

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



**Regulace mTOR při meiotickém zrání myších oocytů**  
**Diplomová práce**

**Autor práce: Bc. Anna Tětková**

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

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

## **Čestné prohlášení**

Prohlašuji, že svou diplomovou práci "Regulace mTOR při meiotickém zrání myších oocytů" jsem vypracovala samostatně pod vedením školitele specialisty a vedoucího diplomové práce a s použitím odborné literatury a dalších informačních zdrojů, které jsou citovány v práci a uvedeny v seznamu literatury na konci práce. Jako autorka uvedené diplomové práce dále prohlašuji, že jsem v souvislosti s jejím vytvořením neporušila autorská práva třetích osob.

V Praze dne 8. 4. 2015

---

## **Poděkování**

Ráda bych touto cestou poděkovala Katedře veterinárních disciplín FAPPZ ČZU za perfektní studijní zázemí, jmenovitě pak prof. Mgr. Ing. Markétě Sedmíkové, Ph.D. za vedení mé diplomové práce a Ing. Tereze Krejčové, Ph.D. za podporu ve studiu. Především ale děkuji celé Laboratoři biochemie a molekulární biologie zárodečných buněk ÚŽFG AV ČR za možnost realizace mé práce, poskytnutí zázemí, skvělou pracovní atmosféru i morálku a profesionální vedení včetně cenných rad a připomínek k mé práci; jmenovitě vedoucímu laboratoře Ing. Michalu Kubelkovi, CSc., školiteli mé práce Ing. Andreji Šušorovi, Ph.D., laborantkám Jarce Šupolíkové a Markétě Hančové, a také Mgr. Denise Jansové. Děkuji také své rodině a přátelům za podporu a zázemí.

## Regulace mTOR při meiotickém zrání myších oocytů

---

### Regulation of mTOR during meiotic maturation of mouse oocytes

#### Souhrn

Meiotické zrání oocytu, období mezi profází I a metafází II, tedy mezi dvěma meiotickými bloky, je charakterizováno rozpadem jaderné membrány (NEBD), kondenzací chromatinu, utvářením meiotického vřeténka a vydělením prvního pólového tělíska. Na molekulární úrovni dochází po NEBD ke změnám v translaci specifických mRNA.

V myším oocytu je cap-dependentní translace ovlivněna kinázou mTOR, která fosforyluje translační represor 4E-BP1. Hyperfosforylovaný 4E-BP1 se uvolňuje z vazby s eukaryotním iniciačním faktorem 4E (eIF4E), který je pak dostupný pro iniciaci translace specifických mRNA.

Cílem mé diplomové práce bylo charakterizovat lokalizaci aktivního proteinu mTOR a aktivní protein kinázy B (PKB/AKT), které hrají zásadní úlohu v regulaci cap-dependentní translace, a stanovit úlohu kalcium/kalmodulin dependentní protein kinázy II (CaMKII) v regulaci translační aktivity v savčím oocytu.

Zjistili jsme, že aktivní PKB/AKT (Ser 473) je po NEBD lokalizována na tvořícím se vřeténku, což odpovídá lokalizaci fosforylovaného mTOR (Ser 2448).

Dále jsme zjistili, že vzhledem k vysoké aktivitě eIF2 $\alpha$ , je při potlačení úlohy CaMKII během meiotického zrání zablokována globální translace, aniž by byla ovlivněna aktivita mTOR.

**Klíčová slova:** mTOR, CaMKII, kináza, translace, mRNA, oocyt, myš

## **Summary**

Oocyte meiotic maturation, the period between prophase I and metaphase II, the two meiotic arrests, is characterized by NEBD, chromatin condensation, meiotic spindle assembly and extrusion of the first polar body. On the molecular level, post NEBD translational reprogramming occurs.

In the mouse oocyte cap-dependent translation is influenced by mTOR kinase that phosphorylates translational repressor 4E-BP1. Hyperphosphorylated 4E-BP1 is released from eukaryotic initiation factor 4E (eIF4E) which becomes available for the translational initiation of specific mRNAs.

The aim of my master's work was to characterize localization of active mTOR and active Protein kinase B (PKB/AKT) which are key players in regulation of cap-dependent translation, and to determine the role of Calcium/calmodulin dependent protein kinase II (CaMKII) in the regulation of translational activity in the mammalian oocyte.

We found that active PKB/AKT (Ser 473) is localized at the forming spindle post NEBD which corresponds to localization of phosphorylated mTOR (Ser 2448).

Next we found that downregulation of CaMKII during meiotic maturation suppress global translation as a result of high activity of eIF2 $\alpha$  without affecting mTOR activity.

**Key words:** mTOR, CaMKII, kinase, translation, mRNA, oocyte, mouse

# Obsah

<b>Obsah .....</b>	<b>6</b>
<b>1. Úvod .....</b>	<b>8</b>
<b>2. Literární rešerše .....</b>	<b>9</b>
<b>2.1. Oogeneze .....</b>	<b>9</b>
2.1.1. Od PGCs k oocytu .....	9
2.1.2. Růst oocytu .....	11
2.1.3. Meiotické zrání oocytu .....	13
<b>2.2. Regulace proteosyntézy v savčím oocytu .....</b>	<b>18</b>
2.2.1. Transkripce v oocytu .....	19
2.2.2. Translace v oocytu .....	20
2.2.3. 4E-BP1 .....	22
2.2.4. mTOR .....	23
2.2.5. AKT .....	27
2.2.6. CaMKII .....	30
<b>3. Vědecká hypotéza a cíle práce .....</b>	<b>33</b>
<b>4. Materiál a metody .....</b>	<b>34</b>
<b>4.1. Izolace vaječníků a oocytů, kultivace oocytů .....</b>	<b>34</b>
<b>4.2. Experimentální schéma .....</b>	<b>34</b>
4.2.1. Experiment 1 .....	34
4.2.1. Experiment 2 .....	35
4.2.2. Experiment 3 .....	35
4.2.3. Experiment 4 .....	36
4.2.4. Experiment 5 .....	36
<b>4.3. Zpracování vzorků a hodnocení výsledků .....</b>	<b>36</b>
4.3.1. SDS-PAGE a western blot .....	36
4.3.2. Imunocytochemie a konfokální mikroskopie .....	37
4.3.3. Statistická analýza .....	38
<b>5. Výsledky .....</b>	<b>39</b>

<b>5.1. Experiment 1: Lokalizace p-AKT a p-mTOR v průběhu meiotického zrání oocytů .....</b>	<b>39</b>
<b>5.2. Experiment 2: CaMKII v oocytu .....</b>	<b>41</b>
<b>5.3. Experiment 3: Vliv KN93 na meiotické zrání myších oocytů .....</b>	<b>41</b>
5.3.1. Morfologie oocytů kultivovaných s KN93 .....	41
5.3.2. Fenotyp oocytů po vystavení vlivu KN93 .....	43
<b>5.4. Experiment 4: Fosforylace mTOR při kultivaci s KN93.....</b>	<b>45</b>
<b>5.5. Experiment 5: Fosforylace proteinu eIF2<math>\alpha</math>.....</b>	<b>46</b>
<b>6. Diskuze.....</b>	<b>50</b>
<b>7. Závěr .....</b>	<b>54</b>
<b>8. Seznam použité literatury .....</b>	<b>55</b>
<b>9. Seznam použitých zkratek .....</b>	<b>69</b>
<b>10. Seznam obrázků .....</b>	<b>72</b>
<b>11. Seznam grafů.....</b>	<b>73</b>

# 1. Úvod

V prokaryotní buňce translace přímo navazuje na transkripci, a proto je regulace genové exprese na úrovni translace výsadou eukaryotních buněk, kde translace probíhá v cytoplazmě, tedy odděleně od transkripce probíhající v jádře. Regulace translace je výhodná především proto, že buňce umožňuje rychle a účinně reagovat na podněty z okolí, jako jsou růstové faktory, teplotní šok nebo virová infekce, bez nutnosti vytvářet novou mRNA. Tyto mechanismy se uplatňují především při kontrole buněčného růstu, diferenciaci a vývoje.

V jedinečné buňce, kterou savčí oocyt je, dochází v průběhu jejího vývoje ke změnám v regulaci genové exprese a dle toho může být vývoj oocytů rozdělen do dvou fází, ve kterých oocyty nabývají různých vlastností. Období růstu oocytu je charakterizováno relativně konstantní expresí genů a akumulací makromolekul jako jsou RNA nebo proteiny. Naproti tomu během krátké periody meiotického zrání, tedy přestupu z profáze I do metafáze II, jsou morfologické změny (rozpad jaderné membrány, kondenzace chromatinu, tvorba meiotického vřeténka, vydělení prvního pólového tělíska), doprovázeny dramatickými změnami v translaci specifických mRNA. Tato fáze vývoje oocytů je také spojena s kaskádami fosforylací a defosforylací různých kináz.

Během meiotického zrání jsou některé maternální mRNA translačně zablokovány a jsou aktivovány právě během meiotického zrání. Aktivace a translace specifických mRNA během zrání může být regulována několika mechanismy. Jedním z těchto mechanismů fosforylace a defosforylace řady různých iniciačních faktorů a jejich regulátorů. Časově a prostorově ohraničená translace specifických mRNA hraje zásadní roli ve zdárném průběhu meiotického zrání a veškerých procesech, které při něm probíhají (především formování meiotického vřeténka, řazení a rozchod chromozomů a následné asymetrické dělení oocytu).

Tato práce se zabývá konkrétními signálními drahami ovlivňujícími translační represor 4E-BP1 a kinázu mTOR, jejichž funkcemi se během posledních let zabývají mnohé studie.



## 2. Literární rešerše

### 2.1. Oogeneze

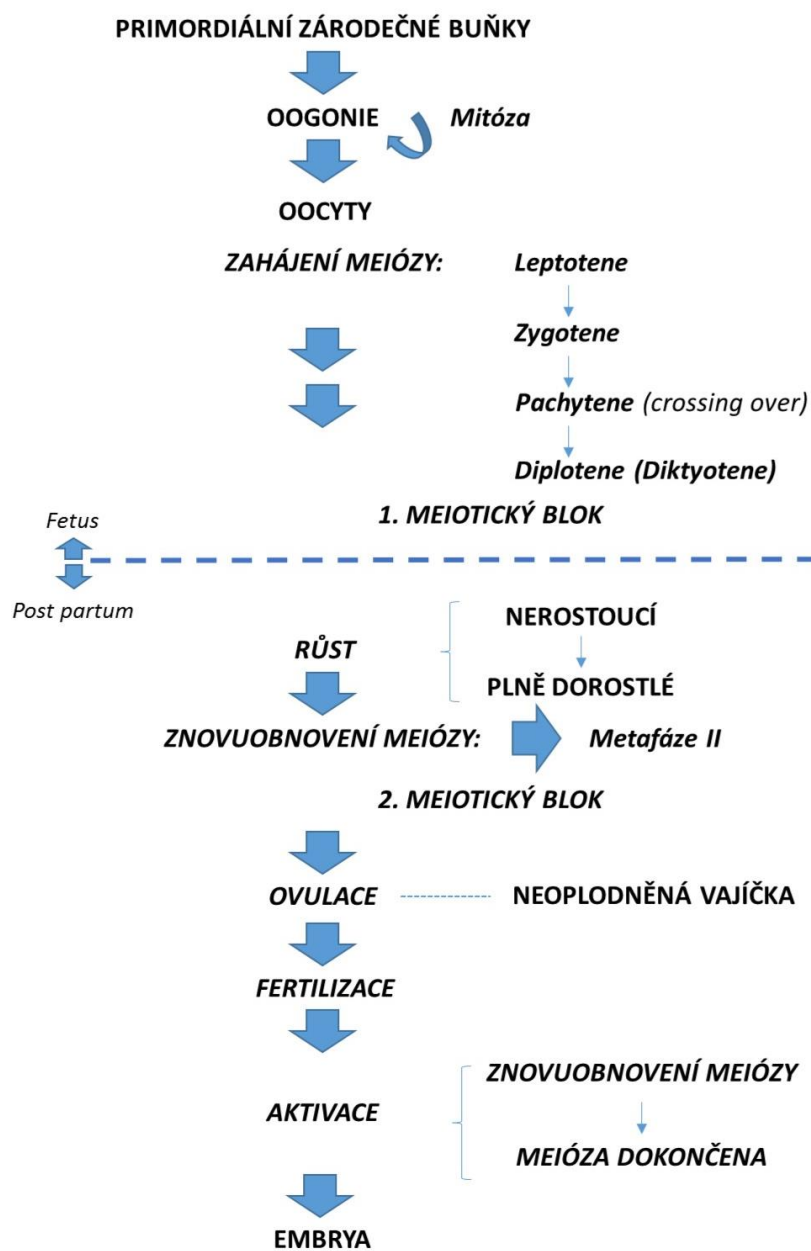
U savců začíná proces vzniku samičích pohlavních buněk ve fetálním vývoji, zahrnuje tvorbu primordiálních zárodečných buněk (primordial germ cells, PGCs) a následné buněčné transformace z PGCs do oogonií a z oogonií do oocytů. Oogeneze pak končí až za měsíce až roky u pohlavně dospělého jedince, kdy se mění oocyty ve vajíčka (Obrázek 1) (Wassarman a Albertini, 1994; van den Hurk a Zhao, 2005). Studie z poslední dekády potvrzují existenci zárodečných kmenových buněk i u dospělých samic, což vyvrací dogma tvorby nových oocytů pouze v prenatálním období (Johnson *et al.*, 2004; White *et al.*, 2012).

#### 2.1.1. Od PGCs k oocytu

Tvorba PGCs, které jsou extragonádálního původu, je začátkem oogeneze. Za místo vzniku těchto kmenových buněk je považována kaudální část primitivního proužku (Wassarman a Albertini, 1994; van den Hurk a Zhao, 2005). Pro tvorbu PGCs jsou důležité minimálně dva kostní morfogenetické proteiny (bone morphogenetic proteins), BMP4 a BMP8B, produkované extraembryonálním ektodermem (Ying *et al.*, 2000; Ying *et al.*, 2001). BMP4 a BMP8B se váží na receptory na pluripotentních buňkách epiblastu a tím vyvolávají jejich specifikaci. Jakmile jsou PGCs vytvořeny, BMP4 a BMP8B už nejsou pro jejich další vývoj potřebné (Vanderhyden, 2002).

Z místa svého vzniku PGCs migrují přes žloutkový váček a zadní trávicí trakt, až se dostávají do genitálních lišt na ventrální části prvoledvin. Není zcela jasné, zda je tato migrace výsledkem améboidních pohybů samotných PGCs, nebo zda jsou spíše tlačeny vpřed okolní rostoucí tkání (van den Hurk a Zhao, 2005). Mechanismy, které řídí migraci a proliferaci PGCs, nejsou zcela známy, ovšem některé látky se zdají být důležitými mediátory těchto procesů. Například integrin – pokud PGCs postrádají integrinové podjednotky beta 1, nedaří se jim účinně kolonizovat genitální lišty (Anderson *et al.*, 1999). Také cytokiny hrají důležitou roli v proliferaci a přežití PGCs. Bazální fibroblastový růstový faktor (bFGF), tumor nekrotizující faktor alfa (TNF-alfa) a neuregulin beta zvyšují počet PGCs v kultuře (Resnick *et al.*, 1998; Kawase *et al.*, 1994; Vanderhyden, 2002). Leukemický inhibiční faktor (LIF) podporuje přežití PGCs inhibicí apoptózy (Pesce *et al.*, 1993).

Obrázek 1 Důležitá stádia v oogenezi u myši



*Vývoj od PGCs po nerostoucí oocyty během fetálního vývoje a vývoj nerostoucích oocytů v oplozená vajíčka u pohlavně dospělých jedinců (převzato z Wassarman a Albertini, 1994; upraveno).*

Původ a migrace PGCs jsou stejné u samce i samice. K diferenciaci pohlaví dochází při vstupu do pohlavních lišt; PGCs se diferencují v závislosti na dostupných pohlavních chromozomech buď v oogonii, nebo ve spermatogonii. U myši k tomu dochází ve dvanácti až třináctidenním embryu (Wassarman a Albertini, 1994).

Oogonie, které vykazují vysokou mitotickou a transkripční aktivitu, jsou obklopeny somatickými buňkami, které budou podporovat jejich další vývoj. Tyto pregranulózní buňky vznikají z epitelových buněk coelomu, z mesonephros a z mezenchymu hřbetní stěny těla. Oogonie s pregranulózními buňkami tvoří primitivní zárodečné provazce (Wassarman a Albertini, 1994; Vanderhyden, 2002).

Jakmile je kolonizace genitálních lišt kompletní, oogonie vstupují do meiózy. Zárodečné buňky, které se nyní nazývají oocyty, vstupují do profáze I, ale dále nepokračují, zůstávají zablokovány v tomto stádiu, konkrétně v diplotene, dokud plně nedorostou. Tyto zablokované oocyty, nazývané primární oocyty (oocyty I. řádu) jsou větší než oogonie, mají více cytoplazmatických organel, intaktní jadernou membránu a jádro je nazýváno zárodečný váček (germinal vesicle, GV), proto se také tyto oocyty označují jako GV oocyty (Obrázek 2) (Vanderhyden, 2002; Eppig *et al.*, 2004; van den Hurk a Zhao, 2005).

### **Obrázek 2 Myší oocyt ve stádiu GV**



#### **2.1.2. Růst oocytu**

Je známo, že pouze plně dorostlé oocyty mohou pokračovat v meióze a mít tak možnost být *in vivo* ovulovány a oplozeny (Wassarman a Albertini, 1994).

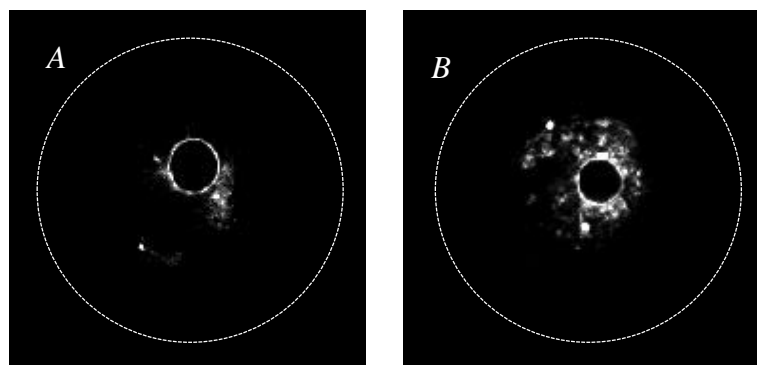
Myší oocyt roste od velikosti 15  $\mu\text{m}$  v průměru do 80  $\mu\text{m}$  během období dvou až tří týdnů, zatímco lidský oocyt začíná na 35  $\mu\text{m}$  a je třeba několika měsíců, aby dosáhl konečné velikosti 120  $\mu\text{m}$  (Gosden *et al.*, 1997).

Růst oocyty a folikulu nutně nemusí probíhat paralelně, u myši většina růstu oocyty probíhá v době, kdy jsou utvořeny první dvě vrstvy granulóznic buněk. Růst tohoto oocyty je pak dokončen, když se začíná formovat folikulární antrum. Naproti tomu u hospodářských zvířat oocyty rostou v průběhu expanze Graafova folikulu (Gosden *et al.*, 1997).

Během růstu oocyty se množí cytoplazmatické orgány a obecně dochází ke změnám v ultrastruktuře oocyty (Wassarman a Albertini, 1994; Gosden *et al.*, 1997). Jádro se zvětšuje a chromatin se kondenzuje v bezprostřední blízkosti jádérka (Wassarman a Albertini, 1994).

