



DIPLOMOVÁ PRÁCE

2013

Barbora Procházková

Česká zemědělská univerzita v Praze
Fakulta agrobiologie, potravinových a přírodních zdrojů
Katedra veterinárních disciplín



**Studium polyadenylace mRNA pro Emi1 a Emi2 a změny
jejich exprese na úrovni proteinů během meiotického zrání
savčích oocytů.**

Diplomová práce

Autor práce: Ing. Barbora Procházková

Konzultant práce: Ing. Michal Kubelka, CSc.

Vedoucí práce: doc. MVDr. Radko Rajmon, Ph.D.

© 2013 ČZU v Praze

PROHLÁŠENÍ

Prohlašuji, že jsem diplomovou práci na téma „Studium polyadenylace mRNA pro Emi1 a Emi2 a změny jejich exprese na úrovni proteinů během meiotického zrání savčích oocytů“ vypracovala samostatně a použila jen pramenů, které cituji a uvádím v příložené bibliografii.

V Praze dne 10. 4. 2013

.....

podpis autorky

PODĚKOVÁNÍ

Chtěla bych poděkovat vedoucímu své práce doc. MVDr. Radko Rajmonovi, Ph.D za cenné poznámky a za vřelý přístup při vedení mé diplomové práce. Dále bych chtěla poděkovat všem mým spolupracovníkům z Ústavu živočišné fyziologie a genetiky Akademie věd ČR, v. v. i. za vytvoření přátelského kolektivu a vhodného pracovního prostředí, jmenovitě potom především mému školiteli Ing. Michalovi Kubelkovi, CSc. a konzultantce Ing. Pavle Karabínové za sáhodlouhé diskuse a rady, Jaroslavě Šupolíkové za vstřícnost a pomoc při experimentální práci. Poděkovat bych chtěla samozřejmě také své rodině a přátelům, nejen za psychickou podporu během celého mého studia. Zvláštní dík patří potom Mgr. Barboře Rendlové za cenné statistické rady.

Studium polyadenylace mRNA pro Emi1 a Emi2 a změny jejich exprese na úrovni proteinů během meiotického zrání savčích oocytů

Study of Emi1 and Emi2 mRNA polyadenylation and changes of Emi1/Emi2 mRNA expression on the protein level during meiotic maturation of mammalian oocytes

Souhrn

Průběh meiotického zrání je řízen celou kaskádou regulačních molekul a komplexů. Důležitými regulačními proteiny meiotického zrání jsou 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 meiose a vytvoření meiotického bloku. Jakmile jsou buňky schopny se dělit, MPF pomocí fosforylace Cdk aktivuje kontrolní body v meiose a mitose. Emi1 a Emi2 mají tedy nezastupitelnou roli v regulaci meiose (popř. mitose) a bez nich by toto zrání nemohlo být ani řádně dokončeno, což bylo jedním z důvodů, proč jsme se ve svém výzkumu zaměřili právě na ně.

Cílem práce bylo zmapovat a porovnat expresi Emi1 a Emi2 proteinů a míru polyadenylace jejich mRNA v průběhu meiotického zrání savčích oocytů a dále ověření hypotézy, že exprese Emi1 a Emi2 se liší v jednotlivých fázích meiotického zrání a je v přímé závislosti na polyadenylaci 3' konci odpovídajících mRNA.

Byla analyzována délka poly(A) konců mRNA a exprese Emi1 a Emi2 na úrovni proteinů v průběhu *in vitro* meiotického zrání (IVM) prasečích a myších oocytů. Sledovanými a porovnávanými stádii zrání byly: profáze I (tzv. germinal vesicle - GV fáze), oocyt po rozpadu jaderné membrány (tzv. germinal vesicle breakdown – GVBD fáze), metafáze I (MI fáze) a metafáze II (MII fáze). Ke studiu exprese proteinů byl použit Western blot. K analýze délky poly(A) konců byl využit poly(A) test s následnou PCR amplifikací a DNA PAGE.

V této práci se nám podařilo ověřit hypotézu, že exprese proteinů Emi1 a Emi2 se liší v jednotlivých fázích zrání oocyty a je v přímé závislosti na polyadenylaci 3' konce odpovídajících mRNA. Tato hypotéza se nepotvrdila pouze u mRNA pro Emi1 u prasečích oocytů, kde nebyla polyadenylace prokázána.

Protein Emi1 byl u prasečích oocytů detekován ve všech fázích zrání a jeho exprese vzrůstala od GV ke K20, kde dosahovala svého maxima a následně klesala. U myších oocytů byl detekován ve fázích GV, GVBD a MI a jeho nejvyšší koncentrace byla ve fázi GVBD. Protein Emi2 byl detekován pouze ve fázi MII u prasečích i u myších oocytů. Signál mRNA pro Emi1 u prasečích oocytů rostl od fáze GV, svého maxima dosahoval ve fázi K20 a následně až do fáze K44 klesal. Polyadenylace zde nebyla prokázána, ale detekce mRNA pro Emi1 je ve shodě se sledovanou expresí proteinu Emi1. Signál mRNA pro Emi1 u myších oocytů se shoduje se sledovanou expresí proteinu. Nejvyšší signál byl zjištěn ve fázi GV a GVBD, kde je mRNA polyadenylována a následně klesá a dochází k deadenylaci ve fázi MI a MII. Detekce mRNA pro Emi2 u prasečích oocytů byla nejsilnější ve fázi K20, kde se potom postupně polyadenylovala až do fáze K44, kde můžeme vidět velký posun signálu, tudíž dobře detekovatelný poly (A) konec. Tato polyadenylace je ve shodě se sledovanou expresí proteinu Emi2. U myších oocytů byla viditelná polyadenylace od fáze MI do fáze MII, což je rovněž ve shodě se sledovanou expresí proteinu Emi2.

V dalším studiu bude PCR produkt pro Emi1 u prasečích oocytů osekvenována a potom bude navrhnout nový, specifický primer, pomocí kterého se budeme snažit prokázat polyadenylaci této mRNA a porovnat jí se sledovanou expresí proteinu Emi1.

Klíčová slova: meiosa, oocyt, exprese proteinů, polyadenylace mRNA, Emi1, Emi2

Summary

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. As soon as the cells are able to divide, MPF by Cdk phosphorylation activates checkpoints in meiosis and mitosis. Therefore Emi1 and Emi2 have an essential role in the regulation of meiosis (or mitosis) and this maturation can not be completed without them. This was one of the reasons why we have focused on research of them.

The aim of this thesis was to map the expression of Emi1 and Emi2 proteins and the degree at the mRNA polyadenylation during the meiotic division of mammalian oocytes.

The monitored and compared stages of maturation both in pig and mouse oocytes were: prophase I (GV), the oocyte after the breakdown of the nuclear membrane (GVBD), metaphase I (MI) and metaphase II (MII). Western blot was used to study the expression of the proteins. The length of poly(A) tails of mRNA during *in vitro* meiotic maturation (IVM) was analysed by poly(A) test followed by a PCR amplification and DNA PAGE. In this thesis we proved our hypothesis that the expression of the proteins Emi1 and Emi2 varies in different stages of oocyte maturation and is dependent on the polyadenylation of 3' end of the corresponding mRNA. This hypothesis was not confirmed only for Emi1 mRNA in porcine oocytes where the polyadenylation was not proved.

The Emi1 protein was detected in all stages in pig oocytes and its expression increased from the GV stage to K20 (GVBD) stage, when it reached its peak and then decreased. In mouse oocytes, Emi1 was detected only in GV, GVBD and MI stages and the highest concentration was in the GVBD stage. In the case of Emi2 protein, the expression was detected in both mouse and pig oocytes in the MII (K44) stage. The signal of Emi1 mRNA in pig oocytes rose from the GV stage, reached its peak in the stage of K20 and subsequently decreased to the K44. Polyadenylation has not been confirmed, but the

detection of mRNA for Emi1 is consistent with the observed protein expression. The signal of mRNA of Emi1 in mouse oocytes coincides with the observed protein expression. It is highest in GV and GVBD stages where the mRNA is polyadenylated then it subsequently decreases and deadenylation occurs in MI and MII stages. Detection of mRNA of Emi2 in porcine oocytes was highest in the K20 stage, the mRNA is then gradually polyadenyloved up to the K44 stage, where we can see well detectable poly(A) tail. This polyadenylation is consistent with the observed protein expression of Emi2. In the mouse oocytes there was visibly lower polyadenylation from MI phase to MII phase, which is also consistent with the observed Emi2 protein expression.

In further studies we will sequence the PCR product of Emi1 from porcine oocytes and then we will subsequently design a new specific primer. Using this specific primer we will try to demonstrate the mRNA polyadenylation and compare it with the expression of Emi1 protein.

Keywords: meiosis, oocyte, protein expression, polyadenylation of mRNA, Emi1, Emi2

OBSAH

1	ÚVOD	- 11 -
2	CÍL PRÁCE	- 12 -
3	LITERÁRNÍ REŠERŠE.....	- 13 -
3.1	OOGENEZE.....	- 13 -
3.1.1	Fáze množení zárodečných buněk	- 13 -
	PGC	- 13 -
	Oogonie a oocyty	- 14 -
3.1.2	Fáze růstu zárodečných buněk a folikulogeneze	- 15 -
	Meiotická kompetence	- 17 -
3.1.3	Fáze zrání oocyty.....	- 19 -
3.1.4	Regulace genové exprese v průběhu zrání oocyty.....	- 20 -
3.1.5	Polyadenylace mRNA	- 21 -
3.2	REGULACE MEIOTICKÉHO ZRÁNÍ.....	- 23 -
3.2.1	Cyklin dependentní kinázy (CDK).....	- 23 -
3.2.2	M-phase promoting factor (MPF).....	- 25 -
3.2.3	Cytostatic faktor (CSF).....	- 28 -
3.2.4	Mitogen activated protein kinase (MAPK).....	- 29 -
3.2.5	Polo-like kinase 1 (Plk1)	- 30 -
3.2.6	Budding uninhibited by benzimidazoles 1 (Bub1)	- 31 -
3.2.7	Vápníkové kationty (Ca ²⁺).....	- 31 -
3.2.8	Ca ²⁺ /kalmodulin dependentní protein kináza II (CaMKII).....	- 32 -
3.2.9	Anaphase-promoting complex/cyclosome (APC/C)	- 33 -
3.2.10	Emi/Erp rodina	- 34 -
	Emi1 (FBXO5)	- 35 -
	Emi2 (Erp1, FBXO43).....	- 37 -
4	METODIKA.....	- 40 -
4.1	KULTIVACE OOCYTŮ A PŘÍPRAVA VZORKŮ	- 40 -
4.1.1	Prasečí oocyty	- 40 -
4.1.2	Myší oocyty	- 43 -
4.2	STUDIUM EXPRESE PROTEINŮ EMI1 A EMI2.....	- 44 -
4.2.1	Polyakrylamidová gelová elektroforéza	- 44 -
	Příprava vzorků.....	- 44 -
	Příprava polyakrylamidového gelu	- 45 -
	Elektroforéza.....	- 47 -
4.2.2	Western blot.....	- 48 -

Příprava před blotováním.....	48 -
Vlastní blot.....	48 -
Barvení gelu a práce s membránou	48 -
Použité protilátky.....	51 -
4.2.3 Vyhodnocování negativů a statistická analýza dat	52 -
4.3 STUDIUM POLYADENYLACE MRNA EMI1 A EMI2.....	53 -
4.3.1 Izolace RNA	53 -
4.3.2 First-Strand cDNA Synthesis	54 -
4.3.3 RT PCR amplifikace	55 -
4.3.4 DNA PAGE.....	56 -
Příprava vzorků.....	56 -
Příprava polyakrylamidového gelu	56 -
Elektroforéza.....	57 -
Barvení gelu a vizualizace	58 -
5 VÝSLEDKY	59 -
5.1 STUDIUM EXPRESE PROTEINŮ	59 -
5.1.1 Detekce proteinu Emi1	59 -
5.1.2 Detekce proteinu Emi2.....	63 -
5.2 STUDIUM POLYADENYLACE MRNA	67 -
5.2.1 Polyadenylace mRNA Emi1.....	67 -
5.2.2 Polyadenylace mRNA Emi2.....	68 -
6 DISKUSE.....	70 -
7 ZÁVĚR.....	74 -
8 SEZNAM POUŽITÝCH ZKRATEK A SYMBOLŮ	76 -
9 SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY, OBRÁZKŮ, TABULEK A GRAFŮ	80 -
9.1 SEZNAM LITERATURY.....	80 -
9.2 SEZNAM OBRÁZKŮ.....	92 -
9.3 SEZNAM TABULEK	93 -
9.1 SEZNAM GRAFŮ.....	94 -
9.2 PŘÍLOHY	95 -
Emi1 prase (sus scrofa)	95 -
Emi1 myš (mus musculus).....	96 -
Emi2 prase (sus scrofa)	97 -
Emi2 myš (mus musculus).....	98 -

1 ÚVOD

Šlechtění hraje stále nezastupitelnou úlohu nejen v zemědělské výrobě, ale i v zájmových chovech zvířat. Aby však mohlo být samotné šlechtění realizováno, je nezbytné správně porozumět funkci pohlavního aparátu zvířat, a to nejen z anatomického a fyziologického hlediska, ale rovněž z hlediska biotechnologií a molekulární biologie.

Díky novým biotechnologickým poznatkům lze lépe zhodnotit a detekovat rizikové faktory reprodukční výkonnosti hospodářských zvířat, které pak mohou být aplikovány i do humánní medicíny. V dnešní době je proto přínosný výzkum především na modelu prasete, a to z důvodu značné podobnosti a aplikovatelnosti i na člověka. V době, kdy každým rokem vzrůstá počet párů, které mají značné problémy s reprodukcí má tento výzkum zásadní význam.

V reprodukčních biotechnologiích je velmi významná zejména *in vitro* produkce oplození schopných oocytů a následně také života schopných embryí. Detailní osvětlení a porozumění biochemických procesů účastnících se jejich správného vývoje, růstu a meiotického zrání je pro reprodukční biologii a patologii zcela nezbytné.

Proto jsem se ve své práci zaměřila právě na důležité regulátory buněčného zrání, a to proteiny Emi1 a Emi2. Tyto proteiny byly již v řadě prací zkoumány, ale především se tento výzkum prováděl na modelu žab – *Xenopus Leavis*, který se od savců v mnoha hlediscích dost odlišuje. To byl právě hlavní důvod, proč jsem se rozhodla tyto proteiny zkoumat právě na savčím modelu – konkrétně u myši a prasete. Myší model jsme si vybrala zejména kvůli dostupnosti vzorků a prasečí model z důvodu dobré aplikovatelnosti v humánní medicíně.

Tato práce navazuje na mou předešlou výzkumnou činnost a na základě dříve zjištěných poznatků jsou v této práci upraveny metodiky a rovněž využity nově navržené primery pro mRNA Emi2.

2 CÍL PRÁCE

Cílem práce bylo zmapovat a porovnat expresi a aktivitu Emi1 a Emi2 proteinů a míru polyadenylace jejich mRNA v průběhu meiotického zrání savčích oocytů a dále ověření hypotézy, že exprese Emi1 a Emi2 se liší v jednotlivých fázích zrání oocytu a je v přímé závislosti na polyadenylaci 3' konci odpovídajících mRNA.

3 LITERÁRNÍ REŠERŠE

Jedním z klíčových objektů reprodukčních biotechnologií jsou právě samičí gamety - oocyty, kterým se budu věnovat v následujícím textu. Oocyty se vyvíjejí ve vnitřních samičích reprodukčních orgánech – vaječnicích (ováriích). V nichž musí projít nejen oogenezí, ale i následným meiotickým zráním.

3.1 Oogeneze

Počátek oogeneze je u savců již ve fázi embryonálního vývoje, kdy z PGC (*primordial germ cells*) vzniká velké množství oogonií (Anger, 2001), z nichž se dále vyvíjejí zralé, oplození schopné oocyty (Romanovský et al., 1988). Nediferencované oogonie musí zredukovat svůj genetický materiál z diploidního (2n) na haploidní (n), což se děje v průběhu redukčního dělení – meiosis (Wassarman, 2008). Tyto haploidní buňky se poté diferencují do zralých gamet (Simmons et Snustad, 2009).

Proces oogeneze můžeme rozdělit do tří fází: fáze množení zárodečných buněk, fáze jejich růstu a fáze zrání. Během poslední fáze vzniká v jednom primárním folikulu pouze jeden oocyt a dvě pólóvá tělíška, tzv. pólocyty, což je odlišné od samčího meiotického zrání - spermatogeneze, při které z jednoho primárního spermatocyty vznikají 4 spermie (Simmons et Snustad, 2009).

3.1.1 Fáze množení zárodečných buněk

PGC

Primordiální zárodečné buňky se vyvíjejí již během pohlavní diferenciaci samičího plodu (Romanovský et al., 1988). PGC jsou založeny jako populace progenitorových buněk ve velmi časném – presomitovém období, a to jako první diferenciovaná embryonální buněčná linie (Buehr, 1997). Nejdříve vzniká malý shluk těchto buněk, který se postupně začne fenotypově odlišovat od buněk somatické linie a následně proliferuje do několika tisíců. K jejich normálnímu vývoji patří také typická migrace. Z místa jejich první lokalizace v proximálním epiblastu se PGC buňky postupně vydávají na dlouhou cestu skrz vyvíjející se embryo až do mezodermální oblasti, zvané genitální lišta. Po dosažení této

oblasti se vývoj zárodečných buněk odehrává již jen v gonádách. Zde prodělávají svou konečnou maturaci.

Na počátku se musí PGC oddělit od somatické linie, k čemuž dojde především díky působení jejich signálních drah (Ewen et Koopman, 2009). První studie vzniku PGC předpokládali, že vznikají přímo z entodermu žloutkového váčku (Chiquoine, 1954), ale tento předpoklad byl záhy vyvrácen Ozdzenskim (1967), který uvádí, že se formují v sousedním extraembryonálním mezodermu a že ke konci gastrulace vstupují druhotně do entodermu. Poté primordiální zárodečné buňky aktivně migrují do zadní části embrya, kde se nakonec usídlí v místě vznikající pohlavní lišty na *mesonephros*. Během migrace do pohlavní lišty se primordiální zárodečné buňky několikanásobně mitoticky dělí (Freeman, 2003).

Podle Eddyho et al. (2005) se na řízení migrace do budoucích gonád s největší pravděpodobností podílí protein podobný transformujícímu růstovému faktoru $\beta 1$ (TR $\beta 1$), který je v místě budoucích gonád sekretován.

Oogonie a oocyty

Primordiální zárodečné buňky, nacházející se v zárodečné liště, se mění na oogonie ve chvíli, kdy se přesouvají na povrch gonád a zanořují se do jejich kůry (Wassarman, 1988). Oogonie se dále mitoticky dělí a vzniká z nich několik milionů nezralých pohlavních buněk (Štípek, 2009). Proces vzniku oogonií se v sedmém měsíci gravidity redukuje (Anger, 2011) a kolem oogonií se následně shlukují buňky pocházející z *mesonephros*. Jakmile jsou oogonie obklopeny těmito buňkami (prekurzory folikulárních buněk), zahajují replikaci DNA (Bielanska - Osuchowska, 2006) a vstupují do prvního meiotického dělení, díky kterému se z nich stávají transkripčně aktivní 4C oocyty, které jsou obklopené jednou vrstvou granulóznic buněk. Tento útvar se nazývá jako primordiální folikul (Anger, 2001).

Počet primordiálních folikulů pro celé reprodukční období samice není však konečný, tak jak uváděli starší prameny (Kliment et Kliment, 1989; Marvan et al., 1992), ale dle studie Johnsona et al. (2004) dochází ještě během pohlavní dospělosti k tvorbě nových primordiálních zárodečných buněk ze zárodečných kmenových buněk (GSC - germline stem cells).

3.1.2 Fáze růstu zárodečných buněk a folikulogeneze

Fáze růstu oocyty zahrnuje dlouhé období a trvá až do konce pohlavní činnosti. Od začátku pohlavní dospělosti v průběhu každého ovariálního cyklu vstupuje do fáze růstu vždy několik primárních oocytů. Pro toto období je charakteristický růst jádra, hromadění kortikálních zrn pod buněčnou membránou a především aktivní syntéza RNA a proteinů, (Marvan et al., 1998). Dochází také ke zvětšování endoplazmatického retikula, Golgiho komplexu a přibývání mitochondrií, které se pravidelně rozmisťují v cytoplazmě (Motlík et Kubelka, 1990).

Každý primordiální oocyt je uložen ve folikulu, který se postupně tvoří shlukováním somatických buněk, a který hraje významnou roli ve vývoji vlastního oocyty (Motlík a Fulka, 1986). K dalšímu vývoji oocyty a folikulu tak dochází současně (Wassarman, 1988). V primordiálních folikulech, jak již bylo uváděno v předchozím textu, následně dochází k zahájení meiosis. Například u prasečích embryí začíná meiotické dělení již okolo 40. dne života plodu (Hunter, 2000). Oocyty a folikuly se po zahájení meiosis neoznačují již jako primordiální, ale jako primární (Sládeček, 1986). Tato přeměna tedy nastává ještě během embryonálního vývoje, před narozením samice (Mauleon, 1978).

Primární folikuly jsou z vývojových stádií folikulů nejmenší (velikost primárního folikulu se pohybuje dle Sládečka (1986) kolem 30 - 50 μm), ale zato nejpočetněji zastoupené (Marvan et al., 1992). Vyskytují se buď jednotlivě, nebo tvoří skupiny v nejzvnější vrstvě vaječnickové kůry, těsně pod bělavým obalem (*tunica albuginea*). Jedná se o útvary kulovitěho tvaru, které se skládají z primárního oocyty (označovaného také jako oocyt I. řádu), který je obklopen vrstvou kubických nebo plochých folikulárních buněk. Po narození má každá samice ve vaječniku zásobu velkého počtu primárních folikulů. Marvan et al. (1992) uvádějí souhrnně u savců 50 - 200 tisíc, Monniaux et al. (1997) uvádějí u krávy 100 tisíc, u prasnice 210 tisíc, u myši pouhých 10 tisíc a u ženy až 500 tisíc primárních oocytů.

Z celkové zásoby primárních oocytů se však velké množství dále nevyvíjí a podléhá atrezii (zániku). K tomuto jevu dochází po celý život samice, nejvíce ale v prepubertálním období a v období končící pohlavní aktivity. I přes tuto skutečnost zůstává ve vaječnicích

pohlavně dospělé samice mnohonásobně větší množství folikulů, než je schopno za celý její život dozrát (Hsueh et al., 1994; Marvan et al., 1992).

Jednotlivé primární folikuly se zvětšují a transformují v rostoucí sekundární folikuly, následně poté ve folikuly antrální (měchýřkovité folikuly) (Motlík et al., 1984) a ve folikuly Graafovy, označované také jako folikuly ovulační či terciální. Vznik Graafova folikulu z rostoucího folikulu závisí na působení hormonů a začíná při dosažení puberty, kdy se tonická hladina luteinizačního (LH) a folikulostimulačního hormonu (FSH) začíná zvyšovat a klesat s průběhem každého estrálního cyklu (Reece, 2011).

K růstu primárního folikulu dochází především díky tomu, že dochází ke zvětšování oocytu. Vaječná buňka se zvětšuje na základě ukládání zásobních buněk - žlutkových inkluzí, které ukládá ve své cytoplazmě. Folikulární buňky se zvětšují také díky tomu, že se mitoticky dělí, čímž se znásobí jejich počet. Postupně tak obalují v několika vrstvách celý oocyt (Marvan et al., 1992). Jak uvádí Knoz (1979) v této fázi se velikost oocytů I. řádu zvětšuje až 10 tisíckrát.

Před samotnou ovulací (Šípek, 2010), když je primární oocyt obklopen více než jednou vrstvou folikulárních buněk, dochází ke vzniku tzv. sekundárního oocytu (Eppig, 2001). Je dokončena první meiosa a je vyděleno první pólové tělísko (Šípek, 2010).

Vrstva folikulárních buněk, která má cylindrický tvar a nejtěsněji přiléhá k oocytu je označována jako *corona radiata*. Folikulární buňky vytvářejí okolo oocytu ještě další vrstvu, který se nazývá jako *zona pellucida*. Jedná se o průsvitný, glykoproteinový obal (Marvan et al., 1992), který se skládá především ze tří (myš) nebo čtyř (člověk, skot, prase) základních glykoproteinů ZP1, ZP2, ZP3 (a ZP4), které vytvářejí podstatnou část její hmoty (Gupta et al., 2007). Glykoproteiny ZP2 a ZP3 tvoří heterodimer, který je propojen pomocí glykoproteinu ZP1. ZP3 umožňuje primární navázání spermií, u kterých vyvolá akrozomální reakci (Brewis et Wong, 1999). Tato Interakce mezi spermií a zónou pellucidou je založena právě na rozpoznání určitých sacharidových složek glykoproteinů zóny pellucidy proteiny na povrchu spermie (Yonezawa et al., 2007). Hlavní funkcí ZP2 je vazba se spermií a její udržení na ZP po dobu akrozomální reakce (Hoodbhoy, 2004). Funkce glykoproteinu ZP4 je vyvolání akrozomální reakce (Wassarman, 2008).

Jak uvádí Reece (2011) následuje období, kdy vaječná buňka intenzivně roste. Mezi folikulárními buňkami oocytu se začnou tvořit malé štěrbin, které jsou vyplněny

folikulárním mokem. Tyto štěrby se postupně zvětšují a slévají se, až dají za vznik tzv. antrální dutině (*antrum*). Podle vytvořené antrální dutiny se rovněž označuje folikul v této fázi růstu jako folikul antrální, neboli měchýřkovitý. Antrální folikul je předposledním stadiem folikulogeneze (Šípek, 2010). Má lehce ovoidní tvar, přičemž jeden jeho pól se zanořuje hluboko do kůry vaječníku a druhý je blíže k vaječnickovému povrchu. Dalším zvětšováním folikulu, zapříčiněným stále probíhajícím množением folikulárních buněk a zvětšující se antrální dutiny, dojde k vyklenování folikulu nad povrch vaječníku. Tento folikul je posledním vývojovým stádiem a jak bylo v předchozím textu již uváděno, nazývá se jako folikul terciální, ovulační či Graafův. Měří okolo 15 – 20 mm (Sova et al., 1981), ale jeho velikost se u jednotlivých druhů značně odlišuje. Například prasečí oocyty rostou v průměru z 30 μm do 120 μm a jejich růst je téměř kompletní ve folikulu velkém 1,8 mm (Motlík a Fulka, 1986).

Obal Graafova folikulu tvoří dvě vrstvy – vnitřní vrstva (*theca folliculy interna*) je bohatá na buňky a vnější vrstva (*theca folliculy externa*) je vazivová a hojně se zde vyskytují cévy (Reece, 2011). Uvnitř obalu se nachází granulózní vrstva (*stratum granulosum*), kterou tvoří 4-5 vrstev granulózních buněk vystýlajících prostornou folikulární dutinu. Shluk těchto granulózních buněk (Sova et al., 1981) na straně odvrácené od povrchu vaječníku zesiluje v tzv. vejconosný hrbolek (Marvan et al., 1992) vyklenující se dovnitř folikulární dutiny, který ve svém středu nese samotný oocyt (Marvan et al., 1992). Granulózní buňky mají kromě obalové funkce významnou inkreční aktivitu, protože vylučují estrogény. Estrogény jsou ovšem vylučovány i thékálními buňkami (Reece, 2011).

Jakmile oocyt dosáhne své plné velikosti a meiotické kompetence (což popisuje následující podkapitola), čeká na signál ve formě náhlého zvýšení luteinizačního hormonu (LH-peak) (Šolc, 2003). Dochází k prasknutí stěny Graafova folikulu a k uvolnění oocytu (ovulaci), který je zachycen vejcovodem, pomocí něhož dále putuje směrem k děloze (Reece, 2011). V ovulovaném oocytu dochází ke znovuzahájení meiosis (Šolc, 2003).

Meiotická kompetence

Meiotická kompetence je schopnost oocytu procesem GVBD znovuzahájit a dokončit meiosu (Sorensen et Wassarman, 1976). Pouze meioticky kompetentní oocyty jsou schopné

překonat G2 kontrolní bod (Fulka et al., 1994) a projít blokem prvního meiotického dělení (Hunter, 2000).

Při přeměně preantrálních folikulů ve folikuly antrální dochází v oocytu k důležitým vývojovým změnám. Před vznikem antra se oocyty nedokáží vyvíjet za diplotenní fázi prvního meiotického dělení (Eppig, 2001). Nejsou na začátku svého růstu schopny zahájit zrání a jsou takzvaně zcela meioticky nekompetentní (Motlík et al., 1984). Což je, jak uvádí Eppig (2001) díky nedostatku regulačních molekul, které jsou pro další postup meiosy nezbytné.

Později, v dalších fázích růstu jsou sice oocyty schopny zrání zahájit, ale nejsou schopny jej zcela dokončit, jsou tzv. částečně meioticky kompetentní. Až oocyty s ukončeným růstem mají plně vyvinutou kompetenci (Motlík et al., 1984).

