPEB3 mRNA během meiotického zrání prasečích oocytů a ranných parthenogenetických embryí byly porovnány hladiny relativní mRNA exprese CPEB3 mezi kontrolními a CPEB2 KD skupinami. Experiment byl proveden pomocí kvantitativní PCR v reálném čase (qRT-PCR).

Hladina exprese CPEB3 mRNA v kontrolní a experimentální skupině vykazovala stejný trend a nebyl mezi nimi pozorován žádný statisticky významný rozdíl. Expresse CPEB3 mRNA, stejně jako tomu bylo v případě CPEB4, nebyla negativně ani pozitivně ovlivněna utlumením funkce CPEB2.

Expresie CPEB3 mRNA v obou skupinách lehce klesla z GV do GVBD fáze. Následně exprese rostla až do MII fáze, kde dosahovala svého maxima. Ve fázi zygoty exprese opět klesla a následně ve fázi dvoubuněčného embrya došlo k jejímu lehkému zvýšení. Poté klesala až do stadia blastocysty. Po čtyřbuněčném stádiu byl pokles opět velice výrazný. Ve stádiu blastocysty byla exprese CPEB3 mRNA na hranici detekce. Expresi CPEB3 mRNA během meiotického zrání prasečích oocytů a časného embryonálního vývoje zachycuje Graf 12.



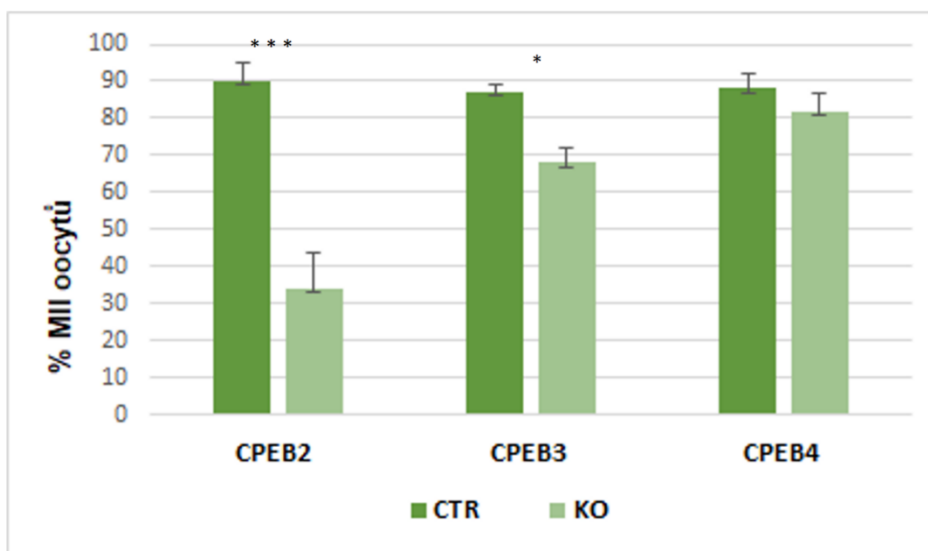
Graf 12. Expresie CPEB3 mRNA během meiotického zrání prasečích oocytů a časného embryonálního vývoje. Relativní hladiny exprese CPEB3 mRNA byly determinovány pomocí qRT-PCR. Byla porovnána exprese v normálních a v CPEB KD oocytech a embryích. Sledovanými fázemi meiotického zrání byly GV (germinal vesicle), GVBD (germinal vesicle breakdown), MI (metafáze I) and MII (metafáze II) a během parthenogenetického embryonálního vývoje bylo sledováno stadium zygoty (1C), dvoubuněčné embrya (2C), čtyřbuněčné embrya (4C), osmibuněčné embrya (8C), morula (MO) a blastocysta (BL) embryos. Expresie CPEB2 byla normalizována na hladinu transkriptu GAPDH (jakožto exogenní kontroly). Data jsou zobrazena jako průměr ze 4 nezávislých biologických experimentů (n = 4) a pomocí úseček je zobrazena střední chyba průměru (\pm SEM). Mezi vzorky nebyly indikovány statisticky významné rozdíly.

5. 15 Vliv CPEB2, CPEB3 a CPEB4 KO na meiotické zrání myších oocytů

Pro vyhodnocení vlivu CPEB2, CPEB3 a CPEB4 knockoutu na meiotické zrání myších oocytů byly porovnány počty oocytů maturovaných do MII fáze - a to vždy mezi kontrolní a experimentální skupinou.

CPEB4 KO myši nevykazovaly žádné abnormality co se týče fenotypu vaječníků či počtu oocytů. CPEB2 KO myši rovněž nejevily fenotypové změny ovárií, nicméně počet jejich GV oocytů byl znatelně redukován. U CPEB3 KO myši byly vaječnky znatelně menší než u kontrolní skupiny myši a měly velmi malé množství oocytů.

Co se týče samotného zrání izolovaných GV oocytů, byl statisticky významný rozdíl mezi kontrolní a experimentální skupinou u CPEB2 a CPEB3. A to 90 MII oocytů v kontrolní skupině versus 34% MII oocytů u CPEB2 KO skupině a 87% MII versus 68% CPEB3 KO. U CPEB4 nebyl pozorován žádný statistický rozdíl mezi zráním kontrolní a experimentální skupiny (Graf 13).



Graf 13. Meiotická maturace u CPEB2, CPEB3 a CPEB4 KO myších oocytů. Byly zaznamenány počty oocytů maturovaných do MII fáze v kontrolních a experimentálních skupinách. Experiment byl proveden nejméně třikrát, počty oocytů v jednotlivých experimentech byly variabilní. Kultivace kontrolní a experimentální skupiny vždy probíhaly zároveň, aby se eliminovaly vnější faktory. Znáznorněny jsou průměry měření \pm SEM. Hvězdičky indikují statisticky významný rozdíl v procentu maturovaných oocytů vůči kontrole (* $P < 0.05$, *** $P < 0.001$).

6 Diskuse

6. 1 Diskuse k experimentům s členy Emi/Erp rodiny

Meiotické zrání oocytů, stejně tak jako časné embryogeneze, je velmi přísně regulovaný proces, který vyžaduje časově přesnou proteinovou syntézu. Aktivace translace specifických mateřských mRNA se mění během jednotlivých fází buněčného cyklu a spolu s řízením degradace těchto translatovaných proteinů řídí meiotickou i mitotickou progresi. Nejlépe charakterizovaným mechanismem regulace translační aktivace mateřských mRNA je cytoplazmatická polyadenylace, která zajišťuje translatování konkrétních mRNA přesně v ten okamžik, kdy jsou potřebné.

Cílem dílčí části z experimentů v této disertační práci bylo detekovat expresi proteinů Emi1 a Emi2 během meiotického zrání myších a prasečích oocytů a ranných embryí. Dále bylo cílem zjistit, zda je tato exprese v přímé korelaci s polyadenylací jejich mRNA, což by dokazovalo, že zásadními posttranskripčními úpravami, jež u Emi1 a Emi2 regulují genovou expresi, je právě polyadenylace.

Během studia exprese proteinu Emi1, byl pozorován rozdílný trend u prasečích a myších oocytů. U obou modelových organismů byla nejnižší exprese ve stádiu GV a následně vzrůstala. U myších oocytů dosahovala svého maxima již v MI fázi, kdežto u oocytů prasečích až v MII fázi. Rozdíly v expresi mezi MI a MII ovšem nebyly ani v jednom případě nijak markantní. Nejnižší exprese proteinu byla sledována po oplození (a v případě prasečích oocytů po parthenogenetické aktivaci) ve stádiu zygoty, kde byl protein stále dobře detekovatelný.

Na začátku meiotického zrání byla námi sledovaná exprese prasečího Emi1 proteinu lehce odlišná od toho, co bylo dříve publikováno a kde někteří autoři tvrdí, že nejsilněji je protein Emi1 exprimován po rozpadu zárodečního váčku - ve fázi GVBD (Marangos et al., 2007; Tunquist et Maller, 2003). Tyto experimenty byly ovšem prováděny na myším modelu a dá se říci, že korelují s námi dosaženými výsledky u myšího Emi1. Je však diskutabilní, zda by byla nejvyšší exprese myšího Emi1 opravdu ve fázi GVBD, protože námi sledované fáze zrání byly pouze GV, MI, MII a stádium zygoty. Nicméně do budoucna plánujeme další doplňující experiment, který by tuto teorii vyvrátil či potvrdil.

Jak však uvádí Schmidt et al. (2006) hladina Emi1, se po profázi I výrazně nemění a přetrvává až do druhé metafáze, kde se účastní tvorby a udržení druhého meiotického

bloku, což s našimi výsledky koreluje. Rozdílné maximum exprese proteinu Emi1 mezi prasečími a myšími vzorky lze vysvětlit odlišnými mechanismy řízení meiotického zrání u myši a prasat. Jedním z nich je rozdílná potřeba *de novo* syntézy proteinů (Miyano et al., 2007).

Co se týče degradace proteinu Emi1, jsou rovněž uváděny rozličné názory. Tunquist et Maller (2003) demonstrují, že ve fázi MII je hladina Emi1 nejnižší a dále je na konstantní úrovni až do fáze mitózy. Paronetto et al. (2004), kteří Emi1 studovali rovněž na myším modelu, dokonce uvádí, že nejen že Emi1 zůstává aktivní v MII fázi, ale dokonce se během embryonálního vývoje jeho koncentrace až jeden a půlkrát zvyšuje. Jejich experimenty dokonce ukazují, že je protein Emi1 zachován v nízkých koncentracích až do implantace blastocysty. To je však v rozporu s výzkumem Reimanna et al. (2001), kteří zastávají názor, že k degradaci Emi1 dochází v ranné mitóze v závislosti na Cdk fosforylaci. Naše výsledky demonstrují, že po oplození sice dojde k masivní degradaci Emi1 proteinu, ale ve fázi zygoty je jeho exprese i tak relativně vysoká. Tím můžeme rovněž potvrdit názor Eldridga et al. (2006), že degradace Emi1 proteinu v anafázi není závislá na aktivitě CaMKII (Ca²⁺/kalmodulin dependentní protein kináza II), která je aktivována vápníkovým signálem indukovaným vstupem spermie do oocyty. S tímto tvrzením je ve shodě také výzkum Peterse (2003), který píše, že je degradace proteinu Emi1 zprostředkována až vazbou β -Trcp1 na SCF.

Druhým sledovaným proteinem Emi/Erp rodiny byl Emi2, jež je specifický pro meiotické buňky a jeho hlavní úloha spočívá především v udržování MII bloku jako součást CSF (Madgwick et al., 2006).

Námi detekovaná exprese Emi2 byla rovněž trochu rozdílná u myších a prasečích vzorků, což potvrzuje výše zmiňovanou hypotézu o rozdílných mechanismech regulace buněčného cyklu u myši a prasat, obzvláště pak co se týče proteosyntézy. U prasečích oocytů jsme detekovatli expresi Emi2 ve všech sledovaných fázích meiotického zrání, nicméně v GV oocytech byla exprese na hranici detekce. Ve fázi první metafáze (MI) se exprese Emi2 proteinu lehce zvýšila, ale stále byla na velmi nízkých hladinách. Ve fázi druhé metafáze (MII) došlo k masivní expresi proteinu, která zde dosahovala maxima. Po parthenogenetické aktivaci oocytů došlo k degradaci Emi2 proteinu a ve fázi zygoty nebyl již žádný signál detekován. Během embryogeneze se protein Emi2 opět reakumuloval a

ve fázi dvoubuněčného embrya byl již dobře detekovatelný. Exprese Emi2 se následně ve fázi čtyřbuněčného embrya zvýšila, načež ve fázi osmibuněčného embrya opět lehce klesla.