Současně s nárůstem jejich velikosti oocyty získávají meiotickou kompetenci, což je schopnost obnovit a dokončit meiózu, a vývojovou kompetenci, což je schopnost dokončit preimplantační vývoj (Sorensen a Wassarman, 1976; Eppig a Schroeder, 1989; Erdogan *et al.*, 2005). Nicméně některé plně dorostlé oocyty tuto meiotickou nebo vývojovou kompetenci postrádají. V této souvislosti byly v plně dorostlých oocytech identifikovány dvě různé konfigurace chromatinu (Obrázek 3). První typ, který je nazýván SN (surrounded nucleolus), má chromatin, který je vysoce kondenzovaný a obklopuje jádérko. Druhý typ je nazýván NSN (non-surrounded nucleolus) – chromatin je méně kondenzovaný a neobklopuje jádérko. U oocytů s jádrem SN typu (SN oocyty) je mnohem větší pravděpodobnost, že dokončí meiotické zrání, ve srovnání s NSN oocyty (Zuccotti *et al.*, 1998; 2002; Liu a Aoki, 2002). Navíc myší SN oocyty se po oplození dokáží vyvinout v blastocystu, zatímco NSN ne (Zuccotti *et al.*, 2002). Tudiž lze říci, že SN oocyty mají plnou meiotickou a vývojovou kompetenci, NSN pouze částečnou.

**Obrázek 3** Myší oocyty se SN (A) a NSN (B)



*Bílá čára naznačuje cytoplazmatickou membránu.*

### 2.1.3. Meiotické zrání oocyty

Proces meiotického zrání je nezbytný pro vývoj gamety v embryu, které pak dává vzniknout zdravému novému jedinci.

Plně dospělé oocyty znovu zahajují meiózu v odpovědi na preovulační vlnu luteinizačního hormonu (LH). Komplexy oocytů s jejich kumuly vyjmuté z antrálních folikulů a kultivované ve vhodném médiu podstupují zrání nezávislé na LH (spontánní zrání) (Pincus a Enzmann, 1935; Edwards, 1965). Z toho vyplývá, že hormonální indukce ovulace není potřebná pro iniciaci programu jaderného zrání. Zároveň oocyty myších kmenů, které vykazují defekty v procesu meiózy, jsou ovulovány v MI, což demonstruje, že ovulace není závislá na dokončení meiotického zrání (Eppig *et al.*, 1977).

Meiotické zrání lze rozdělit na tři druhy procesů: jaderné zrání, epigenetické zrání a cytoplazmatické zrání. Jaderné zrání je charakteristické znovuoobením meiózy a jejím vývojem do metafáze II (více v podkapitole Jaderné zrání).

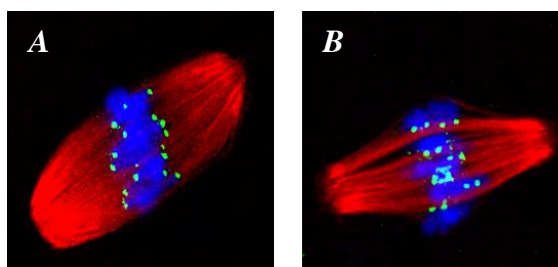
Epigenetické zrání probíhá během růstu oocyty a jedná se o genomické modifikace, které regulují genovou expresi během vývoje oocyty a rané embryogeneze. Epigenetické jevy jsou stabilní dědičné modifikace chromatinu, které mají vliv na expresi genu bez změny sekvence DNA. Při oogenezi epigenetické změny na chromatinu slouží nejen ke genetickému imprintingu specifickému pro gamety, ale také k regulaci genové exprese v průběhu procesu zrání. Během oogeneze nebo spermatogeneze podstupují zárodečné buňky sérii vratných epigenetických změn, které v konečném důsledku udělují genomu parentální imprinting. Reciproký imprinting během gametogeneze stanovuje funkční rozdíl mezi mateřskými a otcovskými alelami (Eppig *et al.*, 2004).

Cytoplazmatické zrání zahrnuje procesy, které připravují oocyt na fertilizaci a embryogenezi. Odehrává se během růstu oocyty i během jaderného zrání. Oocyty hromadí latentní maternální organely, nazývané maternálně ovlivněné faktory (maternal effect-factors), které jsou nezbytné pro transformaci vajíčka do embrya a pro časnou embryogenezi. Tyto faktory jsou kódovány maternálními geny a mohou být syntetizovány během růstu oocyty, meiotického zrání nebo po fertilizaci. Maternální RNA, která je syntetizována během růstu oocyty, je skladována v latentní formě a selektivně translatována (více v kapitole Regulace translace v savčích oocytech) (Eppig *et al.*, 2004; Ellederová *et al.*, 2004; Clarke, 2012).

### 2.1.3.1. Jaderné zrání

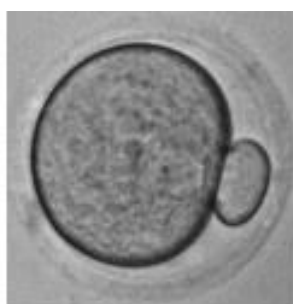
Nejzřetelnějšími projevy znovuoobnovení meiózy jsou rozpad jaderného obalu (nuclear envelope breakdown, NEBD), kondenzace chromatinu a tvorba bipolárního metafázního (MI) vřeténka (Obrázek 4A). Během prvního meiotického dělení homologní chromozomy segregují a jeden jejich set je vydělen do prvního pólového tělíska (PB1) (Obrázek 5). Následně je formováno druhé meiotické (MII) vřeténko (Obrázek 4B). V této fázi jsou oocyty opět zablockovány až do aktivace spermií. Kompletní meiózu oocyty tedy dokončují až po fertilizaci. U většiny savců je meiotické zrání dokončeno v době ovulace, výjimkou je čeleď *Canidae*, u které dochází k ovulaci vajíčka už ve stádiu GV (Hyttel *et al.*, 1990).

**Obrázek 4** MI (A) a MII (B) vřeténka u myších oocytů (A. Šušor)



*Červená – tubulin, modrá – chromatin, zelená – kinetochory*

**Obrázek 5** Myší oocyt s vyděleným prvním pólovým tělískem



Meióza je řízena velkým počtem různých molekul, mezi nejdůležitější patří například metafázi podporující faktor (MPF), mitogenem aktivovaná protein kináza (MAPK) nebo cyklický adenosinmonofosfát (cAMP).

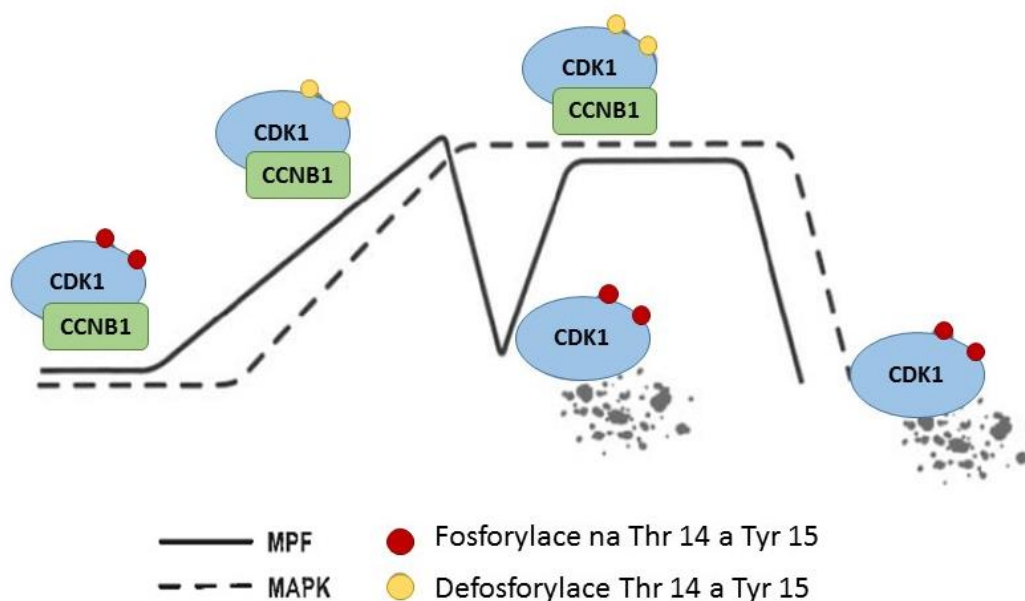
Podobně jako mitotický cyklus v somatických buňkách je meióza regulována oscilacemi v aktivitě cyklin dependentní kinázy 1 (CDK1), což je protein kináza regulovaná cyklinem B1 (CCNB1). CDK1 a CCNB1 jsou komponenty tzv. faktoru podporujícího metafázi (metaphase promoting factor, MPF) (Murray, 1995).

V oocytech je CDK1 aktivována krátce před znovuoobením meiózy. Aktivita CDK1 je nezbytná pro NEBD; tato aktivita roste a dosahuje vrcholu v MI. Během přechodu mezi MI a MII, kdy je vyděleno PB1, se aktivita CDK1 výrazně snižuje. Nicméně je obnovena a udržována na vysoké úrovni během zablokování v MII (Hampl a Eppig, 1995).

Aktivace CDK1 je řízena jednak změnami v množství CCNB1 a jednak její fosforylací na specifických aminokyselinových zbytcích (Verlhac *et al.*, 1994; Hampl a Eppig, 1995; Ledan *et al.*, 2001). Syntéza CCNB1 narůstá během meiotického zrání a nejvyšší je na konci MI, nicméně se začátkem anafáze I je CCNB1 rapidně degradován pomocí ubikvitin-dependentní dráhy (Hampl a Eppig, 1995; Ledan *et al.*, 2001; Glotzer *et al.*, 1991, Karabínová *et al.*, 2011). Nově syntetizovaný CCNB1 je třeba pro obnovení aktivity CDK1 v metafázi II. Inhibice syntézy proteinů na konci MI vede k selhání zablokování v MII (Hashimoto a Kishimoto, 1988).

Aktivita CDK1 je navíc regulována fosforylací a defosforylací na příslušných aminokyselinových zbytcích. CDK1 je udržována v inaktivním stavu během profáze I (první meiotický blok) fosforylací na Thr 14 a Tyr 15. Tato fosforylace je zajišťována inhibičními kinázami MYT a WEE 1 (Parker a Piwnica-Worms, 1992). Před začátkem NEBD jsou tato místa na CDK1 defosforylována fosfatázou CDC25 a díky tomu se CDK1 stává aktivní (Obrázek 5) (Coleman a Dunphy, 1994).

**Obrázek 6 Diagram aktivity MPF a MAPK během jaderného zrání oocyty (Eppig *et al.*, 2004)**



Po dokončení prvního meiotického dělení fungují kontrolní mechanismy, které udržují zralá vajíčka zablokovaná v MII až do oplodnění. Jako jeden z těchto mechanismů byl stanoven tzv. cytotatický faktor (CSF); jeho aktivita byla detekována v oocytech v MII a mizela brzy po fertilizaci (Kubiak *et al.*, 1992; Verlhac *et al.*, 1994).

Zásadní součástí cytotatického faktoru jsou Mos-*proto-onkogen* (MOS protein), kináza mitogenem aktivované protein kinázy (MAPKK/MEK1) a mitogenem aktivovaná protein kináza (MAPK).

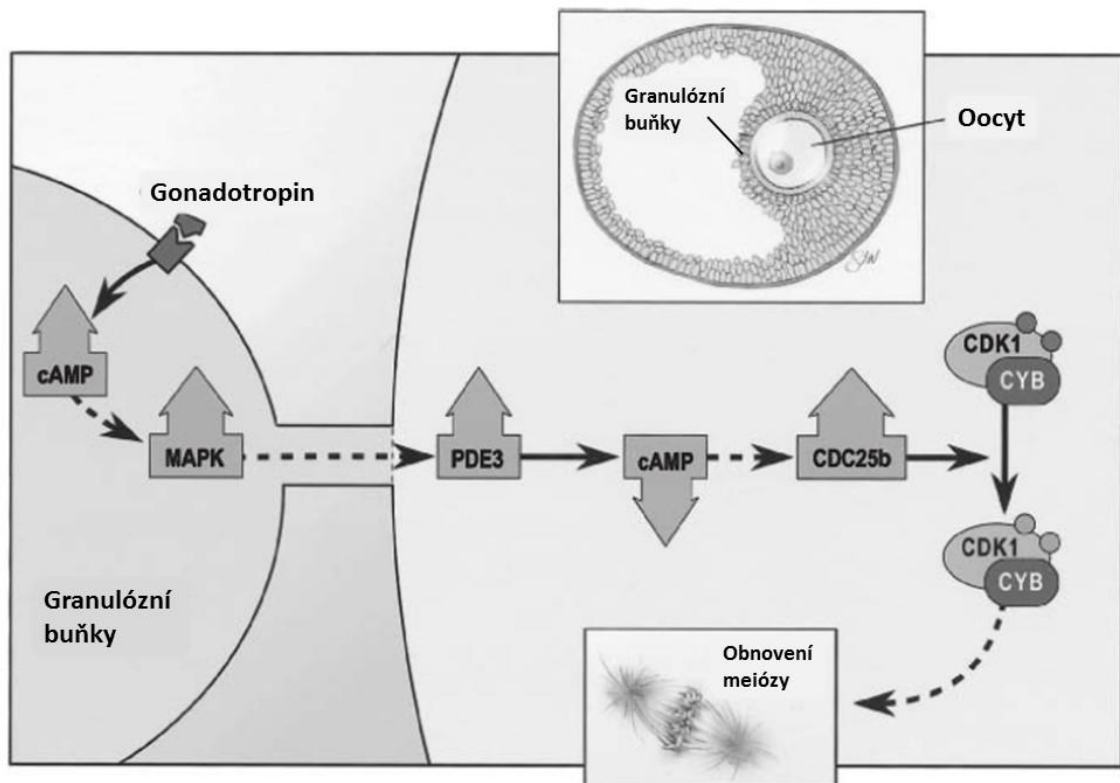
MAPK se aktivuje jen po aktivaci CDK1 a po znovuoobnovení meiózy, její aktivita se zvyšuje během zrání a přetrvává během progrese z MI do MII (Obrázek 5). MAPK je také nezbytná pro udržování druhého meiotického bloku, jelikož oocyty, které pocházejí od *MOS<sup>-/-</sup>* myši a nevykazují žádnou aktivitu MAPK, sice dokončí první meiotické dělení, ale nejsou schopny bloku v MII, namísto toho podstupují spontánní partenogenetickou aktivaci (Verlhac *et al.*, 1996).

Jako molekulární cíl MAP kinázy byla identifikována protein kináza p90RSK (Kalab *et al.*, 1996; Bhatt a Ferrell, 1999). p90RSK pravděpodobně hraje roli v potlačování vstupu do S-fáze mezi prvním a druhým meiotickým dělením, patrně skrze reaktivaci CDK1, respektive inhibicí MYT 1 (Palmer *et al.*, 1998).



Zásadními pro regulaci znovuobnovení meiózy jsou hladiny cyklického adenosinmonofosfátu (cAMP). Gonadotropní stimulace zvyšuje hladinu cAMP v granulózních buňkách, což s sebou nese zvýšenou aktivitu MAPK. To má pak za následek generování neznámého meiózu vyvolávajícího signálu, který se dostává přes gap junction, spoje propojující granulózní buňky a oocyt. Tento signál zvyšuje v oocytu aktivitu cAMP-fosfodiesterázy 3 (PDE3), čímž se snižuje hladina cAMP v oocytu. Poté po zatím neznámém počtu dalších kroků dochází k aktivaci CDC25 a tím i k aktivaci MPF (Obrázek 6) (Eppig *et al.*, 2004).

**Obrázek 7 Mechanismus znovuobnovení meiózy vyvolaného gonadotropiny**



Šipky naznačují zvýšení nebo snížení aktivity nebo hladiny dané molekuly. Přerušované čáry naznačují, že při přechodu do další události může být zahrnuto více kroků (Eppig *et al.*, 2004).

Oocyty, které prošly meiotickým zráním, mohou být ovulovány a oplodněny. Proces fertilizace, tedy spojení samčí a samičí pohlavní buňky, vajíčka a spermie, zahrnuje několik rozpoznatelných kroků. Spermie musí podstoupit akrozomální reakci, aby mohla penetrovat vrstvou *zona pellucida* (Wassarman, 1999). Při splnutí membrán obou buněk vajíčko podstupuje proces aktivace. Zahajuje tzv. kortikální reakci, což je exocytóza obsahu kortikálních granul do perivitelinního prostoru. Enzymy z těchto granul modifikují *zona pellucida* a odstraňují z ní receptory pro navázání spermií, proto je tento proces důležitou prevencí proti polyspermii (Ducibella, 1996).

Před fertilizací je vajíčko zablokováno v MII a znovuzahájení a dokončení meiózy je kritickým momentem oplodnění. K obnovení meiózy dochází během dekonkondenzace spermatického chromatinu a tvorby paternálního prvojádra v cytoplazmě vajíčka. Aktivita buněčných proteinů, a tím i tento opětovný vstup do buněčného cyklu, jsou řízeny řadou kináz a fosfatáz. Během znovuoobnovení meiózy lze pozorovat jisté morfologické změny, především vstup vajíčka do anafáze a vydělení druhého pólového tělíska (Williams, 2002). Pak může dojít k fúzi paternálního a maternálního haploidního genomu a vzniku zygoty.

## 2.2. Regulace proteosyntézy v savčím oocytu

Kontrola a řízení proteosyntézy, respektive translace mRNA hraje zásadní roli v regulaci genové exprese během oogeneze a rané embryogeneze. Při regulaci translace záleží především na její iniciaci, která je řízena pomocí 5' a 3' nepřekládané oblastní mRNA (5' a 3' untranslated region, 5'UTR a 3'UTR) a začíná formováním 48S pre-iniciačního komplexu. Ten váže 40S ribozomální podjednotku a řadu eukaryotních iniciačních faktorů (Rhoads, 1993; Gray a Wickens, 1998). Vazba ribozom-mRNA při cap-dependentní translaci zahrnuje interakce zprostředkované eukaryotním translačním iniciačním faktorem 4F (eIF4F), který je také nazýván čepičku vázající komplex. Tento faktor sestává ze tří podjednotek: eIF4E (specificky rozeznává 7-methylguanoinovou čepičkovou strukturu na 5' konci mRNA), eIF4A (má helikázovou aktivitu) a eIF4G (spojuje faktory eIF4E a eIF4A) (Mader *et al.*, 1995).

Kromě iniciace translace, která je závislá na čepičkové struktuře, existuje u eukaryot mechanismus na čepičce nezávislý, tzv. IRES (interní vstupní místo ribozomu, internal ribosome entry site). Spočívá v nasedání ribozomu na specifické sekundární struktury mRNA,

které se nacházejí uvnitř 5'UTR ve značné vzdálenosti od čepičkové struktury (Ellederová *et al.*, 2004).

Míra translace je hlavním determinantem buněčného růstu, diferenciaci a vývoje (Tomek *et al.*, 2002).

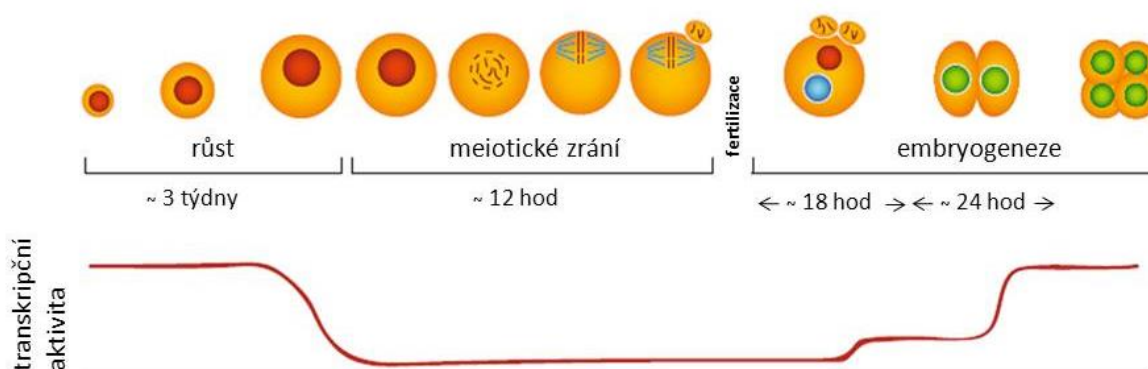
### **2.2.1. Transkripce v oocytu**

Během růstové fáze jsou savčí oocyty transkripčně aktivní. Tato transkripční aktivita je nezbytná pro nabytí meiotické kompetence, a tedy i pro schopnost dokončit meiózu, pro fertilizaci a časný embryonální vývoj. V období růstu se totiž v oocytu díky vysoké míře transkripce mohou kumulovat potřebné cytoplazmatické organely a makromolekuly (Eppig *et al.*, 2004). V době, kdy oocyty dosahují své plné velikosti, se transkripce rychle snižuje na velmi nízkou až nedetekovatelnou úroveň a na této úrovni zůstává po celou dobu meiotického zrání oocytu (Obrázek 7).