Tento proces je možné rozdělit do dvou částí. V první fázi se oocyt stane schopným znovuzahájit meiotické dělení, dochází k rozpadu zárodečného váčku a dosažení metafáze prvního meiotického dělení (metafáze I). V druhé fázi získává oocyt schopnost vydělit první pólové tělísko a podstoupit vývoj až do stádia metafáze druhého meiotického dělení (metafáze II) (Wassarman et Albertini, 1994).

Jak vyplývá z předešlého textu, schopnost podstoupit kompletní meiotické zrání se vyvíjí postupně během růstu oocytu (Motlík et Fulka, 1976). Odvíjí se mimo jiné od skutečnosti, že během fáze růstu dochází v oocytu k intenzivní transkripci, translaci a syntéze nových organel, které tvoří zásobu pro následující meiotické zrání a preimplantační vývoj embrya (Petr et al., 1994). Nástup meiotické kompetence koreluje také s formováním kompaktního jadérka (Motlík et Kubelka, 1990).

Na biochemické úrovni je dosažení meiotické kompetence charakterizováno hromaděním neaktivního komplexu pre-MPF ($p34^{cdc2}$ /cyklinB), který se dále v antrálním folikulu přestává hromadit a tento komplex je aktivován (pre-MPF se mění na MPF) (Kanayama et al., 2002). Jak uvádí Masui et Markert (1971) je hladina MPF v oocytu pro získání meiotické kompetence zásadní a jeho neschopnost znovuzahájit meiotické dělení může být způsobena nedostatečným množstvím odpovídající mRNA, kterou je kódován. Více o meiotických regulátorech bude popsáno v podkapitole 3.4. Regulace meiotického zrání. Kromě těchto meiotických regulátorů se na získání meiotické kompetence podílejí i

hypofyzární hormony. Zejména FSH, jehož účinek je zprostředkován estrogeny produkovanými folikulem (Wassarman et Albertini, 1994).

Na meiotickou kompetenci dále navazuje tzv. vývojová kompetence, která je spojena s vývojem zygoty do stádia blastocysty. Vývojovou kompetenci nabývá oocyt již během svého zrání (Hyttet et al., 1997).

3.1.3 Fáze zrání oocyty

Do fáze zrání vstupují plně dorostlé oocyty, které jsou ve stádiu pozdního diplotene meiosy I. Během fáze zrání postupně dojde k přeměně meioticky kompetentního oocyty na oocyt, který je schopen oplození (Wassarman, 1988). Hlavním požadavkem aby fáze zrání vůbec započala, je zvýšení hladiny hypofyzárních hormonů – konkrétně folikulostimulačního hormonu (FSH) a luteinizačního hormonu (LH) (Sutton et al., 2003).

Během této fáze se mění nejen morfologie oocyty, ale dochází také k řadě biochemických změn. Pro meiotické zrání je charakteristická zejména redukce diploidního počtu chromosomů ($2n$) na haploidní (n). Tento jev je velmi významnou složkou zrání oocyty, neboť je pro zdárný vývoj oplozené vaječné buňky nezbytný. Po splnutí samčího a samičího prvojádra musí mít časné embryo právě dvě sady chromosomů, jinak dochází k jeho zániku (Alberts et al., 1998).

Meiotické zrání můžeme charakterizovat jako rozpad zárodečného váčku (GVBD), kondenzaci chromatinu, formaci dělicího vřeténka, vydělení prvního polového tělíska (PB1), přechod mezi meiosou I a meiosou II (přičemž je potlačení S-fáze buněčného cyklu) a následné zastavení meiosy v druhém meiotickém bloku (Schmitt et Nebreda, 2002).

Oocyty, které se nahcázejí ve fázi prvního meiotického bloku obsahují dekonzenované chromozomy, které jsou obklopené jadernou strukturou - zárodečným váčkem (GV – *germinal vesicle*). Jak již bylo řečeno, znovuzahájení meiosy můžeme charakterizovat tím, že se chromozomy kondenzují a dochází k rozpadu tohoto zárodečného váčku (GVBD – *germinal vesicle break down*) (Thibault et al., 1987). Motlík et al. (1984) uvádí, že k GVBD u prasete dochází po 16 - 18 hodinách kultivace *in vitro*, což se ale může lišit v závislosti na kultivačních podmínkách (což potvrzují i výsledky kultivace prasečích oocytů v naší laboratoři, kdy k GVBD docházelo až kolem 20 – 24 hodin kultivace).

První meiotické dělení pokračuje stádiem metafáze I (MI), ve kterém dochází ke kongresi chromosomů a jejich seřazení v ekvatoriální rovině dělicího vřeténka. Postupně dochází k formování prvního pólového tělíska (Dekel et al., 1995). Dochází rovněž k segregaci chromosomů v anafázi I. (Homa et al., 1993). Po ovulaci vstupuje oocyt do profáze druhého meiotického dělení a zastavuje se v metafázi II (oocyty jsou zastaveny v tzv. MII bloku) (Kalous, 2011). MII blok vzniká díky aktivaci komplexu cyklinu B/Cdk1 (Cdc2) a jeho následnou stabilizací pomocí CSF (cytostatický faktor) (Kishimoto 2003). Meiotické dělení oocyty je následně dokončeno při jeho oplození (Sun et Nagai, 2003), kdy dochází k aktivačním stimulům na základě zvýšení intracelulárních hladin volných Ca^{2+} iontů (Swann et Ozil, 1994). Teprve po oplození oocyty dochází k dokončení meiosis II a je vyděleno druhé pólové tělíska (PB2) (Štípek, 2010).

Ke zrání oocyty v podmínkách *in vitro* dochází většinou díky vyjmutí oocyty z folikulu a následné kultivaci ve vhodném médiu bez inhibitoru (jak bude dále popsáno v metodice této práce).

3.1.4 Regulace genové exprese v průběhu zrání oocyty

Množství jednotlivých látek v buňce je řízeno jak intenzitou jejich syntézy, tak i intenzitou jejich odbourávání nebo výdeje. V průběhu života jedné buňky je v určitém okamžiku vyjádřena vždy jen část informace uložené v DNA, protože se syntetizují pouze ty produkty genů, které jsou v daném okamžiku pro buňku nebo pro organismus potřebné (Štípek, 1997).

Jako genovou expresi označujeme děj, ve kterém uplatňuje gen svůj účinek na buňku (nebo na celý organismus), většinou díky řízení syntézy RNA (molekula RNA může být překládána do proteinu, který má svou charakteristickou aktivitu) (Alberts et al., 1998).

Jak uvádí Simmons et Snustad (2009), je genetická informace uložená v DNA přeměněna v konkrétní buněčné struktury či metabolické procesy. Informace je uchovávána v nukleotidové sekvenci genů a překládá se do aminokyselinových sekvencí proteinů prostřednictvím nestabilních intermediátů zvaných mediátorové RNA (mRNA).

Jedná se o složitý proces, který sestává z transkripce DNA do RNA, následných posttranskripčních úprav tohoto primárního transkriptu, transportu transkriptů strukturních

dějí z jádra do cytoplazmy, dále translacmRNA do proteinů, následné posttranslační úpravy proteinů a jejich lokalizaci v buňce (Štípek, 1997).

Během zrání oocyty dochází k potlačení transkripce. Právě díky tomuto faktu je genová exprese regulována na úrovni translace. Aktivace translace nashromážděných mRNA během oogeneze je kontrolována změnami fosforylace různých iniciačních faktorů, jejich regulátorů a ribozomálních proteinů. Limitujícím faktorem translace je pravděpodobně iniciace translace (Ellederová, 2004).

Nejintenzivnější exprese genů v oocyty probíhá před tím, než je znovuzahájena meiosa. Poté již neprobíhá téměř žádná (Moo et Dai, 2001).

3.1.5 Polyadenylace mRNA

Většina mRNA se v oocytech tedy syntetizuje před prvním meiotickým dělením a je aktivní pouze v prvních stádiích embryonálního vývoje po fertilizaci. Před samotnou syntézou mRNA prodělávají chromosomy oocytů nejprve částečnou kontrakci, při které se většina DNA zkroutí do kompaktní masy (chromomery) a menší část vytvoří podél hlavní chromosomální osy dlouhé smyčky – štětkovité chromosomy. Většinou se jedna molekula DNA táhne od jednoho konce chromosomu ke druhému. Část DNA, která se nachází uvnitř chromomerní masy, není aktivní (neprobíhá v ní transkripce), naopak v postranních smyčkách dochází k velmi intenzivní transkripci. Ta obvykle začíná na jednom místě blízko hlavní chromosomové osy, takže se potom během pohybu molekul RNA-polymerázy podél příslušné smyčky vytvářejí dlouhé řetězce RNA. Každá tato smyčka pravděpodobně představuje jeden gen, který kóduje jeden polypeptidový řetězec (Rosypal et al., 1983).

Nasyntetizovaná mRNA je chráněna před degradací a velké množství RNA je během zrání uskladněno jako deadenylované transkripty spojené s proteiny (Moor et Dai, 2001). Do aktivace takto inaktivní RNA jsou zapojeny různé mechanismy jako fosforylace translačních faktorů, ribozómové podjednotky, defosforylace polymerázy a především polyadenylace mRNA, o které bude hovořeno dále (Colgan et al., 1996).

Poté, co je DNA přeepsaná 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 pre-mRNA (jejíž funkce

spočívá v ochraně mRNA před degradací 5` endonukleasami, regulaci jaderného transportu mRNA do cytoplazmy a excizi 5` proximálního intronu a rovněž také v iniciaci translace, Ohno et al., 1987). Dalšími ději posttranskripčních úprav jsou **sestřih (splicing)**, při kterém dochází k odstranění intronů (nekódujících sekvencí v RNA-transkriptu, Korf, 2006) a editace, což je změna informačního obsahu v molekulách mRNA (zřejmě sloužící jako primitivní mechanismus pro zajištění změn profilů genové exprese, Simmons et Snustad, 2009). Velmi důležitou posttranskripční úpravou je také námi zkoumaná **polyadenylace** 3` konce pre-mRNA.

Jak uvádí Zhao et al. (1999) dochází k polyadenylaci těsně po ukončení transkripce. Na 3` konec je navázána dlouhá sekvence adeninů (AAAAA...), která se označuje jako poly(A) konec. Přibližně 10 - 30 nukleotidů před místem ukončení transkripce je pomocí sekvence šesti nukleotidů AAUAAA vytvořen tzv. polyadenylační signál, pro to, aby mohl být poly(A) konec k transkriptům připojen je však nutná specifická složka, rozeznávající a vázající tuto sekvenci a také stimulační faktor, vázající se k sekvenci bohaté na guanin a uracil. Pro návazání úseku poly(A) je však důležitá také přítomnost endonukleázy a poly(A) polymerázy (Simmons et Snustad, 2009). Jedná se o kanonickou poly(A)-polymerázu Pap1p. Polyadenylace probíhá procesivním způsobem, tedy celý šedesáti- až devadesátinukleotidový poly(A) řetězec se připojuje najednou (Brown a Sachs, 1998). V důsledku toho je přístup 3` → 5` exonukleáz k 3` konci takovéto pre-mRNA blokován po celou dobu syntézy poly(A) konce (Vaňáčková et al., 2005).

Hlavním úkolem poly(A) konce je, že funguje jako přenašeč, na který se váží vazebné proteiny zprostředkovávající transport mRNA z jádra do cytoplazmy, a které rovněž inhibují degradaci mRNA. Poly(A) konec získávají po své syntéze v jádře všechny mRNA, ale u některých mRNA dochází po vstupu do cytoplazmy k jeho zkrácení. Tyto mRNA jsou následně degradovány, nebo skladovány pro pozdější využití.

Jak uvádějí Coller et al. (1998) nejen, že působí poly(A) konec jako zesilovač translace, ale nebyla by bez nich ani možná (Vassalli et al., 1989).

Konkrétně u oocytů je specifická cytoplazmatická polyadenylace - translace mRNA do proteinů. Po transportu mRNA dochází k deadenylaci a následně v závislosti na potřebě konkrétního proteinu k polyadenylaci. Tuto polyadenylaci můžeme rozdělit dle času kdy probíhá do tří po sobě následujících fází – na polyadenylaci časnou (která je u mRNA pro

Emi1), pozdní a pozdně pozdní (u mRNA pro Emi2). Jak uvádí Pique et al. (2008) je cytoplasmatická polyadenylace řízená prvky CPEs (cytoplasmatické polyadenylační elementy) a AREs (AU rich elements) v 3' UTR (nepřekládané oblasti) a právě vzdálenost sekvence CPE od polyadenylačního signálu AAUAAA, nebo případně sekvence přilehlé k CPE, mohou mít vliv na dobu, ve které bude mRNA polyadenylována (Méndez et Richter, 2001). Oblast 3' UTR se u Emi1 a Emi2 liší (Belloc et Méndez, 2008).

3.2 Regulace meiotického zrání

Pro správný vývoj oocyty (jako je tomu i u buněčného cyklu somatických buněk) je nezbytná řada faktorů podílejících se na regulaci meiosis. Tyto faktory můžeme tedy nazývat jako regulátory meiotického zrání. Dělení buňky buď urychlují, zpomalují, či dokonce zcela zastavují.

Meiosa savců je řízena pomocí celého komplexu faktorů, z nichž některé jsou prozatím zahaleny tajemstvím a jsou předmětem intenzivního zkoumání v laboratořích celého světa. Obecně se jedná o cykliny, cyklin dependentní kinázy (**CDK**), fosfatázy a signální molekuly, které jsou zpravidla propojeny ve složité signální kaskády.

Největší část těchto regulačních faktorů je produkována samotným oocytem, ale nemalou měrou se na jejich produkci podílejí rovněž somatickými buňkami, které mění v oocyty signální transdukční cesty a ovlivňují například expresi **MPF** (M-phase promoting factor) a **CSF** (cytostatic factor), které tvoří fosforylačně-defosforylační regulační kaskádu, která zajišťuje schopnost oocytů dokončit meiosu (Stojkovic et al., 1999).

Díky těmto složitým regulačním mechanismům je zajištěna synchronizace meiotického zrání s ostatními zásadními ději v savčí reprodukci (Albertini, 1992).

3.2.1 Cyklin dependentní kinázy (CDK)

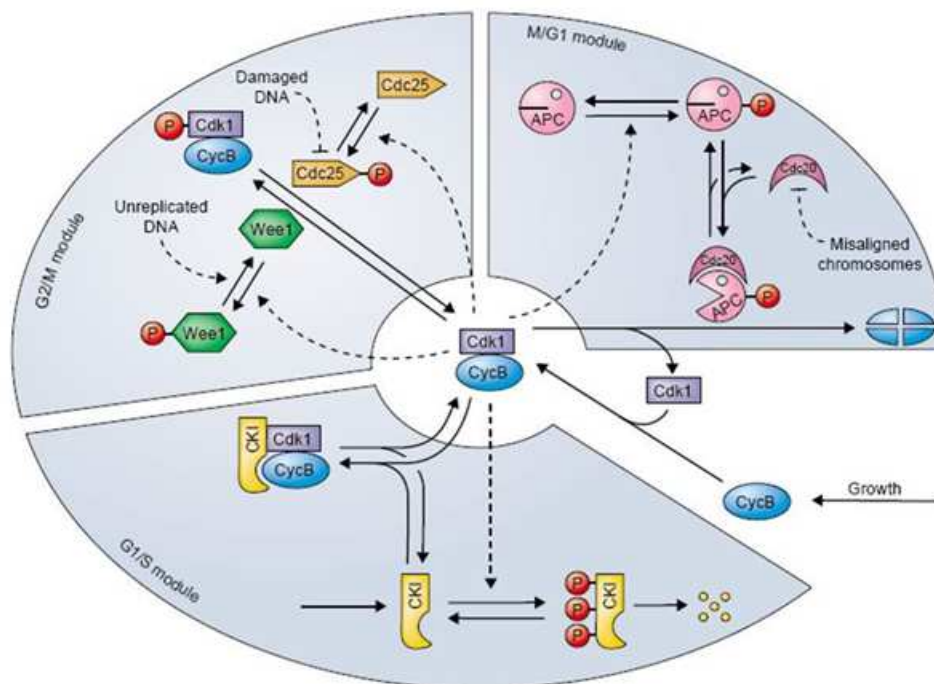
Cyklín dependentní kinázy (CDK) mají v regulacích buněčného cyklu (mitotického i meiotického) zásadní vliv, protože zprostředkovávají reverzibilní fosforylace, které jsou hlavními post-translačními modifikacemi, které kontroluje a řídí veškeré buněčné procesy. Regulaci buněčného cyklu pomocí Cdk/cyklín komplexů zje znázorněna na Obr. 1. Fosforylace hydroxyly serinových, threoninových a tyrozinových reziduí proteinu je katalyzována proteinkinázami (Manning et al., 2002). Meiotické dělení regulují tím, že dokáží fosforylovat

určité proteiny resp. skupiny proteinů. Tyto proteiny pak pozitivně regulují transkripci genů. CDK fosforylované proteiny řídí expresi genů zodpovědných za průběh buněčného cyklu. Pokud dojde k expresi určitého genu (resp. skupiny genů), přejde buňka do určité fáze buněčného cyklu (Meijer et al., 2006). Inhibice či aktivace CDK může vést k regulaci proliferace, nebo také k indukci diferenciace. CDK tak zastávají významnou roli v udržování rovnovážného stavu mezi buněčnou proliferací a diferenciací, i když funkce některých CDK se liší v závislosti na buněčném typu (Malgrange et al., 2003).

Svou chemickou podstatou jsou to serin/threonin proteinkinázy, které jsou mezi sebou vysoce konzervované a vykazují silnou sekvenční homologii. Spolu s cykliny tvoří heterodimerické komplexy (Pavletich, 1999). Kinázová podjednotka komplexu zastává funkci katalytickou, kdežto cyklin má funkci regulační. Díky jeho navázání na CDK se změní konformace kinázy na aktivní formu (Knockaert et al., 2002). Jednotlivé cykliny mají různé funkce, například cyklin E indukuje replikaci DNA a duplikaci centrosomu, cyklin B navozuje mitosu a cyklin A podporuje všechny tyto uvedené procesy (Murray, 2004).

Aktivita samotných CDK je regulována v několika krocích. Pro aktivaci CDK je nutná fosforylace CDK aktivační kinázou (**CAK**) neboli **CDK7/CYCH/MAT1** (Patel et Simon, 2010) na threoninu uvnitř T-smyčky. Roli hraje také negativní fosforylace **Wee1** kinázou, přičemž tento inhibiční fosfát je později odstraněn fosfatázou **cdc25** (Meijer et al., 2006). Na regulaci aktivity CDK se kromě výše uvedených způsobů regulace také významně podílí jejich přirozené proteinové inhibitory (**CKI**) (Lodish et al., 2003).

Pro přehlednost textu jsou vybrané cyklin dependentní kinázy uváděny v samostatných podkapitolách v návaznosti na komplexy, pro které jsou specifické.



Obr. 1. **Regulace buněčného cyklu pomocí Cdk/cyklin komplexů (Novák, 2010).**

Aktivní Cdk1/cycB dimer může být inaktivován vazbou na inhibitor CKI nebo fosforyací kinázové podjednotky pomocí Wee1. Inhibiční fosfátová skupina se poté odstraní pomocí fosfatázy Cdc25. Komplex Cdk1/cycB může být rovněž inaktivován proteolýzou jeho cyklické složky, která je zprostředkována pomocí APC v koiniaci s Cdc20.

3.2.2 M-phase promoting factor (MPF)

M-phase (MPF) je univerzální buněčný regulátor mitosy i meiosy (Stojkovic et al., 1999), a proto ho můžeme označit jako univerzální regulátor buněčného cyklu (Nurse, 1990). U somatických buněk se uplatňuje v přechodu z G2 do M fáze buněčného cyklu, ale především je odpovědný (ať už přímo, či zprostředkovaně) za události provázející M-fázi, jako je kondensace chromatinu, rozpad jaderné membrány (Mayes, 2002) a spolu s MAPK je nezbytně nutný pro rozpad zárodečného vajíčku (Kubelka et al., 2002). MPF také fosforyluje proteiny asociované s mikrotubuly, díky čemuž může být následně vytvořeno dělicí vřeténko (Alberts et al., 1998).

Jako první MPF popsali ve své práci Masui a Market (1971), a to na modelu žabích oocytů (*Rana pipiens*). Až o šest let později (1997) byl tento faktor poprvé potvrzen

v savčích oocytech, a to na modelu myši (*mus musculus*) a o dalších šest let později byl prokázán také v oocytu prasete (*sus scrofa*) (Fulka, 1983).

Jedná se o heterodimer, který se skládá ze dvou podjednotek, z regulační podjednotky **cyklinu B1**, který asociuje s katalytickou podjednotkou serin/threonin protein kinázy **p34^{cdc2}** – nazývanou jako cyklin dependentní kináza 1 (**Cdk1, Cdc2**) (Gautier et al., 1989). MPF se proto také často označuje jako komplex **cyklin B1/Cdk1**. Zdárný průběh meiotického zrání vyžaduje aktivaci celé řady signálů směřujících k aktivaci MPF (Levesque et Sirard, 1996). Aby byl MPF aktivován, musí dojít především ke spojení dvou výše popisovaných podjednotek, ale pouze samotná vazba cyklinu B1 na Cdk1 k plné aktivitě MPF nestačí (Palmer et al., 1998). Další krok k získání aktivity tohoto komplexu je defosforylace p34^{cdc2}. V nezralých oocytech se komplex MPF hromadí v neaktivní formě **pre-MPF**. Pre-MPF je udržována v neaktivním stavu právě z důvodu inhibiční fosforylace podjednotky p34^{cdc2} na Thr14 (treoninu-14) a Tyr15 (tyrosinu-15). Tuto fosforylaci zajišťují inhibitorové kinázy **Myt1** a **Wee1** (Gautier et al., 1989)

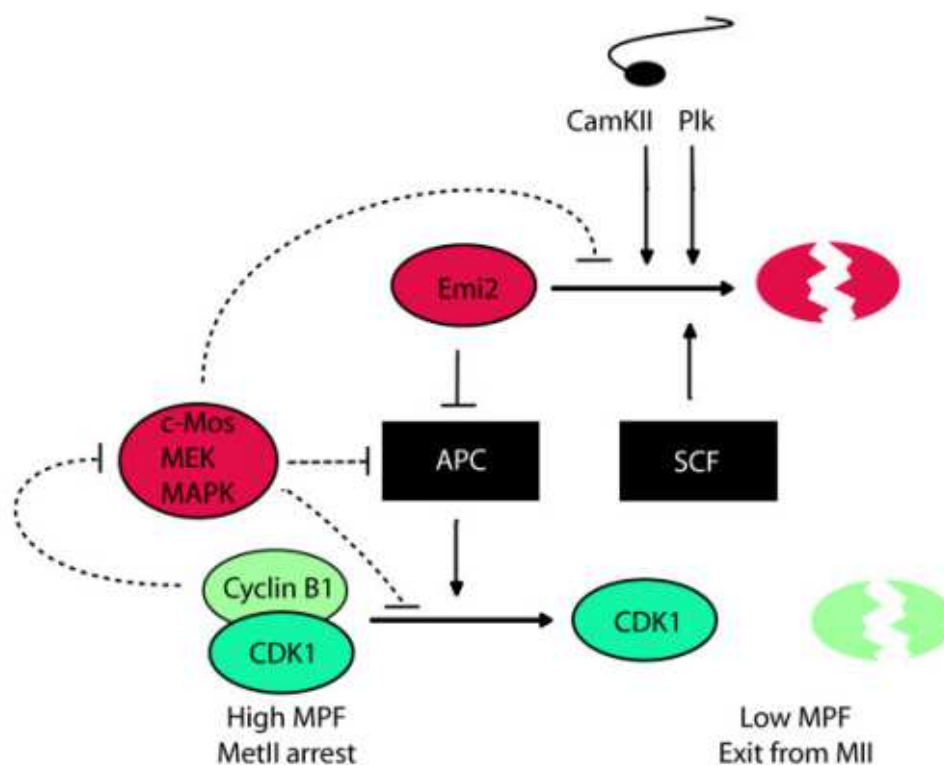
Po rozpadu jaderné membrány (GVBD) nastává aktivace MPF díky působení fosfatázy **Cdc25**, která komplex defosforyluje. Množství MPF následně stoupá až do metafáze I (Schmitt et Nebředa, 2002). Cdc25 je aktivována pomocí polo-like kinasy (**Plk1**) (Abrieu et al., 2001).

Aktivaci a stabilizaci MPF aktivity napomáhají dvě stěžejní kaskády, a to Mos/MEK/MAPK/p90^{Rsk} a Plk1/Plk1/cdc25, o kterých bude ještě hovořeno. Usuzuje se, že MAPK kaskáda by mohla být propojena prostřednictvím p90^{Rsk}, která je spojena s karboxylovým koncem Myt1. S fosforylací p90^{Rsk} následně klesá schopnost Myt1 regulovat cyklin B1/Cdk1. Toto bylo však dokázáno pouze v *in vitro* podmínkách. Během inhibice endogenní Myt1 může být spuštěna meiosa i bez progesteronové stimulace (Nebředa et Ferby, 2000).

Jedním z mechanismů regulace MPF je i syntéza a degradace cyklin B1. Ten se začíná v oocytu syntetizovat již během časné profáze (GV) a jeho koncentrace se následně stále zvyšuje až do stádia metafáze, kde se chvíli drží na stejné hladině. Následně začne docházet k jeho postupné degradaci a až do stádia anafáze klesá (Stojkovic et al., 1999). Aby mohlo být dokončeno první meiotické dělení, musí být tedy cyklin B1 degradován (Jones, 2004).

Aktivita Cdk1 se kontinuálně zvyšuje a největší koncentrace dosahuje v metafázi I, poté klesá. Při druhém meiotickém dělení je vrchol vzestupu MPF v metafázi II, kde se meiosa podruhé zastavuje. Ve fázi MII je vysoká hladina MPF udržována pomocí CSF (cytostatický faktor) (Wu et al., 1997), a to až do doby, kdy dojde k oplodnění. Aktivace oocyty indukuje inhibici CSF a v odezvě na to dochází i k poklesu Cdk1 aktivity, což je stěžejní pro to, aby mohl oocyt opustit blok metafáze II (Kishimoto, 2003). Viz Obr. 2.

Opětovná aktivace MPF zajišťuje bezprostřední návaznost obou meiotických dělení a její zablokování způsobuje dekonkondensaci chromosomů, vytvoření jádra a vstup oocytů do interfáze (Josefsberg et al., 2003).



Obr. 2. Model regulace druhého metafázního bloku v savčích oocytech (Madgwick et Jones, 2007)

V myších oocytech není c-mos dráha zprostředkována pomocí p90rsk, takže její další působení není přesně známé (přerušované čáry), ale v konečném důsledku buď inhibuje přímo APC/C nebo inhibuje degradaci Emi2.

3.2.3 Cytostatic faktor (CSF)

CSF obsažen v cytoplazmě ovulovaných vajíček (Haccard, 1993) byl poprvé popsán v sedmdesátých letech u žabích oocytů (*Xenopus leavis*) (Masui et Markert, 1971), jako faktor schopný zabránit přechodu z metafáze II do anafáze II. Jak již bylo popsáno v předchozím textu, aktivita CSF brání ubiquitin-dependentnímu odbourávání cyklinů specifických pro M-fázi (Fan et Sun, 2004). CSF je tedy důležitý pro stabilizaci a udržení aktivity MPF během metafáze II, což je nezbytné pro zastavení meiosis a vytvoření meiotického bloku (Murray et al., 1989). Pro udržení aktivity MPF je nutné zabránit této degradaci cyklinu B1, což je zajišťováno fosforylační inhibicí APC/C komplexu, jenž je za rozpad cyklinu B1 odpovědný (Anger, 2001).

Stejně jako je tomu u MPF, není CSF tvořen pouze jednou specifickou molekulou, ale sestává z celé řady komponent (jak ukazuje Obr. 3.), z nichž nebyly prozatím všechny identifikovány (Fan et Sun, 2004). Hlavní složku cytostatického faktoru tvoří protein **Mos**, který je produkován genem *c-mos* a **MAPK** (Mitogen Activated Protein Kinase). V oocytech se uplatňuje MAP-signalizace, která jde po již zmiňované dráze Mos/MEK/MAPK/p90rsk a je pro udržení aktivity CSF nezbytnou. Mos se začíná v nezralých oocytech syntetizovat v odezvě na zvyšující se hladiny progesteronu a fosforylačně aktivuje **MEK1** kinázu, a tím zvyšuje aktivitu MAPK. MAPK dále aktivuje serin/threonin proteinovou kinázu **p90rsk** (Sagata, 1997). Pomocí tohoto důmyslného mechanismu je zabráněno již zmiňované fosforylaci Cdk1 na Thr14 a Tyr15, a tím zůstává komplex MPF aktivní (Abrieu et al., 2001).