U myších oocytů byla exprese Emi2 detekována ve všech sledovaných fázích meiotického zrání i ranné *in vivo* embryogeneze. Exprese proteinu rostla z GV fáze až do MII, kde dosahovala svého maxima. Po fertilizaci došlo k markantní degradaci Emi2 proteinu, nicméně ve fázi zygoty byl stále nepatrně detekovatelný. Po započetí mitotického buněčného dělení se exprese Emi2 proteinu opět znatelně zvýšila (fáze čtyřbuněčného embrya).

Hlavními rozdíly v exprese Emi2 u myši a prasat byla znatelně vyšší exprese myšího Emi2 v GV fázi a stejně tak zde protein na nízkých hladinách přetrvával i po fertilizaci. Vzhledem k tomu, že není metoda western blotu až tak přesná co se týče kvantifikace relativního množství exprimovaného proteinu, je možné, že tato nízká koncentrace u myších zygot mohla být způsobena nespecifickým signálem díky pozadí filmu.

Námi dosažené výsledky u prasečího Emi2 korelují s výzkumem Shojiho et al. (2006) a Tunquista et Mallera (2003), kteří uvádějí, že nejvyšší exprese Emi2 proteinu je ve fázi MII. Jejich názory na to, kdy se protein začíná exprimovat se však rozcházejí. Shoji et al. (2006) demonstruje, že k této expresi dochází po GVBD (což by odpovídalo našim výsledkům u prasečích oocytů), Tunquist (2003) však uvádí, že je Emi2 přítomný dokonce už v nezralých oocytech ještě před vstupem do meiózy (což odpovídá našim výsledkům u myších oocytů). Oproti tomu Marangos et al. (2007) uvádějí, že k expresi proteinu Emi2 dochází až při vydělení prvního pólového tělíska, tudíž v přechodu MI do MII, což je vzhledem k našim výsledkům dosti nepravděpodobné – zejména s přihlédnutím na polyadenylaci Emi2 mRNA, která byla detekována již v MI oocytech.

Aktivita Emi2 je regulována fosforylací, ať už pozitivně (c-mos, MAPK kinázová signální dráha), či negativně - Cdk1 fosforylace brání interakci Emi2 s APC/C a fosforylace CaMKII a Plk1 vede k destrukci Emi2 a inaktivaci CSF a vstupu oocytu do mitotického cyklu (Tunquist et Maller, 2003).

Degradace Emi2 je tedy, na rozdíl od Emi1, závislá na aktivitě CaMKII, která je jejím spouštěčem. Tento mechanismus vysvětlují ve své práci Liu a Maller (2005), kteří

demonstrují, že v odezvě na signalizaci Ca^{2+} se zvyšuje hladina CaMKII, která fosforyluje místa na N-terminálním konci Emi2. K těmto fosforylacím dochází na threoninu 195. Poté může být fosforylovaný threonin rozpoznán pomocí Polo-box domény Plk1, která se záhy s Emi2 naváže a udržuje jeho fosforylaci (Hansen et al., 2006; Isoda et al., 2011). Tato fosforylační místa jsou potom rozpoznávána SCF a v SCF β TrCP-dependentním procesu během fertilizace či aktivace oocytů, což vede k degradaci Emi2. To rovněž koreluje s našimi dosaženými výsledky, kdy došlo k degradaci Emi2 proteinu následně po oplození u myších a perthenogenetické aktivaci u prasečích oocytů.

Výše zmiňovaný mechanismus můžeme rovněž potvrdit našimi experimenty s malými molekulovými inhibitory Emi2 na bázi pyrrolů, které se právě na Polo-box doménu Plk1 váží a tím zabrání v udržení fosforylace Emi2. U všech testovaných Emi2 inhibitorů došlo ke statisticky významnému snížení oocytů maturovaných do MII fáze. Z čehož lze vyvozovat, že protein Emi2 má v procesu meiotické maturace oocytů nezastupitelnou roli. Nicméně u oocytů, které do MII fáze, i po použití Emi2 inhibitorů, došly, byly pomocí imunohistochemické metody detekovány abnormálně utvářená dělicí vřeténka, stejně jako tomu bylo v experimentech Madgwick et al. (2006), která toto demonstuje na Emi2 KO myších oocytech. Tyto experimenty byly však prozatím spíše ve fázi testování samotné účinnosti inhibice Emi2 a v budoucnu budou ještě optimalizovány a využity pro detailnější studium regulace fosforylace Emi2 a jejím účinkům během meiotického zrání.

Co se týče sledování polyadenylace Emi1 mRNA, byla u myšího i prasečího Emi1 detekována ve všech fázích meiotického zrání, což je v přímé korelaci s expresí Emi1 proteinu. Stejně tak byla v přímé korelaci exprese myšího i prasečího proteinu Emi2 a polyadenylace jejich mRNA, ke které docházelo v MI a MII fázi. V naší práci jsme tedy potvrdili, že stejně jako je tomu u řízení exprese Emi1 a Emi2 u žab rodu *Xenopus* (Belloc et Méndez, 2008) působí u savců stejný mechanismus. Řízení genové exprese savčího Emi1 a Emi2 je na úrovni posttranskripčních úprav a proteiny Emi1 a Emi2 byly tedy exprimovány na základě polyadenylace jejich mRNA.

6. 2 Diskuse k experimentům s členy CPEB2 subrodiny

Hlavním cílem disertační práce bylo prokázání přítomnosti a vlivu CPEB2 během meiotického zrání prasečích oocytů a pathenogenetických embryí, protože o jeho expresi

a funkci během těchto procesů nebyly prozatím publikovány žádné práce. Nicméně jsme se okrajově zaměřili i na myši CPEB2 a rovněž na ne tolik prozkoumané další členy CPEB2 subrodiny, jako jsou CPEB3 a CPEB4.

Cytoplazmatické polyadenylační elementy vázající proteiny (CPEB) jsou rodina proteinů, které váží specifické skupiny mRNA a regulují tak jejich translaci. Úloha regulace translace pomocí CPEB byla potvrzena v mnoha fyziologických a patologických procesech, zahrnujících buněčné dělení, vývoj samičích i samčích zárodečných buněk, diferenciace buněk, buněčnou senescenci, synaptickou plasticitu i procesy spojené s učením a pamětí (Afroz et al., 2014; Eliscovich et al., 2008; Fernández-Miranda et Méndez, 2012; Groisman et al., 2000; Macnicol et al., 2015; Richter, 2007; Wu et al., 1998).

Dosavadní studie CPEB2 se zaměřovaly především na jeho funkce v nervovém systému (Lai et al., 2016; Turimella et al., 2014) a dalších tkáních (Chen et Huang, 2012; Hägelle et al., 2009; Kurihara et al., 2003), ale o jeho funkci a expresi během meiotického zrání oocytů a časně embryogeneze není příliš známo. V této práci jsme poprvé potvrdili expresi CPEB2 mRNA a proteinu a také jeho lokalizaci během meiotického zrání oocytů a vývíjejících se časných embryí a jeho důležitost v těchto procesech.

Všichni členové CPEB rodiny podléhají alternativnímu sestřihu, následkem čehož vzniká více transkripčních variant (Turimella et al., 2014). My jsme potvrdili, že i v prasečích oocytech se vyskytují dvě varianty CPEB2 mRNA, které korelují s detekovanými CPEB2A a CPEB2B transkripty ve studii Wang et Cooper (2010). Wang et Cooper (2010) analyzovali *in silico* myši a lidské orthogeny CPEB1, CPEB2, CPEB3 a CPEB4 proteinů a demonstrují velké množství jejich transkripčních variant, které vedou k expresi různých isoform těchto proteinů. V buňkách myši sítnice objevili dvě transkripční varianty CPEB2, již zmiňované CPEB2A a CPEB2B. Kratší varianta (CPEB2A) je tvořena vynecháním exonu 4 a je 90 o nukleotidů kratší než delší varianta (CPEB2B), což odpovídá i námi detekovaným signálům mRNA. Johnson et al. (2015) pozorovali antagonismus mezi těmito dvěma variantami CPEB2 a hypotezují o jejich možné protichůdné funkci. CPEB2B může jednoduše fungovat pro vazbu specifických mRNA a blokovat je od spojení s CPEB2A, což umožňuje alternativní polyadenylaci a translaci. Navrhují také mechanistické vysvětlení, že zahrnutí dalších 30 aminokyselin v delší

formě CPEB2B změní jeho funkci, takže může vázat RNA pro účinnou polyadenylaci versus polyadenylaci inhibovat, když je přítomna vazba CPEB2A. Přesná úloha těchto dvou variant CPEB2 během meiotického zrání je však prozatím neznámá a bude předmětem dalších výzkumů.

Wang et Cooper (2010) rovněž uvádějí, že dlouhý transkript CPEB2 kóduje dvakrát tak větší protein, což by s vysokou pravděpodobností mohlo korelovat s našimi výsledky exprese CPEB2 proteinu, kdy bylo detekováno více forem CPEB2. Exprese proteinu CPEB2 byla detekována ve všech fázích meiotického zrání a statisticky se významně nelišila, nicméně v MII fázi je viditelná degradace proteinu a exprese CPEB2 zde dosahuje svého minima. Mimoto byly sledovány u všech fází zrání dokonce další dvě formy proteinu. Větší z nich by mohla odpovídat právě již zmiňovanému delšímu proteinu, kdežto menší z nich možné fosforylaci CPEB2, protože rozdíl velikosti je odpovídající a signál vzrůstá od GV fáze, kde je slabý. Právě fosforylace může hrát významnou roli ve vazbě CPEB2 na specifické mRNA a jejich regulaci, stejně, jako je tomu u CPEB1 proteinu (Komrskova et al., 2014). To, zda se u většího signálu jedná o produkt delšího transkriptu, či se jedná v obou případech o možné posttranslační modifikace (zejména právě fosforylaci) musí být ještě prozkoumáno.

Snížení exprese CPEB2 v MII fázi koreluje s jeho paralogem CPEB1, kdy je jeho částečná degradace v žábích vajíčkách nezbytná pro přechod mezi metafází I a metafází II (Mendez et al., 2002) a což bylo potvrzeno i u prasečích oocytů (Komrskova et al., 2014).

Tato hypotéza byla v této práci rovněž potvrzena pomocí více senzitivní metodou, a to pomocí qRT-PCR. Relativní exprese CPEB2 mRNA vzrůstala od GV fáze do MI a následně opět klesala, což koreluje s naší sledovanou expresí CPEB2 proteinu. Zda je však tato degradace nezbytná pro vstup oocytů do MII fáze, jako je tomu v případě CPEB1, musí být ještě zmapováno.

Expresi CPEB2 mRNA jsme potvrdili také během ranné embryogeneze u prasat. Po parthenogenetické aktivaci byla ve všech stádiích embryonálního preimplantačního vývoje exprese detekovatelná. A kromě čtyřbuněčného stádia, kde exprese CPEB2 mRNA znatelně vzrostla, měla kontinuálně klesající charakter. S ohlednutím na skutečnost, že právě ve stádiu čtyřbuněčného embrya dochází k aktivaci embryonálního genomu (Jarrell

et al., 1991), tento nárůst exprese značí, že CPEB2 není pouze maternálně, ale rovněž embryonálně exprimovaným genem.

Co se týče lokalizace CPEB2 proteinu, naše výsledky z imunocytochemie ukazují, že migruje z jadérka do cytoplazmy, kam je relokován po parthenogenetické aktivaci. Tato migrace do cytoplazmy je pravděpodobně odezvou na vápníkový signál skrze aktivitu CaMKII, která po aktivaci (za fyziologických podmínek fertilizaci) nastává (Miao et Williams, 2012). Tato teorie je rovněž diskutována Kanem et al., (2010), kteří uvádějí, že členové CPEB2 subrodiny mají konzervovaný nukleární export, jež není přítomný u CPEB1.