Pozastavení transkripce je spojeno se změnami v distribuci chromatinu v jádře. Tyto změny jsou již zmíněné konformace non-surrounding nucleolus (NSN) a surrounded nucleolus (SN) (Zuccotti *et al.*, 1998; 2002; Liu a Aoki, 2002).

Také po oplození je transkripce nízká; opětovně se zvyšuje až po aktivaci embryonálního genomu – ve stádiu, které je druhově specifické, např. u myši se jedná o dvoubuněčné embryo, u člověka o čtyřbuněčné a u krávy o osmi až šestnáctibuněčné stádium (Clarke, 2012).

**Obrázek 8 Transkripční aktivita během oogeneze a rané embryogeneze**



*Uvedená časová období odpovídají vývoji u myši (Clarke, 2012).*

### **2.2.2. Translace v oocytu**

Z výše uvedeného vyplývá, že celé období od pozdního růstu oocyty až po časný embryonální vývoj je závislé na RNA, která byla syntetizována během růstu oocyty. Plně dorostlý oocyt obsahuje téměř dvakrát tolik mRNA než je přítomno v blastocystě (Clarke, 2012).

Některá mRNA nově syntetizovaná v rostoucím oocyty musí být translatována na podporu právě probíhajících biologických dějů, naproti tomu jiná musí být bezpečně uložena a translatována až ve vhodném stádiu oogeneze nebo rané embryogeneze. Navíc musí být maternální mRNA následně degradována, aby byla umožněna kontrola vývoje nově syntetizovanou embryonální mRNA (Clarke, 2012).

Mnohé mRNA syntetizované v rostoucích oocytech jsou tedy okamžitě translatovány, ale část mRNA, až 30 %, je skladována ve stabilní formě ribonukleoproteinových částic (RNPs) a translace je u nich potlačena až do meiotického zrání nebo do fertilizace, kdy je mnoho mRNA translačně aktivováno (Piqué *et al.*, 2008; Clarke, 2012; Ellederová *et al.*, 2004).

Jeden možný mechanismus represe translace je uskutečňován pomocí cytoplazmatického polyadenylačního elementu (CPE) (Brook *et al.*, 2009, Kang a Han, 2011, Radford *et al.*, 2008). Tato sekvence bohatá na uracil (UUUUA(A)U) se vyskytuje na 3'UTR (Clarke, 2012).

Obsahují ji jen mRNA, u kterých dochází k prodlužování poly(A) konce i v cytoplazmě (Ellederová *et al.*, 2004). Aktivace těchto mRNA je pak při meiotickém zrání závislá na prodlužování poly(A) konce a na CPE. V rostoucích a plně dorostlých nezralých oocytech jsou translačně potlačeny mRNA nesoucí CPE. Tyto mRNA jsou následně aktivovány během zrání. Naopak mRNA, které neobsahují CPE vykazují chování opačné (Clarke, 2012). Polyadenylaci a časově specifickou translaci některých maternálních transkriptů reguluje protein 1 vázající CPE (CPEB1), jehož fosforylace a degradace je zásadní pro vývoj oocyty (Karabínová *et al.*, 2011), nicméně dráhy, které regulují fosforylaci tohoto proteinu, nejsou ještě zcela objasněny, ačkoliv kandidátní kinázy jako je Aurora kináza A (Komrsková *et al.*, 2014), MAPK (Keady *et al.*, 2007) nebo CDK1 (Kuo *et al.*, 2011) jsou v současnosti studovány.

Další mechanismus represe translace se odvíjí od dostupnosti translačních iniciačních faktorů, které se podílejí na vazbě mezi mRNA a ribozomem. Z těchto faktorů byl nejvíce studován eIF4E (4E), protein, který je součástí komplexu eIF4F (4F) a je zodpovědný za vazbu k čepičkové struktuře (Mader *et al.*, 1995).

Během *in vitro* zrání myších (Gavin a Schorderet-Slatkine, 1997; Šušor *et al.*, 2015), bovinních (Tomek *et al.*, 2002) a prasečích (Ellederová *et al.*, 2006, 2008) oocytů je 4E postupně fosforylován, přičemž maximální fosforylace dosahuje ve stádiu MII. Některé dřívější studie indikovaly, že zvýšená úroveň fosforylace 4E u savčích buněk přímo pozitivně koreluje se zvýšenou úrovní translace (Fraser *et al.*, 1999) a také že fosforylace 4E zvyšuje *in vitro* jeho vazbu na čepičkovou strukturu (Minich *et al.*, 1994).

Na druhé straně jiné studie mají za to, že tvorba 4F komplexu nevyžaduje fosforylaci 4E a navíc že fosforylace 4E naopak snižuje jeho vazbu k čepičce (Morley a Naegele, 2002; Scheper *et al.*, 2002). Scheper *et al.* (2002) tato data vysvětlují tím, že snížení afinity k čepičkové struktuře fosforylací 4E by mohlo usnadnit uvolňování komplexu 4F z 5' konce mRNA a v důsledku toho zvýšit ribozomální migraci a iniciaci translace.

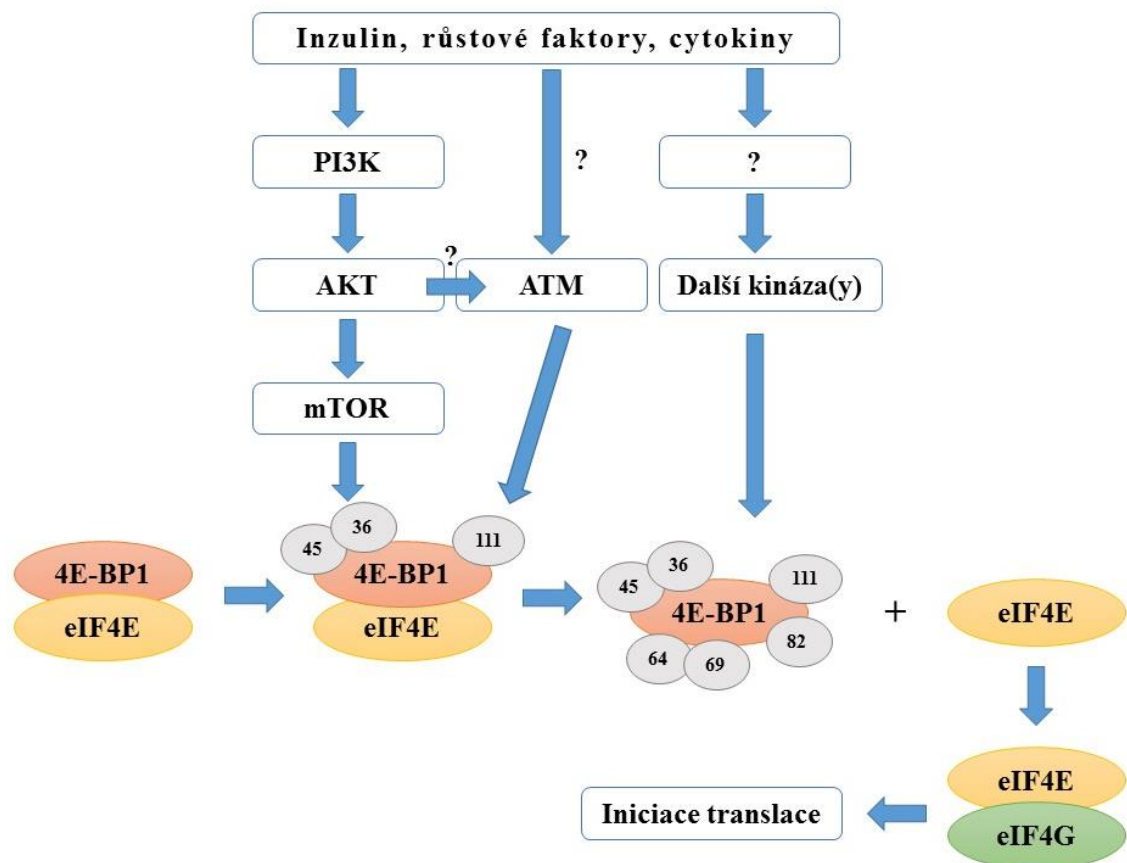
Z výše uvedeného vyplývá, že hlavním mechanismem regulace dostupnosti 4E pro translaci není fosforylace, která pravděpodobně neovlivňuje vazbu 4E na 4G (Morley a Naegele, 2002; Scheper *et al.*, 2002), ale spíše vazba 4E k proteinům – translačním represorům, tzv. 4E-BPs (4E vazebné proteiny, 4E binding proteins). Hypofosforylované 4E-BPs soutěží s 4G o společné vazebné místo na 4E (Mader *et al.*, 1995). Nejvíce studovaným z 4E-BPs je 4E-BP1, který ve své nefosforylované formě váže 4E a touto cestou zabraňuje

formování aktivního 4F komplexu. Po fosforylaci se 4E-BP1 uvolní od 4E, který je pak dostupný pro vazbu s 4G (Gingras *et al.*, 1999).

### 2.2.3. 4E-BP1

Jak již bylo zmíněno, protein 4E-BP1 je jedním z translačních represorů, které se váží na 4E, součást iniciačního komplexu 4F. Pokud je 4E-BP1 hypofosforylovaný, blokuje na 4E vazebné místo pro 4G, čímž znemožňuje tvorbu komplexu 4F a translace je tím potlačena. Naopak hyperfosforylovaný 4E-BP1 se uvolní od 4E a ten je díky tomu volný pro tvorbu iniciačního komplexu (obrázek 8) (Mader *et al.*, 1995; Gingras *et al.*, 1999).

**Obrázek 9** Hyperfosforylace a uvolnění 4E-BP1 z vazby s eIF4E



Zde studovanou dráhou iniciace translace je dráha AKT/mTOR. Další možnou dráhou, která ovlivňuje fosforylaci 4E-BP1 je dráha Ser/Thr kinázy ATM (Ataxia telangiectasia mutated), jež je aktivována dvouvláknovými fragmenty DNA (převzato z Yang a Kastan, 2000; upraveno).

Úlohou 4E-BP1 v savčích oocytech se zabývaly některé studie. Tomek *et al.* (2002) zjistili u bovinních oocytů pokles celkové proteosyntézy během *in vitro* zrání, spojený s defosforylací 4E-BP1 a formováním eIF4E – 4E-BP1 komplexu. Podle Ellederové *et al.* (2006) je u prasečích oocytů 4E-BP1 fosforylován v MI a ještě výrazněji v MII, takže jeho vazba k 4E je v těchto stádiích v porovnání s GV stádiem redukována. Navíc množství faktorů 4E a 4G navázaných na m<sup>7</sup>-methyl GTP-sefárovou výrazně roste v MI a MII oocytech, což naznačuje formování aktivního komplexu 4F v těchto stádiích. U MI a MII oocytů byl také zaznamenán výrazný pokles komplexu eIF4E – 4E-BP1 a samotného eIF4G.

Zároveň ovšem byly u prasečích oocytů zaznamenány úrovně proteosyntézy, které jsou nejvyšší v GV stádiu a postupně klesají v MI a MII (Ellederová *et al.*, 2006). Tyto rozdílné poznatky objasňují autoři studie dvěma možnými hypotézami. Buď translace během zrání prasečích oocytů probíhá cap-independentním mechanismem (pomocí IRES), nebo dochází k potlačení cap-dependentní translace jinou cestou než přes vazbu eIF4E – 4E-BP1, pomocí 3'UTR a CPE.

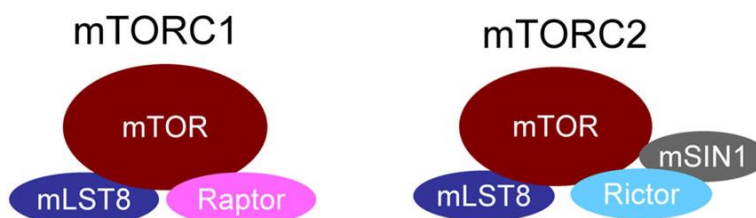
Zvýšená fosforylace 4E-BP1 během meiotického zrání byla zaznamenána také u myších oocytů. Navíc zde byla pozorována prostorová lokalizace fosforylovaného 4E-BP1 a to v oblasti meiotického vřeténka (Romasko *et al.*, 2013; Šušor *et al.*, 2015).

#### 2.2.4. mTOR

mTOR („savčí cíl rapamycinu“, mammalian target of rapamycin) je Ser/Thr protein kináza z rodiny kináz spojených s fosfatidylinositol kinázami (phosphatidylinositol kinase-related kinase, PIKK). Je katalytickou komponentou dvou odlišných signálních komplexů, mTOR – Raptor komplexu (mTORC1) a mTOR – Rictor komplexu (mTORC2) (Obrázek 9). Každý komplex je složen z proteinů mTOR, mLST8 neboli GβL (mammalian lethal with SEC13 protein 8/G protein beta subunit-like), který se váže ke kinázové doméně mTOR, a deptor (protein obsahující DEP doménu interagující s mTOR, DEP domain-containing mTOR-interacting protein). mTORC1 obsahuje navíc Raptor (regulační protein asociovaný k mTOR, regulatory-associated protein of mTOR) a PRAS40 (40 kDa substrát AKT bohatý na prolin, proline-rich AKT substrate of 40 kDa). mTORC2 obsahuje, kromě již uvedeného, Rictor (součást mTOR insenzitivní k rapamycinu, rapamycin-insensitive companion of mTOR), mSin1 (protein 1 interagující se stresem aktivovanou protein kinázou, stress-activated-protein-kinase-interacting protein 1) a PRR5/protor (protein 5 bohatý na prolin,

proline-rich protein 5). Molekulární funkce těchto kofaktorů zůstávají málo objasněné (Bhaskar a Hay, 2007; Cybulski a Hall, 2009; Huang a Manning, 2009; Wiza *et al.*, 2012; Kogasaka *et al.*, 2013).

### Obrázek 10 Komponenty mTOR komplexů



*Nejsou zobrazeny protor a inhibiční proteiny PRAS40 (inhibitor mTORC1) a dektor (inhibitor obou komplexů) (Takei a Nawa, 2014).*

Obecně je mTORC1 znám pro regulaci množství buněčných procesů, především translaci mRNA a proteosyntézy, kontrolu buněčného růstu a proliferace, progresu buněčného cyklu a apoptózy; díky jeho schopnosti integrovat signály z živin a růstových faktorů především přes ribozomální S6 kinázy (S6K) a přes 4E-BPs (Fingar a Blenis, 2004; Ruvinsky a Meyuhas, 2006; Astrinidis *et al.*, 2010); zatímco mTORC2 je spojen s kontrolou organizace aktinového cytoskeletu (Jacinto *et al.*, 2004).

U mitotických buněk je mTOR fosforylován na Ser 2448 nebo Ser 2481 a exprese a lokalizace těchto fosforylovaných forem byla popsána na mitotickém aparátu (Vazquez-Martin, 2009).

Inhibice mTOR v granulózích buňkách a buňkách ovariálního folikulu negativně ovlivňuje proliferaci granulózy a redukuje folikulární růst. Aktivita mTOR se totiž zvyšuje v průběhu M-fáze buněčného cyklu. mTOR-specifická fosforylace p70S6 kinázy a 4E-BP a také exprese Raptor jsou během M-fáze zvýšeny. Pokud je mTOR u somatických buněk v G1 fázi buněčného cyklu inhibován rapamycinem, specifickým inhibitelem mTORC1, je většina těchto buněk v této fázi zablokována. Buňky, které i přes přítomnost rapamycinu pokračují do M-fáze, vykazují v závislosti na dávce inhibitoru aberantní mitotické figury, tzv. anafázní mosty (Yu *et al.*, 2011). U oocytů *Xenopus laevis* naopak vystavení vlivu rapamycinu urychluje NEBD, protože v přítomnosti tohoto inhibitoru je potlačena translace RNA, která



v oblasti čepičky obsahuje úsek až třinácti pyrimidinů, tzv. 5'TOP (5'terminal oligopyrimidine tract); naopak translace RNA, které 5'TOP neobsahují nebo obsahují IRES je v přítomnosti rapamycinu efektivnější (Schwab *et al.*, 1999).

mTORC1 se během M-fáze podílí na fungování vřeténka. Například při vystavení vlivu rapamycinu byly jak u kvasinek, tak u savčích buněk i u oocyty pozorovány negativní změny v segregaci chromozomů (Bonatti *et al.*, 1998; Šušor *et al.*, 2015). Podle Astridinis *et al.*, (2010) je také duplikace centrosomu regulována komponentami z dráhy mTORC1 a aberantní aktivace této dráhy může vést k amplifikaci centrosomu, chromozomální nestabilitě a aneuploidii (Astridinis *et al.*, 2010). Lince-Faria *et al.* (2009) popsali lokalizaci mTOR na dynamické struktuře mitotického vřeténka a jeho nezbytnost pro normální časový průběh mitózy.

V případě signální dráhy pro regulaci translace přes translační represory bylo dokázáno, že *in vitro* je pomocí mTOR zprostředkována fosforylace 4E-BP1 na Thr 36 a Thr 45 a zabraňuje tím interakci 4E-BP1 s 4E. *In vivo* je fosforylace na Thr 45 hlavním regulátorem asociace 4E-BP1 – eIF4E. Tedy fosforylace 4E-BP1 prostřednictvím mTOR podporuje iniciaci translace (Burnett *et al.*, 1998).

#### **2.2.4.1. MTOR v oocyty**

Studie, kterou provedli Yang *et al.* (2009) na myších oocytech, ukázala, že mTOR mRNA je exprimována během meiotického zrání a že mTOR je v GV lokalizován na jaderné membráně, při NEBD se vyskytuje kolem chromozomů a v MII fázi na meiotickém vřeténku. Pokud byly oocyty vystaveny vlivu rapamycinu, pak se lokalizace mTOR změnila a jeho exprese byla výrazně nižší. V GV byl mTOR po kultivaci s rapamycinem distribuován více uvnitř jádra, po NEBD se nevyskytoval kolem chromozomů a v MII mTOR nebyl vůbec patrný. Po NEBD a v MII bylo také změněno samotné uspořádání chromozomů (Yang *et al.*, 2009).

Pomocí rapamycinu bylo také zjištěno, že mTOR je zapojen do migrace meiotického vřeténka a vydělení PB1, jelikož při déletrvajícím vystavení oocytů tomuto inhibitoru byla inhibována aktivita mTORC2 a také dráhy S6K1 a 4E-BP1/eIF4E, zprostředkované pomocí mTORC1, byly inhibovány. Tyto dráhy jsou nezbytné pro expresi malých GTPáz z Rho rodiny (RHO1, RAC1, CDC42) při buněčné motilitě a reorganizaci cytoskeletu v průběhu

meiotického zrání myších oocytů. Kultivací s rapamycinem tak byla v myších oocytech narušena migrace meiotického vřeténka a asymetrické dělení oocyty; tyto děje jsou zprostředkovány právě přes mTOR a GTPázy z Rho rodiny. Zajímavé je, že narušení asymetrie se obvykle objevuje u meiotického dělení oocytů s nízkou kvalitou nebo u oocytů, které prošly tzv. post-ovulatorním stárnutím (aging) a tyto vady jsou spojeny s neplodností u savců (Lee *et al.*, 2012). Nicméně autoři této studie uvádějí také nárůst v expresi mTOR mRNA při přechodu z MI do MII fáze, který se zdá být nepravděpodobný při přihlédnutí k faktu, že transkripce je během meiotického zrání v oocyty potlačena.