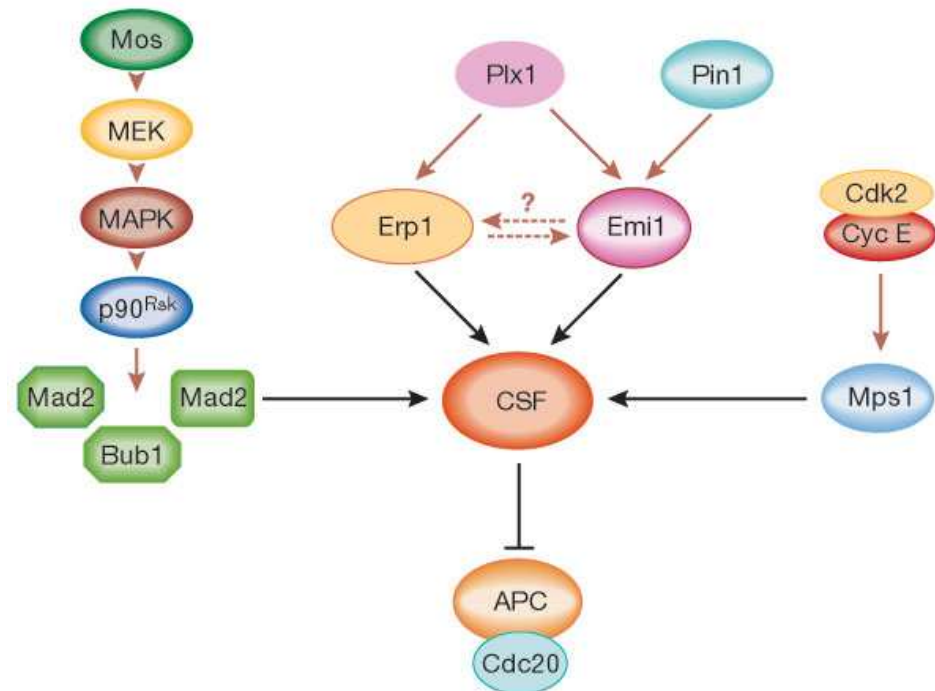
Pro udržení CSF je však ještě potřebný protein **Bub1**, mající důležitou roli v komplexu proteinů kontrolního bodu dělicího vřeténka (Taieb et al., 1997; Tunquist, 2003).

Dalšími známými komponentami CSF jsou proteiny Emi/Erp rodiny, která sestává ze dvou dosud objevených členů, a to jsou právě námi zkoumané proteiny **Emi1** a **Emi2** (Wu et Kornbluth, 2008). O těchto proteinech bude podrobně hovořeno dále.

Mezi další molekuly CSF patří také například SAC (Spindle Assembly Checkpoint) proteiny které jsou důležité pro zastavení buněk v metafázi pomocí inhibice APC/C (Sagata, 1997).

CSF je inaktivován po oplození nebo partenogenetické aktivaci oocytu (Schmidt, 2006). Mechanismem inaktivace CSF je degradace Mos po inkorporaci spermie do oocytu,

čímž může být dokončeno druhé meiotické dělení a vydělnu PB2 (Masopust et Průša, 2003).



Obr. 3. **Hlavní složky a faktory podílející se na tvorbě a udržení CSF (Castro et Lorca, 2005).**

Aktivita cytostatického faktoru může vycházet z kombinovaného působení čtyř hlavních drah. První je Mos/MEK/MAPK/p90^{Rsk} dependentní dráha regulující Mad1/Mad2/Bub1, proteiny účastníci se kontrolního bodu dělicího vřeténka (tzv. „spindle checkpoint proteins“). Druhou dráhou je cyclin E/Cdk2 dependentní dráha regulující Mps1, který působí rovněž jako spindle checkpoint protein. Třetí dráha závisí na proteinu Emi1, který je fosforylován pomocí Plx1 během izomerie Pin1 (protein, lokalizovaný v bazálních částech buňky, který transportuje auxin z buňky do buňky). Čtvrtá dráha závisí na proteinu Emi2 (Erp1), jehož aktivita je stejně jako u příbuzného proteinu Emi1 řízena fosforylací Plx1. Domnělé synergické činnosti nebo interakce proteinů Emi1 a Emi2 nelze vyloučit.

3.2.4 Mitogen activated protein kinase (MAPK)

Mitogeny-aktivované protein kinázy hrají klíčovou roli v regulaci meiosis pomocí fosforylace proteinů na serinových nebo threoninových zbytcích (Inoue et al., 1995). Spolu

s proteinkinázou Mos má MAPK důležitou roli v degradaci PB1 a v samotné aktivaci oocyty (Stojkovic et al., 1999). Vysoká hladina aktivity MAPK (a také MPF) je pak obecně řazena mezi klíčové složky CSF (Sun et Nagai, 2003).

MAPK přenáší signál z různých povrchových transmembránových receptorů a dalších extracelulárních stimulantů do jednotlivých vnitrobuněčných kompartment. Tyto signály jsou přenášeny kaskádovitě fosforylacemi enzymů, jež vyvolávají jejich nadřazené aktivátory (Inoue et al., 1995).

Ohledně aktivace MAPK, převládá názor, že je aktivována již v průběhu GV (Motlík et al., 1998; Ohashi et al., 2003), Inoue et al. (1995) však zastávají názor, že k její aktivaci dochází až po GVBD. Soudí se, že je MAPK přímo či nepřímo aktivovaná pomocí Mos a Plk1, které jsou ovšem nezralém oocyty neaktivní (Sun et Nagai, 2003). Díky aktivované MAPK se zastavuje vývoj oocyty v metafázi II (Masopust et Průša, 2003).

Jednou z funkcí MAPK je přenášení signálu pro zahájení meiosis z cytoplazmy do jádra. Také fosforyluje inhibiční kinázy, které fosforylují části MPF (Inoue et al., 1995) a proteiny, díky kterým je udržován chromatin kondenzovaný. To je důležité hlavně při přechodu z metafáze I do metafáze II. V této době, na rozdíl od MPF, aktivita MAPK neklesá a je tak zabráněno přechodu oocyty do interfáze. Její aktivita klesá až po aktivaci oocyty (Dekel et al., 1995).

V savčích oocytech byly detekovány dvě formy těchto extracelulárně regulovaných kináz (někdy také nazývány jako extracelulárním signálem regulované kinázy - ERK) lišících se svými molekulovými hmotnostmi a to **ERK1** (p44) a **ERK2** (p42) (de Vantery et al., 1996).

3.2.5 Polo-like kinase 1 (Plk1)

Plk1 (Plx1 u řab rodu *Xenopus*) je členem serine/threonine kinazové rodiny a je aktivována společně s MPF (Abrieu et al., 2001). Anger et al. (2001) však uvádějí, že Plk1 pravděpodobně předchází vzestupu MPF. Nelze ale vyloučit možnost, že aktivace Plk1 je následkem malého, ale nedetekovatelného zvýšení MPF aktivity.

U oocytů v profázi I (GV) je Plk1 difuzně rozprostřena v cytoplasmě i v jádře, po fázi GVBD se následně soustředí do okolí kondenzovaných chromosomů a v metafázi se kondenzuje na pólech dělicího vřeténka. 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).

Hlavní rolí plk1 je fosforylace a zvyšování fosfátové aktivity kinázy Cdc25 a kontroluje tak počátek meiotického zrání (Abrieu et al., 2001). Dále se Plk1 podílí na tvorbě bipolárního dělicího vřeténka, rozchodu chromozomů během meiozy a na aktivaci APC/C (Anger et al., 2004).

3.2.6 Budding uninhibited by benzimidazoles 1 (Bub1)

Bylo experimentálně potvrzeno, že je to především serin/treonin protein kináza Bub1, která hraje klíčovou roli v komplexu proteinů kontrolního bodu dělicího vřeténka (SAC), kde řídí správnou formaci mikrotubulů během meiotického zrání oocyty. Bub1 je fosforylován proteiny p90rsk, a tím dochází k jeho aktivaci (Kishimoto, 2003). Tunquist (2003) ve své práci uvádí, že aktivita Bub1 koreluje s aktivitou MPF.

Další důležitou funkcí tohoto proteinu je jeho inhibiční vliv na APC/C, čímž zabraňuje přechodu z metafáze do anafáze (Kishimoto, 2003).

3.2.7 Vápníkové kationty (Ca^{2+})

Kationty vápníku působí v organismu jako nepostradatelní přenašeči intracelulárních signálů, díky čemuž je můžeme zařadit pod intracelulární signální molekuly (Clapham, 1995). Jak uvádí Yanagimachi (2006) jejich význam byl potvrzen i při regulaci řady procesů, které probíhají během oogeneze.

Vápníkové kationty mají vliv jak v samotném zrání oocyty (především ve fázi MI a při výstupu z prvního meiotického bloku), tak i v jeho aktivaci či oplození. Jejich důležitou funkcí je rovněž i aktivace kinázy CaMKII, o které bude hovořeno v další podkapitole.

Na počátku fáze zrání, ihned po GVBD můžeme v cytoplazmě oocyty pozorovat výrazné změny koncentrace vápníkových kationtů. Extracelulární kalcium je po GVBD nutné pro vydělení prvního pólového tělíska. Jeho koncentrace se střídavě zvyšuje (uvolňováním vápníku z intracelulárních zásob) a snižuje, což bývá nazýváno jako oscilační aktivita Ca^{2+} (Carroll et al., 1994). Jak však uvádí Petr et al. (2000), aby mohl oocyt postoupit z fáze MI do MII, musí mít možnost doplnit si zásoby Ca^{2+} i z extracelulárních zdrojů.

Vápník je uskladňován v intracytoplazmatických zásobárnách jako jsou endoplazmatické retikulum, mitochondrie, karyoplazma, vakuoly, najdeme ho však i na povrchu lipidových granul, v cytoplazmě a v jádře kumulárních buněk (Petr et al., 2000; Clapham, 1995).

Pro spuštění signálu interaguje vápník vstupující do cytosolu se specifickými vápenatými receptory, jako jsou například kalmodulin (CaM) a protein kináza C (PKC) (Macháty et al., 2002). Tyto vápníkové signály jsou důležitým stimulem, vedoucím ke znovuzahájení meiozy a následnou aktivaci oocyty. Tímto aktivačním signálem je sama oscilace Ca^{2+} , jehož frekvence, amplituda a trvání ovlivňují další vývoj. Oscilace jsou generovány cyklickým uvolňováním vápníku z popsaných vnitřních zásob, což probíhá přes specializované Ca^{2+} kanálové receptory. Aby byla oscilace udržena, je třeba takto kontinuálně dodávat Ca^{2+} přes plazmatickou membránu (Macháty et al., 2002).

Regulace meiotického zrání pomocí vápníku funguje tak, že zvýšené koncentrace Ca^{2+} inaktivují CSF (Masui, 1991) a tak následně dochází k degradaci MPF (Collas et al., 1995) díky čemuž může oocyt vystoupit z metafázního bloku. Tyto interakce však probíhají především přes CaMKII.

3.2.8 Ca^{2+} /kalmodulin dependentní protein kináza II (CaMKII)

CaMKII je další z řady serin/threonin protein kináz a jak již vyplývá z jejího názvu, je aktivována pomocí Ca^{2+} (vápníkovým signálem indukovaným vstupem spermie do oocyty, (Tunquist, 2003) a kalmodulinu, díky nimž se nefosorylová kináza autofosforyluje na threoninu 286 a stane se na kalcium i kalmodulinu nezávislá (Fan et al., 2003).

Je důležitou kinázou podílející se na regulaci transkripce a buněčného cyklu. CaMKII má čtyři izoformy: α , β , γ , δ , lišící se svými molekulovými hmotnostmi. Je důležitá během celého meiotického zrání, především se účastní iniciace meiozy a přechodu z MI do MII fáze (Fan et al., 2003).

CaMKII, stejně jako CaM, je v jádře akumulována již před GVBD a její hlavní úlohou je regulace aktivity MPF defosforylací $\text{p}^{34\text{cdc}2}$. Účastní se rovněž kontroly meiotické aktivace MAPK. Spolu s CaM hraje také klíčovou úlohu při tvorbě vřeténka a rozchodu chromozomů (Tatone et al., 2002).

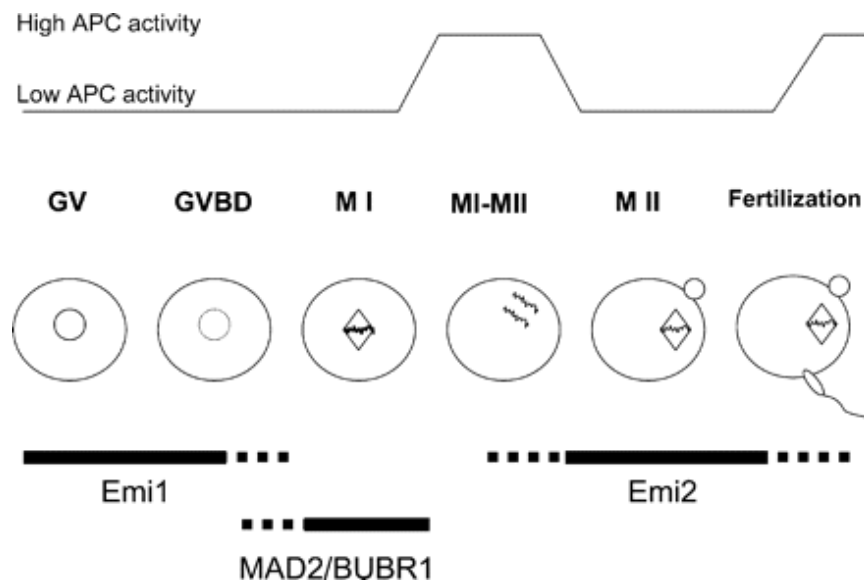
Blok MII je zprostředkován aktivitou MPF a Mos/MEK/MAPK/p90rsk kaskádou. CaMKII může hrát dvojí roli ve zprostředkování Ca^{2+} signálu po aktivaci oocyty. Jednak inaktivuje MPF a uvolňuje oocyty z meiotického bloku stimulací degradace cyklinu B1 a rovněž podporuje fosforylaci MAPK/p90rsk přes neznámý mechanismus (Fan et al., 2003). CaMKII rovněž spouští degradaci Erp1/Emi2, o čemž bude ještě hovořeno (Tunquist, 2003).

3.2.9 Anaphase-promoting complex/cyclosome (APC/C)

Po oplození nebo partenogenetické aktivaci se zvyšuje množství vápníkových iontů v oocyty, které nepřímo působí inhibičně na CSF. Dochází k nástupu APC/C (anaphase promoting komplex/cyclosome) (Yamano et al., 2004). APC/C komplex je aktivován dvěma kofaktory, Cdc20 a Cdh1 (Vodemaier, 2004) a podle Angra et al. (2004) se na aktivaci APC/C podílí rovněž Plk1.

K této aktivaci dochází při výstupu z metafáze (Nait et Toyda, 1991), jakmile jsou všechny kinetochory správně napojeny na dělicí vřeténko (Vodemaier, 2004). Hlavním úkolem tohoto komplexu je spuštění rozestupu chromosomů do dceřiných buněk (Pesin et Orr-Weaver, 2008).

Prostřednictvím APC/C je uskutečněn výstup z metafáze díky degradaci klíčových metafázních proteinů. Dojde ke snížení jejich hladin a uvolnění metafázního bloku (Jones, 2005). APC/C je schopný označit svůj substrát nízkomolekulárními proteiny, ubiquitiny (Peters, 2002). Součástí APC/C je rozpoznávací destrukční protein **DBRP** (Destruction-Box Recognition Protein), který se naváže na produkt určený k degradaci. Ubiquitin-ligáza pak připojí na tento komplex několik molekul ubiquitinu a tím navodí degradaci v proteasomech (Yamano et al., 2004). Polyubiquitinace APC/C substrátů vede tedy k jejich bezprostřední proteolýze prostřednictvím 26S proteosomu (Ciechanover, 2005). APC/C (E3-ubiquitinligáza) se podílí především na polyubikvitinaci sekurinu, proteinu inhibujícího aktivitu enzymu separázy a cyklinu B1, kteří jsou jeho klíčovými substráty. Díky odbourání sekurinu může aktivní separáza rozštěpit kohesiny – proteiny, které drží pohromadě sesterské chromatidy (Vodemaier, 2004). V metafázi polyubiquitinace cyklinu B1 pomocí APC/C velmi rychle snižuje aktivitu MPF a může tak dojít k nástupu anafáze (Haering et al., 2002). Regulace APC komplexu je zobrazena na Obr. 4.



Obr. 4. **Regulace APC komplexu v meiose (Marangos et al, 2007).**

Díky nízké hladině APC je ve fázi GV vytvořen první meiotický blok. Po opuštění tohoto bloku a v počátečních fázích meiotického zrání oocyty je nízká hladina APC udržována pomocí proteinu Emi1, který zajišťuje hromadění cyklinu B a tím pádem aktivitu MPF. Po degradaci Emi1 tuto funkci přejímají spindle assembly checkpoint proteiny (SAC) MAD2 a BUBR1. Během přechodu z MI do MII fáze je degradován cyklin B a sekurin, v odezvě na aktivaci APC komplexu, která se zvyšuje snižováním SAC proteinů. Expese proteinu Emi2 během vydělení prvního polárního tělíska vede k následné inhibici APC a zastavení oocyty v CSF bloku (blok metafáze II), v němž oocyt setrvává až do oplodnění.

3.2.10 Emi/Erp rodina

U savců patří do Emi/Erp rodiny již zmiňované proteiny Emi1 a Emi2 (Wu et Kornblutha, 2008). Spekuluje se o tom, že protein Rca1, nalezen v oocytech *Drosophily* je příbuzným těchto proteinů, zejména díky jeho funkci - negativní regulaci APC/C, kterou zajišťuje regulací cyklinu B1 (Dong et al., 1997).

Stejně tak jako je tomu u Rca1 je hlavní úlohou proteinů Emi1 a Emi2 (které jsou součástí CSF) regulace mitotického i meiotického dělení, a to právě přímou inhibicí APC/C (Wu et Kornblutha, 2008).

Emi1 i Emi2 se nacházejí v oocytech ještě před jejich vstupem do meiotického zrání (tedy v oocytech nezralých) (Tunguist, 2003).

Společnou charakteristikou obou proteinů je fakt, že obsahují F-box doménu (Cenciarelli et al., 1999). Jedná se o strukturální proteinový motiv, který je tvořen z přibližně 50 AMK a jenž zprostředkovává vzájemné interakce proteinů (Kipreos et Pagano 2000). Proteiny obsahující tuto F-box doménu se označují jako F-box proteiny (Crang et Tyers, 1999)

Emi1 je proto rovněž označován jako FBXO5 (F-box only protein 5) a Emi2 jako FBXO43 (F-box only protein 43).

Emi1 (FBXO5)

Emi1, označován také jako ranný mitotický inhibitor, či jako inhibitor APC/C, má v oocytech v průběhu meiosis konstantně nízkou koncentraci (studie na myším modelu) (Tunguist, 2003).

Jak již však napovídá jeho označení, ranný mitotický inhibitor, je důležitý zejména v mitose, kde zastává stěžejní funkci v buněčné proliferaci a pro zachování integrity genomu. Hlavní úlohou Emi1, kterou zajišťuje zachování integrity genomu, je blokování replikace. Nedochozí tak k re-replikaci, ke které by jinak mohlo dojít předčasnou aktivací APC/C (Machina et Duta, 2007). Re-replikace je fatální proces - replikace genomu, která proběhne více než jedenkrát během buněčného cyklu a zpravidla končí apoptosou buňky. Arias et Walter (2007) uvádějí, že k re-replikaci pravděpodobně dochází z důvodu destabilizace gemininu a cyklinu A, které mají významnou roli v prevenci re-replikace v savčích buňkách.

Jak již bylo řečeno výše, Emi1 je tedy velmi důležitý v regulaci mitosy, a to především tím, že díky transkripčnímu faktoru E2F dojde k dependentní expresi Emi1 a ten následně inaktivuje komplex APC/C-Cdh1 v průběhu G1 fáze (Bashir et al., 2004).

Díky Emi1 však dochází také k inhibici APC/C-Cdc20 během S a G2 fáze. Během prometáfáze dochází následně k jeho degradaci, a tím je aktivován komplex APC/C-Cdc20 vůči časným mitotickým substrátům jako je např. právě cyclin A. Aktivita tohoto komplexu APC/C-Cdc20 vůči cyklinu B1 je inhibována působením SACu. V okamžiku kdy jsou chromosomy správně napojené a seřazené na dělicím vřeténku a SAC je tzv. „uspokojen“,

dochází k aktivaci APC/C-Cdc20 komplexu a degraduje se cyklin B1 a sekurin. Následně dochází k aktivaci separázy a k rozdělení chromosomů (Tung, 2006).

V samičích zárodečných buňkách savců inhibuje Emi1 komplex APC/C-Cdh1 během profáze I (GV), díky čemuž se může hromadit MPF (Cdk1/cyklin B1), jenž je bezpodmínečně nutný pro to, aby oocyt vstoupil do prvního meiotického dělení (Marangos et al., 2007).

První výzkumy tohoto proteinu byly prováděny na oocytech žab (rodu *Xenopus*). Jones (2005) studoval funkci Emi1 pomocí mikroinjekcí tohoto proteinu do jedné z buněk dvoubuněčného žabího embrya. Mikroinjekce Emi1 způsobila metafázní blok v injektované buňce (viz Obr. 5.). Jones (2005) ze svého výzkumu vyvodil proto závěry, že je Emi1 nezbytný pro vytvoření CSF bloku v žabích oocytech, a především, že jeho inhibicí se v oocytech, zastavených v metafázi II, předčasně aktivuje APC/C, a to i v bez přítomnosti Ca^{2+} signálu. Naproti tomu, když byl Emi1 nadbytek, došlo k tomu, že nebyl oocyt z CSF uvolněn a nedocházelo tak k dalšímu vývinu.

Jak uvádí Reimannem et Jacksonem (2002) funkce proteinů z Emi/Erk rodiny, tedy proteinů Emi1 a Emi2, není bezpodmínečně závislá na MAPK aktivitě. Z jejich výzkumů usuzují, že přítomnost residuální MAPK aktivity je nejspíše dostačující pro zajištění inhibice APC/C v přítomnosti velkého množství Emi1 a Emi2 proteinů.

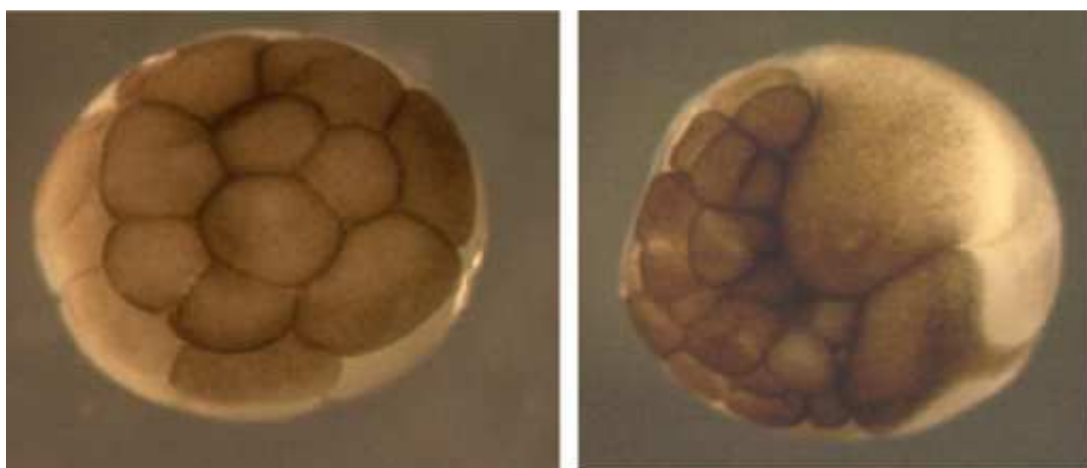
Emi1 je fosforylován pomocí p90rsk a tím je zesilována jeho vazba k aktivátoru APC/C, která zajišťuje inhibici APC/C během CSF bloku (Dumont et al., 2005). Emi1 je rovněž fosforylován pomocí MPF (Kishimoto, 2003). Jak uvádí Schmidt (2006) fosforylace a hladina Emi1 se však v průběhu meiosis nemění.

Co se týče inaktivace Emi1 převládají rozličné názory. Tung (2006) ve své studii uvádí, že Ca^{2+} signalizace, která vznikne jako odezva na plodnění oocytu, inaktivuje nejen Mos, ale zároveň i protein Emi1, čímž může být následně zahájena embryogeneze.

Dle Tunquista (2003) však Emi1 zůstává stabilní i po fertilizaci, ato až do prvního mitotického dělení, protože jeho degradace v anafázi není závislá na aktivitě CaMKII (Ca^{2+} /kalmodulin dependentní protein kináza II, která je aktivována vápníkovým signálem indukovaným vstupem spermie do vajíčka).

V odporu s těmito tvrzeními jsou rovněž Paronetto et al. (2004), kteří dělali své experimenty na myších oocytech a embryích, tvrdí, že se nízká hladina Emi1 během fáze

MII následně v prvních dvou cyklech mitotického dělení zvyšuje nejméně 1,2 krát a zůstává stále detekovatelná až po preinplantační vývoj.



Obr. 5. Injekce Emi1 do časných žabích embryí (vpravo) blokuje mitosu (Reimann et al., 2001).

Emi2 (Erp1, FBXO43)

Dalším proteinem, který je charakteristický pro meiosu a rovněž se účastní inhibice APC/C je druhý člen Emi/Erp rodiny – protein Emi2 (Shoji et al., 2006). V oocytech exprimuje po fázi GVBD a ve své podstatě zastupuje obdobnou roli jako protein Emi1. Díky němu může docházet k hromadění cyklinu B1, a rovněž brání replikaci mezi prvním a druhým meiotickým dělením, právě tím, že inhibuje komplex APC/C-Cdc20 (Madgwick et al., 2006). Na přechodu mezi meiosou I a meiosou II podstupuje posttranslační modifikace (Schmidt, 2006) a je stejně jako Emi1 součástí CSF, díky kterému je udržována vysoká úroveň MPF během metafáze II.

Emi2 není však specifický pouze pro samičí meiosu, ale rovněž i pro meiosu samčích zárodečných buněk – spermií, což vyplývá ze skutečnosti, že jeho vysoké koncentrace byly nalezeny také ve varlatech (Shoji et al., 2006).

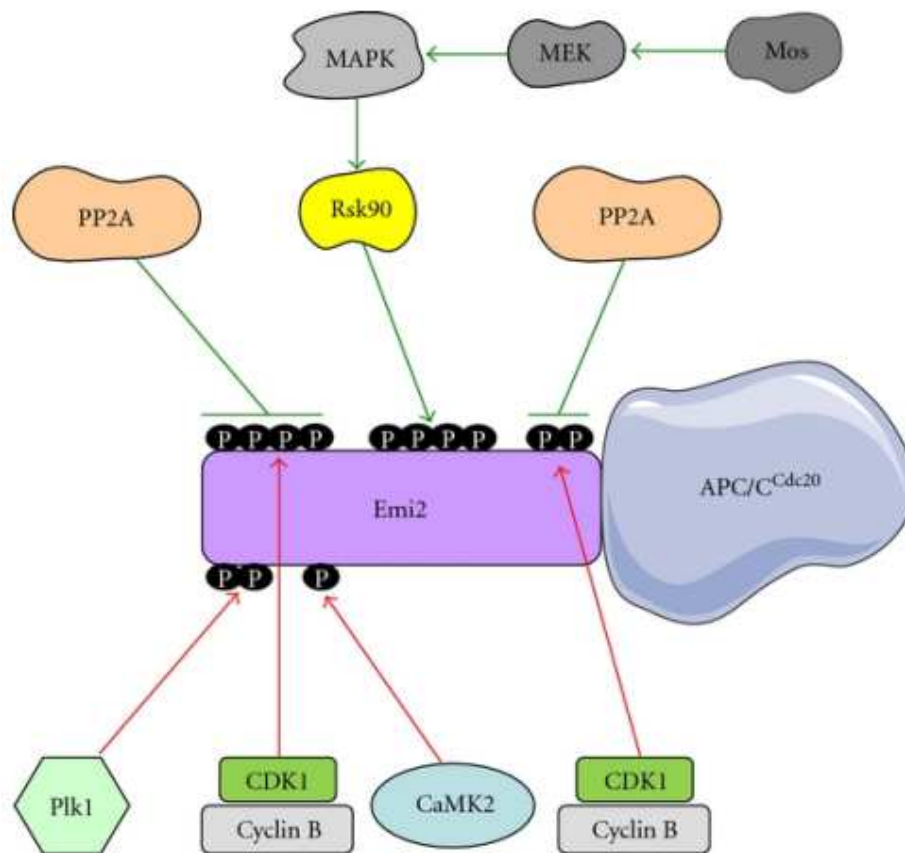
Jak již bylo popsáno, je Emi2 důležitý pro funkčnost CSF bloku, ale prozatím není přesně objasněna jeho funkce v cytotatickém faktoru oocytů, ani v embryonickém buněčném cyklu. Liu et al. (2006) však usuzují, že Emi2 hraje významnou roli pouze v meiose a nikoli v mitotickém buněčném cyklu.