O funkci CPEB2 a jeho interakci s cílovými mRNA není příliš známo, ale vzhledem k podobným vlastnostem, sekvenci a expresnímu profilu s dobře prozkoumaným CPEB1 proteinem, lze předpokládat, že s ním CPEB2 sdílí mnoho podobných funkcí.

Překrývající se specifická ve vázaných RNA mezi CPEB1 a CPEB2 indikuje také možnou interakci CPEB2 s β -kateninem a CaMKII (Turimella et al., 2014), jež jsou oba vázány CPEB1 proteinem (Kundel et al., 2009; Wu et al., 1998).

β -katenin je důležitým mediátorem WNT signální dráhy, jejíž bezchybné působení je esenciální pro buněčnou proliferaci (Clevers et Nusse, 2012) a pro meiotické zrání zárodečných buněk, což naznačuje nezbytnost této dráhy v procesech folikulogeneze a oogeneze. Zvýšená aktivita β -kateninu v samičích zárodečných buňkách nad fyziologickou hranici měla za následek abnormální působení WNT signální dráhy, což vedlo v konečném důsledku k defektům v samičí plodnosti (Kumar et al., 2016).

Stejně tak je důležitým regulátorem meiotického zrání i CaMKII a ovlivňuje utváření dělicího vřeténka, což může řídit během meiotického zrání a aktivace prasečích oocytů prostřednictvím regulace aktivity MPF a MAPK/p90orsk signální dráhy. Po blokování CaMKII bylo potlačeno vydělení prvního pólového tělíska a meiotické zrání tak nemohlo být řádně dokončeno (Fan et al., 2003).

Vzhledem k tomu, že CPEB2 pravděpodobně interaguje s těmito meiotickými regulátory, lze předpokládat, že špatné meiotické zrání u CPEB2 deficientních oocytů demonstrováno v této práci, může být odezvou právě na narušení těchto mechanismů.

Důležitost CPEB-řízené translace během meiotického zrání oocytů a spermií bylo Tayem et Richterem (2001) ověřováno pomocí CPEB1 genového knockoutu u myši. Myši s blokováním CPEB1 genem neměly viditelné problémy se životaschopností, ale jejich reprodukční orgány byly výrazně redukovány (samice neměly detekovatelná ovária a u samců byla varlata o 30% menší) a samci i samice byli sterilní. Podobný trend jsme pozorovali u CPEB3 KO myši, kdy byla ovária výrazně redukována a varlata dosahovala pouze 35% váhy oproti kontrolním skupinám samců. Rovněž meiotické zrání CPEB3 KO oocytů bylo narušeno, ale i tak dozrálo do MII fáze 68% oocytů. Jediným problémem je velmi malé množství experimentálních CPEB3 KO oocytů, právě z důvodu velké redukce ovárií, takže výsledky mohou být lehce zkresleny. Záznamy, porovnávací počet oocytů z KO a kontrolních myši nebyly bohužel zaznamenávány.

V případě CPEB4 deficientních myších oocytů nebylo meiotického zrání téměř narušeno. Tyto naše výsledky potvrzují již dříve naznačovanou hypotézu, že zřejmě existuje nějaký mechanismus, který zajišťuje nahrazení funkce CPEB4 po jeho zablokování a že je tomu tak nejen u procesů spojených se synaptickou plasticitou a pamětí, jak uvádí Tsai et al. (2013), ale rovněž i v reprodukčních procesech. Lze tedy předpokládat, že nefunkční CPEB4 je nahrazen jiným CPEB, což je ovšem dost troufalá teorie a mechanismus nahrazení funkce CPEB4 bude muset být předmětem detailnějšího zkoumání.

Možnost nahrazení funkce CPEB4 jiným CPEB nás přivedla na myšlenku, že možná po CPEB2 KO a KD je jeho funkce také částečně nahrazena jiným CPEB, protože u prasečích CPEB2 KD oocytů maturovalo do MII fáze 43% oocytů a u myších CPEB2 KO 34% oocytů, stejně jako byla sice narušena ranná embryogeneze a počty embryí vyvinutých do požadovaných stádií byly statisticky průkazně nižší, než u kontrolní skupiny, nicméně jejich vývoj nebyl pozastaven úplně.

Tuto naši hypotézu jsme se pokusili ověřit pomocí porovnání hladin mRNA CPEB3 a CPEB4 u kontrolních a CPEB2 KD skupin oocytů a embryí v rozdílných fázích meiotického zrání a embryogeneze, ale ani u jednoho genu nebyla pozorována zvýšená exprese. Hladina exprese CPEB1 nebyla porovnávána, protože jsme usuzovali, že nahrazení funkce by bylo pravděpodobněji zprostředkováno některým ze CPEB2 orthologů, nicméně to nelze vyloučit a bude to prověřeno v budoucnu.

Co se týče mechanismu regulace embryogeneze pomocí CPEB2, Nairismägi et al. (2012) uvádějí, že CPEB2 protein interaguje s TWIST1 transkripčním faktorem a negativně ovlivňuje jeho expresi. V embryích je TWIST1 nezbytným genem, který se podílí na vývoji embryonálního mezodermu a dorzo-ventrální formaci embrya (Fuchtbauer, 1995; Gitelman, 1997; Xu et al., 2012), z čehož lze usuzovat, že pouze malý zlomek z blastocyst, které se i přes zablokování CPEB2 vyvinuly, by dále bylo životaschopných a lze tak vysvětlit velmi malý počet potomků u CPEB2 KO myši, i přes to, že není jejich fenotyp abnormální.

Narušení vývoje ranných CPEB2 deficientních embryí do stádia blastocysty je možné odůvodnit potenciálním zapojením CPEB2 proteinu do vytváření těsných buněčných spojů (TJ – tight junction), které jsou pro řádný vývoj embrya nezbytné. CPEB-řízená tvorba těchto buněčných spojů byla již dříve identifikována u polarity epiteliálních buněk. Normální buňky vykazovaly silnou polaritu, adekvátní tvorbu buněčných dutin a selektivní propustnost na rozdíl od buněk s deficiencí CPEB1, které měly sníženou polaritu a tvorbu dutin a jejich propustnost byla zvýšená (Matter et al., 2005; Nagaoka et al., 2012). Jak je uváděno Nagaokou et al. (2012), CPEB1 hraje důležitou roli v regulaci lokalizace Tjp1 (tight junction protein 1) mRNA a tím pádem reguluje tvorbu těchto těsných buněčných spojů. Stejně jako Tjp1, je s regulací TJ spjat i β -katenin (Hartsock et Nelson, 2008), což jen potvrzuje naši hypotézu, že je CPEB2 pro tvorbu TJ během embryogeneze nezbytným a bude to otázkou pro budoucí výzkum.

7 Závěr

V této disertační práci byla zmapována a porovnána exprese Emi1 a Emi2 během meiotického zrání savčích oocytů a ranné embryogeneze a byl odhalen mechanismus regulace jejich genové exprese. Rovněž byly doplněny chybějící informace o cytoplazmatických polyadenylačních vazebných proteinech. V našem výzkumu jsme se zaměřili především na málo prozkoumaný protein CPEB2. Byla zmapována jeho exprese na úrovni proteinů i mRNA a naznačena jeho možná regulace fosforylací a dále byla ověřena jeho důležitost v meióze a mitóze. Výsledkem práce bylo také otestování funkce nových makrocyclických inhibitorů Emi2 na bázi pyrrolů, které budou na základě našich výsledků dále optimalizovány a budou dále využity v budoucím výzkumu mechanismů regulace buněčného cyklu.

Výsledky naší práce byla potvrzena hypotéza, že se exprese Emi1 a Emi2 proteinů se liší mezi jednotlivými fázemi meiotického zrání myších a prasečích oocytů a že exprese Emi1 a Emi2 proteinů je v přímé korelaci s polyadenylací 3' konce jejich mRNA. Zásadními posttranskripčními úpravami, jež u nich regulují genovou expresi, je tedy právě polyadenylace.

Byly rovněž potvrzeny hypotézy, že exprese Emi1 proteinu přetrvává i po fertilizaci či parthenogenetické aktivaci oocytů a že proteinu Emi2 je po fertilizaci či parthenogenetické aktivaci oocytů degradován a k jeho reakumulaci dochází až během prvních cyklů mitózy. Zároveň bylo ověřeno, že zablokování Polo-box domény Plk1 malými makrocyclickými inhibitory zabrání fosforylaci Emi2 a sníží tak procento myších a prasečích oocytů maturovaných do MII fáze.

Co se týče výzkumu cytoplazmatické polyadenylační elementy vazebných proteinů, byla ověřena hypotéza, že se exprese CPEB2 mRNA i proteinu liší v jednotlivých fázích meiotického zrání prasečích oocytů a vývoje ranných parthenogenetických embryí a je pro jejich zdárný vývoj nezbytná. Také byla ověřena hypotéza, že i v prasečích oocytech jsou dvě formy CPEB2 transkriptu – CPEB2A a CPEB2B. V dalším výzkumu však bude nezbytné ověření jejich funkce.

Nicméně hypotéza, že se po zablokování CPEB2 zvýší exprese ostatních CPEB z CPEB2 subrodiny (CPEB3, CPEB4) a částečně tedy nahradí jeho funkci, byla vyvrácena, i když

byla potvrzena hypotéza, že CPEB3 a CPEB4 transkripty jsou přítomny ve všech fázích meiotického zrání.

Rovněž náš výzkum potvrdil hypotézu, že jediným členem CPEB2 subrodiny, jehož inhibice nemá letální vliv na meiotické zrání myších oocytů, je CPEB4 a potvrdili jsme tak již dříve diskutovanou možnost, že je jeho funkce u deficientních buněk nahrazena jiným mechanismem, což bude otázkou budoucího výzkumu.

Výsledky této práce pomohly objasnit jeden z klíčových procesů významně ovlivňujících správný průběh meiózy a molekulární mechanismy ovlivňující výstup oocytů z MII bloku a bezchybné zahájení embryonálního vývoje. Naše poznatky mohou rovněž přispět ke zlepšení podmínek in vitro kultivace oocytů a potažmo in vitro produkce embryí u savců.