Odlišnými funkcemi jednotlivých komplexů mTORC1 a mTORC2 při meióze v myších oocytech a mitóze v kumulárních buňkách se zabývali Kogasaka *et al.* (2013). Výsledky této studie naznačují, že je to právě mTORC2, který je zodpovědný za kontrolu migrace meiotického vřeténka pomocí regulace reorganizace mikrofilamentů, jelikož Rictor byl lokalizován kolem pólů vřeténka pouze v MII oocytech a v kumulárních buňkách nikoliv (Kogasaka *et al.*, 2013). Naproti tomu mTORC1 se zdá být spojen s funkcí vřeténka během mitózy i meiotického zrání oocytů; jeho silná exprese byla pozorována na pólech i na středovém tělísku (midbody) vřetének v kumulárních buňkách i v oocytech (Kogasaka *et al.*, 2013; Romasko *et al.*, 2013; Šušor *et al.*, 2015).

Pomocí Torinu 2, což je inhibitor mTOR, byla sledována fosforylace 4E-BP1 (Mayer *et al.*, 2014). Po kultivaci bovinních oocytů v tomto inhibitoru byl zaznamenán pokles ve fosforylaci 4E-BP1 a přibližně 60 % oocytů bylo po 24 hodinách v inhibitoru zablokováno v MI stádiu. Pokles fosforylace se ukázal jako reverzibilní, protože po dalších 24 hodinách v médiu bez Torinu 2 byla úroveň fosforylace srovnatelná s kontrolní skupinou. Nicméně oocyty zůstaly zablokované v MI, což může indikovat potřebu časově a prostorově regulované translace během meiotického zrání.

V této studii byly mimo jiné také sledovány fosforylace mTOR (Ser 2448), Rictor (Thr 1135) a Raptor (Ser 792). Ukázalo se, že fosforylace mTOR a Rictor jsou v GV nízké a narůstají v MII stádiu. Raptor vykazuje chování opačné. Fosforylace na Ser 792 a Thr 1135 mohou potenciálně inaktivovat celý mTOR komplex, takže výsledky této studie mohou indikovat fakt, že mTORC1 je inaktivní v GV stádiu, ale aktivní po NEBD, v MII. Nicméně je zajímavé, že na tyto fosforylace neměla vliv kultivace oocytů s Torinem 2 (Mayer *et al.*, 2014).

### 2.2.5. AKT

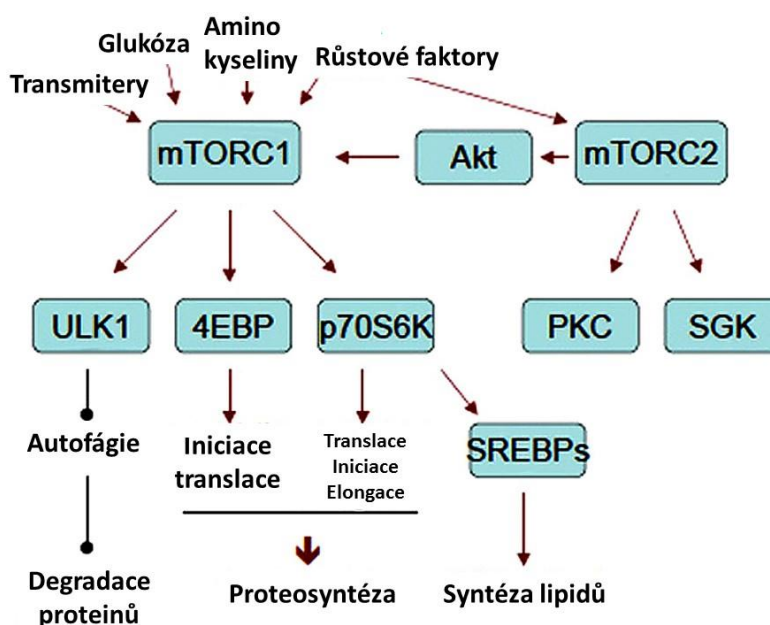
Ser/Thr protein kináza AKT, také známá jako protein kináza B (PKB) je centrálním uzlem v buněčné signalizaci růstových faktorů, cytokinů a dalších buněčných stimulů. Hypo- nebo hyperaktivace AKT vede k patofyziologickým dějům, které jsou podstatou různých onemocnění, například diabetu druhého typu nebo nádorového bujení. Lze tedy říci, že AKT má klíčovou roli v mnohých buněčných procesech jako je buněčná proliferace a migrace, metabolismus glukózy, apoptóza a transkripce (Manning a Cantley, 2007).

Aktivace AKT je závislá na třídě I fosfoinositid-3-kináz (PI3Ks), které jsou aktivovány pomocí dráh vedoucích od tyrosin kinázových receptorů, nebo od receptorů spojených s G-proteiny (Engelman *et al.*, 2006). PI3K vytváří lipidového druhého posla fosfatidylinositol-3,4,5-trifosfát (PIP<sub>3</sub>), který se přímo váže na Pleckstrin homologní doménu AKT a Fosfoinositid-dependentní kinázu 1 (PDK1). PDK1 fosforyluje aktivační smyčku AKT na Thr 308, což je nezbytné pro aktivaci AKT (Alessi *et al.*, 1996, 1997). Fosforylace AKT na konzervativních zbytcích (Ser 473) vede k dalšímu nárůstu aktivity AKT (Alessi *et al.*, 1996).

Aktivní AKT fosforyluje množství substrátů zahrnutých v regulaci buněčného přežití, růstu a proliferace (Manning a Cantley, 2007). Mezi substráty AKT patří i mTOR, respektive mTORC1, který následně fosforyluje ribozomální S6 kinázy a 4E-BPs, což v konečném důsledku stimuluje výše zmíněné buněčné děje (Huang a Manning, 2009).

mTOR může být ovšem kinázově nadřazený (upstream) i podřazený (downstream) AKT (Obrázek 10) (Huang a Manning, 2009; Takei a Nawa, 2014).

Obrázek 11 Schéma buněčných procesů ovlivněných AKT signální kaskádou



Kromě již zmíněných molekulárních cílů ovlivňuje dráha mTORC1 také protein kinázu ULK1 (savčí homolog proteinu 1 spojeného s autofágií, autophagy-related protein 1 homolog) a transkripční faktory SREBPs (proteiny vázající regulační element sterolu, sterol regulatory element binding proteins). Dráha mTORC2 ovlivňuje kromě jiného také protein kinázu C (PKC) a sérem a glukokortikoidy regulovanou kinázu (SGK, serum and glucocorticoid-regulated kinase) (Takei a Nawa, 2014).

AKT reguluje mTORC1 pomocí fosforylace TSC2 (tuberin), což je jeden ze dvou proteinů tvořících heterodimerický komplex, který funguje jako funkční jednotka v supresi mTOR. Druhým proteinem je hamartin (TSC1). TSC2 obsahuje tzv. GAP (protein aktivující GTPázu) doménu, která stimuluje GTPázovou aktivitu malého G-proteinu RHEB (obohacený homolog Ras v mozku, Ras homolog enriched in brain), čímž zvyšuje přeměnu RHEB do inaktivního stavu vázajícího GDP (Manning a Cantley, 2003). Ačkoliv molekulární mechanismus není přesně znám, RHEB, který váže GTP, je účinný aktivátor mTORC1. V odpovědi na růstové faktory AKT přímo fosforyluje TSC2 na čtyřech nebo pěti aminokyselinových zbytcích, což mu znemožňuje jeho supresorovou funkci (Inoki *et al.*, 2002).

Na základě výsledků Gingras *et al.* (2014) je zřejmé, že PI3K a jí kinázově podřazená AKT jsou součástí dráhy vedoucí *in vivo* k fosforylaci 4E-BPs a tato fosforylace je senzitivní

k rapamycinu, což vede k závěru, že ve fosforylační kaskádě ovlivňující 4E-BP1 je mTOR podřazený AKT (Gingras *et al.*, 2014).

### 2.2.5.1. AKT v oocytu

Signální dráhy PI3K/AKT a mTOR se zdají být zásadními regulátory mimo jiné při znovuoobnovení meiózy a zrání oocytů u různých druhů (Makker *et al.*, 2014).

Výsledky získané z oocytů hvězdic (Asteroidea) indikují, že AKT stimuluje přechod z G2 do M-fáze díky tomu, že reguluje aktivitu MYT 1 (Okumura *et al.*, 2002). Díky tomu je snížena inhibiční fosforylace MPF a MPF může být aktivován prostřednictvím fosfatázy CDC25. Tyto experimenty identifikují AKT jako iniciátor M-fáze, nicméně u *Xenopus laevis* sice aktivita AKT roste během znovuoobnovení meiózy stimulovaného inzulinem, ale při znovuoobnovení meiózy indukovaném progesteronem, což je více fyziologický stimul, má aktivita AKT spíše pomocnou funkci (Andersen *et al.*, 2003).

AKT (společně s protein kinázou A, PKA) se u myších oocytů podílí na zvyšování enzymatické aktivity cAMP-fosfodiesterázy (PDE3A), která je zodpovědná za degradaci cyklického adenosin monofosfátu (cAMP) na počátku meiotického zrání (Han *et al.*, 2006; Vaccari *et al.*, 2008).

Během meiotického zrání myších oocytů fosforylace a aktivace AKT předchází rozpad jaderné membrány. Tato aktivita AKT je přechodná a značně klesá, jakmile oocyty projdou NEBD. Navíc bylo u myších oocytů zjištěno, že AKT se podílí na aktivaci CDK1 a tím i na znovuoobnovení meiózy (Kalous *et al.*, 2006).

Tomek a Smiljakovic (2005) na základě experimentů s bovinními oocyty zjistili, že AKT je detekována, stejně jako MAPK, po celou dobu meiotického zrání, bez žádných zvláštních změn v GV, MI a MII stádiích. Nicméně dříve publikované výsledky Vignerona *et al.* (2004) poukazují na žádné nebo jen velmi malé množství AKT v GV stádiu. Rozdílné výsledky mohou být vysvětleny použitím různých protilátek s různou specifitou (Tomek a Smiljakovic, 2005).

Ve své studii se Tomek a Smiljakovic (2005) také zabývali aktivitou AKT a vlivem inhibitoru SH6, analogu fosfatidylinositolu, na ni. Ukázalo se, že AKT je aktivní především v MI stádiu. Při kultivaci s SH6 byla většina oocytů zablokována v MI, nicméně také velké množství oocytů zrало až do MII, což může být způsobeno přítomností množství aktivované

AKT už v GV. Jelikož syntéza proteinů v bovinních oocytech je na svém maximu při NEBD a během MI stádia, je možné, že se AKT podílí na vyvážené proteosyntéze fosforylací 4E-BP1 (Tomek a Smiljakovic, 2005).

Zajímavé zjištění bylo učiněno u zrání myších oocytů. Jiang *et al.* (2014) prokázali zásadní úlohu Survivinu, nejmenšího člena rodiny inhibitorů apoptózy (inhibitor of apoptosis protein, IAP). Tento protein je kinázový cíl PI3K/AKT a mTOR signálních drah a u myši je důležitý pro produkci vajíček a samičí fertilitu. Ovlivňuje správnou organizaci meiotického vřeténka, aktivitu kontrolního bodu vřeténka, včasný přechod z metafáze do anafáze a cytokinezi (Jiang *et al.*, 2014, Šušor *et al.*, 2015).

### 2.2.6. CaMKII

Kalcium/kalmodulin-dependentní protein kináza II (CaMKII) je Ser/Thr protein kináza, která je aktivována vápenatými kationty a kalmodulinem (CaM) a podílí se na regulaci buněčného cyklu a transkripce (Tombes a Krystal, 1995; Hama *et al.*, 1995). CaMKII se vyskytuje ve 4 isoformách –  $\alpha$ ,  $\beta$ ,  $\gamma$  a  $\delta$  o molekulární hmotnosti od 52 kDa ( $\alpha$ ) do 58 – 61 kDa ( $\beta$ ,  $\gamma$  a  $\delta$ ) (Tashima *et al.*, 1996; Baltas *et al.*, 1995; Braun a Schulman, 1995). Byly již publikovány mnohé studie zabývající se problematikou  $\text{Ca}^{2+}$ , CaM i CaMKII v průběhu meiotického zrání oocytů, ale také například v souvislosti s aktivací oocytů po fertilizaci nebo partenogenetické aktivaci.

Během meiotického zrání savčích oocytů dochází k oscilacím nebo vlnám kalciových iontů a tyto hrají, dle některých studií, při zrání důležitou roli (Balakier *et al.*, 2002; Carroll *et al.*, 1994; Sedmíková *et al.*, 2003). Studie zabývající se gap junction komunikací v komplexech oocyt – kumulus zjistily, že FSH a EGF, které stimulují zrání *in vitro*, neovlivnily koncentrace  $\text{Ca}^{2+}$  v těchto komplexech (Webb *et al.*, 2002). Takže zůstává otázka, zda jsou  $\text{Ca}^{2+}$  oscilace potřebné pro zrání oocytu. Rozdílné výsledky mohou být dány rozdíly mezi druhy a mezi mechanismy, které vyvolávají spontánní zrání *in vitro* a zrání indukované gonadotropiny *in vivo* (Bi *et al.*, 2004).

Intracelulárním mediátorem vápníkové signalizace je všudypřítomný protein kalmodulin (CaM). Vazba vápníku na CaM umožňuje kalmodulinu aktivovat různé cílové enzymy, jako jsou kalcium/kalmodulin dependentní protein kinázy, a tím regulovat mnohé fyziologické procesy (Wang *et al.*, 1985; Rasmussen a Means, 1989; Vogel, 1994).

CaM je dynamicky redistribuován během buněčného cyklu u HeLa buněk (Li *et al.*, 1999a,b). Každé stádium buněčného cyklu má svůj speciální vzor distribuce: v G1 se CaM nachází především v cytosolu, během S až G2 fáze je translokován do jádra a před přechodem z G2 do M fáze je vysoce koncentrován v jádře. Skrze distribuci CaM, která je prostorově a časově specifická, vápníková signalizace ovlivňuje fyziologické procesy jako je přechod z G1 do S fáze, replikace DNA, kondenzace chromatinu, rozpad jaderné membrány, udržování struktury vřeténka, tok aktinových vláken na vnitřní straně cytoplazmatické membrány a cytokineze (Baitinger *et al.*, 1990; Means, 1994; Santella, 1998; Li *et al.*, 1999a,b).

W7, inhibitor kalmodulinu, který blokuje vazbu  $\text{Ca}^{2+}$  na CaM, byl přidáván do kultivačního média k myším oocytům, které byly v důsledku toho zablokovány v GV stádiu. Zdá se tedy, že kalmodulin je pro NEBD zásadní (Bi *et al.*, 2004).

Byla také testována lokalizace  $\text{Ca}^{2+}$  a CaM v průběhu znovuoobnovení meiózy myších oocytů. Vápenaté ionty i kalmodulin jsou před NEBD soustředěny v jedné polovině oocytu, během NEBD jsou vysoce koncentrovány do oblasti chromozomů a poté rovnoměrně rozptýleny v cytoplazmě. Tato kolokalizace může usnadňovat aktivaci kalmodulinu během obnovy meiózy (Bi *et al.*, 2004).

Kalcium/kalmodulin dependentní protein kináza II v nefosforylované formě vyžaduje pro svou aktivitu  $\text{Ca}^{2+}$  a CaM. V přítomnosti kalcia a kalmodulinu je enzym autofosforylován na Thr 286 a stává se na kalcium a kalmodulinu nezávislým. Proto jsou pro tvorbu této autonomní kinázy základem změny vápenatých signálů (Lou *et al.*, 1986, Fan *et al.*, 2003).

Bylo zjištěno, že CaMKII se podílí na zrání myších a prasečích oocytů (Fan *et al.*, 2003; Su a Eppig, 2002). Su a Eppig (2002) testovali funkci CaMKII při meiotickém zrání myších oocytů pomocí inhibitorů této kinázy, KN93 a AIP. Při těchto experimentech byly využity dva systémy zrání oocytů: spontánní zrání nezávislé na gonadotropinech a zrání indukované pomocí folikulostimulačního hormonu (FSH). NEBD u oocytů indukovaných FSH byl pomocí inhibitorů zablokován, zatímco u spontánně zrajících oocytů inhibitory tuto funkci neměly. Vydělení PB1 bylo inhibováno u obou systémů a tyto oocyty pak vykazovaly normální MI rozložení chromozomů a meiotického vřeténka, takže inhibitory CaMKII zablokovaly přechod z metafáze I do anafáze I. Podobné výsledky byly pozorovány, pokud byly oocyty vystaveny vlivu W7, antagonistovi kalmodulinu (Su a Eppig, 2002).

U prasečích oocytů byly provedeny experimenty se stejnými inhibitory a navíc ještě s chelatačním činidlem vápenatých iontů (BAPTA-AM). Meiotickému zrání prasečích oocytů

s kumulem i zbavených kumulárních buněk bylo zabráněno pomocí KN93, AIP II i W7. BAPTA-AM zabraňuje NEBD pouze u oocytů zbavených kumulárních buněk. Pokud byly oocyty vystaveny vlivu těchto inhibitorů po NEBD, bylo inhibováno vydělení PB1 (Fan *et al.*, 2003). Byl také zkoumán vliv CaMKII během meiotického buněčného cyklu prasečích oocytů na MPF, MAPK a p90RSK. KN93 a W7 během meiotického zrání zabránily akumulaci cyklinu B a plné fosforylaci MAPK a p90RSK. Pokud byla aktivita CaMKII inhibována během partenogenetické aktivace, cyklin B nebyl degradován, na rozdíl od MAPK a p90RSK, které byly rychle defosforylovány a degradovány (Fan *et al.*, 2003).

Také lokalizace CaM a CaMKII u prasečích oocytů naznačuje, že CaMKII je regulátorem meiotického buněčného cyklu a formování meiotického vřeténka, jelikož oba proteiny jsou v GV lokalizovány v jádře a na periférii, po NEBD jsou kumulovány u chromozomů a v MI a MII oocytech je CaM distribuován po celém meiotickém vřeténku, zatímco CaMKII je lokalizována pouze na pólech vřeténka (Fan *et al.*, 2003).

Kromě meiotického zrání CaMKII hraje úlohu při aktivaci vajíčka. Například dle Johnsona *et al.* (1998) jsou CaM a CaMKII po aktivaci úzce spojeny s meiotickým vřeténkem. Oocyty, které Fan *et al.* (2003) aktivovali v přítomnosti KN93 nebo W7 vykazovaly inhibici tvorby prvojádra. Dle Backs *et al.* (2010), kteří se zabývali také jednotlivými isoformami CaMKII, je převládající isoformou v myších oocytech CaMKII $\gamma$  a ta je nezbytná pro aktivaci vajíčka. CaMKII<sup>-/-</sup> oocyty vykazují sice po fertilizaci normální Ca<sup>2+</sup> oscilace a podstupují exocytózu kortikálních granul, nejsou ale schopny znovuzahájit meiózu a translatovat specifické maternální mRNA (Backs *et al.*, 2010). CaMKII tedy reguluje buněčný cyklus jak na úrovni meiotického zrání (přechod z profáze I až do metafáze II), tak jeho dokončení během aktivace oocytu.



### **3. Vědecká hypotéza a cíle práce**

Cílem této diplomové práce je vhodnými experimenty ověřit následující hypotézu: Regulace cap-dependentní translace je v myších oocytech ovlivněna regulací mTOR novou kinázou.

#### **Dílčí hypotézy:**

Fosforylovaná forma mTOR (Ser 2448) a fosforylovaná forma AKT (Ser 473) jsou po NEBD lokalizovány v oblasti nově vznikajícího vřeténka.

V průběhu meiotického zrání se v myších oocytech vyskytuje hlavní isoforma CaMKII, CaMKII $\gamma$ .