Během meiotické maturace se Emi2 v oocytech objevuje až po metafázi I a svého maxima dosahuje v metafázi II.

Důležitost Emi2 během meiotického zrání ve své práci demonstrují Fire et al. (1998), kteří uvádějí, že díky jeho vyčerpání *in situ* pomocí RNA interference (což je proces, kterým je regulována transkripce a vnitrobuněčná exprese genu) je vyvoláno předčasné ukončení meiosis a oocyt následně podléhá atresii. Toto tvrzení dokazuje i práce Shojiho et al. (2006), kteří dělali pokusy s rekombinanními proteiny Emi2 a zjistili, že po jejich aplikaci do myších oocytů je výrazně snížen sklon MII oocytů ukončit meiosu v závislosti na aktivačních stimulech. Tím, že se sníží koncentrace Emi2 dojde k uvolnění zralých a oplození schopných oocytů (v MII fázi) z CSF bloku.

Velkým orzdílem mezi proteiny Emi1 a Emi2 je jejich degradace, která je u Emi2 (na rozdíl od Emi1) závislá na aktivitě **CaMKII**, která je jejím spouštěčem. Emi2 je pomocí CaMKII fosforylován na treoninu 195. To vede k zesílení vazby Plx1 (u žabích oocytů). Plx1 fosforyluje DSGx3S sekvenci na N-konci Emi2, díky čemuž je vyvolána reorganizace motivu pro ubiquitin ligázu SCF β -TRCP. Tato malá změna ve struktuře vede následně k destrukci Emi2 (Tunquist, 2003). Emi2 je tedy rychle degradován v odezvě na signalizaci Ca²⁺ v Plx1 a SCF β TrCP-dependentním procesu během fertilizace či aktivace oocytů. To vede k inaktivaci CSF, aktivaci APC/C-Cdc20 a následné degradaci cyklinu B1 (Tung, 2006).

Protein Emi2 byl detailně prozkoumán zejména u žab rodu *Xenopus* (Schmidt, 2006) a přibývá i studií na myších oocytech, prasečímu modelu se zatím věnuje minimu studií, což je i důvodem proč se mu chceme rovněž věnovat.



Obr. 6. **Regulace proteinu Emi2, který asociuje s APC/C^{Cdc20} (Kubiak et Dika, 2011).**

Fosforylační místa v horní části Emi2 jsou inhibitory pro asociaci a jsou během bloku metafáze II chráněné (zelené šipky a symboly inhibice), zatímco místa ve spodní části Emi2 jsou aktivátory asociace a výstupu z CSF (červené šipky).

4 METODIKA

Metodické postupy vychází z metodik použitých a ověřených v předešlém výzkumu (Procházková, 2012) s drobnými úpravami. Byly navrženy nové primery pro Emi2 a použité již ozkoušené protilátky na Western blot (viz dále).

Před samotnými experimenty bylo třeba připravit vzorky myších a prasečích oocytů v různých fázích zrání – GV, GVBD (K20), MI (K28), MII (K44). Následně byla sledována exprese proteinů pomocí Western blotu a polyadenylace pomocí poly(A) testu, následně PCR kvantifikace a DNA PAGE.

Western Blot pro detekci exprese proteinů i DNA PAGE byly vždy min. 4 krát opakovány (jak u Emi1, tak i u Emi2).

4.1 Kultivace oocytů a příprava vzorků

4.1.1 Prasečí oocyty

Prasečí vaječníky byly odebírány na jatkách (Český brod), od porážených prasnic, u kterých nebylo známo stádium estrálního cyklu. Do laboratoře byly dováženy ve fyziologickém roztoku (0,9 % chloridu sodném) při teplotě 39 °C řádově do max. 3 hodin po porážce.

Izolace oocytů byla prováděna aspirací pomocí injekční stříkačky (10 ml, Lauer solo, B. Braun) s jehlou (0,80 x 50 mm, Sterican, B. Braun) a následně byly oocyty vstříknuty i s folikulární tekutinou do zkumavky, kde byly ponechány cca 10 minut, aby sedimentovaly na dno. Následně byla přebytečná folikulární tekutina odsáta pomocí plastové pasterové pipety (3 mm, 88337, Kartell s.p.a). Poté byl sediment propláchnut Transfer Mediem (TM, složení viz Tab. 1.), zahřátým na termodesce (PA digit R290707, Falc instruments) na cca 38 °C, které bylo po sedimentaci oocytů rovněž odsáto. Sediment byl ze zkumavky pomocí TM vypláchnut na Petriho misku o průměru 90 mm (400974, Gama group a.s.). Pro snadnější vybrání oocytů bylo přidáváno libovolné množství TM.

Oocyty byly vybírány pod mikroskopem (WP 10x/23, 455043, Carl Zeiss) ruční skleněnou pipetou a následně buď kultivovány, nebo vloženy opět do zkumavky a pomocí vertexu (Vortex techno kartel TK3S, 2241, Elisabeth Pharmacon) z nich byly odstraněny kumulární buňky (na vzorky GV). Oocyty určené na ostatní vzorky (K20, K26, K28, K44,

K = kultivace, číslo určuje dobu kultivace v hodinách) byly po vybrání dvakrát promyty v kapce TM, jedenkrát promyty v kapce kultivačního roztoku a následně kultivovány v *in vitro* podmínkách v plastové kultivační misce (4 jamková destička Nunc IVF, Nucleon Delta, 179830) s kultivačním roztokem, který se před použitím nechal vysytit v termostatu (HERA cell 150, Thermo Elector Corporation) při 38.5 °C a ve směsi s 5 % CO₂ se vzduchem, po dobu minimálně 30 min. Doba kultivace závisela na typu vzorku, jak je uváděno výše.

Po kultivaci a odstranění kumulárních buněk (opět vortexováním) byly vytvořeny požadované vzorky, a to následujícím způsobem: požadovaný počet oocytů (50, 100) byl promyt přes 4 kapky TM a vzorky určené na izolaci RNA ještě v kapce RNase free H₂O. Po vložení oocytů do ependorfovy zkumavky byla tenkostěnnou skleněnou pipetou odsáta tekutina a následně byly vzorky zamraženy v - 80 °C.

Pro kontrolu zrání byl při každé kultivaci vytvořen preparát 20 oocytů fixovaných v roztoku acetylalkoholu po dobu min. 24 hodin. Na podložní sklíčko byly udělány dva proužky z vazelíny a do vzniklého prostoru se v řadách rozmístily oocyty. Na podložní sklíčko bylo přiloženo krycí sklíčko a preparát byl vložen do kyvety s roztokem kyseliny octové a lihu v poměru 1 : 3. Preparát se barvil 1 % orceinem (viz Tab. 3.). Ihned potom se odbarvoval 40 % kyselinou octovou (tak aby zůstalo lehké zbarvení) a takto vytvořený preparát se vyhodnocoval pod mikroskopem (WF 10x/20, 415500, Carl Zeiss). K experimentům byly použity pouze vzorky s min. 80 % oocytů vyžralých do požadované fáze.

Tab. 1. Transfer Medium (pro manipulaci s oocyty)

ROZTOK A	2 l	ROZTOK B	0,5 l
NaCl (2315983, Carl Roth)	12,8 g	Roztok A	500 ml
KCl (60132 1, Penta)	0,8 g	NaHCO ₃ 7,5 % (S8761, Sigma-Aldrich)	7,5 ml
CaCl ₂ .2H ₂ O (21100 1, Penta)	0,6 g	Penicillin (Biotika Bohemia)	0,0225 g
KH ₂ PO ₄	0,14 g	Streptomycin	0,0325 g

(60230 1, Penta)		(ICN Galenika)	
MgSO ₄ .7H ₂ O (158 000005, Penta)	0,194 g	Amphotercin B 25 µg/ml (A9538, Sigma-Aldrich)	0,5 ml
Glukóza (49163, Sigma-Aldrich)	4 g	Na pyruvate (C-8356, Serva)	0,1 g
HEPES solution (H0887, Sigma-Aldrich)	4 g		
PVA (341584, Sigma-Aldrich)	2 g		
Destilovaná H ₂ O	doplnit do 2 l		
Takto připravený roztok byl rozlit do 0,5 l lahví a následně autoklávován. Trvanlivost - neomezená.		U namíchaného Transfer Media bylo vždy třeba změřit osmolaritu, která musela být v rozmezí 250 – 260 mosmol / l	

Tab. 2. Příprava kultivačního média pro prasata.

Modifikované M119 médium	
Médium M199 (21157-029, Invitrogen)	4,5 ml
Millipore H ₂ O	4,5 ml
10 % FCS (fetální telecí sérum, C-37350, PromoCell)	1 ml
Namíchaný roztok byl přefiltrován a následně z něj byly připraveny alikvoty po 1250 µl, které se zaparafilmují a zamrazí.	
Hormon P.G. 600 - ředění	
P.G. 600 (A046A01, Intervet)	600 ui
TM (přidat přes filtr)	12000 µl
Z takto rozředěného hormonu byly opět udělány alikvoty po 20 µl a zamraženy.	
Kultivační médium	

Modifik. M119 médium	1250 μ l (jeden alikvót)
P.G. 600 (naředěný)	20 μ l (jeden alikvót)
Doporučené dávkování – do každé jamky v kultivační misce 400 μ l / 100 oocytů.	

Tab. 3. Příprava roztoku orceinu

1 % orcein	
CH ₃ COOH	50 ml
Orcein (O7380, Sigma-Aldrich)	1 g
Po smíchání se roztok 20 min. vaří ve vodní lázni a následně se přefiltruje.	
Citrát sodný (25112, Penta)	0,5 g

4.1.2 Myší oocyty

Myší oocyty byly izolovány z myší chovaných v ÚŽFG AV ČR a některé z myší dovezené od společnosti AnLab s.r.o. Pro lepší a kvalitnější estrus byly smaice ve věku 5 týdnů umísťovány na podestýlku od samců a zpracovávány byly v cca 6 týdnech. Estrální cyklus myší však nebyl opět znám. Byly zabity mechanickým způsobem a následně z nich byly vyjmuty vaječníky. Pro izolaci oocytů z vaječnicků bylo používáno manipulačním médiu M2 (M2 medium with hepes without penicillin, M7167, Sigma-Aldrich) s přídatkem inhibitoru IBMX v poměru 10 000 : 1 a zahřáté na teplotu cca 37 °C. IBMX (3-isobutyl-1-methylxanthine, I7918, Sigma-Aldrich) se před svým použitím ředí pomocí DMSO (dimethyl sulfoxide, D2650, Sigma-Aldrich) na jeho požadovanou 0,2 mol koncentraci, takto vytvořený roztok se může uchovávat ve tmě při pokojové teplotě (není tedy nutné IBMX ředit před každým použitím).

Vaječníky byly umístěny do velké kapky manipulačního média v Petriho misce o průměru 5,5 cm () a pomocí dvou inzulinových injekčních stříkaček (0,5 mm x 16 mm, Omnifit-F, B. Braun) se pod mikroskopem (WP 10x / 23, 455043, Carl Zeiss) mechanicky rozrušily (aby tak došlo k uvolnění oocytů z folikulů). Následně se pomocí ústní skleněné pipety (230 mm, 747720, Brand) vybraly oocyty v GV fázi, které se daly do kultivačního

média M16 (M16 medium with hepes without penicillin, M7292, Sigma-Aldrich). Kultivační médium se nechalo cca 30 minut před použitím vysytit v termostatu (HERA cell 150, Thermo Elector Corporation) při 37,5 °C a ve směsi s 5 % CO₂ se vzduchem (za těchto podmínek potom probíhala i samotná kultivace). Ke kultivaci byly používány dvě malé Petriho misky o průměru 3,5 cm (153066, Nunclon surface), ve kterých bylo 5 kapek média M16, přelitých minerálním olejem (M8410, Sigma-Aldrich). V jedné misce bylo médium s přísávkem IBMX, opět v poměru 10 000 : 1. Ve druhé misce bylo samotné médium M16. Nejprve byly oocyty umístěny do kultivačního roztoku s přísávkem IBMX a byly ponechány hodinu v termostatu (regenerace oocytů). Po uplynutí hodiny byly oocyty z termostatu vyjmuty a pomocí ruční skleněné tenkostěnné pipety byly opakovaným nasáváním zbaveny kumulárních buněk. Takto ošetřené oocyty byly kultivovány v druhé Petriho misce bez přísávku IBMX. Kultivace GVBD byla prováděna přibližně 2,5 hodiny, kultivace M1 8 hodin a kultivace MII 16 hodin. Uváděné časy jsou orientační, zrání oocytů bylo třeba průběžně sledovat. Vzorky byly dělány stejným způsobem jako u oocytů prasečích.

4.2 Studium exprese proteinů Emi1 a Emi2

Pro studium exprese proteinů Emi1 a Emi2 byly využity vzorky prasečích a myších oocytů. Co se týče vhodných protilátek, použili jsme již vyzkoušené protilátky a optimalizované podmínky (Procházková, 2012). U myších i prasečích vzorků bylo množství 50 oocytů / vzorek. Toto množství se osvědčilo. Separace proteinů byla prováděna na polyakrylamidovém gelu. Z polyakrylamidového gelu byly proteiny pomocí Western Blotu přeneseny na membránu a následně pomocí RTG filmů detekovány.

4.2.1 Polyakrylamidová gelová elektroforéza

Příprava vzorků

Ke vzorkům oocytů bylo přidáno 10 µl 2x koncentrovaného SDS Loading (Sample) Bufferu (viz Tab. 4.), pomocí vortexu došlo k promísání vzorku s pufrem a následně se endorfovy zkumavky stočily na centrifuze (Micro centrifuga, 050710, Carl Roth). Lýza

oocytů byla provedena povařením (3 min.) ve vroucí destilované vodě. Na rozdíl od minulých let jsme při vaření vzorků již nepropíchnávali víčko ependorfovy zkumavky, protože jsme došli k závěrům, že se část vzorku tímto způsobem vždy vypařila. Po povaření se vzorky opět zvortexovaly a stočily na centrifuze.

Tab. 4. Příprava 2x SDS Loading Bufferu

10 ml	
0,5 M Tris-HCl, pH 6,8	2,5 ml
Glycerol	2 ml
10 % SDS	4 ml
0,1 % Bromfenolová modř (599, Penta)	0,5 ml
Millipore H ₂ O	doplníme do 10 ml
B-merkптоethanol	je přidán na konečnou koncentraci 2,5 až 5 %
Roztok musí být skladován v - 30 °C.	

Příprava polyakrylamidového gelu

Byl používán polyakrylamidový gel o tloušťce 0,75 mm a rozměrech v. 10,1 d x š. 7,3. Do připraveného stojánku bylo nejprve vloženo těsnění a olihovaná skla, daná na sebe. Do vzniklé mezery byla nejprve nalita destilovaná voda, aby se vyzkoušelo, zda takto připravená aparatura nepodtéká. Po namíchání 10 % dělicího gelu byla destilovaná voda vylita a vnitřek skel byl vysušen savým papírem dosucha. Nejprve se mezi skla nalil dělicí gel, který se přelil destilovanou vodou. Po zatuhnutí gelu se destilovaná voda opět vylila a místo ní tam byl nalit 5 % startovací gel, do kterého byl vložen hřeben s požadovaným počtem zubů (podle počtu vzorků, 10 nebo 15). Po zatuhnutí startovacího gelu byl hřeben vyjmut a vzniklé jamky se propláchly destilovanou vodou, aby se odstranil zbytek kyseliny polyakrylamidové. Takto připravený gel může být skladován v lednici cca 4 dny, ale musí být udržována stálá vlhkost (gel musí být proto skladován v sáčku s trochou vody). Složení dělicího a startovacího gelu uvádí následující tabulka.

Tab. 5. Předpis polyakrylamidového gelu

Startující gel		2 ml	5 %
Destilovaná H ₂ O			1,9 ml
Bis-acrylamide 30 % (A3699, Sigma-Aldrich)			0,34 ml
0,5 M Tris pH 6,8			0,5 ml
10 % SDS (sodium dodechl sulfate, L6026, Sigma-Aldrich)			20 µl
10 % APS (peroxosíran amonný, 30154-AP0, Lach-Ner)			20 µl
Temed (Temed electrophoresis reagent, V1-LP-RC-102-EA Biosciences)			2 µl
0,5 M Tris pH 6,8 (stacking gel buffer)			
Tris base (2010644, Carl Roth)			6 g
Millipore H ₂ O			65 ml
Pomocí HCl (30565, Lach-Ner) dotitrovat na pH 6,8.			
Millipore H ₂ O			doplnit do 100 ml
Roztok se přefiltruje. Doba skladování 1 měsíc při 4 °C.			
Dělicí gel		5 ml	10 %
Destilovaná H ₂ O			1,9 ml
Bis-acrylamide 30 %			1,7 ml
1,5 M Tris pH 8,8			1,3 ml
10 % SDS			50 µl
10 % APS			50 µl
Temed			2 µl
1,5 M Tris pH 8,8 (resolving gel buffer)			
Tris base			18,171 g
Millipore H ₂ O			65 ml
Pomocí HCl dotitrovat na pH 8,8.			
Millipore H ₂ O			doplnit do 100 ml
Roztok se přefiltruje. Doba skladování 1 měsíc při 4 °C.			

Elektroforéza

Před sestavením aparatury (Mini-Protean 3 Cell, 67S/04859, Bio-Rad) byla vždy z jamek gelu vytřepána destilovaná voda. 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 (složení viz Tab. 4.). Vzorky byly na gel nanášeny pomocí loadovacích špiček. Nanáška 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 5 nebo 6 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 dojetí čela elektroforézy téměř ke spodnímu okraji byla elektroforéza zastavena a skla s gely vyjmuta. Po oddělení skel byl vždy odříznut spodní levý roh pro zachování orientace a byl oddělen startovací gel.

Tab. 6. Složení Running bufferu

Running buffer 10x koncentrovaný – zásobní roztok, 1 l	
Tris base	30,3 g
Glycin (2002722, Carl Roth)	144 g
SDS	10 g
Destilovaná H ₂ O	doplnit do 1 l
Skladování – 1 měsíc při RT	
Running buffer 1x koncentrovaný, 2 l	
10 x c Running Buffer	200 ml
Destilovaná H ₂ O	1800 ml
Skladování- 1 měsíc od data přípravy 10x c RB, při 4 °C	

4.2.2 Western blot

Příprava před blotováním

Před samotným Western blotem byl polyakrylamidový gel změřen a vložen přední stranou nahoru do 20 % Towbinu (složení viz Tab. 5.) a 10 min. se třepal na třepačce (Laboratory shaker type 3583, ELPAN). Mezitím byla PVDF membrána (IPVH00010, Immobilon Transfer Membranes) aktivována přelitím methanolu a dána také do 20 % Towbinu. K membráně byl přidán 2x filtrační papír (Extra hic blot paper, 1703969/A, Bio-Rad), s rozměry gelu, a nechal se i s membránou se 2 min. třepat.

Vlastní blot

Na anodu blotu (Fastblot B 43, 2106465, Biometria) se navrstvil filtrační papír, membrána, polyakrylamidový gel a opět filtrační papír. Pomocí skleněné pipety (25 ml, Costar) byly vyváleny bulbiny a potom se přiklopila katoda (víko) blotu. Při práci se dvěma gely bylo zapnuto chlazení. Po připojení blotu do zdroje bylo nastaveno 5 mA / 1cm² , 18 W a nastaven čas blotování na 35 min. Pokud se marker málo otiskl, bylo přidáno dalších 10 min.

Barvení gelu a práce s membránou

Po skončení blotování se polyakrylamidový gel barvil 20 min. na třepačce v Coomassie Blue (viz Tab. 6.) a následně byl odbarvován dle potřeby Destainem (viz Tab. 7.) a na závěr třepán 10 min. v destilované vodě. Membrána se po dobu jedné hodiny blokovala na překlápěčce (Profile Maker, M1241-4001, New Brunswick Scientific CO., INC) v min. 5 ml blokačního roztoku. Následovalo přendání membrány do flakonu (50 ml, Centrifuga tube 50, 20110048, TPP) s roztokem primární protilátky (min. 2 ml roztoku). Flakon s membránou byl přes noc ponechán v lednici na roleru (RM 5, 348, Assistent) Druhý den se membrána promývala 3x 10 min. na třepačce v TTBS (viz Tab. 8.). Po každých 10 min. byl nalit nový roztok. Po promytí se membrána nechala překlápět jednu hodinu v roztoku se sekundární protilátkou. Následně byla opět promývána 3 krát po 10 min. v TTBS. Složení roztoků pro blokaci, roztoků s primární a sekundární protilátkou se liší v závislosti na používané primární protilátce (viz závěr této kapitoly).

Membrána byla dále detekována na RTG filmu (CL-X Posure film, 34091, 8 x 10 inches, Pierce). K vizualizaci byl použit ECL kit (Amersham ECL plus Western Blotting detection systém, 2132, GE Healthcare). Membrána se polila roztokem ECL v množství 1 ml / 50 cm² a po 5 minutách byla dána do kazety (Hypercassette amersham, 23649, 8 x 10 INCH, Pharmacia Biotech). Délka expozice byla dle potřeby 10 min., 5 min., 1 min., 30 sec., případně 1 hod. Následně byl negativ umístěn 2 min. do vývojky (Foma LP-T, 1010, Foma Bohemia, s.r.o) poté opláchnut v destilované vodě a vložen do ustalovače (Foma Fix, 0511, Foma Bohemia) opět na 2 min. Na závěr byl opět opláchnut v destilované vodě a po oschnutí byl vyhodnocován, jak je popsáno níže v samostatné podkapitole.

Membrána se následně promývala 2 krát po 10 min. v TTBS a sušila se na filtračním papíře. V případě potřeby byla dále barvena stříbrem (membrána se třepala 10 min. v destilované vodě a poté 10 min. v roztoku viz Tab. 9., následně se opláchla pod destilovanou vodou a byla opět sušena na filtračním papíře).

Tab. 7. Příprava 20 % Towbinu

Zásobní roztok 1 l	
Tris base	5,82 g
Glycin	2,93 g
Destilovaná H ₂ O	750 ml
Pomocí 10 M NaOH nebo HCl	Upravit na pH 9,2
Methanol (603-001-00-x, Lach-Ner)	200 ml
Doplnit destilovanou H ₂ O	do 1 l
Skladování - 1 měsíc při RT	

Tab. 8. Příprava Coomassie Blue „R“

Zásobní roztok 1 l	
Methanol	400 ml
CH ₃ COOH (457401, Penta)	100 ml

Coomassie (Brilliant Blue „R“, 27816, Sigma-Aldrich)	1 g (rozpustit v 100 ml destil. H ₂ O)
Destilovaná H ₂ O	doplnit do 1 l
Skladování – neomezená trvanlivost	

Tab. 9. Příprava Destainu

Zásobní roztok 2 l	
Methanol	800 ml
CH ₃ COOH	200 ml
Destilovaná H ₂ O	1 l
Skladování – 1 měsíc při RT	

Tab. 10. Příprava TTBS

Zásobní roztok 1 l	
NaCl	8 g
Tween 20 (Polyoxyethylenesorbitan monolaurate, P-1379, Sigma-Aldrich)	0,5 ml
2 M Tris pH 7,6	10 ml
Destilovaná H ₂ O	doplnit do 1 l
Skladování – max. 3 dny při RT	
2 M Tris pH 7,6	
Tris HCl (Trizma hydrochloride, T5941, Carl Roth)	27,02 g
Tris base	3,46 g (rozpustit v 80 ml dest. H ₂ O)
Pomocí 10 M NaOH (1310-73-2, Spolchemie)	dotitrovat na pH 7,6
Destilovaná H ₂ O	doplnit do 100 ml
Skladování – 1 měsíc při RT	

Tab. 11. Roztok na barvení membrán stříbrem

50 ml	
Citrát sodný	1 g
Síran železnatý (30193-AP0, Lach-Ner)	9,4 g
Dusičnan stříbrný (1015120025, Merck, s.r.o.)	0,1 g
Destilovaná H ₂ O	50 ml

Použité protilátky

Byly použity již ozkoušené protilátky (Procházková, 2012) – jedna protilátka pro Emi1 a jedna protilátka pro Emi2. Protilátka proti Emi1 je uvedena v Tab. 12., protilátka proti Emi2 v Tab. 13.

Tab. 12. Protilátka proti Emi1

FBXO5/EMI1 Rabbit anti-Human Polyclonal Antibody	
Výrobce	LifeSpan Biosciences
Katalogové číslo	LS-C80548
Zdroj	rabbit
Velikost	56 kDa
Blokační médium	10 % želatina (teleostean gelatin,G-7765, Sigma-Aldrich), rozpuštěná v TTBS
Ředění	1 : 1 000, TTBS
Sekundární protilátka	anti-rabbit, 1 : 7 500, TTBS
Epitope	neuveđen

Tab. 13. Protílátka proti Emi2

Emi2 (H-62)	
Výrobce	Santa Cruz Biotechnology, Inc.
Katalogové číslo	sc-68894
Zdroj	rabbit
Velikost	71 kDa
Blokační médium	5 % mléko (odtučněné, 1,3 %, Laktino, Promyl), rozpuštěné v TTBS
Ředění	1 : 500, 5 % mléko, rozpuštěné v TTBS
Sekundární protílátka	anti-rabbit, 1 : 7 500, 2,5 % mléko, rozpuštěné v TTBS
Epitope	C-terminus

4.2.3 Vyhodnocování negativů a statistická analýza dat

Vyvolané negativy byly scannovány scannerem BioRad GS-800, model PowerLook 2100XL (Umax, U9901-H9D0) a pomocí programu Quantity One 4.6.5. byla u specifických bandů změřena optická densita na mm. U každého proteinu a savčího modelu (Emi1 prase, Emi1 myš, Emi2 prase, Emi2 myš) byl vybrán reprezentativní negativ a pomocí hodnot OD x mm u něj naměřených, byly dále ostatní hodnoty negativů standardizovány, aby se tak ošetřila rozdílnost expozic, která se liší experiment od experimentu. Z reprezentativních negativů byly zprůměrovány hodnoty za všechna zraní a vyděleny průměrem hodnot zraní od standardizovaného negativu, čímž vznikl koeficient, jakým se dále násobily jednotlivé hodnoty zraní u daného negativu. Dále byly výsledky statisticky zpracovány pomocí programu PASW Statistics 18 (SPSS), kde byla nejprve použita procedura ANOVA a v případě, že vyšly statisticky průkazné rozdíly mezi průměry v jednotlivých fázích zraní oocytů, byly následně použity Post Hoc testy, díky nimž jsme porovnali rozdíly v průměrech mezi jednotlivými dvojicemi kategorií zraní. Jako H₀ byla stanovena hypotéza, že se průměry ve skupinách zraní neliší. Jako H_A byla stanovena hypotéza, že se průměry mezi zraními liší na hladině významnosti $\alpha = 0,05$. Na základě

Leveneho testu shodnosti rozptylů byl pro Post Hoc test u neshodných rozptylů použit Games-Howellův test a pro shodné rozptyly Sheffeho test. Pro porovnání optické density mezi myšimi a prasečími oocyty ve stejných fázích zrání byl použit t-test. Grafy a popisná statistika byly vytvořeny v programu Microsoft Office Excel 2007.

4.3 Studium polyadenylace mRNA Emi1 a Emi2

Pro studium polyadenylace mRNA Emi1 a Emi2 bylo nejprve zapotřebí izolovat z oocytů RNA a následně byl využit poly(A) test s následnou PCR amplifikací. Výhody této metody jsou její rychlost, snadnost provedení a nezávislost na použití radioaktivních látek. K detekci amplifikovaných fragmentů byla využita DNA PAGE.

4.3.1 Izolace RNA

Pro izolaci RNA byl využit RNeasy Micro Kit (74004, Qiagen) nebo RNeasy Plus Mikro Kit (74034, Qiagen), který obsahuje navíc kolonky pro vychytání genomické DNA. Při porovnávání výsledků z izolací těmito dvěma kity nebyl však shledán žádný výrazný rozdíl. Před prvním použitím kitu bylo třeba RPE pufr naředit 4 díly ethanolu (96 – 100 %). Dále před každou izolací připravit 70 % a 80 % EtOH (39556.02, Serva), EtOH byl ředěn pouze RNase free H₂O. K RLT byl přidán β-Mercaptoethanol v poměru 100 : 10. Výtěžek z izolace byl 12 μl total RNA / vzorek.

Postup izolace RNA byl následující:

1. Oocyty byly zlyzovány přidáním 350 μl RLT Plus pufru a dobře zamíchány pomocí vortexu.
2. Dále byla provedena homogenizace – zlyzované oocyty byly přeneseny na kolonku QIAshredder – která se dále centrifigovala 2 min. max. rychlostí.

- zde je u RNeasy plus Micro kitu navíc jeden krok:

Vzorek je přenesen na dna eliminátor spin column, centrifuguje se 30 s. min. 800 G, po protečení vzorku kolonkou se ujistíme, že uvnitř nezbyla žádná tekutina – v opačném případě centrifugujeme do té doby než bud ekolonka prázdná, následně

můžeme kolonku vyhodit.