8 Seznam zkratek

1C	jednobuněčné embryo
1DE	jendorozměrová gelová elektroforéza
2C	dvoubuněčné embryo
2DE	dvourozměrná gelová elektroforéza
2n	diploidní počet chromozomů
2- $\Delta\Delta$ Ct	srovnávací metoda delta delta prahového cyklu
3' konec	3' nepřekládaný (netranslatovaný) konec mRNA
4C	čtyřbuněčné embryo
8C	osmibuněčné embryo
A	adenin
ACT	aktivační medium
ANOVA	analýza rozptylu
APC/C	anaphase promoting komplex/cyclosome
APS	peroxosíran amonný
AREs	AU rich elements (elementy bohaté na adenin a uracil)
ATP	adenosintrifosfát
BORA	protein Aurora Borealis
BL	blastocysta
bp	pár bází
BSA	hovězí sérový albumin
CaMKII	Ca ²⁺ /kalmmodulin dependentní protein kináza II
cAMP	cyklický adenosinmonofosfát
Cdc20	cell-division cycle protein 20, aktivátor APC/C operující v anafázi
Cdc25	rodina duálních fosfatáz schopných defosforylovat Thr14 a Tyr15 na Cdk1/2
CDH1	cadherin-1
Cdh1/Hct1	aktivátor APC/C operující v G1-fázi
Cdk	cyklin dependentní kináza
Cdk1	cyklin dependentní kináza 1
Cdk1/cyklin B	viz MPF
cDNA	komplementární deoxyribonukleová kyselina
CHAPS	3-[(3-Cholamidopropyl)dimethylammonio]-1-propanesulfonát
CHK1	checkpoint kináza 1
c-mos	protein mos proto-onkogenu
COC	kumulus-oocyt komplex
CPE	cytoplazmatické polyadenylační element
CPEB	cytoplazmatické polyadenylační elementy vázající proteiny
CPEB1	cytoplazmatické polyadenylační elementy vázající protein 1
CPEB2	cytoplazmatické polyadenylační elementy vázající protein 2
CPEB3	cytoplazmatické polyadenylační elementy vázající protein 3
CPEB4	cytoplazmatické polyadenylační elementy vázající protein 4
CSF	cytostatický faktor
CTR	kontrola
DAPI	2-(4-amidinofenyl)-1H-indol-6-carb
dbcAMP	N ₆ ,2'-O-Dibutyryladenosine 3',5'-cyclic monophosphate
DEPC	diethylpyrokarbonát
DNA	deoxyribonukleová kyselina

DNA PAGE	nedenaturační polyakrylamidová gelová elektroforéza na separaci DNA/RNA
dsRNA	dvouřetězcová ribonukleová kyselina
E2F	transkripční faktor, operující v G1/S přechodu
E3-ub.lig	ligáza katalyzující vlastní polyubiquitinaci cílového proteinu
ECL	chemiluminescenční reagent
EDTA	kyselina ethylendiamintetraoctová
eEF2	eukaryotický elongační faktor 2
Emi1	FBXO5, F box only protein 5, ranný mitotický inhibitor, inhibitor APC/C
Emi2	FBXO43, F box only protein 43, inhibitor APC/C
FCS	fetální telecí sérum
GAPDH	glyceraldehyde-3-fosfát dehydrogenáza dehydrogenáza
GSC	germline stem cells - zárodečné kmenové buňky
GV	germinal vesicle - zárodečný váček, fáze zrání oocyty, profáze I
GVBD	germinal vesicle breakdown - rozpad zárodečného váčku
HEPES	N-[2-hydroxyethyl]piperazin-N`-[2-ethansulfonová kyselina]
Hif-1 α	hypoxia-inducible faktor-1 α
hnRNA	heterogenní jaderná RNA
IBMX	isobutylmethylxantin
ICC	imunocytochemické barvení
IEF	izoelectrické zaostřování
IgG	imunoglobulin G
IVM	in vitro maturace
KD	knockdown
KO	knockout
M	marker
m7G	7-metylguanosin
MAPK	mitogen-aktivační protein kináza
MI	metafáze I
MII	metafáze II
MO	morula
MPF	maturaci podporující komplex (Cdk1/cyklin B)
mRNA	messenger ribonukleová kyselina
NC	negativní kontrola
NCBI	National Center for Biotechnology
NEURL1	neuralized-like 1
NLP	nine-liked protein
ORB1	oo18 RNA-vazebný protein 1
ORB2	oo18 RNA-vazebný protein 2
p21	cyklin-dependentní kinázový inhibitor 1A
p27	cyklin-dependentní kinázový inhibitor 1B
p53Bp1	p53-vázající protein 1
p57	cyklin-dependentní kinázový inhibitor 1C
p90rsk	ribosomální protein S6 kinázy A1
PAGE	polyakrylamidová gelová elektroforéza
PAK	serin/threonin cAMP dependentní kináza
Pb	pólové tělísko
PBS	fyzilogický roztok pufrovaný fosforečnanem

PDE3A	fosfodiesteráza 3A
PCR	polymerázová řetězová reakce
PGC	primordial germ cells - primordiální zárodečné buňky
pI	izoelektrický bod
PIN1	peptidylprolyl-cis-trans-izomeráza
PKB	protein kináza B
poly(A)	polyadenylát
PVA	poly(vinyl) alkohol
PZM-5	prasečí zygoté médium-5
qRT-PCR	kvantitativní reverzní transkripční PCR v reálném čase
RNA	ribonukleová kyselina
RRM	RNA-rozpoznávací motiv
rRNA	ribonukleová RNA
RT	reverzní transkripce
RT-PCR	reverzně transkripční polymerázová řetězová reakce
SAC	spindle assembly checkpoint – kontrolní bod dělicího vřeténka
SCF	E3-ubiquitin ligáza operující
SCF β -TrCP	F-box protein nutný pro degradaci Cdc25
SCP1	synaptonemální komplex protein 1
SCP2	synaptonemální komplex protein 2
SCP3	synaptonemální komplex protein 3
SDS	sodium dodecyl sulfát
SDS-PAGE	denaturační polyakrylamidová gelová elektroforéza
SEM	střední chyba průměru
Skp2	F-box protein podílející se mj. na degradaci p21, p27, p57
SPSS	statistický program
ssRNA	jednořetězová RNA
TGS	motiv Polo-like kinázy
TCEP	tris(2-carboxyethyl)phosphine
TEMED	N,N,N',N'-tetramethyldiamin
Thr14	treonin-14
TJ	tight junction - těsný buněčný spoj
Tjp1	tight junction protein 1
TRIS	N-tris[hydroxymethyl]-methyl-2-aminoethansulfonová kyselina
tRNA	transferová RNA
TTBS	tween-tris roztok
TWIST1	twist-příbuzný protein 1
Tyr15	tyrosin-15
UTR	untranslated region - nepřekládaná oblast mRNA
WB	western blot
Wee1	Wee1-like protein kináza
Wee2	Wee1-like protein kináza 2
WNT	wnt gen
β 1	transformující růstový faktor

9 Seznam použité literatury

- Afroz, T., Skrisovska, L., Belloc, E., Guillen-Boixet, J., Mendez, R., & Allain, F. H.-T. (2014). A fly trap mechanism provides sequence-specific RNA recognition by CPEB proteins. *Genes & Development*, *28*(13), 1498–1514. <https://doi.org/10.1101/gad.241133.114>
- Anger, M., Klima, J., Kubelka, M., Prochazka, R., Motlik, J., & Schultz, R. M. (2004). Timing of Plk1 and MPF activation during porcine oocyte maturation. *Molecular Reproduction and Development*, *69*(1), 11–16. <https://doi.org/10.1002/mrd.20151>
- Bachvarova, R. F. (1992). A maternal tail of poly(a): The long and the short of it. *Cell*, *69*(6), 895–897. [https://doi.org/10.1016/0092-8674\(92\)90606-D](https://doi.org/10.1016/0092-8674(92)90606-D)
- Baker, T. G. (1963). A quantitative and cytological study of germ cells in human ovaries. *Proceedings of the Royal Society of London. Series B, Biological Sciences*, *158*(972), 417–433. <https://doi.org/10.1098/RSPB.1963.0055>
- Barr, F. A., Silljé, H. H. W., & Nigg, E. A. (2004). Polo-like kinases and the orchestration of cell division. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, *5*(6), 429–441. <https://doi.org/10.1038/nrm1401>
- Bashir, T., Dorrello, N. V., Amador, V., Guardavaccaro, D., & Pagano, M. (2004). Control of the SCFSkp2–Cks1 ubiquitin ligase by the APC/CCdh1 ubiquitin ligase. *Nature*, *428*(6979), 190–193. <https://doi.org/10.1038/nature02330>
- Belloc, E., & Méndez, R. (2008). A deadenylation negative feedback mechanism governs meiotic metaphase arrest. *Nature*, *452*(7190), 1017–1021. <https://doi.org/10.1038/nature06809>
- Black, J. L., & Erickson, B. H. (1968). Oogenesis and ovarian development in the prenatal pig. *The Anatomical Record*, *161*(1), 45–55. <https://doi.org/10.1002/ar.1091610105>
- Brännström, M., & Enskog, A. (2002). Leukocyte networks and ovulation. *Journal of Reproductive Immunology*, *57*(1–2), 47–60. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12385833>
- Brewis, I. A., & Wong, C. H. (1999). Gamete recognition: sperm proteins that interact with the egg zona pellucida. *Reviews of Reproduction*, *4*(3), 135–142. Retrieved

from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10521150>

- Brook, M., & Gray, N. K. (2012). The role of mammalian poly(A)-binding proteins in co-ordinating mRNA turnover. *Biochemical Society Transactions*, 40(4), 856–864. <https://doi.org/10.1042/BST20120100>
- Buehr, M. (1997). The Primordial Germ Cells of Mammals: Some Current Perspectives. *Experimental Cell Research*, 232(2), 194–207. <https://doi.org/10.1006/EXCR.1997.3508>
- Carlson, B. M. (2014). *Human embryology and developmental biology*. Elsevier/Saunders. Retrieved from <https://www.google.cz/search?q=Human+embryology+and+developmental+biology&oq=Human+embryology+and+developmental+biology&aqs=chrome..69i57j0l5.5807j1j4&sourceid=chrome&ie=UTF-8>
- Carson, D. D., Bagchi, I., Dey, S. K., Enders, A. C., Fazleabas, A. T., Lessey, B. A., & Yoshinaga, K. (2000). Embryo Implantation. *Developmental Biology*, 223(2), 217–237. <https://doi.org/10.1006/DBIO.2000.9767>
- Casenghi, M., Barr, F. A., & Nigg, E. A. (2005). Phosphorylation of Nlp by Plk1 negatively regulates its dynein-dynactin-dependent targeting to the centrosome. *Journal of Cell Science*, 118(Pt 21), 5101–5108. <https://doi.org/10.1242/jcs.02622>
- Chao, H.-W., Tsai, L.-Y., Lu, Y.-L., Lin, P.-Y., Huang, W.-H., Chou, H.-J., ... Huang, Y.-S. (2013). Deletion of CPEB3 Enhances Hippocampus-Dependent Memory via Increasing Expressions of PSD95 and NMDA Receptors. *The Journal of Neuroscience*, 33(43), 17008–17022. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.3043-13.2013>
- Chappel, S. C., & Howles, C. (1991). Reevaluation of the roles of luteinizing hormone and follicle-stimulating hormone in the ovulatory process. *Human Reproduction*, 6(9), 1206–1212. <https://doi.org/10.1093/oxfordjournals.humrep.a137513>
- Chen, P.-J., & Huang, Y.-S. (2012). CPEB2-eEF2 interaction impedes HIF-1 α RNA translation. *The EMBO Journal*, 31(4), 959–971. <https://doi.org/10.1038/emboj.2011.448>
- Cheng, H.-C., Qi, R. Z., Paudel, H., & Zhu, H.-J. (2011). Regulation and function of