Oocyty jsou při meiotickém zrání v KN93, specifickém inhibitoru CaMKII, zablokovány v MI, vykazují MI fenotyp.

Fosforylace mTOR je při meiotickém zrání myších oocytů v přítomnosti KN93 inhibována.

## 4. Materiál a metody

### 4.1. Izolace vaječníků a oocytů, kultivace oocytů

Myši vaječnky byly získávány z laboratorních myší (*Mus musculus* var. *alba*, kmen CD1) nejméně šest týdnů starých, které byly nastimulovány equinním sérovým gonadotropinem (Folligon, Merck Animal Health, Kirkland, Kanada) 46 hodin před odběrem. Tyto myši byly usmrcovány pomocí cervikální dislokace. Následně byly vaječnky odebrány a očištěny od tuku. S vaječnky i oocyty bylo manipulováno na plastových Petriho miskách (Gama Group, České Budějovice, Česká republika).

Oocyty byly izolovány bezprostředně po odběru ovárií pomocí dvou jehel (Omnifix F, B. Braun, Melsungen, Německo) do transfer média, TM (NaCl, KCl, CaCl<sub>2</sub>.2H<sub>2</sub>O, KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, MgSO<sub>4</sub>.7H<sub>2</sub>O, glukóza, 4-(2-hydroxyethyl)-1-piperazin-enthansulfonová (HEPES) kyselina, polyvinylalkohol (PVA), destilovaná voda, bovinní sérový albumin) s inhibitorem zrání (inhibitorem fosfodiesteráz) 3-isobutyl-1-methylxanthinem (IBMX; Sigma-Aldrich, St. Louis, Missouri, USA); ředěno v poměru 1000 : 1.

Takto vyizolované oocyty byly vkládány do jamek v kultivační misce (Greenpia Technology, Yeosu, Jižní Korea) do vytemperovaného kultivačního média M16 (Millipore, Billerica, Massachusetts, USA) s IBMX (v poměru 1000 : 1). Kultivační misky byly pak ponechány 15 minut v inkubátoru (Heracell 150, Thermo Fisher Scientific, Waltham, Massachusetts, USA; teplota 37,5 °C, CO<sub>2</sub> 5 %) a následně zbaveny kumulárních buněk pomocí propipetování tekutiny v jamce 100μl pipetou (Eppendorf, Hamburg, Německo). Po dalších 15 minutách v inkubátoru byl prováděn výběr plně dorostlých oocytů ve stádiu GV vizuálně pod binolupou (Stemi 2000 nebo Stemi 2000-C, Zeiss, Oberkochen, Německo).

Vybrané oocyty byly třikrát promyty v kapkách čistého TM a poté přeneseny do vytemperovaného kultivačního média M16, kde zrály příslušnou potřebnou dobu, v čistém médiu nebo s přidavkem inhibitoru – dle experimentálního schématu.

### 4.2. Experimentální schéma

#### 4.2.1. Experiment 1

V prvním experimentu byla pozorována lokalizace fosforylované formy mTOR (p-mTOR na Ser 2448) a fosforylované formy AKT (p-AKT na Ser 473). Oocyty byly

kultivovány do příslušných požadovaných stádií, tedy 70 minut do NEBD a 8 hodin do prometafáze/metafáze I. Po kultivaci byly oocyty promyty v roztoku polyvinylalkoholu ve fyziologickém roztoku pufovaném fosfátem (PVA/PBS; Sigma-Aldrich), zafixovány 20 – 30 minut v 4% paraformaldehydu (PFA; Alfa Aesar, Ward Hill, Massachusetts, USA) a imunocytochemicky (ICC) barveny.

#### **4.2.1. Experiment 2**

V druhém experimentu byly pozorovány isoformy CaMKII v průběhu meiotického zrání myších oocytů. Oocyty byly izolovány tak, jak je popsáno výše a kultivovány v médiu M16 do příslušných stádií, 70 minut do NEBD a 16 hodin do MII. Následně byly promyty v PVA/PBS, ve zkumavkách (0,5ml; Eppendorf) byly zbaveny veškerého PVA/PBS a okamžitě vloženy do -20 °C, následně do -80 °C. Zamražené vzorky byly následně zpracovávány pomocí SDS-PAGE a western blotu (WB) a hodnoceny.

#### **4.2.2. Experiment 3**

V tomto experimentu byl pozorován vliv KN93 (specifický inhibitor kalcium/kalmodulin dependentní protein kinázy II; Sigma-Aldrich) na rozpad jaderné membrány, vydělení PB1 a formování druhého meiotického vřeténka.

Kontrolní skupina oocytů byla kultivována v médiu bez KN93, pokusné skupiny oocytů byly kultivovány v M16 s přidaným KN93 (konečná 100nM koncentrace KN93, zásobní roztok 20mM).

První experimentální skupina oocytů byla kultivována v médiu, ve kterém byl inhibitor od samého začátku kultivace (po promytí v TM byly oocyty umístěny rovnou do roztoku s inhibitorem). Druhá experimentální skupina oocytů byla ponechána v čistém M16 po 70 minut (proběhl zde NEBD), poté byl přidán KN93.

Oocyty ve všech skupinách byly kultivovány ~16 hodin (od počátku zrání). Po 70 minutách by zaznamenáván počet oocytů, které prošly NEBD a po 16 hodinách počet oocytů, které vydělily PB1. Po kultivaci byly oocyty promyty v PVA/PBS, zafixovány 20 – 30 minut v 4% PFA a imunocytochemicky barveny.

### **4.2.3. Experiment 4**

Cílem dalšího experimentu bylo ověřit vliv KN93 na cap-dependentní translaci v průběhu meiotického zrání oocytů.

K tomuto účelu byly připraveny vzorky pro western blot. Oocyty byly izolovány tak, jak je popsáno výše, a následně kultivovány v médiu M16 (kontrolní skupina) a v médiu M16, do kterého byl po 70 minutách (po NEBD, což bylo hodnoceno vizuálně pod binolupou) přidán inhibitor KN93 v konečné 100nM koncentraci (zásobní roztok 20mM).

Po přidání tohoto inhibitoru byly oocyty kultivovány ještě 2 hodiny, následně byly promyty v PVA/PBS, ve zkumavkách (0,5ml; Eppendorf) byly zbaveny veškerého PVA/PBS a okamžitě vloženy do -20 °C, následně do -80 °C. Zamražené vzorky byly následně zpracovávány pomocí SDS-PAGE a western blotu a hodnoceny.

### **4.2.4. Experiment 5**

Byla zjišťována úroveň fosforylace eukaryotního iniciačního faktoru  $2\alpha$  (eIF2 $\alpha$ ; Ser 51) po vystavení oocytů vlivu KN93. Pro tento účel byly připraveny vzorky pro WB i ICC. Oocyty byly kultivovány 4 hodiny v médiu M16 s IBMX (kontrolní skupina) nebo s KN93 (pokusná skupina). Následně byly oocyty buď zamrazeny a dále zpracovány pro WB, nebo fixovány a dále imunocytochemicky barveny.

## **4.3. Zpracování vzorků a hodnocení výsledků**

### **4.3.1. SDS-PAGE a western blot**

Oocyty v zamražených vzorcích byly lyzovány pomocí redukčního činidla (Sample Reducing Agent (10x), Life technologies, Thermo Fisher Scientific), přidán byl také pufr (LDS Sample Buffer (4x), Invitrogen, Thermo Fisher Scientific). Vzorky byly následně povařeny (100 °C, 5 minut) a nanášeny na gel (4 – 12%, Invitrogen) pro gradientovou SDS-PAGE (aparatura Novex Mini Cell, Invitrogen). Vzorky byly na tomto gelu rozděleny za konstantního napětí (100 – 200 V). Gel byl následně přebílen (polosuchý blotter, Biometra, Göttingen, Německo) na polyvinyliden-fluoridovou membránu (Immobilon P, Millipore) po 25 min při 5 mA.cm<sup>2</sup>. Následně byly membrány prehybridizovány v 1%

sušeném mléku jednu hodinu a poté inkubovány s příslušnými primárními protilátkami přes noc v 4 °C.

Byly použity tyto primární protilátky od firmy Cell Signaling (Danvers, Massachusetts, USA) řaděné v 1% mléku v 0,05% TTBS: CaMKII (pan) Antibody #3362 (1 : 1000), CaMKII- $\alpha$  Antibody #3357 (1 : 1000), Phospho-mTOR (Ser 2448) (D9C2) XP ® Rabbit Ab #5536 (1 : 8000), Phospho-eIF2 $\alpha$  (Ser 51) (D9G8) XP ® Rabbit mAb #3398 (1 : 500), Anti-GAPDH antibody produced in rabbit, #G9545 (1 : 30 000); a od firmy Sigma-Aldrich Monoclonal Anti- $\beta$ -Tubulin antibody produced in mouse, #T4026 (1 : 100).

Jako sekundární protilátky byly použity Peroxidase AffiniPure Donkey Anti-Rabbit IgG (H+L) (#711-035-152) a Peroxidase AffiniPure Donkey Anti-Mouse IgG (H+L) (#715-035-151) od Jackson ImmunoResearch Laboratories Inc. (West Grove, Pensylvánie, USA).

Po inkubaci a následném promytí v 0,05% TTBS (Tween-Tris-buffer saline; NaCl, Tween 20, 2M Tris pH 7,6, destilovaná voda) byly membrány ošetřeny ECL (ECL Prime Western Blotting Detection Reagent, Amersham, Little Chalfont, Velká Británie), ve fotokomoře k nim byl přikládán film (CL-Xposure Film, Life Technologies) na různě dlouhou dobu (dle intenzity signálu). Film byl následně vyvoláván pomocí vývojky (Foma LP-T, Foma Bohemia, Hradec Králové, Česká republika) a ustalovače (Formafix, Foma Bohemia). Vyvolané filmy byly skenovány pomocí skeneru (GS 800 Calibrated Densitometer, Bio-Rad, Hercules, Kalifornie, USA) a software Quantity One a data kvantifikována pomocí programu ImageJ (<http://rsbweb.nih.gov/ij/>).

#### **4.3.2. Imunocytochemie a konfokální mikroskopie**

Fixované oocyty byly 15 minut permeabilizovány pomocí 0,1% Tritonu X-100 (Sigma-Aldrich) v PBS a inkubovány v primární protilátce přes noc v 4 °C. Následně byly 2x 15 minut promyty v PVA/PBS a poté inkubovány 1 hodinu se sekundární protilátkou při laboratorní teplotě. Po dalším promytí byly vzorky montovány na sklíčka (podložní: Fisherfinest Premium Microscope Slides, Thermo Fisher Scientific, Waltham, Massachusetts, USA; krycí: Cover Glasses thickness No. 1, Paul Marienfeld GmbH & Co. KG, Lauda-Königshofen, Německo) v montovacím médiu s 4',6-diamidino-2-fenylindolem (Vectashield Mounting Medium with DAPI, Vector Laboratories, Burlingame, Kalifornie, USA), fluorescenčním barvivem, které se váže na A-T bohaté oblasti na DNA.

Pro imunocytochemické barvení (ICC) byly použity tyto primární protilátky ředěné v PVA/PBS (1 : 150): Phospho-Akt (Ser473) Antibody (#9271; Cell Signaling), Phospho-mTOR (Ser2448) Antibody (#2971; Cell Signaling), Monoclonal Anti-Tubulin, Acetylated antibody produced in mouse (#T6793; Sigma-Aldrich), Phospho-eIF2a (Ser51) Antibody (#9721; Cell Signaling) a Monoclonal Anti-Lamin A/C antibody produced in mouse (#SAB4200236; Sigma-Aldrich).

Jako sekundární protilátky byly použity: Goat anti-Mouse IgG (H+L) Secondary Antibody, Alexa Fluor® 594 conjugate (#A-11032), Donkey anti-Mouse IgG (H+L) Secondary Antibody, Alexa Fluor® 488 conjugate (#A-21202) a Donkey anti-Rabbit IgG (H+L) Secondary Antibody, Alexa Fluor® 488 conjugate (#A-21206), vše od Invitrogen. Sekundární protilátky byly ředěny v PVA/PBS 1 : 250.

Takto připravené vzorky byly následně skenovány pomocí konfokálního mikroskopu (Leica SP5, Leica Microsystems, Wetzlar, Německo) nebo epifluorescenčního mikroskopu (Leica DMI 6000 B, Leica Microsystems). Získaná data byla zpracovávána pomocí software LAS AF Lite od firmy Leica, ImageJ (měření intenzity signálu) a Adobe Photoshop CS3.

### **4.3.3. Statistická analýza**

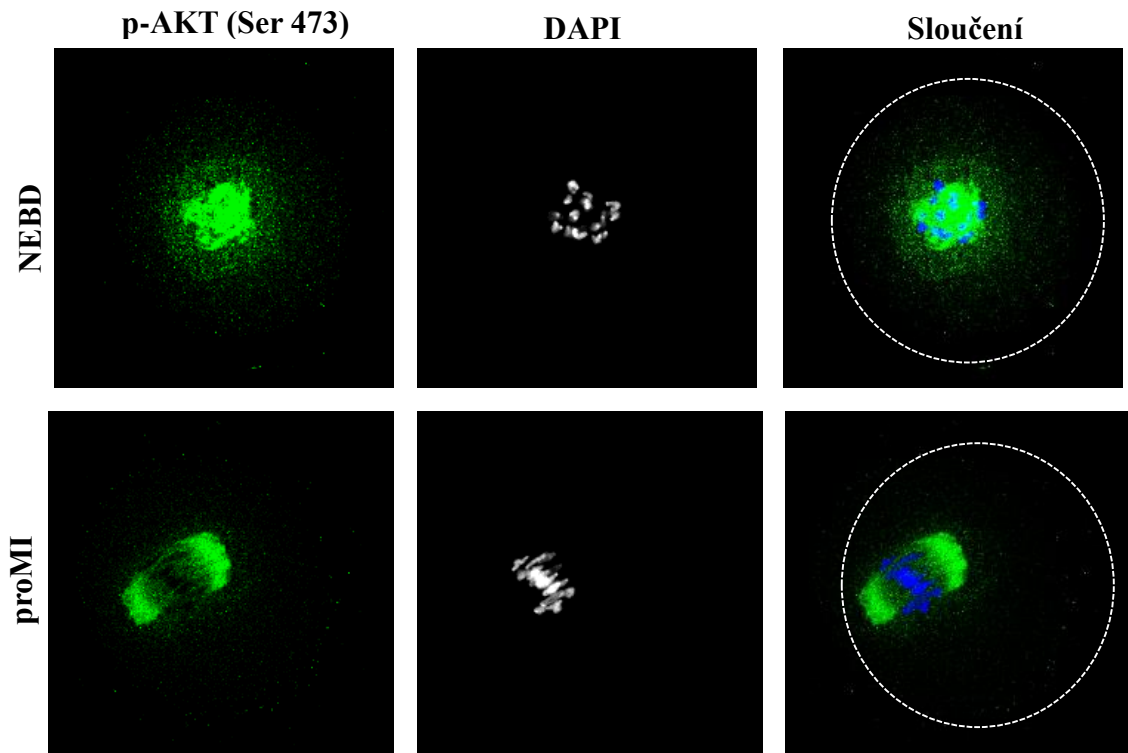
Všechny experimenty byly 2 – 3x opakovány. Data získaná z kvantifikace pomocí programu ImageJ byla statisticky zpracována programem Statistica 12.0 a MS Excel 2013. Byl použit Studentův *t*-test. Hodnoty  $P < 0,05$  byly považovány za statisticky významné.

## 5. Výsledky

### 5.1. Experiment 1: Lokalizace p-AKT a p-mTOR v průběhu meiotického zrání oocytů

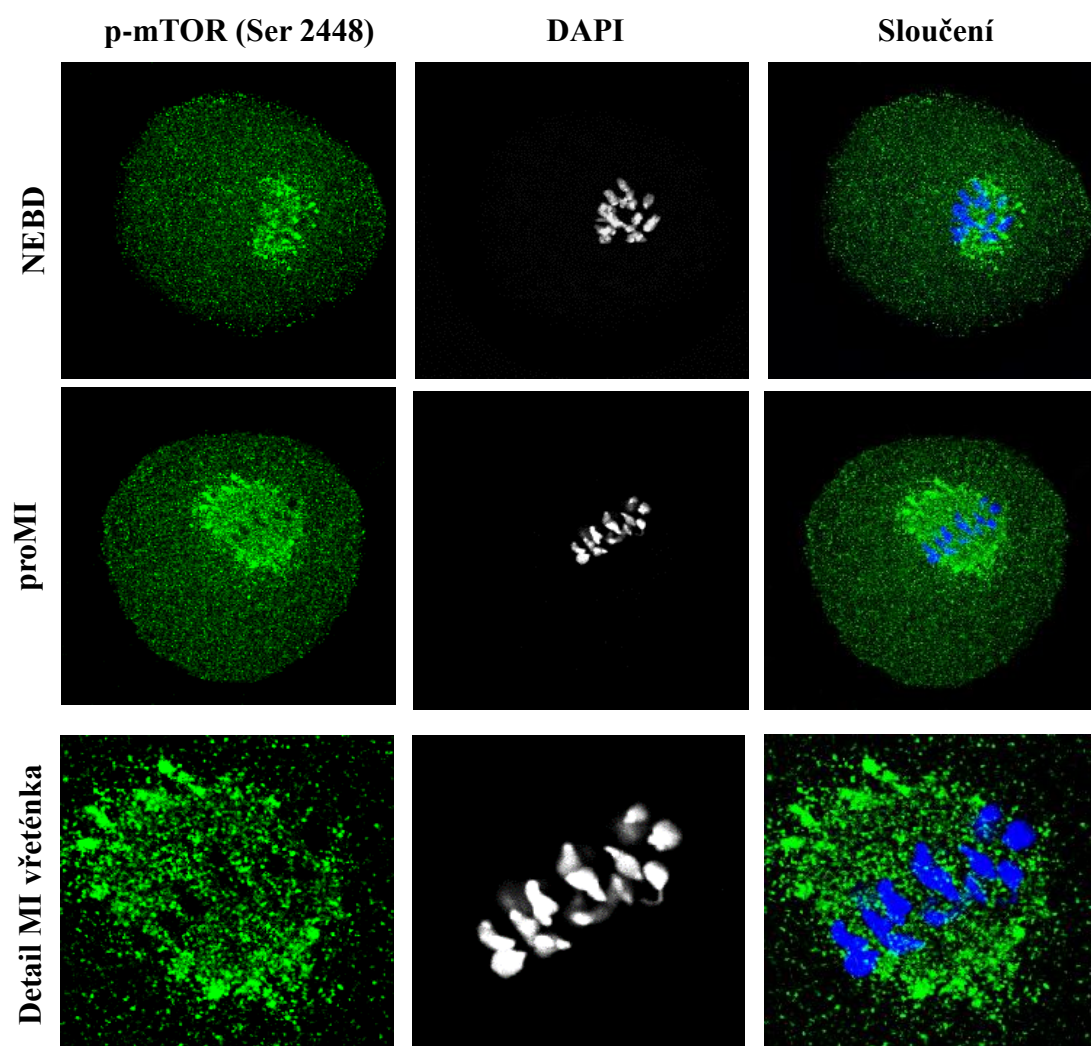
V prvním experimentu byla sledována lokalizace fosforylované AKT (Ser 473) a fosforylovaného mTOR v průběhu meiotického zrání myších oocytů, respektive při NEBD a v prometafázi až metafázi prvního meiotického dělení. Po NEBD je p-AKT akumulována kolem chromozomů, v proMI pak na meiotickém vřeténku (Obrázek 12). p-mTOR (Ser 2448) vykazuje chování podobné (Obrázek 13).