3. Do kolonky bylo přidáno 350 μ l 70 % EtOH a důkladně propipetováno.
4. Vzorek byl přemístěn na RNeasy Min Elute kolonku ve 2 ml sběrné zkumavce a centrifugován 15 s. při 8000 G.
5. Dále bylo přidáno 700 μ l RW1 pufru a centrifugováno 15 s při min. 8000 G. Po centrifugaci byl roztok z kolonky vylit.
6. Do kolonky bylo přidáno 500 μ l RPE pufru a centrifugováno 15 s. při 8000 G (promytí membrány) a poté byla opět vylita sběrná zkumavka.
7. Následně bylo přidáno 500 μ l 80% EtOH a centrifugováno 2 min. při 8000G. Následně byla sběrná zkumavka vyhozena.
8. Kolonka se umístila do nové 2 ml sběrné zkumavky a s otevřeným víčkem se centrifugovala 5 min. max. rychlostí, čímž došlo k odstranění zbytkového alkoholu, který by vadil při další analýze. Po skončení centrifugace byla sběrná zkumavka opět vyhozena.
9. Kolonka se umístila do nové zkumavky (1,5 ml, RNase free) a eluovala se vázaná RNA do 14 μ l RNase free H₂O, nechalo se inkubovat 1 minutu a bylo stočeno 1 min. na max. rychlost.
10. Vzorek byl umístěn na led a byla stanovena koncentrace RNA na nanodropu (Spectrophotometer ND-1000, Nanodrop technologies).
11. Po změření koncentrace byl vzorek buď ihned použit na First-Strand cDNA Synthesis nebo byl zamražen do dalšího použití v - 80 °C.

4.3.2 First-Strand cDNA Synthesis

1. K vzorku 5 μ l total RNA byl přidán 1 μ l Oligo(dT)₁₂₋₁₈ primeru (18418-012, Invitrogen Life Technologies)
2. Vzorek byl přenesen do 42 °C (termocykler - T3 Thermoblock, 1712115, Biometria)
a bylo k němu přidáno 14 μ l přehřátého premixu (viz Tab. 12.). Vzorek byl ve 42 °C ponechán 30 min.

3. Následně byly ke vzorku přidány 2 μl Oligo(dT)-anchoru (200 ng / μl , Tab. 14.) a byl přenesen na 2 hodiny do 12 °C.
4. Po uplynutí 2 h. byl zahřát opět na 42 °C a byl k němu přidán 1 μl SuperScript III RT (200 U / μl) a vzorek se ponechá 1 hodinu (reverzní transkripce).
5. Vzorek se následně zahřeje na 30 min. na teplotu 70 °C (inaktivace enzymů). Nasyntetizovaná cDNA byla rovnou použita na PCR amplifikaci a zbylá byla zmražena v - 30 °C.

Tab. 14. Složení First-Strand cDNA Synthesis PREMIXU

Na jednu reakci (jeden vzorek), 14 μl	
5x First-Strand Buffer (620875, Invitrogen)	4 μl
0,1 M DTT (510985, Invitrogen)	1 μl
RNAseOut Inhibitor (574752, Invitrogen)	1 μl
10 mM dNTPs (Deoxinucleotide solution MIX, N0447S, BioLabs)	1 μl
10 mM ATP (P0756S, BioLabs)	1 μl
RNAse free H ₂ O	5 μl
10 U / μl T4 DNA ligasy (M0202S, BioLabs)	1 μl

4.3.3 RT PCR amplifikace

Naředěný PCR premix (viz Tab. 15.), k němuž se následně přidala cDNA (2 μl / vzorek) , byl umístěn do termocykleru a amplifikace probíhala v následujících krocích:

1. 94 °C 2 min.
2. 94 °C 45 s.
3. 57/60 °C 45 s. u Emi1/Emi2
4. 72 °C 1 min. Následně byl nastaven cyklus kroků 2. – 4. s 29x opakováním.
5. 72 °C 5 min.
6. 4 °C (pause)

Sekvence použitých primerů a podrobnější informace, jako je jejich vzdálenost od polyadenylačního signálu AATAAA a samotné sekvence Emi1 a Emi2 pro prase i myš jsou uvedeny v Příloze 1. Primery byly navrženy pomocí databáze NCBI a programu Primer-BLAST. Výrobce primerů – Integrated DNA technologies.

Tab. 15. Složení PCR PREMIXU

Na jednu reakci (jeden vzorek), 20 μl	
10x Polymeráze Thermopholl Buffer (B9004S, BioLabs)	10 μ l
10 mM dNTPs	0,6 μ l
10 μ M Emi1 / Emi2 primer (Tab. 16.)	1 μ l
10 μ M Oligo(dT)-anchor (Tab. 16.)	1 μ l
RNAse free H ₂ O	13,3 μ l
Tag DNA polymeráza (M0267L, BioLabs)	0,1 μ l

4.3.4 DNA PAGE

Příprava vzorků

Ke vzorkům po PCR amplifikaci byly přidány 4 μ l / vzorek vzorkovacího pufru 6x Loading Dye (R0611, Fermentas). Jako marker byl používán GeneRuler 50bp DNA Ladder (SM0371, Fermentas) v množství 3 μ l.

Příprava polyakrylamidového gelu

Byl používán 5 % gel o rozměrech v. 12,6 x š. 14 x hl. 0,15. Složení uvádí Tab. 16.

Tab. 16. Příprava polyakrylamidového gelu na SDS PAGE

30 ml - jeden gel	
5x TBE	6 ml
Acrylamide (30%), 29:1 (A3574,Sigma-Aldrich)	5 ml
Deionizovaná H ₂ O	18,8 ml
10% APS	300 µl
TEMED	30 µl
5x TBE, zásobní roztok 1 l	
Tris base	54 g
Kyselina boritá (005-007-00-2, PENTA)	27,5 g
0,5 M EDTA (pH 0,8) (kys. ethylendiamintetraoctová, 03610 2, Penta)	20 ml
Deionizovaná H ₂ O	Doplnit do 1 l
Skladování – 1 měsíc při RT.	
1x TBE, zásobní roztok 1 l	
5x TBE	200 ml
Deionizovaná H ₂ O	800 ml

Elektroforéza

Do Aparatury (P9DS, Owl Separation System, Inc.) bylo nalito 1x TBE (viz Tab. 16.). Před nasazením vzorků na gel nejprve spustila elektroforéza na 30 min. při 120 V. Po nasazení vzorků bylo nastaveno 100 V a elektroforéza se nechala běžet až po vyjetí spodního čela z gelu (cca 3,5 h.).

Barvení gelu a vizualizace

Po vyjmutí z aparatury byl u gelu označen levý spodní roh (pro zachování orientace) a gel byl barven přední stranou nahoru v roztoku GelRedu (Biot41002, LabMark) a 1x TBE 1 mg / ml.

K vizualizaci byly využity Kodac Gel Logic 100 / 200 Camera (C00289, Molecular imaging System carestream Health, Inc.), K. G. L. integrated iluminátor cabinet (C98063, imaging System carestream Health, Inc.) a PC program KODAK MI SE (standard edition r. 4. 5. 0, 1994 – 2007, Carestream Health, Inc.).

5 VÝSLEDKY

5.1 Studium exprese proteinů

5.1.1 Detekce proteinu Emi1

U prasečích oocytů byl protein Emi1 detekována ve všech fázích zrání. U pěti z šesti experimentů byla pozorována vzrůstající exprese od GV ke K20 (GVBD), která následně opět klesala. Ve fázi K44 (metafáze II) byla exprese proteinu stále viditelná, ale již pouze velmi slabě. U zbývajících experimentu byl tento tren shodný, s tím rozdílem, že byl protein detekován ve vyšších hladinách již ve fázi GV a následně plynule klesal až do fáze K44. Velmi rychlou degradaci proteinu demonstruje velký pokles síly signálu od K28 do K44. Reprezentativní výsledek ze šesti nezávislých experimentů ukazuje Obr. 7. Průměrné hodnoty optické density (OD x mm) v jednotlivých fázích zrání a popisnou statistiku těchto hodnot ukazuje Tab. 17. Výsledky hladin OD x mm během zrání prasečích oocytů v jednotlivých pokusech jsou zobrazeny v Grafu 1. a jejich průměry pak dále v Grafu 3.



Obr. 7. **Expres proteinu Emi1 během meiotického zrání prasečích oocytů.**

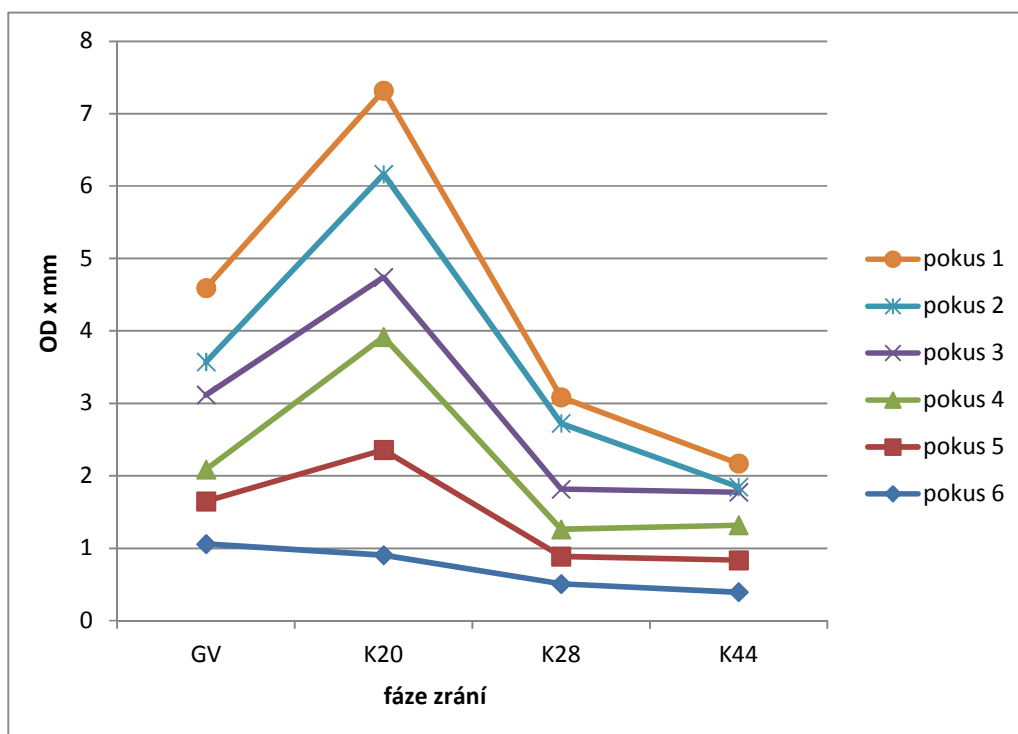
Detekce proteinu odpovídá 56 kDa. Extrakty z oocytů v příslušném stádiu meiotického zrání (50 oocytů/vzorek) byly rozděleny pomocí SDS-PAGE na 10 % gelu a přeneseny na PVDF membránu. Proteiny navázané na membránu pak byly detekovány pomocí specifických protilátek proti Emi1.

Tab. 17. Základní statistické charakteristiky hodnot optické density (OD x mm) proteinu Emi1 v jednotlivých fázích meiotického zrání prasečích oocytů.

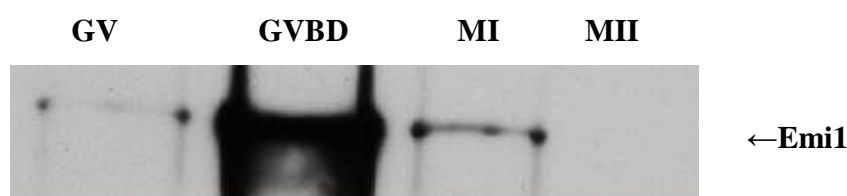
Statisticky významné rozdíly ($P < 0,05$) v naměřené optické densitě jsou označeny odlišnými superskripty (A, B).

Fáze zrání	GV	K20	K28	K44
Průměr	0,765474	1,219753 ^{A,B}	0,514105 ^A	0,361668 ^B
Směrodatná odchylka	0,30081	0,30757	0,20907	0,15231
Medián	0,80517	1,2890	0,44301	0,41654
Minimum	0,44072	0,82270	0,36100	0,072287
Maximum	1,0566	1,5609	0,90925	0,48479
Variační koeficient	0,39297	0,25216	0,40668	0,42113

Graf 1. Změny hladin proteinu Emi1 během meiotického zrání prasečích oocytů v jednotlivých pokusech.



U myších oocytů bylo u sledování exprese proteinu Emi1 prováděno opět šest nezávislých experimentů, z nichž vyšla polovina shodně tak, že síla exprese rostla od stádia GV do K20 (GVBD), kde dosahovala svého maxima a následně opět klesala až do fáze K44 (metafáze II), ve které nebyl protein již detekován. U dvou experimentů byla naměřena nevyšší hladina proteinu ve fázi GV a následně klesala až do fáze K28, dále nebyl protein opět detekován. U zbývajících pokusů byl trend shodný, ale ve fázi K44 byla hladina proteinu nepatrně vyšší. Reprezentativní vzorek zobrazuje Obr. 8. Hodnoty optické density (OD x mm) v jednotlivých fázích zrání a popisnou statistiku těchto hodnot ukazuje Tab. 18. Výsledky hladin OD x mm během zrání prasečích oocytů v jednotlivých pokusech jsou zobrazeny v Grafu 2. a jejich průměry pak v Grafu 3.



Obr. 8. **Expresa proteinu Emi1 během meiotického zrání myších oocytů.**

Detekce proteinu odpovídá přibližně 56 kDa. Extrakty z oocytů v příslušném stádiu meiotického zrání (50 oocytů/vzorek) byly rozděleny pomocí SDS-PAGE na 10 % gelu a přeneseny na PVDF membránu. Proteiny navázané na membránu pak byly detekovány pomocí specifických protilátek proti Emi1.

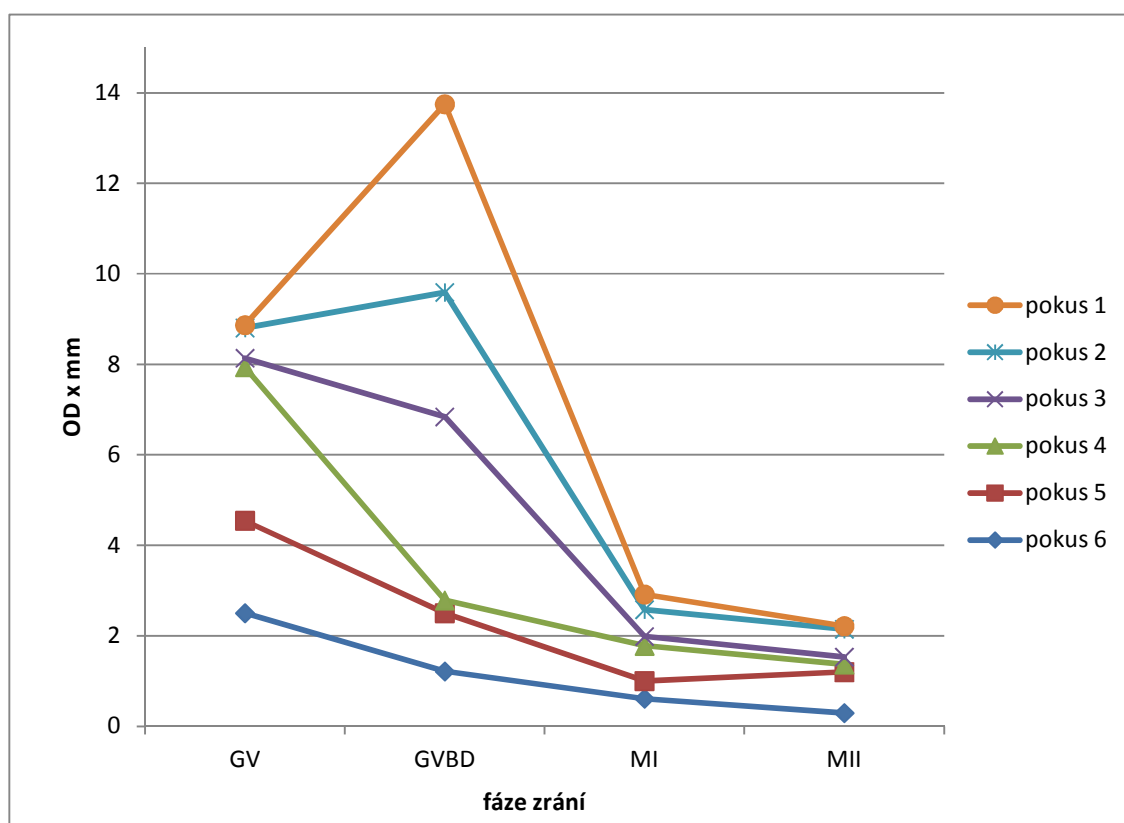
Tab. 18. **Základní statistické charakteristiky hodnot optické density (OD x mm) proteinu Emi1 v jednotlivých fázích meiotického zrání myších oocytů.**

U myších oocytů nebyly na hladině $\alpha = 0,05$ žádné statisticky významné rozdíly.

Fáze zrání	GV	GVBD	MI	MII
Směrodatná odchylka	1,3667	1,6136	0,21239	0,32449
Medián	1,3551	2,0213	0,48850	0,23156
Minimum	0,063000	0,27914	0,20574	0,068000

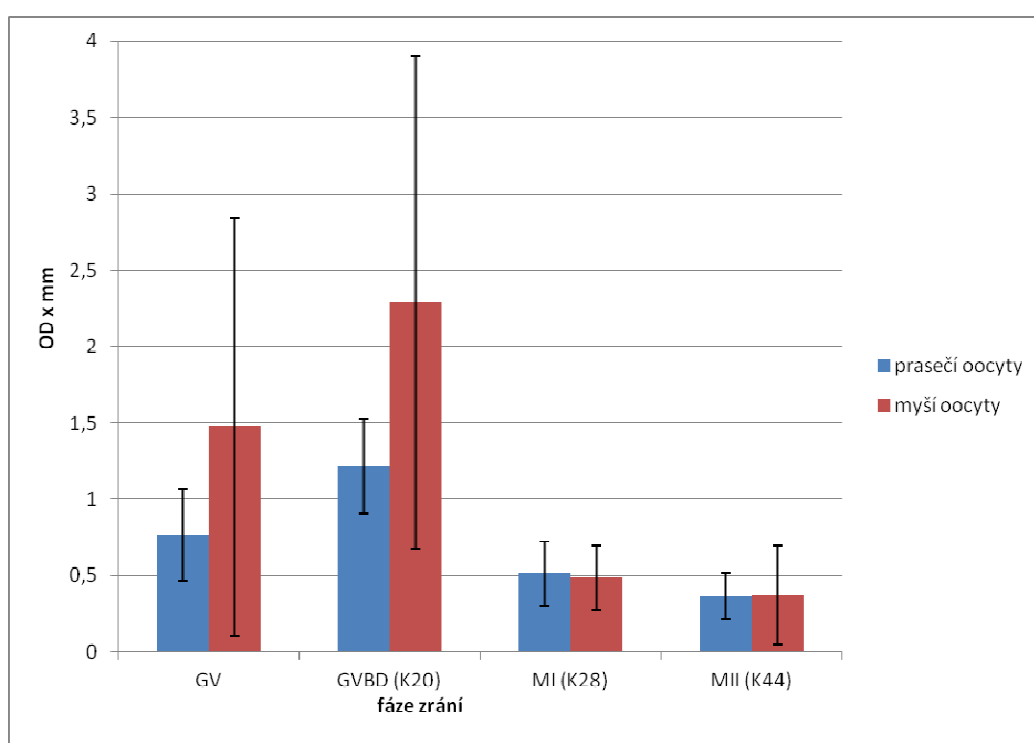
Maximum	3,3956	4,1570	0,78159	0,90623
Variační koeficient	0,92470	0,70413	0,43705	0,87833
Průměr	1,478029	2,291564	0,485963	0,369443

Graf 2. Změny hladin proteinu Emi1 během meiotického zrání prasečích oocytů v jednotlivých pokusech.



Graf 3. **Změny hladin proteinu Emi1 během meiotického zrání prasečích a myších oocytů.**

V jednotlivých fázích zrání jsou uvedeny průměrné hodnoty ze všech šesti měření. Pomocí černě vyznačených chybových úseček je zobrazena směrodatná odchylka měření v každé fázi zrání. Hladiny optické density u prasečích a myších oocytů ve stejných fázích zrání se na hladině významnosti $\alpha = 0,05$ statisticky významně nelišily.



5.1.2 Detekce proteinu Emi2

Co se týče detekce proteinu Emi2, byla potvrzena jeho exprese pouze v MII fázi (K44), a to jak u myších, tak i u prasečích oocytů. U každého modelu byly provedeny čtyři experimenty. Reprezentativní vzorek z těchto experimentů je zobrazen na Obr. 9 a Obr. 10. Hodnoty optické density (OD x mm) v jednotlivých fázích zrání a popisnou statistiku těchto hodnot ukazuje pro prasečí oocyty Tab. 19., pro myší oocyty Tab. 20. Výsledky hladin OD x mm během meiotického zrání prasečích oocytů jsou zobrazeny v Grafu 4., výsledky hladin OD x mm během meiotického zrání myších oocytů zobrazuje Graf 5. Průměry těchto naměřených hodnot zobrazuje Graf 6.



Obr. 9. **Expresse proteinu Emi2 během meiotického zrání prasečích oocytů.**

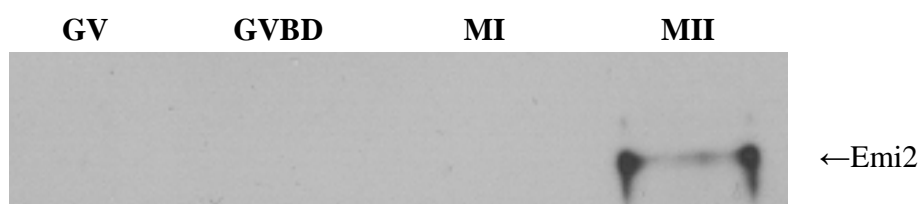
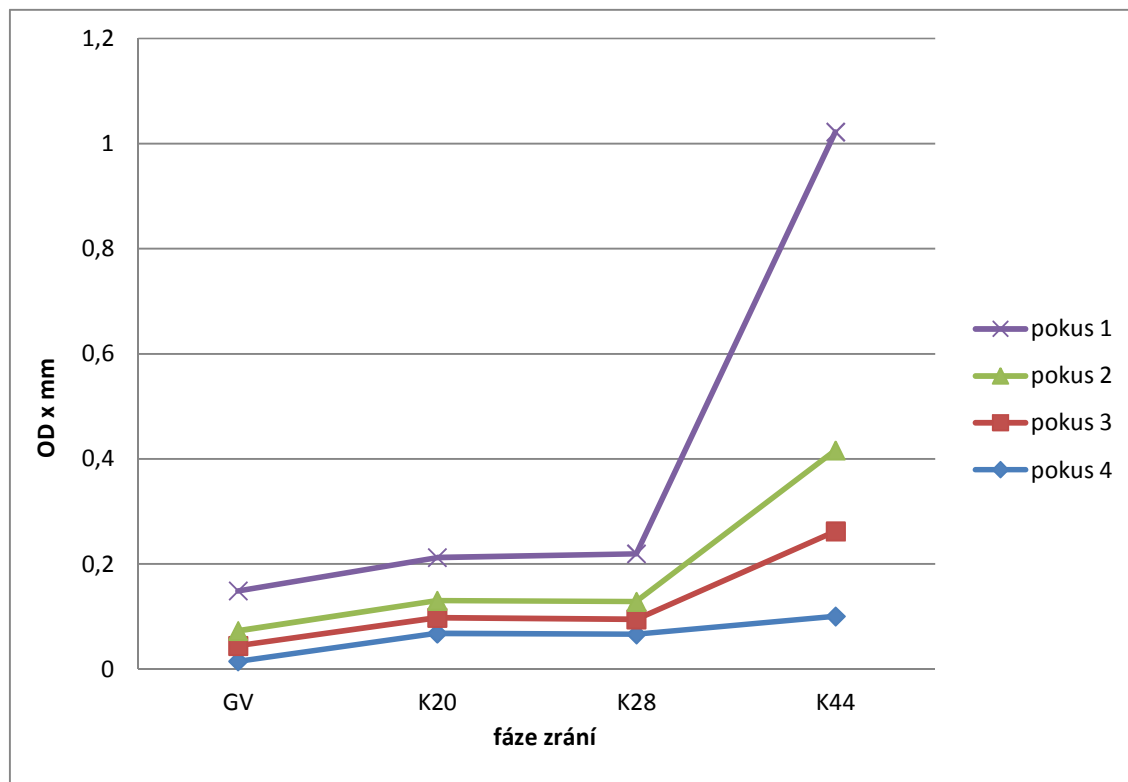
Detekce proteinu odpovídá přibližně 72 kDa. Extrakty z oocytů v příslušném stádiu meiotického zrání (50 oocytů/vzorek) byly rozděleny pomocí SDS-PAGE na 10 % gelu a přeneseny na PVDF membránu. Proteiny navázané na membránu pak byly detekovány pomocí specifických protilátek proti Emi2.

Tab. 19. Základní statistické charakteristiky hodnot optické density (OD x mm) proteinu Emi2 v jednotlivých fázích meiotického zrání prasečích oocytů.

U prasečích oocytů se průměry optické density na hladině významnosti = 0,05 v jednotlivých fázích zrání proteinu n Emi2 statisticky významně nelišily.

Fáze zrání	GV	K20	K28	K44
Průměr	0,037172	0,05304	0,054809	0,255479
Směrodatná odchylka	0,026740	0,025920	0,029314	0,23526
Medián	0,028966	0,050228	0,049899	0,15777
Minimum	0,014756	0,029703	0,028439	0,10037
Maximum	0,014756	0,082000	0,091000	0,60600
Variační koeficient	0,71937	0,48868	0,53483	0,92086

Graf 4. Změny hladin proteinu Emi2 během meiotického zrání prasečích oocytů v jednotlivých pokusech.



Obr. 10. Expresa proteinu Emi2 během meiotického zrání myších oocytů.

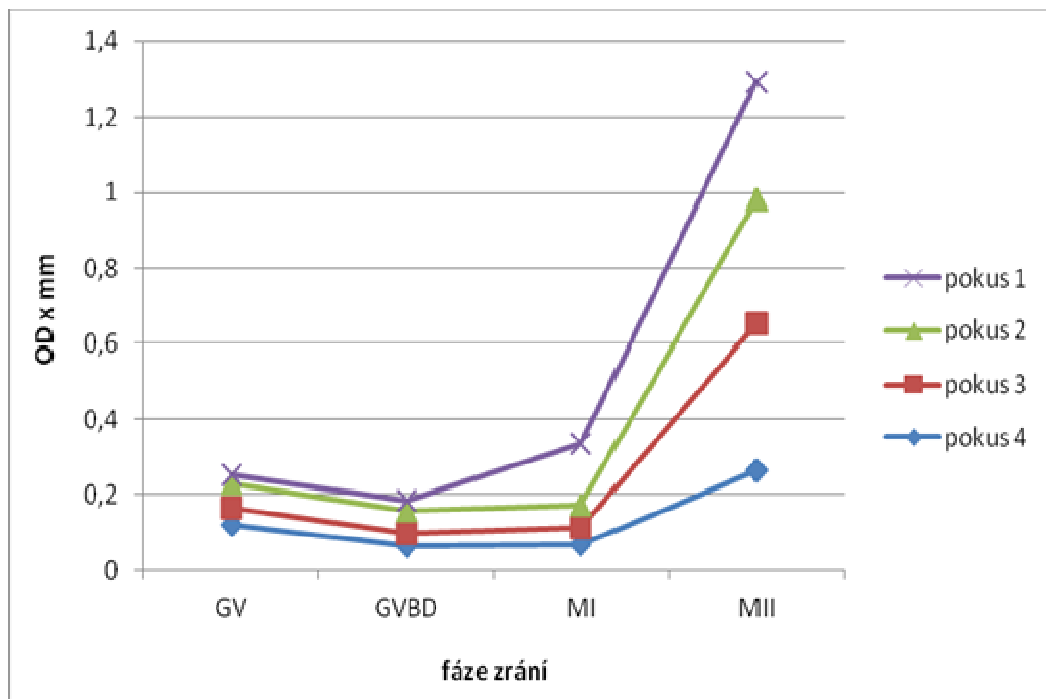
Detekce proteinu odpovídá 72 kDa. Extrakty z oocytů v příslušném stádiu meiotického zrání (50 oocytů/vzorek) byly rozděleny pomocí SDS-PAGE na 10 % gelu a přeneseny na PVDF membránu. Proteiny navázané na membránu pak byly detekovány pomocí specifických protilátek proti Emi2.

Tab. 20. Základní statistické charakteristiky hodnot optické density (OD x mm) proteinu Emi2 v jednotlivých fázích meiotického zrání myších oocytů.

Statisticky významné rozdíly ($P < 0,05$) v naměřené optické densitě jsou označeny superskripty (A,B,C).