- protein kinases and phosphatases. *Enzyme Research*, 2011, 794089.
<https://doi.org/10.4061/2011/794089>
- Chiquoine, A. D. (1954). The identification, origin, and migration of the primordial germ cells in the mouse embryo. *The Anatomical Record*, 118(2), 135–146.
<https://doi.org/10.1002/ar.1091180202>
- Clevers, H., & Nusse, R. (2012). Wnt/ β -Catenin Signaling and Disease.
<https://doi.org/10.1016/j.cell.2012.05.012>
- Colgan, D. F., Murthy, K. G. K., Prives, C., & Manley, J. L. (1996). Cell-cycle related regulation of poly(A) polymerase by phosphorylation. *Nature*, 384(6606), 282–285. <https://doi.org/10.1038/384282a0>
- Delsol, M. (1977). Embryogenesis, Morphogenesis, Genetics and Evolution. In *Major Patterns in Vertebrate Evolution* (pp. 119–138). Boston, MA: Springer US.
https://doi.org/10.1007/978-1-4684-8851-7_5
- Ducibella, T. (1996). The cortical reaction and development of activation competence in mammalian oocytes. *Human Reproduction Update*, 2(1), 29–42. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9079401>
- Eddy, E. M., Clark, J. M., Gong, D., & Fenderson, B. A. (1981). *Review Article: Origin and Migration of Primordial Germ Cells in Mammals. Gamete Research* (Vol. 4).
<https://doi.org/0148-7280>
- Eldridge, A. G., Loktev, A. V, Hansen, D. V, Verschuren, E. W., Reimann, J. D. R., & Jackson, P. K. (2006). The Evi5 Oncogene Regulates Cyclin Accumulation by Stabilizing the Anaphase- Promoting Complex Inhibitor Emi1, 367–380.
<https://doi.org/10.1016/j.cell.2005.10.038>
- Eliscovich, C., Peset, I., Vernos, I., & Méndez, R. (2008). Spindle-localized CPE-mediated translation controls meiotic chromosome segregation. *Nature Cell Biology*, 10(7), 858–865. <https://doi.org/10.1038/ncb1746>
- Ellederova, Z., Kovarova, H., Melo-Sterza, F., Livingstone, 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. <https://doi.org/10.1002/mrd.20368>
- Ewen, K. A., & Koopman, P. (2010). Mouse germ cell development: From specification to sex determination. *Molecular and Cellular Endocrinology*, 323(1), 76–93. <https://doi.org/10.1016/J.MCE.2009.12.013>
- Fair, T. (2003). Follicular oocyte growth and acquisition of developmental competence. *Animal Reproduction Science*, 78(3–4), 203–216. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12818645>
- Fan, H.-Y., Huo, L.-J., Meng, X.-Q., Zhong, Z.-S., Hou, Y., Chen, D.-Y., & Sun, Q.-Y. (2003). Involvement of Calcium/Calmodulin-Dependent Protein Kinase II (CaMKII) in Meiotic Maturation and Activation of Pig Oocytes1. *Biology of Reproduction*, 69(5), 1552–1564. <https://doi.org/10.1095/biolreprod.103.015685>
- Fang, L. (2010a). Nucleotide [HM037344.1] Sus scrofa cytoplasmic polyadenylation element binding protein 2 variant A (CPEB2) mRNA, complete cds. Embryonic and Genetic Engineering Laboratory, The Chinese Academy of Agricultural, Beijing, China.
- Fang, L. (2010b). Nucleotide [HM037345.1] Sus scrofa cytoplasmic polyadenylation element binding protein 2 variant B (CPEB2) mRNA, complete cds. Embryonic and Genetic Engineering Laboratory, The Chinese Academy of Agricultural, Beijing, China.
- Fernández-Miranda, G., & Méndez, R. (2012). The CPEB-family of proteins, translational control in senescence and cancer. *Ageing Research Reviews*, 11(4), 460–472. <https://doi.org/10.1016/j.arr.2012.03.004>
- Fuchtbauer, E.-M. (1995). Expression of M-Twist During Postimplantation Development of the Mouse. *DEVELOPMENTAL DYNAMICS*, 204, 31–22. Retrieved from file:///C:/Users/Admin/Downloads/F-chtbauer-1995-Developmental_Dynamics.pdf
- Fujimoto, T., Miyayama, Y., & Fuyuta, M. (1977). The origin, migration and fine morphology of human primordial germ cells. *The Anatomical Record*, 188(3), 315–329. <https://doi.org/10.1002/ar.1091880305>
- Fulka, J. (1983). Nuclear maturation in pig and rabbit oocytes after interspecific fusion.

- Experimental Cell Research*, 146(1), 212–218. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/6861907>
- Fusek, M., Káš, J., Ruml, T., & Vysoká škola chemicko-technologická v Praze. (2008). *Bioléčiva*. Vydavatelství VŠCHT. Retrieved from https://vydavatelstvi.vscht.cz/katalog/publikace?uid=uid_isbn-978-80-7080-678-4
- Giangarrà, V., Igea, A., Castellazzi, C. L., Bava, F.-A., & Mendez, R. (2015). Global Analysis of CPEBs Reveals Sequential and Non-Redundant Functions in Mitotic Cell Cycle. *PLOS ONE*, 10(9), e0138794. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0138794>
- Gioia, L., Barboni, B., Turriani, M., Capacchietti, G., Pistilli, M. G., Berardinelli, P., & Mattioli, M. (2005). The capability of reprogramming the male chromatin after fertilization is dependent on the quality of oocyte maturation. *Reproduction*, 130(1), 29–39. <https://doi.org/10.1530/rep.1.00550>
- Gitelman, I. (1997). Twist Protein in Mouse Embryogenesis. *DEVELOPMENTAL BIOLOGY*, 189, 205–214. Retrieved from https://ac.els-cdn.com/S0012160697986140/1-s2.0-S0012160697986140-main.pdf?_tid=7323ab1c-138b-11e8-8aaa-00000aab0f02&acdnat=1518835217_a4143ace13959ef781084eef4b4ac7b2
- Gosden, R. G. (2002). Oogenesis as a foundation for embryogenesis. *Molecular and Cellular Endocrinology*, 186(2), 149–153. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11900888>
- Groisman, I., Huang, Y.-S., Mendez, R., Cao, Q., Theurkauf, W., & Richter, J. D. (2000). CPEB, Maskin, and Cyclin B1 mRNA at the Mitotic Apparatus. *Cell*, 103(3), 435–447. [https://doi.org/10.1016/S0092-8674\(00\)00135-5](https://doi.org/10.1016/S0092-8674(00)00135-5)
- Groisman, I., Ivshina, M., Marin, V., Kennedy, N. J., Davis, R. J., & Richter, J. D. (2006). Control of cellular senescence by CPEB. *Genes & Development*, 20(19), 2701–2712. <https://doi.org/10.1101/gad.1438906>
- Gunasekaran, P., Lee, S.-R., Jeong, S.-M., Kwon, J.-W., Takei, T., Asahina, Y., ... Bang, J. K. (2017). Pyrrole-Based Macrocyclic Small-Molecule Inhibitors That Target Oocyte Maturation. *ChemMedChem*, 12(8), 580–589.

<https://doi.org/10.1002/cmdc.201700048>

- Gupta, S. K., Chakravarty, S., Suraj, K., Bansal, P., Ganguly, A., Jain, M. K., & Bhandari, B. (2007). Structural and functional attributes of zona pellucida glycoproteins. *Society of Reproduction and Fertility Supplement*, 63, 203–216. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17566274>
- Hägelle, S., Kühn, U., Böning, M., & Katschinski, D. M. (2009). Cytoplasmic polyadenylation-element-binding protein (CPEB)1 and 2 bind to the HIF-1 α mRNA 3'-UTR and modulate HIF-1 α protein expression. *Biochem. J*, 417, 235–246. <https://doi.org/10.1042/BJ20081353>
- Hake, L. E., & Richter, J. D. (1994). CPEB is a specificity factor that mediates cytoplasmic polyadenylation during *Xenopus* oocyte maturation. *Cell*. [https://doi.org/10.1016/0092-8674\(94\)90547-9](https://doi.org/10.1016/0092-8674(94)90547-9)
- Hamatani, T., Carter, M. G., Sharov, A. A., & Ko, M. S. H. (2004). Dynamics of global gene expression changes during mouse preimplantation development. *Developmental Cell*, 6(1), 117–131. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/14723852>
- Hansen, D. V., Loktev, A. V., Ban, K. H., & Jackson, P. K. (2004). Plk1 Regulates Activation of the Anaphase Promoting Complex by Phosphorylating and Triggering SCF \square TrCP - dependent Destruction of the APC Inhibitor Emi1, 15(December), 5623–5634. <https://doi.org/10.1091/mbc.E04>
- Hansen, D. V., Tung, J. J., & Jackson, P. K. (2006). CaMKII and Polo-like kinase 1 sequentially phosphorylate the cytostatic factor Emi2 \square XErp1 to trigger its destruction and meiotic exit. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2006 Jan 17;103(3):608-13
- Hartsock, A., & Nelson, W. J. (2008). Adherens and tight junctions : Structure , function and connections to the actin cytoskeleton, 1778, 660–669. <https://doi.org/10.1016/j.bbamem.2007.07.012>
- Hodgman, R., Tay, J., Mendez, R., & Richter, J. D. (2001). CPEB phosphorylation and cytoplasmic polyadenylation are catalyzed by the kinase IAK1 / Eg2 in maturing mouse oocytes, 2822, 2815–2822.

- Homa, S. T., Carroll, J., & Swann, K. (1993). Fertilization and early embryology: The role of calcium in mammalian oocyte maturation and egg activation. *Human Reproduction*, 8(8), 1274–1281.
<https://doi.org/10.1093/oxfordjournals.humrep.a138240>
- Hoodbhoy, T., & Dean, J. (2004). Insights into the molecular basis of sperm-egg recognition in mammals. *Reproduction*, 127(4), 417–422.
<https://doi.org/10.1530/rep.1.00181>
- Hsu, J. Y., Reimann, J. D. R., Sørensen, C. S., Lukas, J., & Jackson, P. K. (2002). E2F-dependent accumulation of hEmi1 regulates S phase entry by inhibiting APCCdh1. *Nature Cell Biology*, 4(5), 358–366. <https://doi.org/10.1038/ncb785>
- Huang, Y.-S., Kan, M.-C., Lin, C.-L., & Richter, J. D. (2006). CPEB3 and CPEB4 in neurons: analysis of RNA-binding specificity and translational control of AMPA receptor GluR2 mRNA. *The EMBO Journal*, 25(20), 4865–4876.
<https://doi.org/10.1038/sj.emboj.7601322>
- Hunter, M. (2000). Oocyte maturation and ovum quality in pigs. *Reviews of Reproduction*, 5(2), 122–130. <https://doi.org/10.1530/ror.0.0050122>
- Hunter, T. (1995). Protein kinases and phosphatases: The Yin and Yang of protein phosphorylation and signaling. *Cell*, 80(2), 225–236. [https://doi.org/10.1016/0092-8674\(95\)90405-0](https://doi.org/10.1016/0092-8674(95)90405-0)
- Hyttel, P., Fair, T., Callesen, H., & Greve, T. (1997). Oocyte growth, capacitation and final maturation in cattle. *Theriogenology*, 47(1), 23–32.
[https://doi.org/10.1016/S0093-691X\(96\)00336-6](https://doi.org/10.1016/S0093-691X(96)00336-6)
- Igea, A., & Méndez, R. (2010). Igea, A., & Méndez, R. (2010). Meiosis requires a translational positive loop where CPEB1 ensues its replacement by CPEB4. *The EMBO Journal*, 29(13), 2182–2193.
<https://doi.org/10.1038/emboj.2010.111> Meiosis requires a translational positive
- Isoda, M., Sako, K., Suzuki, K., Nishino, K., Nakajo, N., Ohe, M., ... Sagata, N. (2011). Dynamic Regulation of Emi2 by Emi2-Bound Cdk1/Plk1/CK1 and PP2A-B56 in Meiotic Arrest of *Xenopus* Eggs. *Developmental Cell*, 21(3), 506–519.
<https://doi.org/10.1016/j.devcel.2011.06.029>