Obrázek 12 Lokalizace p-AKT při meiotickém zrání oocytů



*Zelená – p-AKT (Ser 473), bílá/modrá – chromatin. Bílá čára naznačuje cytoplazmatickou membránu.*

Obrázek 13 Lokalizace p-mTOR při meiotickém zrání oocytů



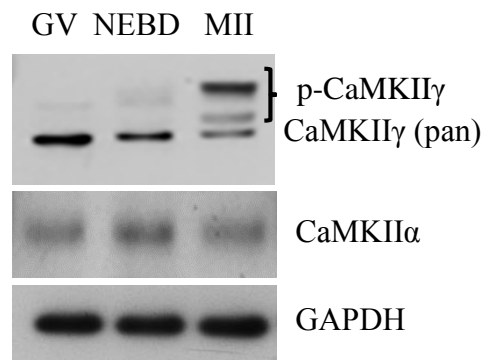
*Zelená – p-mTOR (Ser 2448), bílá/modrá – chromatin.*



## 5.2. Experiment 2: CaMKII v oocytu

V dalším experimentu byla sledována exprese isoform CaMKII, CaMKII $\alpha$  a CaMKII $\gamma$ , v průběhu meiotického zrání. Oocyty byly kultivovány do příslušných stádií (70 minut do NEBD, 16 hodin do MII). V myších oocytech je hlavní isoformou CaMKII $\gamma$ , což je patrné i z obrázku 11 z WB. V MII se vyskytují pravděpodobně fosforylované formy CaMKII $\gamma$ .

**Obrázek 14** Exprese a fosforylace isoform CaMKII v průběhu meiotického zrání



*Jako pozitivní kontrola byla použita glyceraldehyd-3-fosfátdehydrogenáza (GAPDH).*

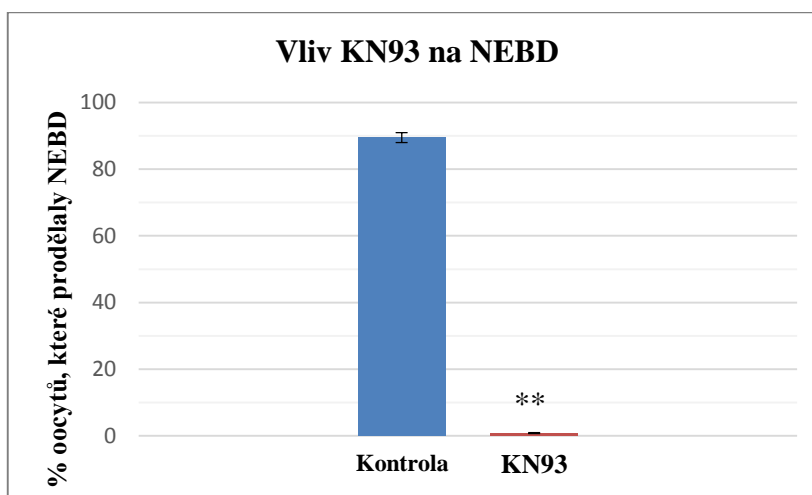
## 5.3. Experiment 3: Vliv KN93 na meiotické zrání myších oocytů

### 5.3.1. Morfologie oocytů kultivovaných s KN93

V dalším experimentu byl pozorován vliv KN93, specifického inhibitoru CaMKII, na rozpad jaderné membrány, vydělení PB1 a formování druhého meiotického vřeténka.

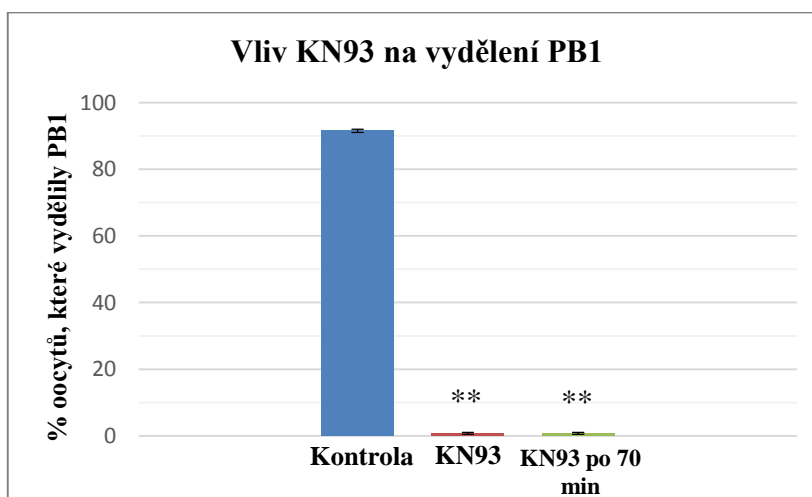
Jak vyplývá z grafů 1, 2 a 3, vliv KN93 na průběh meiotického zrání oocytů byl značný. Všechny oocyty, které byly kultivovány s inhibitorem ihned po jejich proplachu od média s IBMX (skupina „KN93“), zůstaly zablokované ve stádiu GV. Oocyty, které nejdříve prošly rozpadem jaderné membrány (byly 70 minut kultivovány v čistém médiu M16; skupina „KN93 po 70 min“) a poté k nim byl přidán inhibitor, nebyly schopné vydělit PB1. Při těchto experimentech bylo  $n \geq 30$  ve třech opakováních.

**Graf 1 Vliv inhibitoru KN93 na rozpad jaderné membrány**



Superskript \*\* označuje statisticky významný rozdíl mezi skupinou „KN93“ a kontrolní skupinou ( $P < 0,01$ ). Byl použit Studentův *t*-test,  $n \geq 30$  ve třech opakováních experimentu. Průměrně 90 % oocytů z kontrolní skupiny prodělalo po 70 minutách NEBD. Naproti tomu oocyty ze skupiny „KN93“ byly všechny po 70 minutách stále ve stádiu GV. Chybová úsečka označuje směrodatnou odchylku.

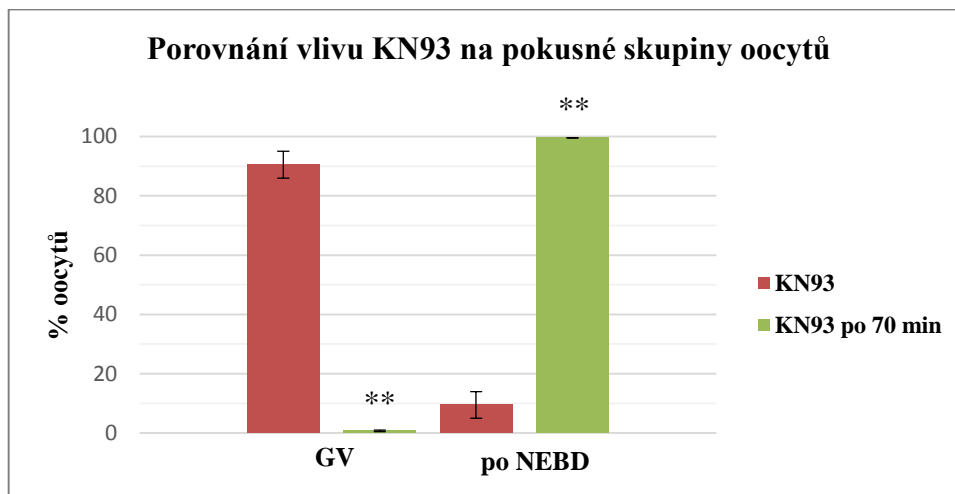
**Graf 2 Vliv inhibitoru KN93 na vydělení prvního pólového tělíska**



Superskript \*\* označuje statisticky významný rozdíl mezi skupinou „KN93“, „KN93 po 70 min“ a kontrolní skupinou ( $P < 0,01$ ; Studentův *t*-test,  $n \geq 30$  ve třech opakováních). Po 16 hodinách od počátku zrání 92 % oocytů v kontrolní skupině vydělilo PB1, zatímco žádný

z oocytů ve skupině „KN93“ ani „KN93 po 70 min“ nebyl schopen PBI vydělit. Chybová úsečka označuje směrodatnou odchylku.

**Graf 3 Porovnání vlivu KN93 na jednotlivé pokusné skupiny**

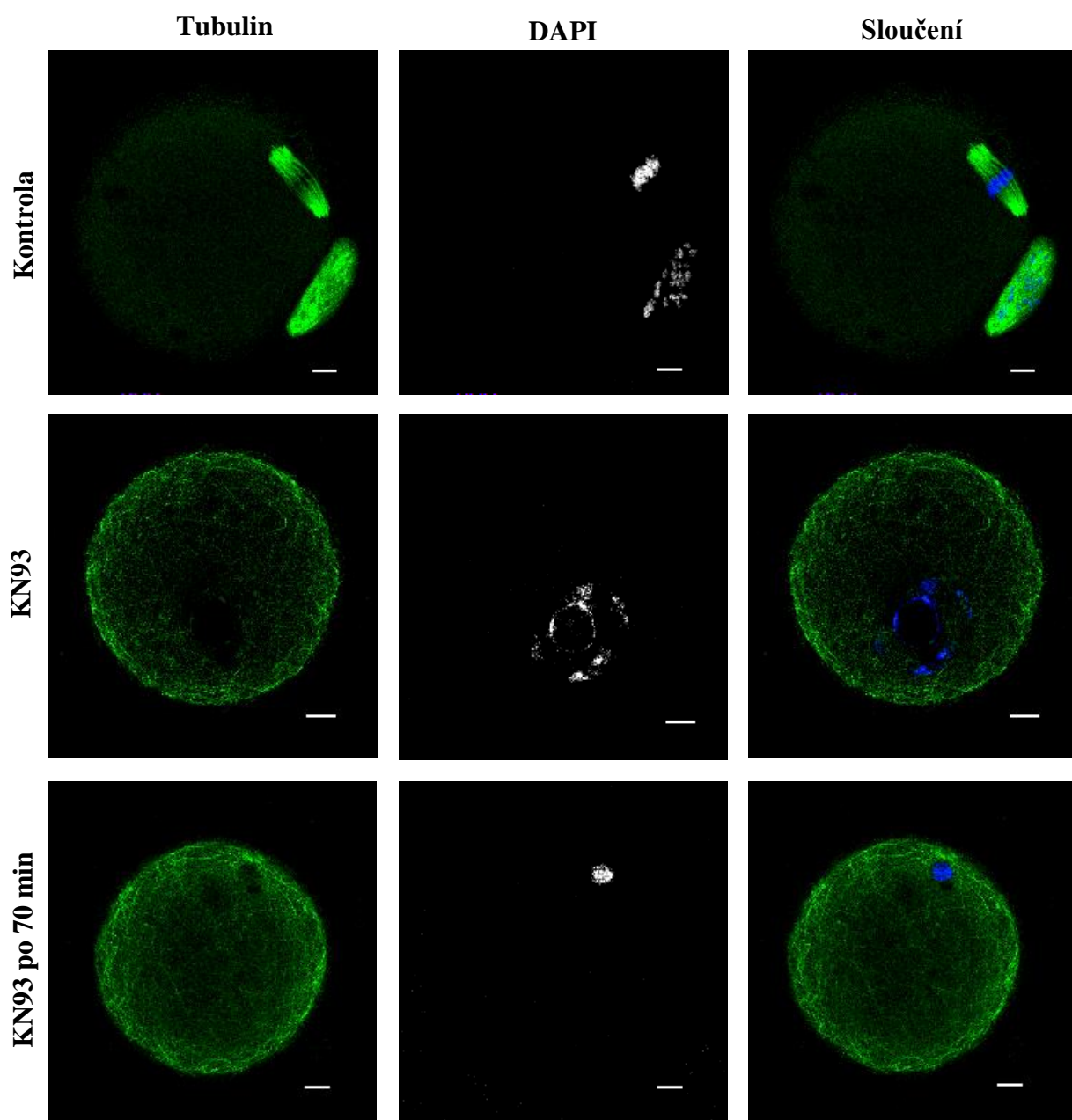


Superskript \*\* označuje statisticky významný rozdíl ( $P < 0,01$ ; Studentův t-test;  $n \geq 30$  ve třech opakováních) mezi skupinou „KN93“ a „KN93 po 70 min“. Většina oocytů (90 %), které byly vystaveny vlivu KN93 od počátku zrání, zůstala zablokována ve stádiu GV (skupina „KN93“). Naproti tomu oocyty, jimž bylo umožněno projít NEBD, v tomto stavu setrvaly po zbylých 15 hodin zrání (skupina „KN93 po 70 min“). Chybová úsečka označuje směrodatnou odchylku.

### 5.3.2. Fenotyp oocytů po vystavení vlivu KN93

Jak vypadají buněčné ultrastruktury je patrné z výsledků fluorescenční mikroskopie (Obrázek 13). Je zřejmé, že značné abnormality v seskupení chromozomů i tvorbě tubulinu vykazuje oproti kontrole skupina „KN93 po 70 min“. Oocyty ve skupině „KN93“ zůstaly zablokované ve stádiu GV.

Obrázek 15 Fenotyp oocytů po potlačení CaMKII



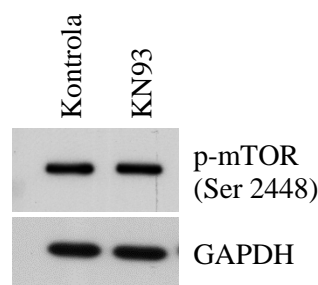
Skupina „KN93“ představuje oocyty, které byly vloženy do média s přídatkem KN93 ihned po svém oplachu z IBMX, tedy zrály v přítomnosti inhibitoru po celou dobu. Druhá pokusná skupina „KN93 po 70 min“ byla vložena do média M16 a KN93 k ní byl přidán až po 70 minutách, tedy po proběhnutí NEBD (oocyty, které po 70 minutách neprošly NEBD byly z této skupiny vyřazeny). Zelená – tubulin, bílá/modrá – chromatin. Měřítko ~10  $\mu$ m.

#### 5.4. Experiment 4: Fosforylace mTOR při kultivaci s KN93

Cílem dalšího experimentu bylo ověřit fosforylaci kinázy mTOR (Ser 2448) a tedy zjištění, zda inhibice CaMKII ovlivňuje cap-dependentní translaci.

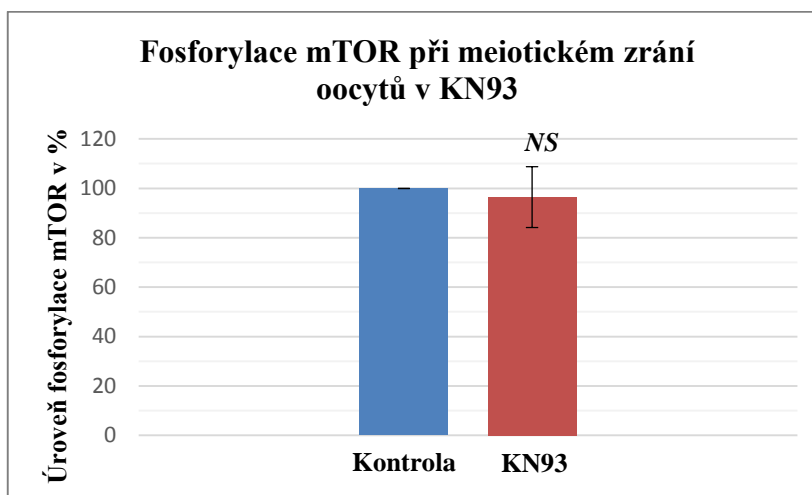
Výsledky z WB (Obrázek 14, Graf 4) zobrazují úroveň fosforylace mTOR při meiotickém zrání oocytů v KN93 v porovnání s kontrolní skupinou. Je zřejmé, že rozdíl mezi oběma skupinami není signifikantní.

**Obrázek 16** Úroveň fosforylace mTOR při meiotickém zrání oocytů v KN93



*Obě skupiny oocytů byly kultivovány v médiu M16 po 70 minut. Poté byl do pokusné skupiny přidán KN93 a kultivace probíhala další 2 hodiny. Výsledky z WB ukazují míru fosforylace mTOR (Ser 2448) v oocytech z jednotlivých skupin. Jako pozitivní kontrola byla použita glycerinaldehyd-3-fosfátdehydrogenáza (GAPDH).*

**Graf 4** Statistické zhodnocení fosforylace mTOR při meiotickém zrání oocytů v KN93

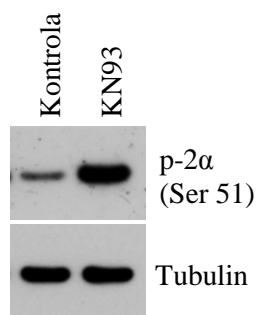


Statistické zhodnocení WB. Úroveň fosforylace kontrolní skupiny byla brána za 100 %. NS:  $P > 0,05$ , mezi pokusnou a kontrolní skupinou není statisticky významný rozdíl, otestováno pomocí Studentova  $t$ -testu.  $n \geq 70$  ve dvou opakováních experimentu. Chybová úsečka označuje směrodatnou odchylku.

### 5.5. Experiment 5: Fosforylace proteinu eIF2 $\alpha$

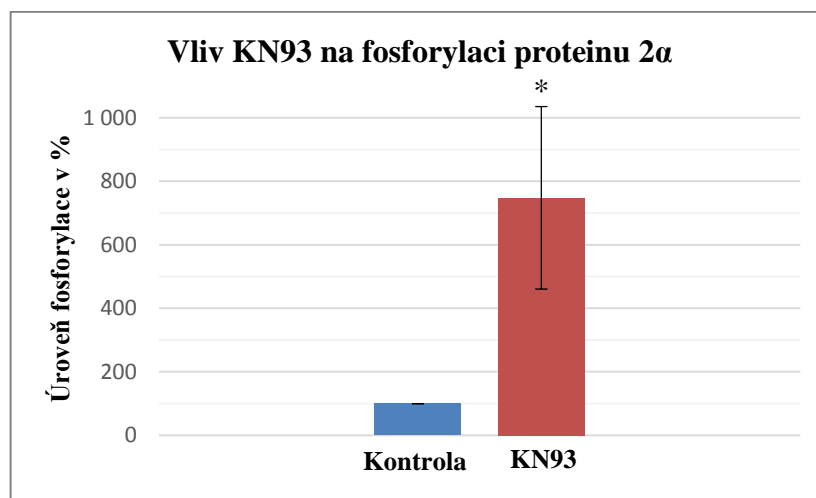
Byla také provedena analýza fosforylace eukaryotního iniciačního faktoru 2 $\alpha$  (eIF2 $\alpha$ ) při meiotickém zrání oocytů v KN93 pomocí WB i ICC. Oocyty byly kultivovány 4 hodiny v médiu M16 s IBMX (kontrolní skupina), nebo s KN93 (pokusná skupina). Následně byly vytvořeny vzorky pro WB nebo ICC dle postupu popsaného v metodice. Pokusná skupina, vystavená vlivu KN93, vykazuje zvýšenou úroveň fosforylace proteinu 2 $\alpha$  na Ser 51 a tento rozdíl je statisticky významný (Obrázek 15, Graf 5). Také při měření intenzity signálu konfokálních řezů oocytů v ekvatoriální rovině byla zjištěna rozdílnost mezi pokusnou a kontrolní skupinou, nicméně se nepotvrdila přítomnost stresových granul (SGs) v oocytech kultivovaných v KN93 (Obrázek 16, Graf 6).