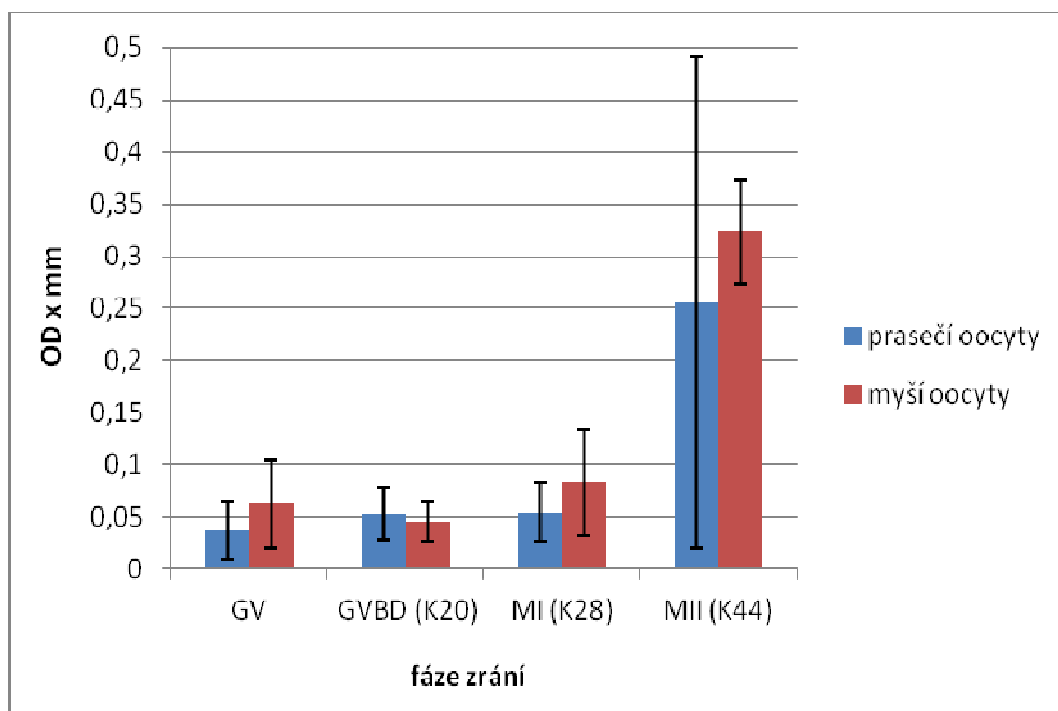
Fáze zrání	GV	GVBD	MI	MII
Průměr	0,062562 ^A	0,04605 ^B	0,083245 ^C	0,324142 ^{A,B,C}
Směrodatná odchylka	0,042089	0,019107	0,050574	0,050058
Medián	0,055512	0,048376	0,064643	0,32265
Minimum	0,019595	0,024298	0,045890	0,26493
Maximum	0,11963	0,063152	0,15780	0,38633
Variační koeficient	0,67275	0,41491	0,60753	0,15443

Graf 5. Změny hladin proteinu Emi2 během meiotického zrání myších oocytů v jednotlivých pokusech.



Graf 6. **Změny hladin proteinu Emi2 během meiotického zrání prasečích a myších oocytů.**

V jednotlivých fázích zrání jsou uvedeny průměrné hodnoty ze všech čtyř měření. Pomocí černě vyznačených chybových úseček je zobrazena směrodatná odchylka měření v každé fázi zrání. Hladiny optické density u prasečích a myších oocytů ve stejných fázích zrání se na hladině významnosti $\alpha = 0,05$ statisticky významně nelišily.



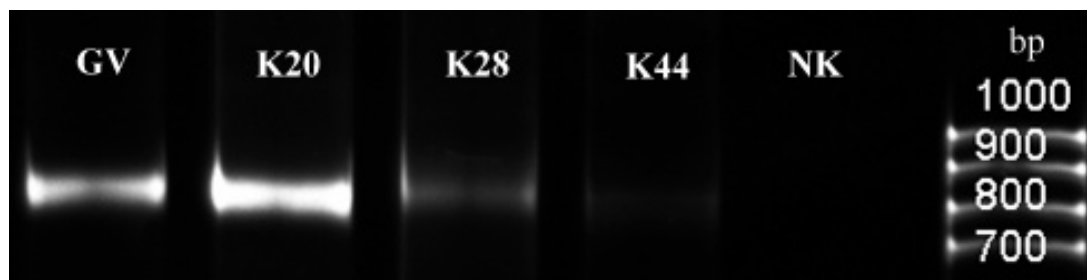
5.2 Studium polyadenylace mRNA

Pomocí specifických primerů pro mRNA Emi1 a mRNA pro Emi2 byl detekován 3' konec mRNA.

5.2.1 Polyadenylace mRNA Emi1

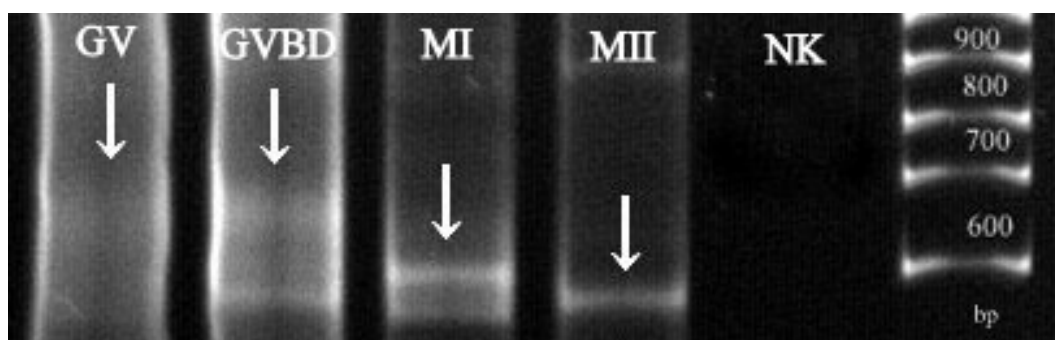
Signál mRNA pro Emi1 u prasečích oocytů rostl od fáze GV, svého maxima dosahoval je ve fázi K20 a následně až do fáze K44 klesal. Polyadenylace zde nebyla prokázána, ale detekce mRNA pro Emi1 je ve shodě se sledovanou expresí proteinu Emi1. Detekce mRNA pro Emi1 u prasečích oocytech zachycuje Obr. 11.

Signál mRNA pro Emi1 u myších oocytů se shoduje se sledovanou expresí proteinu. Je nejvyšší ve fázi GV a GVBD, kde je mRNA polyadenylována a následně klesá a dochází k deadenylaci ve fázi MI a MII. Detekci mRNA pro Emi1 na myších oocytech zachycuje Obr. 12.



Obr. 11. Detekce mRNA pro Emi1 u prasečích oocytů.

NK je negativní kontrola vzorku.



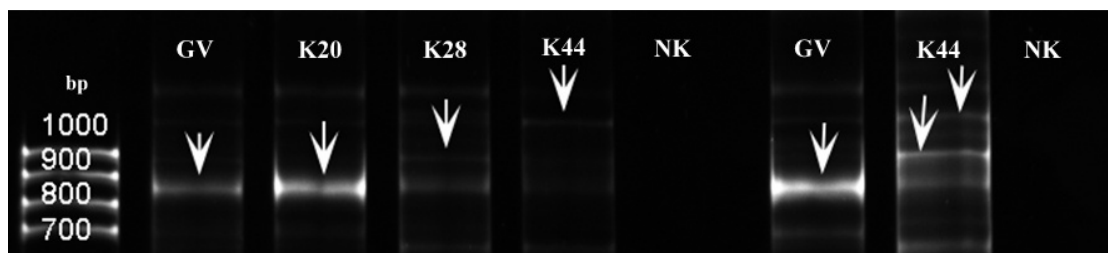
Obr. 12. Polyadenylace mRNA pro Emi1 u myšských oocytů.

Symbolem šipky je zobrazena polyadenylace a následná deadenylace. NK značí negativní kontrolu vzorku.

5.2.2 Polyadenylace mRNA Emi2

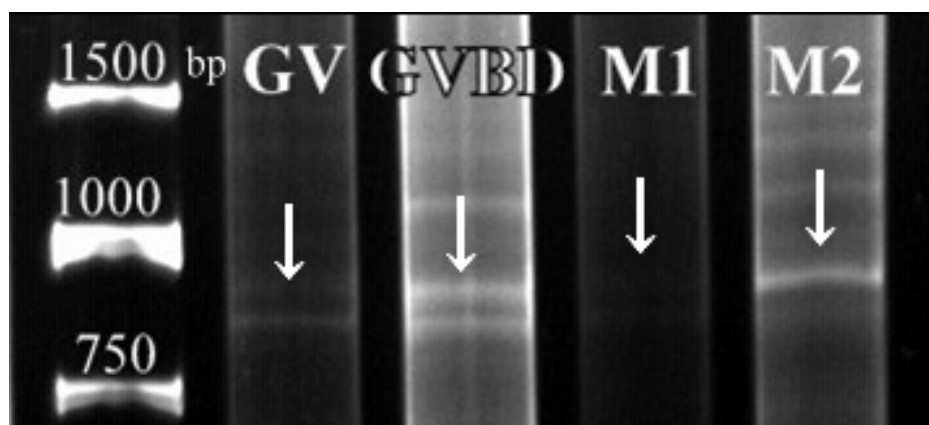
Detekce mRNA pro Emi2 u prasečích oocytů byla nejsilnější ve fázi K20, kde se potom postupně polyadenylovala až do fáze K44, kde můžeme vidět velký posun signálu, tudíž velkou změnu poly (A) konce. Tato polyadenylace je ve shodě se sledovanou expresí proteinu Emi2. Polyadenylaci mRNA pro Emi2 u prasete zobrazuje Obr. 13.

Nejmenší signál mRNA u myších oocytů byl detekován ve fázi MI, ale z důvodu zřejmě nekvalitního vzorku. Byla zde rovněž viditelná slabá polyadenylace od fáze MI do fáze MII, což je rovněž ve shodě se sledovanou expresí proteinu Emi2 u myších oocytů. Studium polyadenylace mRNA pro Emi2 na myších oocytech zachycuje Obr. 14.



Obr. 13. Polyadenylace mRNA Emi2 u prasečích oocytů.

Bílé šipky ukazují polyadenylaci, která nastává ve fázi K28 a K44. NK je negativní kontrola vzorků.



Obr. 14. Polyadenylace mRNA pro Emi2 u myších oocytů.

Bílé šipky ukazují polyadenylaci, která nastává po fázi GVBD. U vzorku MI jje málo viditelný signál, zřejmě z důvodu špatné izolace RNA.

6 DISKUSE

U sledované exprese Emi1 na modelu prasečích oocytů rostly hladiny proteinu v průměru od GV fáze, ve fázi K20 (GVBD) dosahovaly svého maxima. U přesně poloviny případů (tři experimenty z šesti) byl však trend takový, že největší expresi vykazoval protein Emi1 již ve fázi GV, což se shoduje s dostupnou literaturou (avšak zde bylo studium prováděno na myším modelu) (Marangos et al., 2007; Tunquist, 2003). Následně hladiny proteinu až do fáze K44 klesaly, což se shoduje s výsledky dosaženými Parronettem et al. (2004), kteří ovšem experimenty prováděli rovněž na myším modelu.

Směrodatná odchylka (s) mezi pozorováními ve fázi GV i K20 byla však téměř shodná ($\approx 0,3$), takže se od sebe hladiny GV a K20 v poměru až tak nelišily. Pro zjištění případné nesourodosti statistického souboru, u které se dále nedoporučuje použití průměrů pozorovaného znaku (v tomto případě hladin optické density na mm v jednotlivých fázích pozorování exprese proteinu), byly vypočítány variační koeficienty (V_k) pro každou fázi zrání. Žádný z těchto V_k nepřesáhl 50%, takže sledované soubory dat jsou statisticky sourodé.

Sledované exprese proteinu Emi1 u myších oocytů byla ve shodě s výsledky Marangose et al. (2007) a Tunquista (2003) (obě vědecké skupiny prováděly experimenty rovněž na myším modelu). Síla signálu rostla od GV fáze, v GVBD dosahovala svého maxima a následně docházelo k degradaci proteinu, a tím pádem poklesu exprese Emi1. Na rozdíl od exprese Emi1 u prasečích oocytů byl však ve fázi MII protein již u většiny pokusů nedetekovatelný, což je v rozporu se studií Tunquista (2003), který uvádí, že ve fázi MII je hladina Emi1 sice nejnižší a dále zůstává na konstantní úrovni až do fáze mitosy. Tato skutečnost je v rozporu s dosaženými výsledky u myších oocytů, ale koreluje s výsledky exprese Emi1 u oocytů prasečích. Zde vyvstává otázka, zda jde pouze o optický nedetekovatelný - slabý signál, protože při měření OD x mm byly naměřeny sice nejnižší hodnoty ve fázi MII, ale stále dosahovaly poměrně vysokých hodnot, z čehož se dá usuzovat, že slabý signál Emi1 v této fázi přetrvává, ale je pouhým okem špatně detekovatelný.

U exprese myšího Emi1 byl ve fázích zrání GV, GVBD a MII vysoký variační koeficient, převyšující 50 %, což poukazuje na již zmiňovanou nesourodost souboru dat. Toto je však problém práce s biologickým materiálem, kdy nedokážeme zajistit vždy

stejnou kvalitu buněk, i když jsou oocyty před samotnou kultivací či tvorbou GV vzorků důkladně selektovány. Výstupy těchto souborů v podobě grafu z průměrů v jednotlivých fázích zrání jsou proto zatíženy větší chybou, což je na Grafu 3. rovněž vidět i díky velikosti chybových úseček. Tuto chybu se budeme snažit v budoucím výzkumu eliminovat nejen již ošetřením dat kvůli pozadí na negativu, které bude diskutováno níže, ale rovněž vícečetným opakovaným pokusu a vyřazením nejvíce vychýlených dat (experimentů). Při práci s oocyty je však vytvoření obsáhlejších datových souborů zdlouhavý proces, neboť již samotná tvorba vzorků vyžaduje hodně času a je velká spotřeba myší a především již tak málo dostupných prasečích vaječniců.

Jak již bylo zmíněno v kapitole 5. Výsledky, při měření optické density hladiny daného proteinu ve vzorku, je problém s případným pozadím na negativu, které se může vytvořit jako pozadí protilátky, či na samotném negativu při ručním vyvolávání. Díky tomuto pozadí mohou být naměřené optické density lehce zkresleny, obzvláště v případě, kdy se jako pozadí mohou objevit nepravidelné skvrny. Tento problém zde nebyl anulován a jediným možným řešením je do budoucna buď měření pouze „čistých“ negativů, nebo případně „slepé“ měření nad pozorovaným či předpokládaným bandem proteinu a následné odečtení této hodnoty od hodnoty naměřené density, ani to však nezaručuje úplnou přesnost. Tyto odchylky mohou zkreslit statistické vyhodnocení, nemohou však zkreslit optické vyhodnocení experimentu, které je u těchto biologických materiálů stěžejním.

Obdobný problém je rovněž u statistického vyhodnocení exprese proteinu Emi2, který byl jak u myšího, tak i u prasečího modelu detekován pouze ve fázi MII (K44), což je v rozporu s prací Shojiho et al. (2006), kteří uvádějí, že k expresi Emi2 v oocytech dochází již po GVBD, Tunguist (2003), dokonce uvádí, že je Emi2 přítomný již v nezralých oocytech ještě před vstupem do meiosis. Oproti tomu Marangos et al. (2007) uvádějí, že k expresi proteinu Emi2 dochází při vydělení PB1, tudíž v přechodu MI do MII, což koreluje i s našimi výsledky, kdy byl protein Emi2 detekován pouze ve fázi MII.

U studia exprese proteinu Emi2 platí vše výše zmíněné, obzvláště možné zkreslení díky nízkým naměřeným hodnotám optické density, které byly změřeny ve fázích GV, GVBD (K20) a MI (K28) i přes skutečnost, že nebyl žádný signál opticky detekován. Nicméně zde byly hodnoty natolik nízké, že v průměru nepřesáhly ani u jedné proměnné hodnotu 0,07, takže zde můžeme s jistotou tvrdit, že se o okem nedetekovatelné signály

nejedná. Tyto hodnoty jsou však v grafech i přes tuto skutečnost ponechány, a to zejména z toho důvodu, že korelují s naměřenými hodnotami u MII (K44), kde můžeme rovněž počítat s o něco vyššími naměřenými hodnotami díky pozadí na negativech. Data by se dala ošetřit opět již zmiňovanými procesy, nebo v tomto případě, kdy s jistotou tvrdíme, že se opravdu nejedná o nedetekovatelný signál, by tyto zprůměrované hodnoty mohly být následně odečítány od naměřených hodnot ve fázi MII (K44). Avšak i zde si dovoluji poukázat na jistou nepřesnost, takže musíme s jistým chybovým zatížením počítat v každém případě.

Hodnoty variačního koeficientu nám poukazují na nesourodost dat ve fázích zrání prasečích oocytů GV, K28 a K44. Směrodatné odchyly jsou však až na fázi K44 velmi nízké. Ve fázi K44 je $s = 0,23526$, což je způsobeno tím, že u pokusu 1 byl hodně silný signál, oproti ostatním pokusům, kde byl signál slabší, což mohlo být způsobeno právě rozmanitostí biologického materiálu, či vnějšími vlivy při experimentu. Díky tomu je na Grafu 5. ve fázi K44 velká chybová úsečka. Tato problematika by šla shodně jako v případě myšního Emi1 vyřešit odstraněním vychýlených hodnot ze souboru dat před dalším statistické zpracování, což však nebylo v této práci uskutečněno, z důvodu (pro tyto účely) malého počtu opakování.

Vk pro hodnoty Emi2 u myších oocytů byly vysoké u GV a MI. Ve fázi MII byl však soubor dat velmi vyrovnaný, takže je na Grafu 6. zaznamenána o hodně menší chybová úsečka než u prasečích oocytů.

Co se týče polyadenylace mRNA pro Emi1 u prasečích oocytů, vyšly výsledky shodné s předchozím výzkumem (Procházková, 2012). Signál mRNA rostl od fáze GV, ve fázi K20 dosahoval svého maxima a následně klesal až do fáze K44, kde byl již velmi slabý, ale stále dobře detekovatelný, což je ve shodě se sledovanou expresí proteinu., což je rovněž v souladu s pozorováním polyadenylace mRNA Emi1 na modelu žáby *Xenopus Leavis* (Bulloc et Mendéz, 2008), kde dochází k polyadenylaci při přechodu profáze I a MI a k následné deadenylaci mezi MI a MII fází. Zde však samotná polyadenylace nebyla příliš patrná.

U myších oocytů byla mRNA pro Emi1 detekována shodně jako u oocytů prasečích. Zaznamenali jsme zde i postupnou deadenylaci z fáze GV a GVBD do fáze MI a MII, což

je ve shodě se sledovanou expresí. Z čehož můžeme usuzovat, že jsou exprimovány právě proteiny s polyadenylovanými mRNA a ostatní mRNA jsou degradovány.

Rovněž u mRNA pro Emi2 u prasečích oocytů byl signál nejsilnější ve fázi K20, kde byla následně detekována ve fázích K28 a K44 vzrůstající polyadenylace, což i zde koreluje se sledovanou expresí proetinu Emi2.

Shodná trend byl sledován i mRNA myších oocytů, kde byl však ve fázi MI slabý signál mRNA, zřejmě z důvodu špatné izolace RNA z oocytů či možné kontaminace RNAázami (slabý signál vyšel po použití této RNA opakovaně). Nicméně je i přes to vidět vzrůstající polyadenylace, která je také ve shodě se sledovanou expresí.

Naše výsledky se rovněž shodují s výsledky publikovanými na modelu žab *Xenopus Leavis* (Belloc et Méndez, 2008), kde byla zjištěno u mRNA pro Emi2 deadenylaci v profázi I (GV) a následná polyadenylaci v přechodu MI a MII fáze.

Pro ověření specifických sekvencí mRNA pro Emi1 a Emi2 budou dále po PCR z agarózového gelu vyřezány specifické bandy a pomocí MinElute Gel Extraction Kitu (28604, Qiagen–Gentra Systems) bude extrahovaná mRNA dále zaslána na sekvenování, abychom se skutečně ujistili, že se jedná o námi sledované specifické produkty a mohla být tato práce následně publikována. Tato extrakce byla již jednou zkoušena, ovšem díky nízkým hladinám mRNA nebylo vyizolováno dostatečné množství nutné pro sekvenci, takže v budoucnu plánujeme vyizolovat RNA z cca 300 oocytů/vzorek, případně udělat PCR z PCR. V plánu je rovněž namnožení požadované sekvence pomocí klonování.

7 ZÁVĚR

Cílem této práce bylo navázat na předešlou práci (Procházková, 2012) a kvantitativně zmapovat a porovnat expresi a aktivitu Emi1 a Emi2 proteinů a dále míru polyadenylace jejich mRNA v průběhu meiotického zrání savčích oocytů s nově navrženými primery.

V této práci se nám podařilo ověřit hypotézu, že exprese proteinů Emi1 a Emi2 se liší v jednotlivých fázích zrání oocytu a je v přímé závislosti na polyadenylaci 3' konce odpovídajících mRNA s výjimkou mRNA pro Emi1 u prasečích oocytů, kde nebyla polyadenylace prokázána.

Výstupy této práce jsou shrnuty v následujících bodech:

- Protein Emi1 byl u prasečích oocytů detekován ve všech fázích zrání a jeho exprese vzrůstala od GV ke K20, kde dosahovala svého maxima a následně klesala.
- Protein Emi1 byl u myších oocytů detekován ve fázích GV, GVBD a MI a jeho nejvyšší koncentrace byla ve fázi GVBD.
- Protein Emi2 byl detekován pouze ve fázi MII u prasečích i u myších oocytů.
- Signál mRNA pro Emi1 u prasečích oocytů rostl od fáze GV, svého maxima dosahoval je ve fázi K20 a následně až do fáze K44 klesal. Polyadenylace zde nebyla prokázána, ale detekce mRNA pro Emi1 je ve shodě se sledovanou expresí proteinu Emi1.
- Signál mRNA pro Emi1 u myších oocytů se shoduje se sledovanou expresí proteinu. Je nejvyšší ve fázi GV a GVBD, kde je mRNA polyadenylována a následně klesá a dochází k deadenylaci ve fázi MI a MII.
- Detekce mRNA pro Emi2 u prasečích oocytů byla nejsilnější ve fázi K20, kde se potom postupně polyadenylovala až do fáze K44, kde můžeme vidět velký posun signálu, tudíž dobře detekovatelný poly (A) konec. Tato polyadenylace je ve shodě se sledovanou expresí proteinu Emi2
- Nejmenší signál mRNA u myších oocytů byl detekován ve fázi MI, ale z důvodu zřejmě nekvalitního vzorku. Byla zde rovněž viditelná slabá polyadenylace od fáze MI do fáze MII, což je rovněž ve shodě se sledovanou expresí proteinu Emi2 u myších oocytů.

mRNA pro Emi1 u prasete budeme po vyříznutí z gelu sekvenovat a po sekvenaci následně navrhovat nový, specifický primer (ručně nebo pomocí metody RISC), pomocí kterého se budeme snažit prokázat polyadenylaci mRNA a porovnat jí se sledovanou expresí. Na tuto práci bude dále navázáno disertační prací, ve které se budu věnovat především proteinu Emi2, o kterém je toho doposud velmi málo publikováno. Tato práce bude zaměřena nejen na oocyty, ale rovněž na časný embryonální vývoj a budou v ní použity zde uváděné, ozkoušené metodiky.

V tomto výzkumu chceme rovněž pokračovat z důvodu, že polyadenylace mRNA u Emi1 a Emi2 byla v dostupných studiích prováděna především na modelu žab *Xenopus Leavis* a naše výsledky u prasečího a myšího modelu tak mohou významně ovlivnit studium meiotického zrání savčích oocytů a potažmo i časných embryí.

8 SEZNAM POUŽITÝCH ZKRATEK A SYMBOLŮ

2n	diploidní počet (chromosomů...)
3' konec	3' nepřekládaný (netranslatovaný) konec mRNA, tj. část mRNA za STOP kodonem
4C oocyt	transkripčně aktivní oocyt
A	adenin
APC/C	anaphase promoting komplex/cyclosome, E3-ubiquitinligáza, komplex proteinů katalyzující polyubiquitinaci proteinů určených k degradaci, aktivována při metafáze/anafáze přechodu
APS	peroxosíran amonný
AREs	AU rich elements (elementy bohaté na adenin a uracil)
ATP	adenosintrifosfát
BSA	hovězí sérový albumin
Bub1	budding uninhibited by benzimidazoles 1, serin/treonin protein kináza
CaMKII	Ca ²⁺ /kaldmodulin dependentní protein kináza II
Cdc	cell division control, označení proteinů majících funkci v regulaci buněčného cyklu
Cdc20	aktivátor APC/C operující v anafázi
Cdc25	rodina duálních fosfatáz schopných defosforylovat Thr14 a Tyr15 na Cdk1/2
Cdk	cyklin dependentní kináza
Cdk1	cyklin-dependentní kinasa 1
Cdk1/cyklin B	viz MPF
cDNA	copy DNA
c-mos	kináza aktivující MAP-signální dráhu v oocytech; nutná pro aktivitu CSF
CPEs	cytoplasmatické polyadenylační elementy
CSF	cytostatický faktor, faktor udržující oocyty v metafázi II do oplození, udržuje vysokou aktivitu Cdk1

DEPC	diethylpyrokarbonát
DNA	deoxyribonukleová kyselina
DNA PAGE	nedenaturační polyakrylamidová gelová elektroforéza
dsDNA	double stranded DNA, dvouvláknová DNA
E2F	transkripční faktor, operující v G1/S přechodu, aktivuje geny klíčové pro S-fázi
E3-ubiquitinligáza	ligáza katalyzující vlastní polyubiquitinaci cílového proteinu, jež pak vede k jeho proteasom-dependentní degradaci
EDTA	kyselina ethylendiamintetraoctová
Emi1	FBXO5, F box only protein 5, ranný mitotický inhibitor, inhibitor APC/C, exprese stimulována E2F transkripčním faktorem
Emi2	FBXO34, F box only protein 34, inhibitor APC/C
F-box	F-box proteiny určují substrátovou specifitu SCF1 ubiquitinačního komplexu
FCS	fetální telecí sérum
GSC	germline stem cells, zárodečné kmenové buňky
GV	germinal vesicle, zárodečný váček
GVBD	germinal vesicle breakdown, rozpad zárodečného váčku, bývá členěn do fází GV-0, GV-1, GV-2, GV-3, GV-4
HEPES	N-[2-hydroxyethyl]piperazin-N'-[2-ethansulfonová kyselina]
IBMX	isobutylmethylxantin
IVM	in vitro zrání (in vitro maturation)
m ⁷ G	7-metylguanosin
MAPK	MAP-kináza, mitogen aktivační protein kináza
MEK1	kináza MAP-kinázy; enzym aktivující MAP-kinázu
MI	metafáze I
MII	metafáze II
MPF	maturation promoting factor, označení pro komplex Cdk1/cyklin B, který je nutný pro vstup do mitosy/meiosy
mRNA	messenger RNA, mediátorová RNA, vzniká během

	transkripce z DNA a slouží jako templát pro proteinový řetězec
Myt1	kináza, která spolu s Wee1 fosforyluje Cdk1 na Thr14 a Tyr15
n	haploidní počet (chromosomů...)
OD	optická densita
p9rsk	kináza, která je aktivovaná fosforylací katalyzovanou MAPK (ERK1/ERK2), u <i>Xenopus</i> oocytů mj. inhibičně fosforyluje Myt1
PAGE	polyakrylamidová gelová elektroforéza
PCR	polymeráze chain reaction, polymerázová řetězová reakce
PGC	primordial germ cells, primordiální zárodečné buňky
poly(A)	polyadenylát
PVA	polyvinylalkohol
pre-MPF	neaktivní forma MPF
pre-mRNA	prekurzorová mRNA
RNA	ribonukleová kyselina
RT PCR	reverse transcription PCR, reverzní transkripce PCR
s	směrodatná odchylka
SAC	spindle assembly checkpoint, mechanismus, který hlídá správné napojení chromosomů na dělicí vřeténko
SCF	E3-ubiquitin ligáza
SCF β -TrCP	F-box protein nutný pro degradaci Cdc25
SDS	laurylsíran sodný
SDS PAGE	denaturační PAGE
S-fáze	období buněčného cyklu mezi G1-fází a G2-fází, v této době dochází k replikaci DNA
TEMED	N,N,N',N'-tetramethyldiamin
TRIS	N-tris[hydroxymethyl]-methyl-2-aminoethansulfonová kyselina
TTBS	Tween – TRIS buffer solution

Thr14	treonin-14
Tyr15	tyrosin-15
UTR	nepřekládaná oblast (untranslated region)
V _k	variační koeficient
Wee1	kináza, která spolu s MYT1 fosforyluje Cdk1 na Thr14 a Tyr15
β1	transfomující růstový faktor