- Jana, S. C., Bazan, J. F., Dias, M. B., & Bettencourt Dias, M. (2012). Polo Boxes Come out of the Crypt: A New View of PLK Function and Evolution. *Structure*, 20(11), 1801–1804. <https://doi.org/10.1016/j.str.2012.10.008>
- Jansova, D., Tetkova, A., Koncicka, M., Kubelka, M., & Susor, A. (2018). Localization of RNA and translation in the mammalian oocyte and embryo. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0192544>
- Jarrell, V. L., Day, B. N., & Prather, R. S. (1991). The Transition from Maternal to Zygotic Control of Development Occurs during the 4-Cell Stage in the Domestic Pig, *Sus scrofa*: Quantitative and Qualitative Aspects of Protein Synthesis I. *BIOLOGY OF REPRODUCTION*, 44, 62–68.
- Jelínek, R., Dostál, D. M., Likovský, D. Z., Halašková E, Maňáková M, Peterka., M., Peterková, S, Titlbach, M., Zemanová, Z. (2013). *Historie embryologie*. Praha: Universita Karlova. Retrieved from <http://histologie.lf3.cuni.cz/histologie/materialy/doc/skripta.pdf>
- Jia, J.-L., Han, Y.-H., Kim, H.-C., Ahn, M., Kwon, J.-W., Luo, Y., Namgoong, S. (2015). Structural basis for recognition of Emi2 by Polo-like kinase 1 and development of peptidomimetics blocking oocyte maturation and fertilization. *Nature Publishing Group*. <https://doi.org/10.1038/srep14626>
- Jia, J., Han, Y., Kim, H., Ahn, M., Kwon, J., Luo, Y., Namgoong, S. (2016). Structural basis for recognition of Emi2 by Polo-like kinase 1 and development of peptidomimetics blocking oocyte maturation and fertilization Structural basis for recognition of Emi2 by Polo-like kinase 1 and development of peptidomimetics blocking oocyt. *Nature Publishing Group*, <https://doi.org/10.1038/srep14626>
- 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. <https://doi.org/10.1038/nature02316>
- Johnson, R. M., Vu, N. T., Griffin, B. P., Gentry, A. E., Archer, K. J., Chalfant, C. E., & Park, M. A. (2015). The alternative splicing of cytoplasmic polyadenylation element binding protein 2 drives anoikis resistance and the metastasis of triple negative breast cancer. *Journal of Biological Chemistry*. <https://doi.org/10.1074/jbc.M115.671206>

- Judy Qiju Wu and Sally Kornbluth. (2008). Across the meiotic divide – CSF activity in the post-Emi2/XErp1 era. *Journal of Cell Science*, (121), 3509–3514.
<https://doi.org/10.1242/jcs.036855>
- Kan, M.-C., Oruganty-Das, A., Cooper-Morgan, A., Jin, G., Swanger, S. A., Bassell, G. J., ... Richter, J. D. (2010). CPEB4 is a cell survival protein retained in the nucleus upon ischemia or endoplasmic reticulum calcium depletion. *Molecular and Cellular Biology*, 30(24), 5658–5671. <https://doi.org/10.1128/MCB.00716-10>
- Ki Chan Kim, Won Jung Oha, Kwang Ho Koa, Chan Young Shinb, D. G. W. (2011). Cyclin B1 expression regulated by cytoplasmic polyadenylation element binding protein in astrocytes, 31(5), 213–223. <https://doi.org/10.1007/978-1-62703-673-3>
- Kishimoto, T. (2003). Cell-cycle control during meiotic maturation. *Current Opinion in Cell Biology*, 15(6), 654–663. Retrieved from
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/14644189>
- Kliment, J., Kliment, M. (1989). Reprodukcia hospodárských zvierat. Bratislava: Priroda ve spolupráci so SZN Praha. [https://doi.org/ISBN 80-070-0027-5](https://doi.org/ISBN%2080-070-0027-5)
- Komrskova, P., Susor, A., Malik, R., Prochazkova, B., Liskova, L., Supolikova, J., ... Kubelka, M. (2014). Aurora kinase A is not involved in CPEB1 phosphorylation and cyclin B1 mRNA polyadenylation during meiotic maturation of porcine oocytes. *PLoS ONE*, 9(7). <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0101222>
- Korf, B. R., & Korf, B. R. (2007). *Human genetics and genomics*. Blackwell Pub. ISSN: 0340-6717
- Kothe, M., Kohls, D., Low, S., Coli, R., Cheng, A. C., Jacques, S. L., ... Ding, Y.-H. (2007). Structure of the Catalytic Domain of Human Polo-like Kinase 1. *Biochemistry*, 46(20), 5960–5971. <https://doi.org/10.1021/bi602474j>
- Kubiak, J. Z. (2011). *Cell cycle in development*. Springer. ISBN 3642190650
- Kumar, M., Camlin, N. J., Holt, J. E., Teixeira, J. M., McLaughlin, E. A., & Tanwar, P. S. (2016). Germ cell specific overactivation of WNT/ β catenin signalling has no effect on folliculogenesis but causes fertility defects due to abnormal foetal development. *Nature Publishing Group*. <https://doi.org/10.1038/srep27273>
- Kundel, M., Jones, K. J., Shin, C. Y., & Wells, D. G. (2009). Cellular/Molecular

Cytoplasmic Polyadenylation Element-Binding Protein Regulates Neurotrophin-3-Dependent β -Catenin mRNA Translation in Developing Hippocampal Neurons.
<https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.2910-08.2009>

Kurihara, Y., Tokuriki, M., Myojin, R., Hori, T., Kuroiwa, A., Matsuda, Y., ... Uesugi, S. (2003). CPEB2, A Novel Putative Translational Regulator in Mouse Haploid Germ Cells 1, 268(April), 261–268. <https://doi.org/10.1095/biolreprod.103.015677>

L. Kańska-Książkiewicz. (2006). Pig embryo production by in vitro maturation and fertilization of ovarian oocytes. *Journal of Animal and Feed Sciences*, 15(4), 525–542. <https://doi.org/10.22358/jafs/66923/2006>

Lai, Y.-T., Su, C.-K., Jiang, S.-T., Chang, Y.-J., Lai, A. C.-Y., & Huang, Y.-S. (2016). Deficiency of CPEB2-Confined Choline Acetyltransferase Expression in the Dorsal Motor Nucleus of Vagus Causes Hyperactivated Parasympathetic Signaling-Associated Bronchoconstriction. *The Journal of Neuroscience: The Official Journal of the Society for Neuroscience*, 36(50), 12661–12676. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.0557-16.2016>

Lennarz, W. J., & Lane, M. D. (2013). *Encyclopedia of biological chemistry*. USA.ISBN 9780123786302

Lin, A. C., Tan, C. L., Lin, C.-L., Strohlic, L., Huang, Y.-S., Richter, J. D., & Holt, C. E. (2009). Cytoplasmic polyadenylation and cytoplasmic polyadenylation element-dependent mRNA regulation are involved in *Xenopus* retinal axon development. *Neural Development*, 4(1), 8. <https://doi.org/10.1186/1749-8104-4-8>

Liu, J., & Maller, J. L. (2005). Calcium Elevation at Fertilization Coordinates Phosphorylation of XErp1 / Emi2 by Plx1 and CaMK II to Release Metaphase Arrest by Cytostatic Factor, 15, 1458–1468. <https://doi.org/10.1016/j.cub.2005.07.030>

Livak, K. J., & Schmittgen, T. D. (2001). Analysis of Relative Gene Expression Data Using Real-Time Quantitative PCR and the $2^{-\Delta\Delta CT}$ Method. *Methods*, 25(4), 402–408. <https://doi.org/10.1006/meth.2001.1262>

Lowery, D. M., Lim, D., & Yaffe, M. B. (2005). Structure and function of Polo-like kinases. *Oncogene*, 24(2), 248–259. <https://doi.org/10.1038/sj.onc.1208280>

- Lucas, X., Martínez, E. ., Roca, J., Vázquez, J. ., Gil, M. ., Pastor, L. ., & Alabart, J. . (2002). Relationship between antral follicle size, oocyte diameters and nuclear maturation of immature oocytes in pigs. *Theriogenology*, *58*(5), 871–885. [https://doi.org/10.1016/S0093-691X\(02\)00699-4](https://doi.org/10.1016/S0093-691X(02)00699-4)
- Luciano, A. M., Lodde, V., Franciosi, F., Tessaro, I., Corbani, D., & Modena, S. (2012). Large-scale chromatin morpho-functional changes during mammalian oocyte growth and differentiation. *European Journal of Histochemistry : EJH*, *56*(3), e37. <https://doi.org/10.4081/ejh.2012.e37>
- Luitjens, C., Gallegos, M., Kraemer, B., Kimble, J., & Wickens, M. (2000). CPEB proteins control two key steps in spermatogenesis in *C. elegans*. *Genes & Development*, *14*(20), 2596–2609. <https://doi.org/10.1101/gad.831700.ment>
- Machida, Y. J., & Dutta, A. (2007). The APC / C inhibitor , Emi1 , is essential for prevention of rereplication, 184–194. <https://doi.org/10.1101/gad.1495007>
- Macnicol, M. C., Cragle, C. E., Arumugam, K., Fosso, B., Pesole, G., & Macnicol, A. M. (2015). Functional Integration of mRNA Translational Control Programs. *Biomolecules*, *5*, 1580–1599. <https://doi.org/10.3390/biom5031580>
- Macûrek, L., Lindqvist, A., Lim, D., Lampson, M. A., Klompaker, R., Freire, R., ... Medema, R. H. (2008). Polo-like kinase-1 is activated by aurora A to promote checkpoint recovery. *Nature*, *455*(7209), 119–123. <https://doi.org/10.1038/nature07185>
- Madgwick, S., Hansen, D. V, Levasseur, M., Jackson, P. K., & Jones, K. T. (2006). Mouse Emi2 is required to enter meiosis II by reestablishing cyclin B1 during interkinesis. *The Journal of Cell Biology*, *174*(6), 791–801. <https://doi.org/10.1083/jcb.200604140>
- Marangos, P., Verschuren, E. W., Chen, R., Jackson, P. K., & Carroll, J. (2007). Prophase I arrest and progression to metaphase I in mouse oocytes are controlled by Emi1-dependent regulation of APC^{Cdh1}. *The Journal of Cell Biology*, *176*(1), 65–75. <https://doi.org/10.1083/jcb.200607070>
- Marvan, F., Hampl, A., Hložánková, E., Křesán, J., Massanyi, L., & Vernerová, E. (1992). *Morfologie hospodářských zvířat*. Brázda, ISBN 978-80-213-1658-4

- Matter, K., Aijaz, S., Tsapara, A., & Balda, M. S. (2005). Mammalian tight junctions in the regulation of epithelial differentiation and proliferation. *Current Opinion in Cell Biology*, *17*(5), 453–458. <https://doi.org/10.1016/j.ceb.2005.08.003>
- Mendez, R., Barnard, D., & Richter, J. D. (2002). Differential mRNA translation and meiotic progression require Cdc2-mediated CPEB destruction. *EMBO Journal*, *21*(7), 1833–1844. <https://doi.org/10.1093/emboj/21.7.1833>
- Mendez, R., & Richter, J. D. (2001). TRANSLATIONAL CONTROL BY CPEB : A MEANS TO THE END. *Nat Rev Mol Cell Biol.*, (7):521-9.
- Miao, Y.-L., & Williams, C. J. (2012). Calcium signaling in mammalian egg activation and embryo development: the influence of subcellular localization. *Molecular Reproduction and Development*, *79*(11), 742–756. <https://doi.org/10.1002/mrd.22078>
- MIYANO, T. (2005). In vitro growth of mammalian oocyte. *Journal of Reproduction and Development*, *51*(2), 169–176. <https://doi.org/10.1262/jrd.16014>
- Miyano, T., Ogushi, S., Bui, H.-T., & Lee, J. (2007). Meiotic Resumption and Spindle Formation of Pig Oocytes. *Journal of Mammalian Ova Research*, *24*(3), 92–98. <https://doi.org/10.1274/jmor.24.92>
- Moor, R., & Dai, Y. (2001). Maturation of pig oocytes in vivo and in vitro. *Reproduction (Cambridge, England) Supplement*, *58*, 91–104. Retrieved from <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11980205>
- Moore, C. B., Guthrie, E. H., Huang, M. T., & Taxman, D. J. (2013). NIH Public Access, (2), 1–15. <https://doi.org/10.1007/978-1-60761-657-3>
- Motlik, J., Crozet, N., & Fulka, J. (1984). Meiotic competence in vitro of pig oocytes isolated from early antral follicles. *Journal of Reproduction and Fertility*, *72*(2), 323–328. <https://doi.org/10.1530/JRF.0.0720323>
- Nagaoka, K., Udagawa, T., & Richter, J. D. (2012). CPEB-mediated ZO-1 mRNA localization is required for epithelial tight-junction assembly and cell polarity. *Nature Communications*, *3*, 675. <https://doi.org/10.1038/ncomms1678>
- Nairismägi, M.-L., Vislovukh, A., Meng, Q., Kratassiouk, G., Beldiman, C., Petretich, M., Groisman, I. (2012). Translational control of TWIST1 expression in MCF-10A