**Obrázek 17 Fosforylace proteinu 2 $\alpha$  při zrání oocytů v KN93**



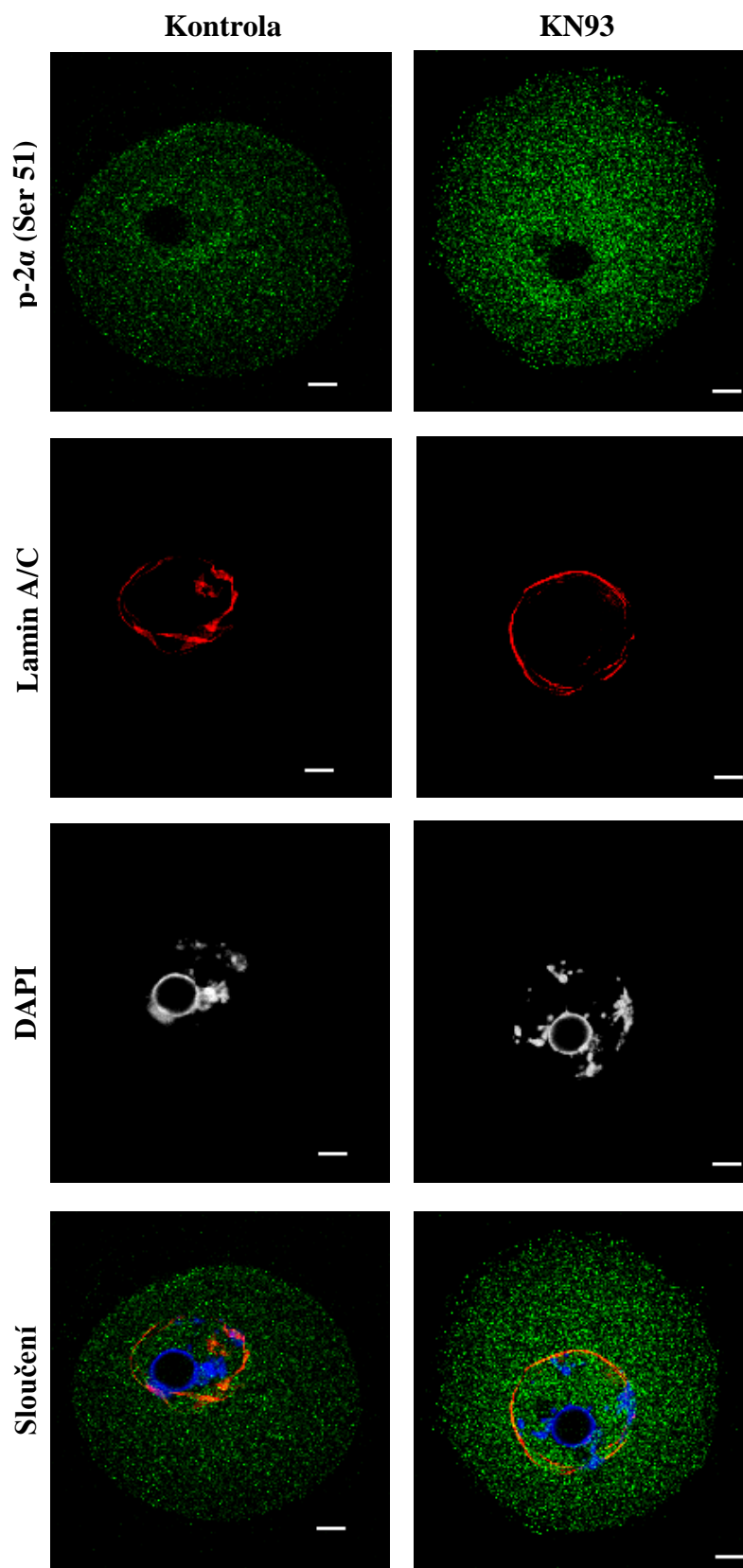
Oocyty byly kultivovány 4 hodiny v médiu M16 s IBMX (kontrolní skupina), nebo s KN93 (pokusná skupina). Výsledky ukazují míru fosforylace proteinu 2 $\alpha$  v porovnání s kontrolou. Jako pozitivní kontrola byl použit tubulin.

**Graf 5 Vliv KN93 na fosforylaci proteinu eIF2 $\alpha$**



Superskript \* označuje statisticky významný rozdíl ( $P < 0,05$ ; Studentův  $t$ -test;  $n \geq 18$  ve třech opakováních) mezi pokusnou a kontrolní skupinou oocytů. Úroveň fosforylace kontrolního vzorku byla považována za 100 %. Chybová úsečka označuje směrodatnou odchylku.

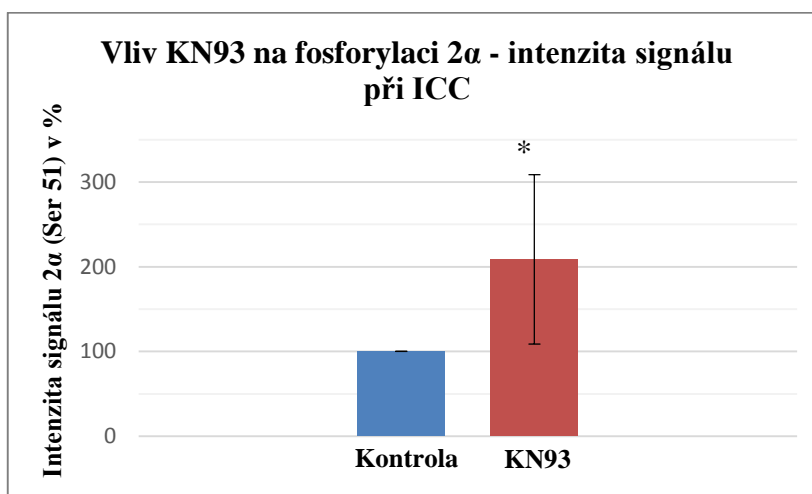
Obrázek 18 Imunocytochemické barvení proteinu p-2 $\alpha$



*Bílá/modrá – chromatin, zelená – p-2 $\alpha$  (Ser 51), červená – lamin A/C. Měřítka ~ 10  $\mu$ m.*



**Graf 6 Vliv KN93 na fosforylaci proteinu 2 $\alpha$  – průměrná intenzita signálu při ICC**



*Superskript \* označuje statisticky významný rozdíl ( $P < 0,05$ ; Studentův  $t$ -test) v průměrných intenzitách signálu proteinu  $p$ -2 $\alpha$  při ICC.  $n \geq 12$ . Chybová úsečka označuje směrodatnou odchylku.*

## 6. Diskuze

Tato práce pojednává o regulaci cap-dependentní translace během meiotického zrání myších oocytů pomocí mTOR a především možném kinázově nadřazeném ovlivňování této kinázy. mTOR zprostředkovává fosforylaci translačního represoru 4E-BP1 na Thr 36 a Thr 45. Díky tomu může dojít k fosforylaci 4E-BP1 na dalších aminokyselinových zbytcích (Thr 69, Ser 64, Ser 111). Touto hyperfosforylací 4E-BP1 je zabráněno jeho interakci s eukaryotním iniciačním faktorem 4E. 4E je díky tomu volný pro tvorbu iniciačního komplexu, který zahajuje cap-dependentní translaci (Lin *et al.*, 1994; Burnett *et al.*, 1998; Mader *et al.*, 1995; Gingras *et al.*, 1999; Karim *et al.*, 2001; Romasko *et al.*, 2013). V myších oocytech je mTOR mRNA exprimována během meiotického zrání a také lokalizace mTOR, který se v GV stádiu vyskytuje na jaderné membráně, při NEBD kolem chromozomů a v MII stádiu na meiotickém vřeténku (Yang *et al.*, 2009; Kogasaka *et al.*, 2013; Romasko *et al.*, 2013; Šušor *et al.*, 2015) a tyto poznatky potvrzují i výsledky uváděné v této práci, fosforylovaná forma mTOR (Ser 2448) byla lokalizována v NEBD kolem chromozomů a v proMI následně na MI vřeténku.

Kinázou nadřazenou mTOR se v regulaci cap-dependentní translace zdá být AKT, jejíž fosforylovaná aktivní forma dále fosforyluje množství substrátů zahrnutých v regulaci buněčného přežití, růstu a proliferace (Manning a Cantley, 2007). Mezi substráty AKT patří i mTOR, respektive mTORC1, který následně fosforyluje mimo jiné také 4E-BPs a tím ovlivňuje proteosyntézu a v konečném důsledku zmíněné buněčné děje (Huang a Manning, 2009). Signální dráhy AKT a mTOR sehrávají ve znovuoobnovení meiózy a meiotickém zrání důležitou roli. Na počátku meiotického zrání se AKT podílí na zvyšování enzymatické aktivity cAMP-fosfodiesterázy, která je potřebná k degradaci cAMP (Han *et al.*, 2006; Vaccari *et al.*, 2008). Již byly také publikovány výsledky experimentů zaměřujících se na správnou organizaci meiotického vřeténka, aktivitu kontrolního bodu vřeténka, včasný přechod z metafáze do anafáze a cytokinezi v souvislosti s proteinem Survivinem, který tyto procesy ovlivňuje. Survivin mRNA je v oocytu regulována právě dráhou AKT/mTOR (Jiang *et al.*, 2014; Šušor *et al.*, 2015).

Výsledky z konfokální mikroskopie v této práci mohou úlohu AKT při zmíněných procesech potvrzovat. Lokalizace p-AKT (Ser 473) vykazuje podobný fenotyp jako lokalizace fosforylovaného mTOR (Ser 2448) a některých fosforylovaných forem 4E-BP1, které již byly publikovány (Šušor *et al.*, 2015), tedy kumulaci kolem chromozomů při NEBD a lokalizaci na

pólech meiotického vřeténka v proMI a MI. Tato data poukazují na fakt, že regulace translace je v oocytu časově a prostorově zabezpečena a že narušení této regulace vede k narušení meiotického zrání či jeho úplnému zastavení (Mayer *et al.*, 2014).

Zajímavým kandidátem pro ovlivňování dráhy mTOR se zdála být CaMKII, vzhledem k tomu, že signální dráhy závislé na vápníku jsou zásadní pro normální průběh meiotického zrání savčích oocytů (Homa, 1995; Eppig *et al.*, 2004). Také lokalizace CaMKII a CaM v průběhu meiotického zrání prasečích oocytů (Fan *et al.*, 2003) naznačuje, že CaMKII je regulátorem meiotického buněčného cyklu a formování meiotického vřeténka, jelikož se oba tyto proteiny vyskytují, podobně jako mTOR, na periférii jádra, po NEBD kolem chromozomů a v MII na vřeténku (Fan *et al.*, 2003). Nicméně molekulární vazby mezi kalciovými signály po znovuoobnovení meiózy v průběhu meiotického zrání jsou zatím nedostatečně objasněny.

Existují čtyři základní isoformy CaMKII,  $\alpha$ ,  $\beta$ ,  $\gamma$  a  $\delta$ , s molekulární hmotností od 52 do 61 kDa (Tashima *et al.*, 1996; Baltas *et al.*, 1995; Braun a Schulman, 1995). Hlavní isoformou v myších oocytech je CaMKII $\gamma$ 3 (Chang *et al.*, 2009) a CaMKII $\gamma$  hraje také zásadní roli ve fertilitě myši, jelikož vajíčka CaMKII $\gamma^{-/-}$  myši vykazují defekty v aktivaci. Dochází sice u nich k normálním Ca<sup>2+</sup> oscilacím a jsou schopna blokovat polyspermii pomocí změn na *zona pellucida*, nicméně při absenci CaMKII $\gamma$  nedochází ke znovuoobnovení buněčného cyklu, snížení aktivity MAPK a MPF, formování prvojader a translaci specifických maternálních mRNA. Lze tedy říci, že CaMKII $\gamma$  se účastní řízení aktivace myších vajíček pomocí regulace jejich výstupu z MII (Bacs *et al.*, 2010).

Výše uvedené poznatky podporují i naše výsledky. Věnovali jsme se všem čtyřem hlavním isoformám CaMKII a jejich expresi v průběhu meiotického zrání myších oocytů, konkrétně ve třech zásadních stádiích, GV, NEBD a MII. Pomocí PCR a southern blotu jsme identifikovali CaMKII $\gamma$  jako hlavní isoformu ve stádiích GV a MII (data neuvedena v této práci). Výsledky z western blotu zobrazují isoformu CaMKII $\gamma$  ve stádiích GV, NEBD a MII, přičemž v MII se vyskytují možné fosforylace této isoformy, které mohou souviset s nárůstem fosforylované formy CaMKII při spontánní aktivaci oocytů při *in vitro* kultivaci (Ito *et al.*, 2006).

Možnost zapojení CaMKII do regulace cap-dependentní translace byla v této práci studována pomocí inhibice CaMKII specifickým inhibitorem KN93. Následně byly sledovány morfologické změny oocytů, především podstoupení NEBD, vydělení PB1 a utváření

meiotického vřeténka, a změny ve fosforylaci mTOR. Oocyty, které byly vystaveny vlivu inhibitoru od počátku meiotického zrání zůstaly zablokovány ve stádiu GV. Oocyty ve skupině, která byla vystavena vlivu KN93 až po proběhnutí NEBD, nebyly schopny vydělit PB1 ani utvářet MI vřeténko. Namísto meiotického vřeténka oocyty vytvářely útvar podobný kvazi jadérku. Tato data jsou ovšem v rozporu s výsledky experimentů, které provedli Su a Eppig (2002), kteří pozorovali vliv KN93 a dalších inhibitorů na spontánní meiotické zrání myších oocytů i na zrání indukované FSH. Při těchto experimentech nebyly oocyty spontánně zrající schopny vydělit PB1, ale vykazovaly normální fenotyp MI oocytů, včetně MI vřeténka. U oocytů, které měly podstoupit meiotické zrání indukované FSH, měly inhibitory negativní vliv i na průběh NEBD. Podobné výsledky v případě prasečích oocytů publikovali také Fan *et al.* (2003). Po kultivaci s KN93 od počátku zrání ovšem prasečí oocyty zůstávaly zablokované ve stádiu GV; pokud jim bylo umožněno projít NEBD a teprve poté k nim byl přidán KN93, byly oocyty po příslušně dlouhé kultivaci zablokované ve stádiu MI s MI vřeténkem.

Dále byla v souvislosti s inhibitorem KN93 testována fosforylace mTOR, kde byla předpokládána jeho snížená fosforylace u oocytů kultivovaných s KN93, což by značilo zapojení CaMKII do regulace cap-dependentní translace, nicméně tuto hypotézu se nepodařilo potvrdit. Je tedy zřejmé, že navzdory neschopnosti oocytů utvářet meiotické vřeténko a vydělit PB1, tedy dokončit meiotické zrání, neovlivňuje CaMKII cap-dependentní translaci.

Byly proto provedeny další experimenty, a sice ověřující fosforylaci proteinu  $2\alpha$  (eIF2 $\alpha$ ), který je jednou ze tří podjednotek eukaryotního iniciačního faktoru 2 (eIF2).  $2\alpha$  je u savců substrátem čtyř kináz: GCN2 (general control nonderepressible 2), PKR (ds-RNA dependentní protein kinázy R), eIF2 $\alpha$ K3 (eIF2 $\alpha$  kinázy 3) a HRI (hemem regulované eIF2 $\alpha$  kinázy), které tuto podjednotku fosforylují na základě různých stresových situací (Zhang *et al.*, 2002; Alves *et al.*, 2009; Krishnamoorthy *et al.*, 2001; Zykova *et al.*, 2007; Shi *et al.*, 1998; Harding *et al.*, 1999; Chen, 2007). Fosforylace  $2\alpha$  na Ser 51 vede k inhibici celkové proteosyntézy (Levin a London, 1978; De Haro *et al.*, 1996), jelikož fosforylovaný  $2\alpha$  zabraňuje výměně GDP za GTP, která je nutná pro zapojení eIF2 do iniciace translace (Krishnamoorthy *et al.*, 2001; Zykova *et al.*, 2007).

Výsledky experimentů uváděné v této práci potvrdily zvýšenou úroveň fosforylace proteinu  $2\alpha$ . Tím může být objasněna neschopnost oocytů vystavených vlivu KN93 utvářet meiotické vřeténko a vydělit PB1, vzhledem k tomu, že tento fenotyp je podobný fenotypu při

kultivaci oocytů s puromycinem, inhibítorem globální translace. V oocytech byla tedy díky vlivu KN93 negativně ovlivněna celková translace, nikoliv pouze translace cap-dependentní.

Provedli jsme také experiment zaměřující se na detekci utváření stresových granul (SGs) v oocytech, které byly kultivovány s KN93, jelikož v somatických buňkách je metabolismus mRNA regulován pomocí ribonukleoproteinových agregátů, jako jsou mimo jiné právě SGs. Tato granula se objevují v cytoplazmě buněk vystavených okolnímu stresu a obsahují translačně zablokované preiniciační komplexy a ke svému formování vyžadují fosforylaci eIF2 $\alpha$  (Kedersha *et al.*, 2005; Buchan a Parker, 2009). Přestože u oocytů různých druhů byla popsána podobná granula, tzv. granula zárodečných buněk (germ cell granules, GCGs), která v oocytech *Drosophila melanogaster*, *Caenorhabditis elegans* a *Xenopus laevis* regulují maternální RNA nezbytné pro specifikaci zárodečných buněk (Kloc a Etkin, 2005; Anderson a Kedersha, 2006), u myších oocytů nebyla GCGs identifikována (Pepling, 2012). Myší oocyty na počátku růstu obsahují agregáty organel a dalších komponent, včetně RNA-vazebných proteinů, tzv. Balbianiho tělíska (Pepling *et al.*, 2007); a pro časně embryonální dělení je důležitý tzv. subkortikální maternální kortex (subcortical maternal cortex, SCMC) vyskytující se na periférii oocyty (Li *et al.*, 2008). Flemr *et al.* (2010) popsali u myších oocytů dynamiku tzv. P-tělísk (processing bodies, P-bodies), která jsou přítomna v malých oocytech bez meiotické kompetence a během růstu oocyty mizí; naopak v podkorové oblasti oocytů se tvoří přechodné agregáty RNA vazebných proteinů. Tyto agregáty během meiotického zrání dispergují v souladu s translací specifických mRNA (Flemr *et al.*, 2010). Nicméně navzdory těmto poznatkům se nám existenci stresových granul podobných těm, která se vytvářejí v somatických buňkách, nepodařilo potvrdit. Zřejmě se taková granula v oocytech v souvislosti se stresem v podobě kultivace s KN93 netvoří, ačkoliv celková translace u těchto oocytů byla potlačena. Tato data jsou ovšem pouze předběžná a byla provedena u oocytů ve stádiu GV, je tedy možné, že situace může být v dalších fázích zrání odlišná.

## 7. Závěr

Dráha mTOR a cap-dependentní translace v průběhu meiotického zrání myších oocytů je s největší pravděpodobností ovlivňována kinázou AKT, jelikož AKT i mTOR jsou v průběhu meiotického zrání lokalizovány kolem chromozomů při NEBD a v MI na meiotickém vřeténku, tedy v místech, kde je časově i prostorově ohraničená právě cap-dependentní translace.

Naproti tomu cap-dependentní translace není ovlivňována CaMKII, ačkoliv se tato kináza, respektive její isoforma CaMKII $\gamma$ , vyskytuje v oocytech v průběhu celého meiotického zrání a přestože oocyty vystavené vlivu KN93, specifického inhibitoru CaMKII, nebyly schopné utvářet meiotické vřeténko ani vydělit PB1. Nicméně v oocytech vystavených vlivu KN93 nebyla potvrzena snížená fosforylace mTOR, naopak oocyty kultivované v KN93 vykazovaly zvýšenou fosforylací proteinu eIF2 $\alpha$ , což naznačuje, že v oocytech byla inhibována celková translace, ne pouze dráha translace cap-dependentní. Tím také mohou být vysvětleny odlišnosti v morfologii oocytů kultivovaných s KN93. Úloha kalcium/kalmodulin dependentní kinázy II při meiotickém zrání nadále zůstává diskutabilní.

Vzhledem k tomu, že časově a prostorově ohraničená translace specifických mRNA hraje v průběhu meiotického zrání zásadní roli, může další výzkum v této oblasti a porozumění mechanismům, které cap-dependentní translaci regulují, poskytnout důležité poznatky v mnoha aspektech buněčné fyziologie i humánní medicíny, jelikož hlavní příčiny aneuploidie lidských oocytů zahrnují chyby, které vznikají během meiózy.