9 SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY, OBRÁZKŮ, TABULEK A GRAFŮ

9.1 Seznam literatury

- Abrieu, A., Doree, M., Fisher, D. 2001. The interplay between cyclin-B-Cdc2 kinase (MPF) and MAP kinase during maturation of oocytes. *Journal of cell science* 114: 257 - 267. ISSN 0021-9533
- Abrieu, A., Doree, M., Fisher, D. 2001. The interplay between cyclin-B-Cdc2 kinase (MPF) and MAP kinase during maturation of oocytes. *Journal of cell science* 114: 257 - 267. ISSN 0021-9533
- Albertini, D. F. 1992. Regulation of meiotic maturation in the mammalian oocyte: Interplay between exogenous cues and the microtubule cytoskeleton. *BioEssays* 14 (2): 97-103. ISSN 0265-9247
- Alberts, B., Bray, D., Johnson, A., Lewis, J., Raff, M., Roberts, K., Walter, P. 1998. *Základy buněčné biologie*. Ústí nad Labem: Espero publishing s.r.o., 2. vydání, 630 s. ISBN 80-902906-2-0
- Anger, M. 2001. Identifikace Polo kinázy a její exprese v průběhu buněčného cyklu. Disertační práce, Přírodovědecká fakulta Univerzity Karlovy v Praze
- Arias, E. E., Walter, J. C. 2007. Strength in numbers: Preventing rereplication via multiple mechanisms in eukaryotic cells. *Genes and Development* 21 (5): 497–518. ISSN 0890-9369
- Bashir, T., Dorrello, N. V., Amador, V., Guardavaccaro, D., Pagano, M. 2004. Control of the SCF(Skp2-Cks1) ubiquitin ligase by the APC/C(Cdh1) ubiquitin ligase. *Nature* 428: 190 - 193. ISSN 0028-0836
- Belloc, E. 2008. Identification of a new deadenylation negative feedback loop that regulates meiotic progression. PhD Thesis, Universitat Pompeu Fabra
- Belloc, E., Méndez, R. 2008. A deadenylation negative feedback mechanism governs meiotic metaphase arrest. *Nature* 452: 1017 – U1. ISSN 0028-0836

- Bielanska-Osuchowska, Z. 2006. Oogenesis in pig ovaries during the prenatal period: ultrastructure and morphometry. *Reproductive Biology* 6: 161 – 193. ISSN 0975-4296
- Brewis, I. A., Wong, C.H. 1999. Gamete recognition: sperm proteins that interact with the egg zona pellucida. *Reviews of Reproduction* 3: 135 - 42. ISSN 1359-6004
- Buehr, M. 1997. The Primordial Germ Cells of Mammals: Some Current Perspectives. *Experimental Cell Research* 232: 194-207. ISSN 0014-4827
- Castro, A., Lorca, T. 2005. Exploring meiotic division in *Cargèse*. *European Molecular Biology Organisation* 6: 821 – 825. ISSN 0261-4189
- Clapham, D. E. 1995. Calcium signaling. *Cell Biology* 80: 259 – 268. ISSN 1471-0072
- Carroll, J., Swann, K., Whittingham, D., Whitaker, W. 1994. Spatiotemporal dynamics of intracellular Ca^{2+} oscillations during the growth and meiotic maturation of mouse oocytes. *Development* 120: 3507 - 3517. ISSN 1011-6370
- Cenciarelli, C., Chiaur, D. S., Guardavaccaro, D., Parks, W., Vidal, M. and Pagano, M. 1999. Identification of a family of human F-box proteins. *Current Biology* 9: 1177-1179. ISSN 0960-9822
- Ciechanover, A. 2005. Proteolysis: from the lysosome to ubiquitin and the proteasome. *Nature Reviews Molecular Cell Biology* 6: 79 – 86. ISSN 1471-0072
- 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: 282 – 285. ISSN 0028-0836
- Coller, J. M., Gray, N. K., Wickens, M. P. 1998. mRNA stabilization by poly(A) binding protein is independent of poly(A) and requires translation. *Genes and Development* 12: 3226 - 3235. ISSN 0890-9369
- Craig, K. L., Tyers, M. 1999. The F-box: a new motif for ubiquitin dependent proteolysis in cell cycle regulation and signal transduction. *Progress in Biophysics and Molecular Biology* 72 (3): 299–328. ISSN 0079-6107
- de Vantéry, C., Gavin, A. C., Vassalli, J. D., Schorderet-Slatkine, S. 1996. An accumulation of p34cdc2 at the end of mouse oocyte growth correlates with the acquisition of meiotic competence. *Journal of Developmental Biology* 174: 335 - 344. ISSN 2221-3759
- Dekel, N. 1995. Molecular control of meiosis. *Trends in Endocrinology and Metabolism* 6: 6 - 10. ISSN 1043-2760

- Dong, X., Zavitz, K. H., Thomas, B. J., Lin, M., Campbell, S. and Zipursky, S. L. 1997. Control of G1 in the developing *Drosophila* eye: *rca1* regulates Cyclin A. *Genes and Development* 11: 94-105. ISSN 0890-9369
- Dumont, J., Umbhauer, M., Rassinier, P., Hanauer, A., Verlhac, M. H. 2005. p90Rsk is not involved in cytostatic factor arrest in mouse oocytes. *Journal of Cell Biology* 169: 227–231. ISSN 0021-9525
- Eddy, E. M., Clark, J. M., Gong, D., Fenderson, B. A. 2005. Origin and migration of primordial germ cells in mammals. *Gamete Research* 4: 333 – 362. ISSN 0148-7280
- Eppig, J. J. 2001. Oocyte control of ovarian follicular development and function in mammals. *Journal of Reproduction and Fertility* 122: 829 – 380. ISSN 0022-4251
- Ewen, K. A., Koopman, P. 2010. Mouse germ cell development: From specification to sex determination. *Molecular and Cellular Endocrinology*, 323: 76 – 93. ISSN 0303-7207
- Fan, H. Y., Sun, Q. Y. 2004. Involvement of Mitogen-activated protein kinase cascade during oocyte maturation and fertilization in mammals. *Biology of Reproduction* 13: 535 - 547. ISSN 0006-3363
- 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 Oocytes. *Biology of Reproduction* 69: 1552 – 1564. ISSN 0006-3363
- Fire, A., Xu, S., Montgomery, M. K., Kostas, S. A., Driver, S. E., Mello, C. C. 1998. Potent and specific genetic interference by double-stranded RNA in *Caenorhabditis elegans*. *Nature* 391: 806-11. ISSN 0028-0836
- Freeman, B. 2003. The active migration of germ cells in the embryos of mice and men is a myth. *Reproduction* 125: 635–643. ISSN 1470-1626
- Fulka, J. Jr. 1983. Nuclear maturation in pig and rabbit oocytes after interspecific fusion. *Journal of Experimental Zoology* 146: 212 – 218. ISSN 1548-8969
- Gautier, J., Matsukawa, T., Nurse, P. a Maller, J. 1989. Dephosphorylation and activation of *Xenopus* p34cdc2 protein kinase during the cell cycle. *Nature* 339: 626 - 629. ISSN 0028-0836

- 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 – 16. ISSN 1747-3403
- Haccard, O., Sarcevic, B., Lewellyn, A. L., Hartley, R., Roy, L. M., Ozimi, T., Ericsson, E., Maller, J. L. 1993. Induction of metaphase arrest in cleaving *Xenopus* embryos by MAP kinase. *Science* 262: 1262 – 1265. ISSN 0036-8075
- Haering, C. H., Lowe, J., Hochwagen, A., Nasmyth, K. 2002. Molecular architecture of SMC proteins and the yeast cohesin complex. *Molecular Cell* 9: 773 – 788. ISSN 1097-2765
- Hansen, D. V., Pomerening, J. R., Summers, M. K., Ferrell, J. E., Miller, J. J., Jackson, P. K. 2007. Emi2 at the Crossroads, where CSF Meets MPF. *Cell Cycle* 6: 732 – 738. ISSN 1538-4101
- Homa, S. T., Carroll, J., Swann, K. 1993. The role of calcium in mammalian oocyte maturation and egg activation. *Molecular Human Reproduction* 8: 1274 - 1281. ISSN 1360 9947
- Hoodbhoy, T., Dean, J. 2004. Insights into the molecular basis of sperm-egg recognition in mammals. *Reproduction* 127: 417 – 22. ISSN 1470-1626
- Hsu, J. Y., Reimann, J. D., Sorensen, C.S., Lukas, J., Jackson, P. K. 2002. E2F-dependent accumulation of hEmi1 regulates S phase entry by inhibiting APC(Cdh1). *Nature Cell Biology* 4: 358 - 366. ISSN 1465-7392
- Hsueh, A. J. W., Hakan, B., Tsafiriri, A. 1994. Ovarian Follicle Atresia: A Hormonally Controlled Apoptotic Process (online). *Endocrine Reviews* 15: 707 – 724. ISSN 1945-7189, poslední revize 2011 (citováno 13. 12. 2012), dostupné z <http://edrv.endojournals.org/content/15/6/707.abstract?sid=95dfa987-72f2-4791-9511-f67a501b328b>
- Chiquoine, A. D. 1954. The identification, origin, and migration of the primordial germ cells in the mouse embryo. *The Anatomical record* 118: 135-46. ISSN 1932-8486
- Inoue, M., Naito, K., Aoki, F., Sato, E., Tayoda, Y. 1995. Activation of mitogen – activated protein kinase during maturation in porcine oocytes. *Zygote* 3: 265 – 271. ISSN 0967-1994
- 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: 145 – 50. ISSN 0028-0836

- Jones, K. T. 2004. Turning it on and off: M-phase promoting factor during meiotic maturation and fertilization. *Molecular Human Reproduction* 10: 1 – 5. ISSN 1360-9947
- Jones, K. T. 2005. Mammalian egg activation: from Ca²⁺ spiking to cell cycle progression. *Society for Reproduction and Fertility* 130: 813 – 823. ISSN 1470–1626
- Josefsberg, L. B., Galiani, D., Lazar, S., Kaufman, O., Seger, R., Dekel, N. 2003. Maturation-Promoting Factor Governs Mitogen-Activated Protein Kinase Activation and Interphase Suppression During Meiosis of Rat Oocytes. *Biology of Reproduction* 68: 1282 ISSN 0006-3363
- Kalous, J. 2011. Zrání a oplození oocytů in vitro. Laboratoř fyziologie reprodukce, Ústav živočišné fyziologie a genetiky AV ČR Liběchov. Poslední revize 2011 (citováno 17. 9. 2012), dostupné z <<http://www.iapg.cas.cz/uzfg/cz/vyuka/prednaska/12kultivace.pdf>>
- Kikuchi, K., Naito, K., Noguchi, J., Shimada, A., Kaneko, K., Yamashita, M., Tojo, H., Toyoda, Y. 1999. Inactivation of p34cdc2 kinase by the accumulation of its phosphorylated forms in porcine oocytes matured and aged in vitro. *Zygote*. 7: 173 - 179. ISSN 0967-1994
- Kipreos, E. T, Pagano, M. 2000. The F-box protein family. *Genome Biology* 1 (5): REVIEWS3002.I-3002.7. ISSN 1465-6906
- Kishimoto, T. 2003. Cell-cycle control during meiotic maturation. *Current Opinion in Cell Biology* 15: 54 - 63, ISSN 0955-0674
- Kliment, J., Kliment, M. 1989. Reprodukcia hospodárskych zvierat. Bratislava: Priroda ve spolupráci so SZN Praha, 2. vydání, 391 s. ISBN 80-070-0027-5
- Knockaert, M., Greengard, P., Meijer, L. 2002. Pharmacological inhibitors of cyclin - dependent kinases. *Trends in Pharmacological Science* 23: 417 – 425. ISSN 0065-3136
- Knoz, J. 1979. Obecná zoologie I. Praha: SPN, 661 s.
- Korf, B. R. 2006. Human Genetics and Genomics. Wiley-Blackwell, 3rd edition, 288 p. ISBN 978-0-632-04656-0
- Kubelka, M., Anger, M., Kalous, J. 2002. Chromosome condensation in pig oocytes: Lack of a requirement for either cdc2 kinase or MAP kinase activity. *Molecular reproduction and development* 63: 110-118. ISSN 1040-452X

- Kubiak, J.Z, El Dika M. 2011. Canonical and Alternative Pathways in Cyclin-Dependent Kinase 1/Cyclin B Inactivation upon M-Phase Exit in *Xenopus laevis* Cell-Free Extracts. *Enzyme Research* 2011. ISSN 2090-0414
- Levesque, J. T., Sirard, M. A. 1996. Resumption of meiosis is initiated by the accumulation of cyclin B in bovine oocytes. *Biology of Reproduction* 55: 1427 – 1436. ISSN 0006-3363
- Liu, J., Grimison, B., Lewellyn, A. L., Maller, J. L. 2006. The APC/C inhibitor EMI2 is essential for meiotic but not mitotic cell cycles. *The Journal of Biological Chemistry* 281 (46): 34736 – 34741. ISSN 0021-9258
- Lodish, H., Berk, A., Matsudaira, P., Kaiser, Ch. A., Krieger, M., Scott, M. P., Zipursky, L., Darnell, J. 2003. *Molecular Cell Biology*. New York: W. H. Freeman. 5th edition, 973 p. ISBN 0-7167-4366-3
- Madgwick, S., Jones, K. T. 2007. How eggs arrest at metaphase II: stabilisation plus APC/C inhibition equals Cytostatic Factor. *Cell Division* 26: 2 – 4. ISSN: 1747-1028
- 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. *Journal of Cell Biology* 174: 791-801. ISSN 0021-9525
- Macháty, Z., Ramsoondar, J. J., Bonk, A. J., Prather, R. S., Bondioli, K. R. 2002. Na⁺/Ca²⁺ exchanger in Porcine Oocytes. *Biology of Reproduction* 67: 1133 – 1139. ISSN 0006-3363
- Machida, Y. J., Dutta, A. 2007. The APC/C inhibitor, Emi1, is essential for prevention of rereplication. *Genes and Development* 21: 184-194. ISSN 0890-9369
- Malgrange, B., Knockaert, M., Belachew, S., Nguyen, L., Moonen, G., Meijer, L., Lefebvre, P. P. 2003. Inhibition of cyclin-dependent kinases induces differentiation of supernumerary hair cells and Deiters' cells in the developing organ of Corti. *The FASEB Journal* 17: 2136 - 2138. ISSN 0892-6638
- Manning, G., Whyte, D.B., Martinez, R., Hunter, T., Sudarsanam, S. (2002): The Protein Kinase Complement of the Human Genome. *Science* 298: 1912 – 1934. ISSN 0036-8075
- 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). *Journal of Cell Biology* 176: 65-75. ISSN 0021-9525

- Marvan, F., Hampl, A., Hložánková, E., Křesán, J., Massanyi, L., Vernerová, E. 1992. Morfologie hospodářských zvířat. ČZU v Praze: Brázda. 328 s. ISBN 978-80-213-1658-4
- Masopust, J., Průša, R. 2003. Patobiochemie buňky. Praha: Univerzita Karlova, 2. lékařská fakulta, 344 s. ISBN 80-239-1011-6
- Masui, Y. 1991. The role of cytotostatic factor (CSF) in the control of oocyte cell cycle – a summary of 20 years study. *Development Growth and Differentiation* 33: 543 - 551. ISSN 0012-1592
- Masui, Y., Markert, C. L. 1971. Cytoplasmic control of nuclear behaviour during meiotic maturation of frog oocytes. *Journal of Experimental Zoology* 177: 129 – 146. ISSN 1548-8969
- Mayes, M. 2002. The meiotic arrest of bovine oocytes. Disertační práce, Université Laval, Quebec.
- Meijer, L., Borgne, A., Mulner., O, Chong, J. P. J., Blow, J. J., Inagaki, N., Inagaki, M., Delcros, J. G., Moulinoux, J. P. 1997. Biochemical and cellular effects of roscovitine, a potent and selective inhibitor of the cyclin-dependent kinases cdc2, cdk2 and cdk5. *Europien Journal of Biochemistry* 243: 527 – 536. ISSN 0014-2956
- Méndez, R., Richter, J. D. 2001. Translational control by CPEB: a means to the end. *Nat Rev Molecular and Cellular Biology* 2: 521 - 529. ISSN 0270-7306
- Moor, R., Dai, Y. 2001. Maturation of pig oocytes in vivo and in vitro. *Journal of Reproduction and Fertility* 58: 91 - 104. ISSN 0022-4251
- Motlík, J., Pavlok, A., Kubelka, M., Kalous, J., Kalab, P. 1998. Interplay between CDC2 kinase and MAP kinase pathway during maturation of mammalian oocytes. *Theriogenology: An International Journal of Animal Reproduction* 49: 461 - 9. ISSN 0093-691X
- Motlík, J., Rozet, N., Fulka, J. 1984. Meiotic competence in vitro of pig oocytes isolated from early antral follicles. *Journal of Reproduction and Fertility* 72: 323 – 328, ISSN 0022-4251
- Murray, A. W. 2004. Recycling the cell cycle: cyclins revisited. *Cell Biology* 116:221-34. ISSN 1465-7392
- Murray, A. W., Salomon, M. J., Kirschner, M. W. 1989. The role of cyclin synthesis and degradation in the control of maturation promoting factor activity. *Nature* 339: 280 - 286. ISSN 0028-0836
- Nebreda, A. R., Ferby, I. 2000. Regulation of meiotic cell cycle in oocytes. *Current opinion in cell biology* 12: 666 - 675. ISSN 0955-0674

- Novák, B. 2010. Dynamics of molecular regulatory network (online). Poslední revize 5. 2. 2010 (citováno 30. 2. 2013), dostupné z
< <http://www.bioch.ox.ac.uk/aspsite/index.asp?pageid=593>>
- Nurse, P. 1990. Universal control mechanism regulating onset of M - phase. *Nature* 344: 503 – 508. ISSN 0028-0836
- Ohashi, S., Naito, K., Sugiura, K., Iwamori, N., Goto, S., Naruoka, H., Tojo, H. 2003. Analyses of mitogen-activated protein kinase function in the maturation of porcine oocytes. *Biology of reproduction* 68: 604 - 609. ISSN 0006-3363
- 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: 5187 - 5191. ISSN 0027-8424
- Ozdzinski, W. 1967. Observations on the origin of primordial germ cells in the mouse. *Zoologica Poloniae* 17: 367-79. ISSN 0044-510
- Palmer, A., Gavin, A. C., Nebreda, A. R. 1998. A link between MAP kinase and p34(cdc2)/cyclin B during oocyte maturation: p90rsk fosforylates and inactivates the p34(cdc2) inhibitory kinase Myt1. *The European Molecular Biology Organization Journal* 17: 5037-5047. ISSN 0261-4189
- 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 European Molecular Biology Organization Journal* 23: 4649–4659. ISSN 0261-4189
- Patel, S. A., Simon, M. C. 2010. Functional Analysis of the Cdk7_Cyclin H_Mat1 Complex in Mouse Embryonic Stem Cells and Embryos. *The Journal of Biological Chemistry* 285: 15587 – 15598. ISSN 0021-9258
- Pavletich, N. P. 1999. Mechanisms of cyclin-dependent kinase regulation: structures of cdk, their cyclin activators, and Cip and INK4 inhibitors. *Journal of Molecular Biology* 287: 821 – 828. ISSN 0022-2836
- Pesin, J. A., Orr-Weaver, T. L. 2008. Regulation of APC/C Activators in Mitosis and Meiosis *Annual Review of Cell and Developmental Biology* 24: 475 – 499. ISSN 1081-0706

- Petr, J., Rozinek, J., Hruban, V., Jílek, F., Sedmíková, M., Vaňourková, Z., Němeček, Z. 2000. Ultrastructural Localization of Calcium Deposits during in vitro Culture of Pig Oocytes. *Molecular Reproduction and Development* 57: 1 – 9. ISSN 1040-452
- Peters, J. M. 2002. The anaphase-promoting complex: proteolysis in mitosis and beyond. *Molecular Cell* 9: 931 – 943. ISSN 1097-2765
- Piqué, M., López, J. M., Foissac, S., Guigó, R., Méndez, R. 2008. A combinatorial code for CPE-mediated translational control. *Cell press journal* 132: 434 – 448. ISSN 0092-8674
- Procházková, B. 2012. Změny cytoplazmatické adenylace mRNA důležitých M-fázních regulátorů během meiotického zrání savčích oocytů. Diplomová práce. ČZU
- Pulverer, B. J., Kyriakis, J. M., Avruch, J., Nikolakaki, E., Woodgett, J. R. 1991. Phosphorylation of c-jun mediated by MAP kinases. *Nature* 353: 670 – 674. ISSN 0028-0836
- Reece, W. O. 2011. Fyziologie a funkční anatomie domácích zvířat. Grada Publishing, 2. vydání, 473 s. ISBN 80-247-328-23
- Reimann, J. D. R., Jackson, P. K. 2002. Emi1 is required for cytostatic factor arrest in vertebrate eggs. *Nature* 416: 416 - 453. ISSN 0028-0836
- Reimann, J. D. R., Freed, E., Hsu, J. Y., Kramer, E. R., Peters., J-M., Jackson, P. K. 2001. Emi1 Is a Mitotic Regulator that Interacts with Cdc20 and Inhibits the Anaphase Promoting Complex. *Cell* 105: 645 – 655. ISSN 0092-8674
- Romanovský, A., Činčerová A., Čížek F., Dvořák P., Kaprálek F., Kubišta V., Nedvídek J., Opatrný Z., Pazourek J., Pikálek P., Sefert J., Slavíková Z., Váňa J., Závada V. 1988. *Obecná biologie*. Praha: Státní pedagogické nakladatelství. 695 s.
- Rosypal, S., Rosypalová, A., Vondrejs, V. 1983. *Molekulární genetik*a. Praha: Státní pedagogické nakladatelství. 312 s.
- Shoji, S., Yoshida, N., Amanai, M., Ohgishi, M., Fukui, T., Fujimoto, S., Nakano, Y., Kajikawa, E., Perry, A. 2006. Mammalian Emi2 mediates cytostatic arrest and transduces the signal for meiotic exit via Cdc20. *The European Molecular Biology Organization Journal* 25: 834–845. ISSN 0261-4189
- Schmidt, A., Rauh, N. R., Nigg, E. A., Mayer, T. U. 2006. Cytostatic factor: an activity that puts the cell cycle on hold. *Journal of cell science* 119: 1213 - 1218. ISSN 0021-9533

- Schmitt, A., Nebreda, A. R. 2002. Signalling pathways in oocyte meiotic maturation. *Journal of cell science* 115: 2457 - 2459. ISSN 0021-9533
- Simmons, M. J., Snudtad, D.P. 2009. *Genetika*. Brno: Masarykova Univerzita, Nakladatelství, 871 s. ISBN 978-80-210-4852-2
- Sládeček, F. 1986. *Rozmnožování a vývoj živočichů*. Praha: Academia. 448 s.
- Sova, Z., Bukvaj, J., Koudela, K., Kroupová, V., Pješčak, M., Podaný, J. 1981. *Fyziologie hospodářských zvířat*. Praha: Státní zemědělské nakladatelství. 512 s.
- Stojkovic, M., Motlík, J., Kölle, S., Sinowatz, F., Zakchartchenko, V., Alberto, R., Wolf, E. 1999. Cell - cycle control and oocyte maturation: Review of literature. *Reproduction in Domestic Animals* 34: 335 – 342. ISSN 0936-6768
- Sun, Q. Y., Nagai, T. 2003. Molecular mechanism underlying pig oocyte maturation and fertilization. *The Journal of Reproduction and Development* 49: 347 – 359. ISSN 0916-8818
- Swann, K. 1996. Soluble sperm factors and Ca²⁺ release in eggs at fertilization. *Journal of Reproduction and Fertility* 1: 33 – 39, ISSN 0022-4251
- Šípek, A. jr. 2010. *Genetika - Váš zdroj informací o genetice (online)*. Poslední revize 6. 3. 2010 (citováno 24. 10. 2012), dostupné z <<http://genetika.wz.cz>>
- Štípek, S. 1997. *Stručná biochemie : uchování a exprese genetické informace*. Praha : Medprint, 92 s. ISBN 80-902036-2-0
- Taieb, R., Thibier, C., Jessus, C. 1997. On cyclins, oocytes and eggs. *Molecular Reproduction and Development* 48: 397 – 411. ISSN 1040-452
- Tatone, C., Monache, S. D., Iorio, R., Caserta, D., Cola, M. D., Colonna, R. 2002. Possible role for Ca²⁺/calmodulin-dependent protein kinase II as an effector of the fertilization Ca²⁺ signal in mouse oocyte activation. *Molecular Human Reproduction* 8: 750 – 757. ISSN 1360-9947
- Tong, C., Fan, H. Y., Lian, L., Li, S. W., Chen, D. Y., Schatten, H., Sun, Q. Y. 2002. Polo-like kinase-1 is a pivotal regulator of microtubule assembly during mouse oocyte meiotic maturation, fertilization, and early embryonic mitosis. *Biology of Reproduction* 67: 546 - 554. ISSN 0006-3363
- Tung, J. J. 2006. *Emi1 and Emi2 regulate meiotic maturation and cytostatic factor arrest of vertebrate eggs*. Dissertation, Stanford University, 138 p.

- Tung, J. J., Hansen, D. H., Ban, K. H., Loktev, A. V., Summers, M. K., Adler, J. R., Jackson, P. K. 2005. A role for the anaphase-promoting complex inhibitor Emi2/XErp1, a homolog of early mitotic inhibitor 1, in cyostatic factor arrest of *Xenopus* eggs. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 102 (12): 4318 – 4323. ISSN 0027-8424
- Tunquist, B. J., Maller, J. L. 2003. Under arrest: cyostatik factor (CSF) - mediated metaphase arrest in vertebrate eggs. *Genes and Development* 17: 683 - 710. ISSN 0890-9369
- Vaňáčová, S., Wolf, J., Martin, G., Blank, D., Dettwiler, S., Friedlein, A., Langen, H., Keith, G., Keller, W. 2005. A new yeast poly(A) polymerase complex involved in RNA quality control. *Plos Biology* impal factor 3: 178 - 189. ISSN 1544-9173
- Vodermaier, H. C. 2004. APC/C and SCF: controlling each other and the cell cycle. *Current Biology* 14: 787 - 796. ISSN 0960-9822
- Wassarman, P. M. 1988. *The Mammalian Ovum* In: Knobil, E., Neill, J. 1994. *The Physiology of Reproduction*. New York: Raven Press Ltd, 3th edition. ISBN 078-17-0086-8
- Wassarman, P. M. 1999. Mammalian fertilization: molecular aspects of gamete adhesion, exocytosis, and fusion. *Cell* 96: 175 - 83. ISSN 0092-8674
- Wianny, F., Tavares, A., Evans, M. J., Glover, D. M., Zernicka-Goetz, M. 1998. Mouse polo-like kinase 1 associates with the acentriolar spindle poles, meiotic chromosomes and spindle midzone during oocyte maturation. *Chromosoma* 107: 430 - 439. ISSN 0009-5915
- Wu, B., Ignatz, G., Curie, W. B., Yang, X. 1997. Dynamics of maturation-promoting factor and its constituent proteins during in vitro maturation of bovine oocytes. *Biology of Reproduction*, 56: 253 – 259. ISSN 0006-3363
- Wu, J. Q., Kornbluth, S. 2008. Across the meiotic divide - CSF activity in the post-Emi2/XErp1 era. *Journal of cell science* 121: 3509 – 14. ISSN 0021-9533
- Yanagimachi, R. 2006. Mammalian fertilisation. *The Physiology of Reproduction*, eds. Knobil, E., Neil, J. New York: Raven Press, 3. rd edition, 3 230 p. ISBN 9780125154024
- Yamano, H., Gannon, J., Mahbubani, H., Hunt, T. 2004. Cell Cycle-regulated recognition of the destruction box of cyclin B by the APC/C in *Xenopus* egg extracts. *Molecular Cell* 16: 2 - 3. ISSN 1097-2765

- 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 - 28. ISSN 1747-3403
- 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* 63: 405 – 445. ISSN 1092-2172

9.2 Seznam obrázků

Obr. 1. Regulace buněčného cyklu pomocí Cdk/cyklin komplexů.....	25 -
Obr. 2. Model regulace druhého metafázního bloku v savčích oocytech.....	27 -
Obr. 3. Hlavní složky a faktory podílející se na tvorbě a udržení CSF.....	29 -
Obr. 4. Regulace APC komplexu v meiose.....	34 -
Obr. 5. Injekce Emi1 do časných žabích embryí (vpravo) blokuje mitosu.....	37 -
Obr. 6. Regulace proteinu Emi2, který asociuje s APC/CCdc20.....	39 -
Obr. 7. Exprese proteinu Emi1 během meiotického zrání prasečích oocytů.....	59 -
Obr. 8. Exprese proteinu Emi1 během meiotického zrání myších oocytů.....	61 -
Obr. 9. Exprese proteinu Emi2 během meiotického zrání prasečích oocytů.....	64 -
Obr. 10. Exprese proteinu Emi2 během meiotického zrání myších oocytů.....	65 -
Obr. 11. Detekce mRNA pro Emi1 u prasečích oocytů.....	68 -
Obr. 12. Polyadenylace mRNA pro Emi1 u myších oocytů.....	68 -
Obr. 13. Polyadenylace mRNA Emi2 u prasečích oocytů.....	69 -
Obr. 14. Polyadenylace mRNA pro Emi2 u myších oocytů.....	69 -

9.3 Seznam tabulek

Tab. 1.	Transfer Medium (pro manipulaci s oocyty).....	- 41 -
Tab. 2.	Příprava kultivačního média pro prasata.....	- 42 -
Tab. 3.	Příprava roztoku orceinu.....	- 43 -
Tab. 4.	Příprava 2x SDS Loading Bufferu.....	- 45 -
Tab. 5.	Předpis 10 % polyakrylamidového gelu.....	- 46 -
Tab. 6.	Složení Running bufferu.....	- 47 -
Tab. 7.	Příprava 20 % Towbinu.....	- 49 -
Tab. 8.	Příprava Coomassie Blue „R“.....	- 49 -
Tab. 9.	Příprava Destainu.....	- 50 -
Tab. 10.	Příprava TTBS.....	- 50 -
Tab. 11.	Roztok na barvení membrán stříbrem.....	- 51 -
Tab. 12.	Protilátka proti Emi1.....	- 51 -
Tab. 13.	Protilátka proti Emi2.....	- 52 -
Tab. 14.	Složení First-Strand cDNA Synthesis PREMIXU.....	- 55 -
Tab. 15.	Složení PCR PREMIXU.....	- 56 -
Tab. 16.	Příprava polyakrylamidového gelu na SDS PAGE.....	- 57 -
Tab. 17.	Základní statistické charakteristiky hodnot optické density (OD x mm) proteinu Emi1 v jednotlivých fázích meiotického zrání prasečích oocytů-	60 -
Tab. 18.	Základní statistické charakteristiky hodnot optické density (OD x mm) proteinu Emi1 v jednotlivých fázích meiotického zrání myších oocytů...	- 61 -
Tab. 19.	Základní statistické charakteristiky hodnot optické density (OD x mm) proteinu Emi2 v jednotlivých fázích meiotického zrání prasečích oocytů..-	64-
Tab. 20.	Základní statistické charakteristiky hodnot optické density (OD x mm) proteinu Emi2 v jednotlivých fázích meiotického zrání myších oocytů....-	66 -

9.1 Seznam Grafů

Graf 1. Změny hladin proteinu Emi1 během meiotického zrání prasečích oocytů v jednotlivých pokusech.....	- 60 -
Graf 2. Změny hladin proteinu Emi1 během meiotického zrání prasečích oocytů v jednotlivých pokusech.....	- 62 -
Graf 3. Změny hladin proteinu Emi1 během meiotického zrání prasečích a myších oocytů....	- 63 -
Graf 4. Změny hladin proteinu Emi2 během meiotického zrání prasečích oocytů v jednotlivých pokusech.....	- 65 -
Graf 5. Změny hladin proteinu Emi2 během meiotického zrání myších oocytů v jednotlivých pokusech.....	- 66 -
Graf 6. Změny hladin proteinu Emi2 během meiotického zrání prasečích a myších oocytů....	- 67 -

9.2 Přílohy

Příloha 1. Informace o mRNA sekvencích a o primerech

Všechna data, pokud není uvedeno jinak, jsou převzata z databáze NCBI.