- cell lines recapitulating breast cancer progression. *Oncogene*.
<https://doi.org/10.1038/onc.2011.650>
- Nakahata, S., Katsu, Y., Mita, K., Inoue, K., Nagahama, Y., & Yamashita, M. (2001). Biochemical Identification of *Xenopus Pumilio* as a Sequence-specific Cyclin B1 mRNA-binding Protein That Physically Interacts with a Nanos Homolog, Xcat-2, and a Cytoplasmic Polyadenylation Element-binding Protein. *Journal of Biological Chemistry*, 276(24), 20945–20953. <https://doi.org/10.1074/jbc.M010528200>
- Nechama, M., Lin, C.-L., & Richter, J. D. (2013). An unusual two-step control of CPEB destruction by Pin1. *Molecular and Cellular Biology*, 33(1), 48–58.
<https://doi.org/10.1128/MCB.00904-12>
- Nishi, H., Hashimoto, K., & Panchenko, A. R. (2011). Article Phosphorylation in Protein-Protein Binding: Effect on Stability and Function. *Structure/Folding and Design*, 19, 1807–1815. <https://doi.org/10.1016/j.str.2011.09.021>
- Novoa, I., Gallego, J., Ferreira, P. G., & Mendez, R. (2010). Mitotic cell-cycle progression is regulated by CPEB1 and CPEB4-dependent translational control. *Nature Cell Biology*. <https://doi.org/10.1038/ncb2046>
- Ohno, M., Sakamoto, H., & Shimura, Y. (1987). Preferential excision of the 5' proximal intron from mRNA precursors with two introns as mediated by the cap structure. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 84(15), 5187–5191. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/2440046>
- Ozdzinski, W. (1967). Observations on the origin of primordial germ cells in the mouse. *Zoologica Poloniae*, 17, 367–379. <https://doi.org/ISSN 0044-510>
- Paronetto, M. P., Giorda, E., Carsetti, R., Rossi, P., Geremia, R., & Sette, C. (2004). Functional interaction between p90Rsk2 and Emi1 contributes to the metaphase arrest of mouse oocytes. *The EMBO Journal*, 23(23), 4649–4659.
<https://doi.org/10.1038/sj.emboj.7600448>
- Pavlopoulos, E., Trifilieff, P., Chevaleyre, V., Fioriti, L., Zairis, S., Pagano, A., ... Kandel, E. R. (2011). Neuralized1 Activates CPEB3: A Function for Nonproteolytic Ubiquitin in Synaptic Plasticity and Memory Storage. *Cell*, 147(6), 1369–1383. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2011.09.056>

- Paynton, B. V., & Bachvarova, R. (1994). Polyadenylation and deadenylation of maternal mRNAs during oocyte growth and maturation in the mouse. *Molecular Reproduction and Development*, *37*(2), 172–180.
<https://doi.org/10.1002/mrd.1080370208>
- Peters, J.-M. (2003). Emi1 proteolysis: how SCF(beta-Trcp1) helps to activate the anaphase-promoting complex. *Molecular Cell*, *11*(6), 1420–1421.
[https://doi.org/10.1016/S1097-2765\(03\)00233-8](https://doi.org/10.1016/S1097-2765(03)00233-8)
- Philpott, A., Krude, T., & Laskey, R. A. (2000). Nuclear chaperones. *Seminars in Cell & Developmental Biology*, *11*(1), 7–14. <https://doi.org/10.1006/scdb.1999.0346>
- Picton, H., Briggs, D., & Gosden, R. (1998). The molecular basis of oocyte growth and development. *Molecular and Cellular Endocrinology*, *145*(1–2), 27–37. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9922096>
- Pines, J. (1999). Four-dimensional control of the cell cycle. *Nature Cell Biology*, *1*(3), E73–E79. <https://doi.org/10.1038/11041>
- Pinna, L. A., & Ruzzene, M. (1996). How do protein kinases recognize their substrates? *Biochimica et Biophysica Acta*, *1314*(3), 191–225. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8982275>
- Primakoff, P., & Myles, D. G. (2002). Penetration, Adhesion, and Fusion in Mammalian Sperm-Egg Interaction. *Science*, *296*(5576), 2183–2185.
<https://doi.org/10.1126/science.1072029>
- Qi, W., Tang, Z., & Yu, H. (2006). Phosphorylation- and Polo-Box–dependent Binding of Plk1 to Bub1 Is Required for the Kinetochores Localization of Plk1. *Molecular Biology of the Cell*, *17*(8), 3705–3716. <https://doi.org/10.1091/mbc.e06-03-0240>
- Qin, Q., Xu, Y., He, T., Qin, C., & Xu, J. (2012). Normal and disease-related biological functions of Twist1 and underlying molecular mechanisms. *Cell Research*, *22*(1), 90–106. <https://doi.org/10.1038/cr.2011.144>
- Rauh, N. R., Schmidt, A., Bormann, J., Nigg, E. A., & Mayer, T. U. (2005). Calcium triggers exit from meiosis II by targeting the APC/C inhibitor XErp1 for degradation. *Nature*, *437*(7061), 1048–1052. <https://doi.org/10.1038/nature04093>
- Reimann, J. D. R., Freed, E., Hsu, J. Y., Kramer, E. R., Peters, J., & Jackson, P. K.

- (2001). Emi1 Is a Mitotic Regulator that Interacts with Cdc20 and Inhibits the Anaphase Promoting Complex, *105*, 645–655.
- Reverte, C. G., Ahearn, M. D., & Hake, L. E. (2001). CPEB Degradation during *Xenopus* Oocyte Maturation Requires a PEST Domain and the 26S Proteasome. *Developmental Biology*, *231*(2), 447–458.
<https://doi.org/10.1006/DBIO.2001.0153>
- Richard, F. J., & Sirard, M. A. (1996). Effects of follicular cells on oocyte maturation. II: Theca cell inhibition of bovine oocyte maturation in vitro. *Biology of Reproduction*, *54*(1), 22–28. Retrieved from
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8837996>
- Richter, J. D. (2007). CPEB: a life in translation. *Trends in Biochemical Sciences*.
<https://doi.org/10.1016/j.tibs.2007.04.004>
- Rieder, C. L., Cole, R. W., Khodjakov, A., & Sluder, G. (1995). The checkpoint delaying anaphase in response to chromosome monoorientation is mediated by an inhibitory signal produced by unattached kinetochores. *The Journal of Cell Biology*, *130*(4), 941–948. Retrieved from
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/7642709>
- Sadler, T. W. (Thomas W. . (2011). *Langmanova lékařská embryologie*. Grada.
 Retrieved from
<https://www.google.cz/search?q=Langmanova+lékařská+embryologie&oq=Langmanova+lékařská+embryologie&aqs=chrome..69i57j0l3.1105j0j1&sourceid=chrome&ie=UTF-8>
- Saitou, M., Barton, S. C., & Surani, M. A. (2002). A molecular programme for the specification of germ cell fate in mice. *Nature*, *418*(6895), 293–300.
<https://doi.org/10.1038/nature00927>
- Sako, K., Suzuki, K., Isoda, M., Yoshikai, S., Senoo, C., Nakajo, N., ... Sagata, N. (2014). Emi2 mediates meiotic MII arrest by competitively inhibiting the binding of Ube2S to the APC/C. *Nature Communications*, *5*(1), 3667.
<https://doi.org/10.1038/ncomms4667>
- Saladin, K. S., Gan, C. A., & Cushman, H. N. (2018). *Anatomy & physiology: the*

- unity of form and function* (Eighth Edi). New York: McGraw-Hill Education.
Retrieved from <https://lccn.loc.gov/2016033675>
- Salehi-Ashtiani, K., Lupták, A., Litovchick, A., & Szostak, J. W. (2006). A Genomewide Search for Ribozymes Reveals an HDV-Like Sequence in the Human CPEB3 Gene. *Science*, *313*(5794), 1788–1792.
<https://doi.org/10.1126/science.1129308>
- Sallés, F. J., & Strickland, S. (1995). Rapid and sensitive analysis of mRNA polyadenylation states by PCR. *PCR Methods and Applications*, *4*(6), 317–321.
Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/7580923>
- Scheper, G. C., Morrice, N. A., Kleijn, M., & Proud, C. G. (2001). The mitogen-activated protein kinase signal-integrating kinase Mnk2 is a eukaryotic initiation factor 4E kinase with high levels of basal activity in mammalian cells. *Molecular and Cellular Biology*, *21*(3), 743–754. <https://doi.org/10.1128/MCB.21.3.743-754.2001>
- Schmidt, A., Rauh, N. R., Nigg, E. A., & Mayer, T. U. (2006). Cytostatic factor : an activity that puts the cell cycle on hold. <https://doi.org/10.1242/jcs.02919>
- Seki, A., Coppinger, J. A., Jang, C.-Y., Yates, J. R., Fang, G., & Fang, G. (2008). Bora and the kinase Aurora a cooperatively activate the kinase Plk1 and control mitotic entry. *Science (New York, N.Y.)*, *320*(5883), 1655–1658.
<https://doi.org/10.1126/science.1157425>
- Setoyama, D., Yamashita, M., & Sagata, N. (n.d.). Mechanism of degradation of CPEB during *Xenopus* oocyte maturation. Retrieved from <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC2084286/pdf/zpq18001.pdf>
- Shoji, S., Yoshida, N., Ohgishi, M., Fukui, T., Fujimoto, S., Nakano, Y., ... Perry, A. C. F. (2006). Mammalian Emi2 mediates cytostatic arrest and transduces the signal for meiotic exit via Cdc20, *25*(4), 834–845.
<https://doi.org/10.1038/sj.emboj.7600953>
- Simmons, M. J., & Snustad, D. P. (2017). *Genetika*. Retrieved from <http://b2b.inform-za.sk/obsahy/9788021048522.pdf>
- Sládeček F. (1986). *Rozmnožování a vývoj živočichů*. Praha: Academia. 448 s

- Solomon, M. J., & Kaldis, P. (1998). Regulation of CDKs by phosphorylation (pp. 79–109). Springer, Berlin, Heidelberg. https://doi.org/10.1007/978-3-540-69686-5_4
- Srinivasrao, G., Park, J.-E., Kim, S., Ahn, M., Cheong, C., Nam, K.-Y., ... Kyu Bang, J. (2014). *Design and Synthesis of a Cell-Permeable, Drug-Like Small Molecule Inhibitor Targeting the Polo-Box Domain of Polo-Like Kinase 1*. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0107432>
- Stebbins-Boaz, B., Hake, L. E., & Richterl, J. D. (1996). CPEB controls the cytoplasmic polyadenylation of cyclin, Cdk2 and c-mos mRNAs and is necessary for oocyte maturation in Xenopus. *The EMBO Journal*, *15*(10), 2582–2592.
- Stocco, C., Telleria, C., & Gibori, G. (2007). The Molecular Control of Corpus Luteum Formation, Function, and Regression. *Endocrine Reviews*, *28*(1), 117–149. <https://doi.org/10.1210/er.2006-0022>
- Stojkovic, M., Motlik, J., Kölle, S., Zakhartchenko, V., Alberio, R., Sinowatz, F., & Wolf, E. (1999). Cell-Cycle Control and Oocyte Maturation: Review of Literature. *Reproduction in Domestic Animals*, *34*(3–4), 335–342. <https://doi.org/10.1111/j.1439-0531.1999.tb01261.x>
- Strebhardt, K. (2010). Multifaceted polo-like kinases: drug targets and antitargets for cancer therapy. *Nature Reviews Drug Discovery*, *9*(8), 643–660. <https://doi.org/10.1038/nrd3184>
- SUN, Q.-Y., & NAGAI, T. (2003). Molecular Mechanisms Underlying Pig Oocyte Maturation and Fertilization. *Journal of Reproduction and Development*, *49*(5), 347–359. <https://doi.org/10.1262/jrd.49.347>
- Suzuki, T., Suzuki, E., Yoshida, N., Kubo, A., Li, H., Okuda, E., ... Perry, A. C. F. (2010). Mouse Emi2 as a distinctive regulatory hub in second meiotic metaphase. *Development*, *137*(19), 3281–3291. <https://doi.org/10.1242/dev.052480>
- Swann, K. (1996). Soluble sperm factors and Ca²⁺ release in eggs at fertilization. *Reviews of Reproduction*, *1*(1), 33–39. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9414436>
- Takakura, I., NAITO, K., IWAMORI, N., YAMASHITA, M., KUME, S., & TOJO, H. (2005). Inhibition of Mitogen Activated Protein Kinase Activity Induces

- Parthenogenetic Activation and Increases Cyclin B Accumulation during Porcine Oocyte Maturation. *Journal of Reproduction and Development*, 51(5), 617–626.
<https://doi.org/10.1262/jrd.17034>
- Tay, J., & Richter, J. D. (2001). Germ Cell Differentiation and Synaptonemal Complex Formation Are Disrupted in CPEB Knockout Mice. *Developmental Cell*.
[https://doi.org/10.1016/S1534-5807\(01\)00025-9](https://doi.org/10.1016/S1534-5807(01)00025-9)
- Theis, M., Si, K., & Kandel, E. R. (2003). Two previously undescribed members of the mouse CPEB family of genes and their inducible expression in the principal cell layers of the hippocampus.
- Thomson, J. A., Itskovitz-Eldor, J., Shapiro, S. S., Waknitz, M. A., Swiergiel, J. J., Marshall, V. S., & Jones, J. M. (1998). Embryonic stem cell lines derived from human blastocysts. *Science (New York, N.Y.)*, 282(5391), 1145–1147. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9804556>
- Tomek, W., Torner, H., & Kanitz, W. (2002). Comparative analysis of protein synthesis, transcription and cytoplasmic polyadenylation of mRNA during maturation of bovine oocytes in vitro. *Reproduction in Domestic Animals = Zuchthygiene*, 37(2), 86–91. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11975745>
- Tsafiriri, A., & Reich, R. (1999). Molecular aspects of mammalian ovulation. *Experimental and Clinical Endocrinology & Diabetes*, 107(01), 1–11.
<https://doi.org/10.1055/s-0029-1212066>
- Tsai, L.-Y., Chang, Y.-W., Lin, P.-Y., Chou, H.-J., Liu, T.-J., Lee, P.-T., ... Huang, Y.-S. (2013). CPEB4 Knockout Mice Exhibit Normal Hippocampus-Related Synaptic Plasticity and Memory. *PLoS ONE*, 8(12), e84978.
<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0084978>
- Tung, J. J., Hansen, D. V., Ban, K. H., Loktev, A. V, Summers, M. K., Iii, J. R. A., & Jackson, P. K. (2005). A role for the anaphase-promoting complex inhibitor Emi2[−]XErp1, a homolog of early mitotic inhibitor 1, in cytostatic factor arrest of *Xenopus* eggs.
- Tung, J. J., & Jackson, P. K. (2005). Emi1 Class of Proteins Regulate Entry into

Meiosis and the Meiosis I to Meiosis II Transition in *Xenopus* oocytes Report ND SC ACKNOWLEDGEMENTS, 4(3), 478–482.

- Tunquist, B. J., & Maller, J. L. (2003). Under arrest: cytostatic factor (CSF)-mediated metaphase arrest in vertebrate eggs. *Genes & Development*, 17(6), 683–710. <https://doi.org/10.1101/gad.1071303>
- Turimella, S. L., Bedner, P., Skubal, M., Vangoor, V. R., Kaczmarczyk, L., Karl, K., ... Theis, M. (2014). Characterization of cytoplasmic polyadenylation element binding 2 protein expression and its RNA binding activity. *Hippocampus*. <https://doi.org/10.1002/hipo.22399>
- Vacek, Z. (2006). *Embryologie : učebnice pro studenty lékařství a oborů všeobecná sestra a porodní asistentka*. Grada.
- van Vugt, M. A. T. M., & Medema, R. H. (2005). Getting in and out of mitosis with Polo-like kinase-1. *Oncogene*, 24(17), 2844–2859. <https://doi.org/10.1038/sj.onc.1208617>
- Vodermaier, H. C. (2004). APC/C and SCF: Controlling Each Other and the Cell Cycle. *Current Biology*, 14(18), R787–R796. <https://doi.org/10.1016/j.cub.2004.09.020>
- Wang, X.-P., & gF cooper, nigel. (2010). comparative in Silico Analyses of Cpeb1–4 with Functional predictions. *Bioinformatics and Biology Insights Bioinformatics and Biology Insights Bioinformatics and Biology Insights*, 4, 61–834. Retrieved from <http://www.la-press.com>.
- Wassarman, P. M. (1988). *The Mammalian Ovum In: Knobil, E., Neill, J. 1994. The Physiology of Reproduction* (3th editio). New York: Raven Press Ltd.
- Wassarman, P. M., Spanopoulou, E., Hodtsev, A., & Kreis, T. (1999). Mammalian Fertilization: Review Molecular Aspects of Gamete Adhesion, Exocytosis, and Fusion. *Cell*, 96, 175–183. Retrieved from <https://www.cell.com/action/showPdf?pii=S0092-8674%2800%2980558-9>
- Wu, L., Wells, D., Tay, J., Mendis, D., Abbott, M. A., Barnitt, A., ... Richter, J. D. (1998). CPEB-mediated cytoplasmic polyadenylation and the regulation of experience-dependent translation of α -CaMKII mRNA at synapses. *Neuron*, 21(5), 1129–1139. [https://doi.org/10.1016/S0896-6273\(00\)80630-3](https://doi.org/10.1016/S0896-6273(00)80630-3)

- Yonezawa, N., Kanai, S., & Nakano, M. (2007). Structural significance of N-glycans of the zona pellucida on species-selective recognition of spermatozoa between pig and cattle. *Society of Reproduction and Fertility Supplement*, 63, 217–228. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17566275>
- Young, J. M., & McNeilly, A. S. (2010). Theca: the forgotten cell of the ovarian follicle. *Reproduction*, 140(4), 489–504. <https://doi.org/10.1530/REP-10-0094>
- Zhao, J., Hyman, L., & Moore, C. (1999). Formation of mRNA 3' ends in eukaryotes: mechanism, regulation, and interrelationships with other steps in mRNA synthesis. *Microbiology and Molecular Biology Reviews : MMBR*, 63(2), 405–445. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10357856>
- Ziomek, C. A., & Johnson, M. H. (1980). Cell surface interaction induces polarization of mouse 8-cell blastomeres at compaction. *Cell*, 21(3), 935–942. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/7438209>

10 Seznam obrázků, tabulek, grafů

Obr. 1. Schéma oogeneze a k němu korespondující folikulogeneze.....	12
Obr. 2. Ovulace a ranná embryogeneze.....	15
Obr. 3. Schéma inaktivní a aktivní translace.....	18
Obr. 4. Schéma ilustrující molekulární pochody během obnovení BC po oplození...25	
Obr. 5. Struktura inhibitoru C-4.....	38
Obr. 6. Struktura nově nasyntetizovaných inhibitorů 557, 556 a 583.....	38
Obr. 7. Struktura bg34 použitého jako negativní kontrola.....	38
Obr. 8. Exprese Emi1 proteinu u prasečích oocytů a zygot.....	48
Obr. 9 Exprese Emi1 proteinu u myších oocytů a zygot.....	50
Obr. 10. Exprese a polyadenylace prasečí Emi1 mRNA.....	51
Obr. 11. Exprese a polyadenylace myší Emi1 mRNA.....	52
Obr. 12. Exprese Emi2 proteinu u prasečích oocytů a ranných embryí.....	53
Obr. 13. Exprese Emi2 proteinu u myších oocytů a ranných embryí.....	54
Obr. 14. Exprese a Polyadenylace prasečí Emi2 mRNA.....	56
Obr. 15. Exprese a Polyadenylace myší Emi2 mRNA.....	56
Obr. 16. Formace dělicího vřeténka u myších oocytů ošetřených inhibitorem 557....	58
Obr. 17. Formace dělicího vřeténka u pras. oocytů ošetřených inhibitorem 557.....	58
Obr. 19. Exprese CPEB2 proteinu u pras. oocytů a ranných embryí.....	59
Obr. 20. Dvě formy CPEB2 transkriptu – CPEB2A a CPEB2B v pras. oocytech.....	62
Obr. 21. Imunocytochemická detekce CPEB2 proteiu v prasečích oocytech.....	63
Obr. 22. Imunocytochemická detekce CPEB2 proteiu v prasečích embryích.....	64
Obr. 23 Účinnost CPEB2 KD na expresi CPEB2.....	66
Obr. 24. Efekt CPEB2 knockdownu na morfologii MII oocytů a blastocyst.....	69
Obr. 25. Exprese CPEB3 a CPEB4 mRNA v prasečích oocytech.....	70
Tabulka 1: Protilátky a podmínky inkubace.....	42
Tabulka 2: Sekvence primerů.....	45
Graf 1 Relativní exprese Emi1 proteinu u prasečích oocytů a zygot.....	49
Graf 2. Relativní exprese Emi1 proteinu u myších oocytů a zygot.....	50
Graf 3. Relativní xprese Emi2 proteinu u prasečích oocytů a ranných embryí.....	53

Graf 4. Relativní xprese Emi2 proteinu u myších oocytů a ranných embryí.....	55
Graf 5. Efektivnost inhibitorů Emi2 na meiotické zrání oocytů.....	57
Graf 6. Relativní exprese CPEB2 proteinu u prasečích oocytů.....	60
Graf 7. Exprese CPEB2 mRNA během meioti. zrání pras. oocytů a embry. vývoje....	61
Graf 8. Účinnost dsRNA CPEB2 KD během maturace oocytů a embr. vývoje.....	65
Graf 9. CPEB2 KD pomocí dsRNA vedl ke snížení počtu maturovaných oocytů.....	67
Graf 10. CPEB2 KD pomocí dsRNA vedl ke snížení počtu vyvinutých embryí.....	68
Graf 11. Exprese CPEB4 mRNA během zrání prasečích oocytů a embr. vývoje.....	71
Graf 12. Exprese CPEB3 mRNA během zrání prasečích oocytů a embr. vývoje.....	72
Graf 13. Meiotická maturace u CPEB2, CPEB3 a CPEB4 KO myších oocytů.....	73