Emi1 prase (<i>sus scrofa</i>)	
sekvence mRNA	<p>>gi 311243769 ref XM_003121138.1 PREDICTED: Sus scrofa F-box protein 5 (FBXO5), mRNA GACCGCTACTCTCCGCAGTGGTAGCAGCTCCTTCTCACCTGAGGCAGGTCCCACCTGCACTGGCATG AGCCGGCGCCCTGCAGCTGTTCCCCACGGCCGCCCTCCGGTTCCTGCCGCTGCAGCTACAGCGCCCTG ACAGCTGCCGGGGCGCCCTCGCCCTCGGACGATTGTAAGAAGAAGGTTCCACTCTCTCCGTCAAATG AAGTGTGATTTAACTATAGCCATGTTCACTTCTGGAGTTAAACCGGTAACCTGATGATAGTGAAGA TGCAGTTCCTACACTCTGCATATTTGGAAGTTCTTATAATGACTGCATTAAGACTATGAAAGGTTAT CAGATATTAGTCTCCAATCGTGAACCCAGGATCGTAGAGCTTGAACCTGAAAGCAAGCCCTTGATA ATAAGGAAAATCAACATGTGCAACAAACACTTAATAGTTCAAATGACATAGAAGAAGCTGGAGACCAGTG GACCTTATGAAGACAGTGGCTACTCTTCATTTTCCCAACAAAGTGTCTCAATGAACATGAAGACAGTAG TCTTACATTGGTGGAAAATTATAGTGACAGTCCACAACCTTGCTGCTACGGATAAAAAGCCAGACCAA TATCCTAACAAAACCTTGCTGCCAGCTCTTCATTTTGCAAAATTTGTTTGTCAACATTAATAAAAAATTGT AAACGAAATCCTAAAATAGATCGAGAGAACTGAAGGAATTTGTATCCAGTGAAATTTTAGACTACAGA ATATAATTGGCAGGAAAATGGGCTAGAATGTGTAGATATTCTCAGCGAACTTTTGAAGGGGACTCAG GCATCTTAGCAAATATTTAACACAGCTCAGTGATATGGACTTAATCAATGTGTCTAGAGTGAGCACA CTTGGAAGAAGATTCTAGAAGATGATAAGGGGGCATTGCAATTATACAATAAAGCAATACAAAGAATTAC TGAAAAGAACATTAAGTTTTACCACATGCTTCAACCAGAGAATATGTTTTATTCAGAACCGCATTAGCATC TGTTCAAAAATCAGCAACCCAGACTCTCCCTAAAAAAGATACTCAAACCAAGTTACCTGATCCAGGTGATCA GAAAGTTCTACCTTAGTCGACACAGTGAATTTCTGAGGTTGCCAAGACTTTGAAAAGAATGAAAGCC TCAAAGCCTGCATTGCTGTAATTCACCAGCAAAATATGATTGCTATTTGCAACGGGCAACCTGTAAACGAG AAGGCTGTGGATTTGATTATTGTACAAGGTGCCTGTGTGATTATCATACTCTGAAGACTGTTCAAATAGCA AGCCTTTAAAAGCCAGTTATAAAATGGGTCCTCTGCCAGGTAAGAAAAGCAAGAAGAATTTACGACGA TTGTGATCTTTATTAATCAATTGTAAGTATGATGACAGGTTAGTTAGAAAATGTTAGGTTTTAATTTAA AAATAAATGTATTGTGATTTCACTTTATGTTGAAATCAATGGGTTTTTTTTCCCAACTGATAAAAGAAGA TGCCCAACCTCTAAAATATTTTACACTTAAATAGGGAAAAGTTCAAATTTCTCAATATATACAAAATTTAA ATATTTAAGAAAAGGGAAAATAGTTACTTGATGATTGTGATTGAGAGGCAAAATAAAATGATTCAGTTT TATAGTAAAGGAAGACCATGTAATTTTACCTACAGTCTTCAGTGCCAATCTTTTACCATCTAGTAACATTTG AGACATTTTATTTGCTTTACCAAATTAATAATACCTATTGAAATATCAACTTCTGATGTCTGTCAATTTAAATG TTTTGTCACCTTAACTCTTTTCAATGTATTTCCAAAATGTTTTATGAAGTCGATTTTCTTATTTGTAAG GTTGTATGTTTTAATATTTGTACATTTGAAATGTTTATTTTATATGTCAAAGAAAATAAATGTCTCTTGAT ATACACATAAATAAAGTGTTCAAATTAATAAATAA</p>
Informace o sekvenci	<p>Velikost sekvence - 2033 Oblast CDS - 67..1413 Chromosom - 1</p>

PR1	5`- ATG GGT CCT CTG CCA GGT ACT AAG AAA AGC -3`	
	Délka produktu	704
	Pozice v sekvenci	1360
AATAAA	Pozice v sekvenci	Vzdálenost od PRIMERU 1
	1487	127
	1685	325
	1984	624
	2011	651
	2030	670

Emil myš (*mus musculus*)

sekvence mRNA	>gi 110225373 ref NM_025995.2 Mus musculus F-box protein 5 (Fbxo5), mRNA
	AAATTCAAAGATTTTAAAAGTACCAGCTGGCGCCTTTTAAAGAGCTGCGGCTCGGCGCCTCGTCTGGCCG GCCACCTTTTTCTGTCTGTCGCCGCCACCTCCCCAGCATTGGAGCCCGAGTTTTGCGGCATGAGCCGGC GCACCTGCAGTGACCTGCGCCGGCCGTCTCTCTGTCCCTGCCGTCTTGGCGCGGGACTACCGTGGACG GTTGTAAAGAAGAAAGCCCTGTTCTTTCTGTTACAATGAAGTGTTTTAATTGCAACCCTGATCTTTCCG AGCTTGAAGTGGTGAAGCCTGAGGACAGTGGGATAGAAGCTTCTACAGTCCCGTGTGTTTGGAACTT CCTGTAATGACTGTGTTAGAAACCATGAGAGGTTGTCTTTCATCGACTCACCAATTGTGGGACATGATA ACAAGGAAAATCAACGCGTACAAAACACACTAGATAGTTCAAACGAAAACAGAAGAGCTAGAGGCCAGTA GACTGTATGAGGACAGTGGCTACTCATCTTTCACACAAAAGTGACCGTGACGATGGCATCCTTATCCTGG AGAATTTTCAGAAACAGTCCCAGGCCGTCTGCTGCCATCACAGAGCCCGGACCAGCATCCCAACAAAA CCTTGCTGCCTGTCTGCATTTTGAAAGAGTGGTTTGTCTCAACACTAAAAAAGAATGGCAAGCGAAACC CTAAAGTGGATCGAGAAATGCTGAAGGAAGTTATTGCCAGCGGAACTTTAGACTGCAAAAATATAATTG GCAAGAAAATGGGCCTGGAGCACCTAGACATCCTGGCTGAGCTCTCCCGCAGGGGATTCGTGCACCTGT TGGCTAACATTTTGACTAAGCTCAGCGCATGGACTTAGTAAATCTGTCTAAAGTGAGCAGAATTTGGA AGAAGATACTGGAAAACAATAAGGGGGCGTTCAGCTCTACAGCAAACCATGCAGCGAGTCATTGAAA GCAGTAAGTTGTCACTACATGCTACAACGAGAGGATATGTTGTGGGCAGAGCTGCACCTAATTGTGTTT AAAAGTCATCGACCTGGGCACCTCCCAAAAAGATGTTCAAATCAAGTCTCCAGTCAGCGTGGTCAGA GAGTTTCTACCTACAGCCGGCACAATGAGTTCGTGGAGGTGGCAAAGACATTGAAGAACAACGAAAGCC TCAAAGCCTGTGTTTCGCTGTAATTTCCCTGCAAAAATATGACCACTATTTAGAGCGAGCAGTCTGCAAC GGGAAAGCTGTCAATTTGAATATTGTACAAAGTGTCTGTGTGCTTACCATAACAACAAGACTGTTTGA ATGGCAAGATCCTAAAAGCCAGCTGTAAAGTGGTCCCTTTCGCTGGAACCTAAAAAGAGTAAAAAGA ACTTACAAAGATTGTGATAGATCAACTGTAGATCTTGGCTACTTTAAAAAGAAAAAAGAACTTCAACTTTA ATTTAAGAAAGTAAAAATAATTATGATGCCTTTTGTGAATAGAGAAATTAATTGTCCATAAAAATGCCA AGATTGACTTATGAAAAACAACCTGGATATCTATCTTAGATACTAAGATAAAAATTGAGTGGACTTTTGG CAAGGGAGGGTTGTGGTCTTTTTATGGAGTCTTGAGAACATTTGCTTCAGTATTCGAGATTCGCTTTAC

	CAAGTTTGTATCATACTTCTATCAACTTGAGTCTGTCCATTTAAATGTTTGTCAATGTGAGTTTTTTTT ATATCTGTGAATACCTGTTTTCAAATGCCAAATAAAATAATACACATAATTTTGTTTAGTTAAAATAAA TTTAGAGGTGTAAAAAAAAAAAAAAAA	
Informace o sekvenci	Velikost sekvence - 1820 Oblast CDS - 129..1394 Chromosom - 10	
PR1	5`- AGA GCG AGC AGT CTG CAA ACG GGA -3` Délka produktu 665bp Pozice v sekvenci 1223bp	
AATAAA	Pozice v sekvenci	Vzdálenost od PRIMERU 1
	1761bp	538bp
	1794bp	571bp

Emi2 prase (<i>sus scrofa</i>)	
sekvence mRNA	<p>>gi 194036984 ref XM_001925334.1 PREDICTED: Sus scrofa F-box protein 43 (FBX043), mRNA</p> <p>ATGACCCTGCTGCAGCTGACACTGCATTGCCAGGAACCCGAATTTGGGAAGTTTCTCCGTTCCAAGAG CAAAGCGAGACATTTTCTTGTGGTGGAAAGCCTACATAACGTTGACATCTAAGAGCTCAAGATTTACTGTT GAAACAGAGATTTTGAAGATGTCAGGGAGGCACCTCAGGTCAAGCTGTTGCTGGAGCAGGAAATGAGGAG GGCTCTCCTACTGTCAATGTCAAGTACTCCAGCTTCGGGAGACTTCTGTCCACATCTTCATTTCAAGAC AGTGGCTACAGTGAGCTGCTAAAATCATGCAGCTTTGAGAATACAGATAAAGAATTTTTTGGAAAGAAA GCAAGAAGCTCAACATTAATCCATGAACATCCTGAAACTTCAAGTCTGGCCTTAACACATAGTTTAGAG TCTCCTATTCAACAAGAGCGATTTGTCTTCCCTAAGGAGGAAAAGGATAAAACCCAGAACTTTGTGAA ACTCCTAAAATCAGTGGGAGAACGTTTTTACCACGCAGAAGGTTGGACATATCTTTCTCTCTTCTGAAG GCAGAGTTTGAATCACAAAATAGTTCTCTCGAAAGTAGTGCAAGCCAAGTTCCTAATTTAGAAAACAAA TTTCCAAGCAGTGCTTCAGCTTTTCCAAGGCAAAATAATTTTAGTTCTTTAGTCACTAGCACTTCAAAA ACAGAAGAAGCGACTTCCAGCAGTCAAAAATTGAGACTCAATTTTTCTCAACAGAAAGTCTCCACGGTT GATGATTCCAAAGATAACTGTGGCCTATTTGAGGTTGAATGTATATCTCCGATTCAGGGCAATAGTTTT AAAGACTCTATCACACATGACTTTAGCGATAGCAGTCTGTGTGGTAATGATGAGAATACATATCCCGAA CTTCTGGGCTCCTCCGCTGGTGGAACTTGTGAAACAGATGAGGACATATTTGTGACTCCAATAAGT AATCTTGTAGCAAATGTTAAATTTAATGCAAGTCAAAGTGAAGCTAGACGCAATATTTCAACACCTGAA GACAGTGGTTTTAACTCGCTTTGCTTGGACAAAATCAGAAGATTCCTCTCTGACCAAGAGGGTTCTTTT CAAGACCTACTTCAGAAATATAAGGGAAATCTAAAAGCTGGGGACACCATAAAAAAGTCAAGGCGTCTA AGAAGGTTGAGAAGACTGTCTACCCTTCGGGAGCAAGGCTCACAGTCTGAGACAGAAGAAGAGAAGCAG ATCAGCCACTCCGGCTCTGAAACAACACCAGCAGCTGCTTCAGATACCTCAGAGGGTCAGCCAGCAGT GACTGTAAGGGCAGGGATTTGAGTTCAAGCTTTAAGAGTTTATCAAAAACCCAGCCTTGCAGTTAGTG CATGAGCTCTTTATGAAAAGCAAAAGAAAGAGATTCAGCAAAAATGGTGCACGTGGACTGTTAGAAGAA AGAGACGAGGGAAAATAGCTGCTCTACAACGTGTGCTTGCAGGACTGATTGGGAAGAAAATGGGTATA GAAAAACTGGACATCTTAACAGAATTTAAAATACAGAAAATTAAGGCATATTCTTGCTATGGTTTTAGAT TCCTTGACTGCAGAAAGCCTATGCAGTGTGGAAAGTGAAGCAGAAAATGGCGTGAAAATATTGCTCAA GATAAAAAAGCAAATCAGAGGAGGAAATTTTATATCACACGACTGAAAAGCAGATTCCGAGGGGGCTGTA TTAAATGTTGAGGATGCTGCCACTCGGCTCCATCTTTTAAATCGAGCGGCTTTAAGGTCTGTGCAAGCA</p>

	CAGGCTAGGACACCAGGTTTTTCAGAAAGAACAAGTTTCAACGTTTTCTCCTTGGGGAGACGTTTTGACACCTATAGCAAGCTCTTCTGTTACTCACCTAAATAGTAAACAGGAGGAATATGTTAAGGTTGCCAAAACACTTTTTATTGATGAAGCATTAAAACCTTGCCCAAGGTGCCAATCCCCTGCTAAGTACCAGCCTTATAAGAGAAGGGGACTATGTAGCCGCACAGCCTGTGGTTTTGACTTTTGTGTGTTATGTTTGTGCGCTTATCATGGGTCTGAAGAATGTAGCAGAGGAGCAGCAAAGCCAAGAAAACAGAAAAGATGCTCTTCCAGGAAGTGCCAGAGTAAGCGGAATTTAAAACGCCTCTAA		
Předpokládaná 3' UTR	AGACTTTCAGTGTAAGAAGCATTGCCCTAGGCAACATGTCGTTTGTCTGACTTAAGATTATGAATATTTTGAAAGCATGCAAGTCTTCCCATCAATGGCAGATGATGATTTAGTTCCTATTTTGTATATAGTATGATCCATGTCATTGTATGTTTTCTTTGAAGTAGTGAGTTTTGAAAAGAACTCATTTTACTATGTCATTTTACTCATTTTAATAACTTAGTGTTTTTAAATAAAGAAATTTTCAGTGTATGTATGTATTTAACTGTTTAAATGTAACATTTAAAACGTGTACATTTTCATCACTATGTGTGAAATGTTCTTTCACTTTTCAAAAATAGTTTGCCAGTAATATTAATAAATTTGAACTTGAGACAGATGGCCTTATAGGTTTCAAAAATTTTGAATATTTGACTGAAATGAAATACAAATAAATGTTTTTCAGAAGTTCTGTTGAATTTACTCTATCATCTCAATCTTTCTCTTAATTTACTGAGTATCATATTTGAGCAGACTTCTGGATAAATAAATTTACCTACTATTGATAACTAAGAAGATGTAAGAAGTAAATTTATTAGCTATATGTGGTTATTC		
	V databázi NCBI je jako sekvenční mRNA Emi2 u prasete uvedena pouze CDS oblast, dle databáze Esemble by měl tento úsek být právě chybějící 3' UTR.		
Informace o sekvenci	Velikost předpokládané 3' UTR - 600 Oblast CDS - 1..2169 Chromosom - 4		
PR1	5`- GGG ACT ATG TAG CCG CAC AGC CTG T -3` Délka produktu 193 Pozice v sekvenci 2007		
PR2	5`- TGC CCA AGG TGC CAA TCC CCT GCT -3` Délka produktu 240 Pozice v sekvenci 1960		
AATAAA	Pozice v sekvenci	Vzdálenost od PRIMERU 1	Vzdálenost od PRIMERU 2
	V sekvenci není	do konce sekvence je 162	Do konce sekvence je 209

Emi2 myš (mus musculus)			
sekvenční mRNA	>gi 124486946 ref NM_001081253.1 Mus musculus F-box protein 43 (Fbxo43), mRNA CGCACGTCCGGGTGACGACCGTTAGTCCCGCCCGCAGCAGACGGCTCGGCAGCTCCGGTGGGGGGGCATCTCTGGTCTCTAGTCGGGAGATCCCCAGGTCCAAGACTGGCTGGAGAGAGGCCGGAGAGTGCAGGCTGCTGCGGGGCGGAGAGATTCCGAGCGACTTGACCTTCCAGCCGCTGCCCTCCTGAAGCCGTCGGGCGCTGCTCCGGGCTCCGTTAATTGTTGAGTTTTTCTCTTAAGTGGTGGTACCTCGGCATGAACTTAAAGGCAAAGATGACAGACTTTGTTGTTTGAAGCCTACCTTACTTTGACATGTCTTAAGAAGTCAAGGTTGACTGGTGGTAAGATATCCACTTTAATGAGAGCATCGGTTAACGAAGCAGTTTTCTGACTTGTATAGGGCTTGCTTGGCTGCACATCACAAAGGAAGAAATAACTGTATCTACTTGGTAAAAACAGAGAGCTTGAAGATATCCAAAGGCACTCAGCCAGCCACAGAGCAGGAAGCAATATGGACTCCTCTGCTGTCACTGTCAAGGGTCTCAGCCTCATAGACTTTTGTCCACATCCTCCTTTAAATATAGGGGCCATCACGAGCTGTGAGAATCTGCAGCCTTAATAAGAAAAGAAGAAGAGCCTATGCTAACCTGTGAGCATCCTGAACTCCAAGTTTAGGTTCCCAATCTGCAGTATCTCCAGTCAATAATGAAGTCTGTGTCCTA		

	<p>AGGAAGGAAAAGGATAAAAAGCCAGAACTTTGTGAGACTCTAAACTCAGAAGGAAAAAATGCACATTACGCA GGCGGCTAGACTTTTTCTTCCCTCTTCTGAAGGGGGATTCTGATTACAAAAGCAGATCTCTGGAAAGTAACATAA GCCAAGGTGTTAGCCTAGAAAAACATTTGCCAGGTAGCACTTCAGGTTTCCCAAAGGAAGACAACCTTTAGCCCA TTAGTTACCAGCACGATAAAAACAGAGGATGTGGTTTCCAACAGTCAGAACTCAAGTTACATTTTTCTCAGCAC AAGACTTCCACCATTGAAGATTCCAAAGACAACCTGTGGCTTGTGTTGAAGTGAATGTCTGTCTCCAATTGAAGGC AATGATTTTAAAGATTCTATCACACACTTTAGTGACAGCAGTTTAAAGTGTAGTGATGAGAATACATGTCCTGAA CTTCTGGGCTCCTGTGGTAGCCAAACAACCTATGGAGCAGATGTGACTACATCTGTAACCTCAGTAAGTAGTCTC ATAGCAAAAATCAAATTTAATGGAAACCAAACCTCTGATTCTTCAAGGAGAGGTGAGAGACAGTCTTTTTACACCT GAAGACAGTGGCTTTTGCTCACTTAGCTGGGACAAATCAGAAGATTTCTCTCTGACCAAGAGGGCTTTTTCAA GAACTGCTTCAAAAACACAGGGTGACTCCCAAAGTTGGGGACCAGGTAAGGCAAGCAAGCATTGTTGGGAGGT TGAGAAGACTGTCCACTCTCCAGGAGCAAGGCTCCAGTCAGAGGATGAAATGCAGACGGTCCATCTAACTCT GATTCAGGTGTCTTGGAGAGTCTGCAAGGCTCTGAGGAGAAGCGTGGGAACCTGGCTTTAAGCTTTAAGGACTT ATCAAATACTCCAGCCTGCAGTTGGTGCAGGAGCTCTTATGAAAAGCAAAAAGGAAACGATCTCAGCAGGAAG ATGACCAGGAATTCTTTGAGGACAGGGACGAGGGGAAAATTGCCAGACTGCAGCGTGTCTCGCAGGACTGAT TGGCAAGAAGATGGGCATAGAACAGCTGGATATCCTGACCGAATTACAGTATAGAACTTGAAGCACATCCTAG CTATGGTTTTAGAGTCTTACTTTCGGAGAGTTTATACAGTGCTTGGAACTGCAGCAGAACTGGCGTGAAAT GTGGCTCAGGATAAAAAGGCAACAGGAGGAGGAACTTTATATACACAGCTGAGAGCAAGTGCTCAGGGG GCCGCTGTGTTACGTGTTAGGATGCTGCCACTCGGCTCTGCCTTCTGAGTCGCTTGGCCTTAAGATCAGTGACG GCACAGGCACAGGCACCCAGTGGTGAGCAGGTTCCAACCTCTGTCCCTTGGGGGGATGTTCTGACACCTGTAGC AAGCTTCCCTCACCCACCTACGGAGTAAACAGGAACAGTATGTGAAGGTTGCCAGGACACTGTTTACTGATG AAGCTTAAAGCCTTGCCCGAGGTGCCAATCCCCTGCTAAGTACCAGCCGCACAAGAAAAGGGGGCTATGCAGC CGCCTGGCCTGCGGCTTTGACTTCTGTGTGTTATGTCTGTGCGCTTATCACGGTCTGAAGACTGTAGAAGAGG GTCAGCAAAGGCGAGAGGTAGCAAAGATGTTCTCCAGGGAGTGCCCAAAGCAAGCGGAACCTTAAACGCCTC TGAAGAGACTAAGGAACCACTCGCGCTGGCCATGTTCTGTCTGACTTAAAATTATGACTATTTGAACACATGC AAATCTTCCCATTGATGACAGACGTTGATTTACTTCCCCTTTGTTTGTATAATGCACACCATTGATATTTTCTTT AAAGTGATGAATTTTGAAGAATTTTATTTACTATGTCATATCCCCATTTAAATATTTTGTATGTTTTAAATAAAG AATTTTCAGGGTTGTTATATATGTGTGTTTTATTGCTCCATGTAACCTTTAAATTTGTGCATTTTATAACAATGTG TTGAAATGTTCTCAATTATTTAAAAATAATTTCCAAATAATTTGAATAATTTGAATTTGAGGTCAGTGAACCTTC AGGTTTAGAAAATGAGTTGATGGCTGAAATTAATAATAAAATGTTTTAAAAGTCCATCAAATGTAATCT ATAATTTCAACCTTCTCTTACTTATATTTAGTAGACTTTTTGTTTAGTAAAATTTACATACTAATAAATGTCAGT TACGGTGACTGTGTAGTACTTATAATGGGAATTTATTTAATAAACTCCTATAAGTCACACATTTTTTTTTTTTT CGAGACAGGGTTTCTCTGTTTAGCTCTGGCTGCCTGGAACCTCACTTTGTAGACCAGGCTGGCCTCAAACCTCAGA AATCCGCTTGCCTCGCTCCCAAGTGCTGGGATTAAGGCGTGTGCCACCACGCCGGCAAGTCACACATTTCT AATTAAGTACTTTAAAAATCTGGAATTATAGTAACAGATTCTGATATTTAAAAGATTTGGGCTGGGCAGAAATG ATGGGTTTTGAATGGGAAAAATATGAAGTTATTAATAATGGCCATTATAATTTGTATGTGTTTGAATGTGCCTTT TTCAAGAGGGATTTGGGAATGAGTGAGCTCTGTTATAGATCAGTGGCAAAAAGAGCTAAGTTTTTTTTATTGCT GAAAAAAGTGAAGAGAGGACTCTGTTTTGCTTTGGGTTTTTTGTTTTGTTTTGTCTATCATTTCGTATTGTTG TACTGTTGTTTTGTTTTGAAGACAGGGTCTCACTATGTAGCTCTAGGCTCCTGAAGTCACTATGTATACCAGGC TGGCCTTGAACACACAGAAGTCCACCTGCCTCCTGAGCTGGGGTCAGAGTCCCTGCACCACTACATCAGGCCTCAA GAAGGAAACTTCAAATGATGATTTATTTATTTTATCTTATGCATATTGGTGTGTTTTGTCTGCATTTATGTGTGGGT ATTAGATCCTTTGGAGCTGGAGTTAGAGACAGTTGTGAACCTGCATGTGGATGCTGGGAACCTGAACCCGAGTTT TTCAGACCAACAGCCAGTGCTCTAACCACTGAGCCATCTCTCCAGACCCATACGAGGGAAACTGACAACACACT TGTATTTTGTATATGTAGGTGATTGCTGTATATATGTGTTTTTATACTATACACACATATTTCAATGTAGCTCTGAA CACATTTATTTAAGAAAGTGGTTAAAAATTAATAAATAAATTTAAATTTAAATTTTACATATTTTC</p>
<p>PR1</p>	<p>5`- TGG GCT GGG CAG AAA TGA TGG GTT -3`</p> <p>Délka produktu 794</p> <p>Pozice v sekvenci 3272</p>

PR2	5`- GGG AGT GCC CAA AGC AAG CGG -3`		
	Délka produktu	1653	
	Pozice v sekvenci	2413	
A A T A A A	Pozice v sekvenci	Vzdálenost od PRIMERU 1	Vzdálenost od PRIMERU 2
	2677	Všechny	264
	2876	AATAAA před PR1,	463
	2978	do konce sekvence je	565
	3031	763	618