## 8. Seznam použité literatury

- Alessi, D. R., Andjelkovic, M., Caudwell, B., Cron, P., Morrice, N., Cohen, P., Hemmings, B. A. 1996. Mechanisms of activation of protein kinase B by insulin and IGF-1. *EMBO Journal*. 15 (23). 6541 – 6551.
- Alessi, D. R., James, S. R., Downes, C. P., Holmes, A. B., Gaffney, P. R. J., Reese, C. B., Cohen, P. 1997. Characterization of a 3-phosphoinositide-dependent protein kinase which phosphorylates and activates protein kinase B alpha. *Current Biology*. 7 (4). 261 – 269.
- Alves, V. S., Motta, F. L., Roffe, M., Delamano, A., Pesquero, J. B., Castilho, B. A. 2009. GCN2 activation and eIF2 alpha phosphorylation in the maturation of mouse oocytes. *Biochemical and Biophysical Research Communications*. 378 (1). 41 – 44.
- Andersen, C. B., Sakaue, H., Nedachi, T., Kovacina, K. S., Clayberger, C., Conti, M., Roth, R. A. 2003. Protein kinase B/Akt is essential for the insulin- but not progesterone-stimulated resumption of meiosis in *Xenopus* oocytes. *Biochemical Journal*. 369. 227 – 238.
- Anderson, P., Kedersha, N. 2006. RNA granules. *Journal of Cell Biology*. 172 (6). 803 – 808.
- Anderson, R., Fassler, R., Georges-Labouesse, E., Hynes, R. O., Bader, B. L., Kreidberg, J. A., Schaible, K., Heasman, J., Wylie, C. 1999. Mouse primordial germ cells lacking beta1 integrins enter the germline but fail to migrate normally to the gonads. *Development*. 126 (8). 1655 – 1664.
- Astrinidis, A., Kim, J., Kelly, C. M., Olofsson, B. A., Torabi, B., Sorokina, E. M., Azizkhan-Clifford, J. 2010. The transcription factor SP1 regulates centriole function and chromosomal stability through a functional interaction with the mammalian target of rapamycin/raptor complex. *Genes Chromosomes & Cancer*. 49 (3). 282 – 297.
- Backs, J., Stein, P., Backs, T., Duncan, F. E., Grueter, C. E., McAnally, J., Qi, X. X., Schultz, R. M., Olson, E. N. 2010. The gamma isoform of CaM kinase II controls mouse egg activation by regulation cell cycle resumption. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 107 (1). 81 – 86.
- Baitinger, C., Alderton, J., Poenie, M., Schulman, H., Steinhardt, R. A. 1990. Multifunctional Ca<sup>2+</sup>/calmodulin-dependent protein kinase is necessary for nuclear-envelope breakdown. *Journal of Cell Biology*. 111 (5). 1763 – 1773.

- Balakier, H., Dziak, E., Sojecki, A., Librach, C., Michalak, M., Opas, M. 2002. Calcium-binding proteins and calcium-release channels in human maturing oocytes, pronuclear zygotes and early preimplantation embryos. *Human Reproduction*. 17 (11). 2938 – 2947.
- Baltas, L. G., Karczewski, P., Krause, E. G. 1995. The cardiac sarcoplasmic-reticulum phospholamban kinase is a distinct delta-CaM kinase isozyme. *FEBS Letters*. 373 (1). 71 – 75.
- Bhaskar, P. T., Hay, N. 2007. The two TORCs and Akt. *Developmental Cell*. 12 (4). 487 – 502.
- Bhatt, R. R., Ferrell, J. E. 1999. The protein kinase p90 rsk as an essential mediator of cytosolic factor activity. *Science*. 286 (5443). 1362 – 1365.
- Bi, C. M., Dai, G., Chen, Y., Wu, Y. C., Zhang, X. R., Li, C. J. 2004. Spatiotemporal pattern of calmodulin and  $[Ca^{2+}]_i$  is related to meiosis in mouse oocytes. *Cell Biology International*. 28 (4). 317 – 322.
- Bonatti, S., Simili, M., Galli, A., Bagnato, P., Pigullo, S., Schiestl, R. H., Abbondandolo, A. 1998. Inhibition of the M(r) 70,000 SG kinase pathway by rapamycin results in chromosome malsegregation in yeast and mammalian cells. *Chromosoma*. 107 (6 – 7). 498 – 506.
- Braun, A. P., Schulman, H. 1995. The multifunctional calcium calmodulin-dependent protein-kinase – from form to function. *Annual review of physiology*. 57. 417 – 445.
- Brook, M., Smith, J. W. S., Gray, N. K. 2009. The DAZL and PABP families: RNA-binding proteins with interrelated roles in translational control in oocytes. *Reproduction*. 137 (4). 595 – 617.
- Buchan, J. R., Parker, R. 2009. Eukaryotic stress granules: the ins and outs of translation. *Molecular Cell*. 36 (6). 932 – 941.
- Burnett, P. E., Barrow, R. K., Cohen, N. A., Snyder, S. H., Sabatini, D. M. 1998. RAFT1 phosphorylation of the translational regulators p70 S6 kinase and 4E-BP1. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 95 (4). 1432 – 1437.
- Carroll, J., Swann, K., Whittingham, D., Whitaker, M. 1994. Spatiotemporal dynamics of intracellular  $[Ca^{2+}]_i$  oscillations during the growth and meiotic maturation of mouse oocytes. *Development*. 120 (12). 3507 – 3517.



- Clarke, J. H. 2012. Post-transcriptional control of gene expression during mouse oogenesis. In: Kubiak, J. Z. (ed.). *Mouse Development, From Oocyte to Stem Cells, Results and Problems in Cell Differentiation* 55. Springer. 1 – 21. ISBN: 978-3642304057.
- Coleman, T. R., Dunphy, W. G. 1994. Cdc2 regulatory factors. *Current Opinion in Cell Biology*. 6 (6). 877 – 882.
- Cybulski, N., Hall, M. N. 2009. TOR complex 2: a signalling pathway on its own. *Trends in Biochemical Sciences*. 34 (12). 620 – 627.
- De Haro, C., Méndez, R., Santoyo, J. 1996. The eIF-2 $\alpha$  kinases and the control of protein synthesis. *The FASEB Journal*. 12. 1378 – 1387.
- Ducibella, T. 1996. The cortical reaction and development of activation competence in mammalian oocytes. *Human Reproduction Update*. 2 (1). 29 – 42.
- Edwards, R. G. 1965. Maturation in vitro of mouse, sheep, cow, pig, rhesus monkey, and human ovarian oocytes. *Nature*. 208 (5008). 349 – 351.
- Ellederová, Z., Cais, O., Šušor, A., Uhlířová, K., Kovářová, H., Jelínková, L., Tomek, W., Kubelka, M. 2008. ERK 1/2 Map kinase metabolic pathway is responsible for phosphorylation of translation initiation factor eIF4E during in vitro maturation of pig oocytes. *Molecular Reproduction and Development*. 75 (2). 309 – 317.
- Ellederová, Z., Kovářová, H., Kubelka, M. 2004. Iniciace translace jako stěžejní bod regulace translace u eukaryot. *Biologické listy*. 69 (1). 73 – 84.
- Ellederová, Z., Kovářová, H., Melo-Sterza, F., Livingstone, M., Tomek, W., Kubelka, M. 2006. Suppression of translation during in vitro maturation of pig oocytes despite enhanced formation of cap-binding protein complex eIF4F and 4E-BP1 hyperphosphorylation. *Molecular Reproduction and Development*. 73 (1). 68 – 76.
- Engelman, J. A., Luo, J., Cantley, L. C. 2006. The evolution of phosphatidylinositol 3-kinases as regulators of growth and metabolism. *Nature Reviews Genetics*. 7 (8). 606 – 619.
- Eppig, J. J., Viveiros, M. M., Bivens, C. M., De la Fuente, R. 2004. Regulation of mammalian oocyte maturation. In: Leung, P. C. K., Adashi, E. Y. (eds.). *The ovary*. Elsevier Academic Press. San Diego. p. 113 – 129. ISBN: 0-12-444562-4

- Eppig, J. J., Kozak, L. P., Eicher, E. M., Stevens, L. C. 1977. Ovarian teratomas in mice are derived from oocytes that have completed the first meiotic division. *Nature*. 269 (5628). 517 – 518.
- Eppig, J. J., Schroeder, A. C. 1989. Capacity of mouse oocytes from preantral follicles to undergo embryogenesis and development to live young after growth, maturation, and fertilization in vitro. *Biology of Reproduction*. 41 (2). 268 – 276.
- Erdogan, S., FitzHarris, G., Tartia, A. P., Baltz, J. M. 2005. Mechanisms regulating intracellular pH are activated during growth of the mouse oocyte coincident with acquisition of meiotic competence. *Developmental Biology*. 286 (1). 352 – 360.
- 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 (5). 1552 – 1564.
- Fingar, D. C., Blenis, J. 2004. Target of rapamycin (TOR): an integrator of nutrient and growth factor signals and coordinator of cell growth and cell cycle progression. *Oncogene*. 23 (18). 3151 – 3174.
- Flemr, M., Ma, J., Schultz, R., Svoboda, P. 2010. P-body loss is concomitant with formation of a messenger RNA storage domain in mouse oocytes. *Biology of Reproduction*. 82 (5). 1008 – 1017.
- Fraser, C. S., Pain, V. M., Morley, S. J. 1999. The association of initiation factor 4F with Poly(A)-binding protein is enhanced in serum-stimulated *Xenopus* kidney cells. *Journal of Biological Chemistry*. 274 (1). 196 – 204.
- Gavin, A. C, Schorderet-Slatkine, S. 1997. Ribosomal S6 kinase p90(rsk) and mRNA cap-binding protein eIF4E phosphorylations correlate with MAP kinase activation during meiotic reinitiation of mouse oocytes. *Molecular Reproduction and Development*. 46 (3). 383 – 391.
- Gingras, A. C., Kennedy, S. G., O’Leary, M. A., Sonenberg, N., Hay, N. 2014. 4E-BP1, a repressor of mRNA translation, is phosphorylated and activated by the Akt (PKB) signaling pathway. *Genes&Development*. 12 (4). 502 – 513.
- Gingras, A. C., Raught, B., Sonenberg, N. 1999. eIF4 initiation factors: Effectors of mRNA recruitment to ribosomes and regulators of translation. *Annual Review of Biochemistry*. 68. 913 – 963.

- Glotzer, M., Murray, A. W., Kirschner, M. W. 1991. Cyclin is degraded by the ubiquitin pathway. *Nature*. 349 (6305). 132 – 138.
- Gosden, R., Krapez, J., Briggs, D. 1997. Growth and development of the mammalian oocyte. *Bioessays*. 19 (10). 875 – 882.
- Gray, N. K., Wickens, M. 1998. Control of translation initiation in animals. *Annual Review of Cell and Developmental Biology*. 14. 399 – 458.
- Hama, N., Paliogianni, F., Fessler, B. J., Boumpas, D. T. 1995. Calcium/calmodulin-dependent protein kinase II downregulates both calcineurin and protein kinase C-mediated pathways for cytokine gene transcription in human T cells. *Journal of Experimental Medicine*. 181 (3). 1217 – 1222.
- Hampl, A., Eppig, J. J. 1995. Analysis of the mechanism(s) of metaphase I arrest in maturing mouse oocytes. *Development*. 121 (4). 925 – 933.
- Han, S. J., Vaccari, S., Nedachi, T., Andersen, C. B., Kovacina, K. S., Rothy, R. A., Conti, M. 2006. Protein kinase B/Akt phosphorylation of PDE3A and its role in mammalian oocyte maturation. *EMBO Journal*. 25 (24). 5716 – 2725.
- Harding, H. P., Zhang, Y., Ron, D. 1999. Protein translation and folding are coupled by an endoplasmic-reticulum-resident-kinase. *Nature*. 397 (6716). 271 – 274.
- Hashimoto, H., Kishimoto, T. 1988. Regulation of meiotic metaphase by a cytoplasmic maturation-promoting factor during mouse oocyte maturation. *Developmental Biology*. 126 (2). 242 – 252.
- Homa, S. T. 1995. Calcium and meiotic maturation of the mammalian oocyte. *Molecular Reproduction and Development*. 40 (1). 122 – 134.
- Huang, J. X., Manning, B. D. 2009. A complex interplay between Akt, TSC2 and the two mTOR complexes. *Biochemical Society Transactions*. 37. 217 – 222.
- Hyttel, P., Farstad, W., Mondain – Moval, M., Lajord, K. B., Smith, A. J. 1990. Structural aspects of oocyte maturation in the blue fox (*Alopex lagopus*). *Anatomy and Embryology*. 181 (4). 325 – 331.

- Chang, H. Y., Minahan, K., Merriman, J. A., Jones, K. T. 2009. Calmodulin-dependent protein kinase gamma 3 (CaMKII gamma 3) mediates the cell cycle resumption of metaphase II eggs in mouse. *Development*. 136 (24). 4077 – 4081.
- Chen, J. J. 2007. Regulation of protein synthesis by the heme-regulated eIF2 alpha kinase: relevance to anemias. *Blood*. 109 (7). 2693 – 2699.
- Inoki, K., Li, Y., Zhu, T. Q., Wu, J., Guan, K. L. 2002. TSC2 is phosphorylated and inhibited by Akt and suppresses mTOR signalling. *Nature Cell Biology*. 4 (9). 648 – 657.
- Ito, J., Kaneko, R., Hirabayashi, M. 2006. The regulation of calcium/calmodulin-dependent protein kinase II during oocyte activation in the rat. *Journal of Reproduction and Development*. 52 (3). 439 – 447.
- Jacinto, E., Loewith, R., Schmidt, A., Lin, S. Ruegg, M. A., Hall, A., Hall, M. N. 2004. Mammalian TOR complex 2 controls actin cytoskeleton and is rapamycin insensitive. *Nature Cell Biology*. 6 (11). 1122 – U30.
- Jiang, Z. Z., Hu, M. W., Wang, Z. B., Huang, L., Lin, F., Qi, S. T., Ouyang, Y. C., Fan, H. Y., Schatten, H., Mak, T. W., Sun, Q. Y. 2014. Survivin is essential for fertile egg production and female fertility in mice. *Cell Death&Disease*. 5. Číslo článku e1154.
- Johnson, J., Bierle, B. M., Gallicano, G. I., Capco, D. G. 1998. Calcium/calmodulin dependent protein kinase II and calmodulin: Regulators of the meiotic spindle in mouse eggs. *Developmental Biology*. 204 (2). 464 – 477.
- Jonhson, J., Canning, J., Kaneko, T., Pru, J. K., Tilly, J. L. 2004. Germline stem cells and follicular renewal in the postnatal mammalian ovary. *Nature*. 428 (6979). 145 – 150.
- Kalab, P., Kubiak, J. Z., Verlhac, M. H., Colledge, W. H., Maro B. 1996. Activation of p90rsk during meiotic maturation and first mitosis in mouse oocytes and eggs: MAP kinase-independent and -dependent activation. *Development*. 122 (6). 1957 – 1964.
- Kalous, J., Šolc, P., Baran, V., Kubelka, M., Schultz, R. M., Motlík, J. 2006. PKB/AKT is involved in resumption of meiosis in mouse oocytes. *Biology of the Cell*. 98 (2). 111 – 123.
- Kang, M. K., Han, S. J. 2011. Post-transcriptional and post-translational regulation during mouse oocyte maturation. *BMB Reports*. 44 (3). 147 – 157.

- Karabínová, P., Kubelka, M., Šušor, A. 2011. Proteasomal degradation of ubiquitinated proteins in oocyte meiosis and fertilization in mammals. *Cell and Tissue Research*. 346 (1). 1 – 9.
- Karim, M. M., Hughes, J. M. X., Warwicker, J., Scheper, G. C., Proud, C. G., McCarthy, J. E. G. 2001. A quantitative molecular mechanism for modulation of mammalian translation by the eIF4E-binding protein 1. *Journal of biological chemistry*. 276. 20750-20757.
- Kawase, E., Yamamoto, H., Hashimoto, K., Nakatsuji, N. 1994. Tumor necrosis factor-alpha (TNF-alpha) stimulates proliferation of mouse primordial germ cells in culture. *Developmental biology*. 161 (1). 91 – 95.
- Keady, B. T., Kuo, P. W., Martinez, S. E., Yuan, L., Hake, L. E. 2007. MAPK interacts with Xgef and is required for CPEB activation during meiosis in *Xenopus* oocytes. *Journal of Cell Science*. 120 (6). 1093 – 1103.
- Kedersha, N., Stoecklin, G., Ayodele, M., Yacono, P., Lykke-Andersen, J., Fitzler, M. J., Scheuner, D., Kaufman, R. J., Golan, D. E., Anderson, P. 2005. Stress granules and processing bodies are dynamically linked sites of mRNP remodeling. *Journal of Cell Biology*. 169 (6). 871 – 884.
- Kloc, M., Etkin, L. D. 2005. RNA localization mechanisms in oocytes. *Journal of Cell Science*. 118 (2). 269 – 282.
- Kogasaka, Y., Hoshino, Y., Hiradate, Y., Tanemura, K., Sato, E. 2013. Distribution and association of mTOR with its cofactors, Raptor and Rictor, in cumulus cells and oocytes during meiotic maturation in mice. *Molecular Reproduction and Development*. 80 (4). 334 – 348.
- Komrsková, P., Šušor, A., Malík, R., Procházková, B., Lišková, L., Šupolíková, J., Hladký, Š., Kubelka, M. 2014. Aurora kinase A is not involved in CPEB1 phosphorylation and cyclin B1 mRNA polyadenylation during meiotic maturation of porcine oocytes. *PLOS ONE*. 9 (7). Číslo článku e101222.
- Krishnamoorthy, T., Pavitt, G. D., Zhang, F., Dever, T. E., Hinnebusch, A. G. 2001. Tight binding of the phosphorylated alpha subunit of initiation factor 2 (eIF2 alpha) to the regulatory subunits of guanine nucleotide exchange factor eIF2B is required for inhibition of translation initiation. *Molecular and Cellular Biology*. 21 (15). 5018 – 5030.

- Kubiak, J. Z., Weber, M., Géraud, G., Maro, B. 1992. Cell cycle modification during the transitions between meiotic M-phases in mouse oocytes. *Journal of Cell Science*. 102. 457 – 467.
- Kuo, P. W., Runge, E., Lu, X. D., Hake, L. E. 2011. Xgef influences XRINGO/CDK1 signaling and CPEB activation during *Xenopus* oocyte maturation. *Differentiation*. 81 (2). 133 – 140.
- Ledan, E., Polanski, Z., Terret, M. E., Maro, B. 2001. Meiotic maturation of the mouse oocyte requires an equilibrium between cyclin B synthesis and degradation. *Developmental Biology*. 232 (2). 400 – 413.
- Lee, S. E., Sun, S. C., Choi, H. Y., Uhm, S. J., Kim, N. H. 2012. mTOR is required for asymmetric division through small GTPases in mouse oocytes. *Molecular Reproduction and Development*. 79 (5). 356 – 366.
- Levin, D., London, I. M. 1978. Regulation of protein synthesis: activation by double-stranded RNA of a protein kinase that phosphorylates eukaryotic initiation factor 2. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 75 (3). 1121 – 1125.
- Li, C. J., Heim, R., Lu, P., Pu, Y. M., Tsien, R. Y., Chang, D. C. 1999a. Dynamic redistribution of calmodulin in HeLa cells during cell division as revealed by a GFP-calmodulin fusion protein technique. *Journal of Cell Science*. 112 (10). 1556 – 1577.
- Li, C. J., Lu, P., Zhang, D. C. 1999b. Using a GFP-gene fusion technique to study the cell cycle-dependent distribution of calmodulin in living cells. *Science in China Series C-Life Sciences*. 42 (5). 517 – 528.
- Li, L., Baibakov, B., Dean, J. 2008. A subcortical maternal complex essential for preimplantation mouse embryogenesis. *Developmental Cell*. 15 (3). 416 – 425.
- Lin, T. A., kong, X., Haystead, T. A., Pause, A., Belsham, G., Sonenberg, N., Lawrence, J. C. 1994. PHAS-I as a link between mitogen-activated protein kinase and translation initiation. *Reproduction*. 266 (5185). 653-656.
- Lince-Faria, M., Maffini, S., Orr, B., Ding, Y., Florindo, C., Sunkel, C. E., Tavares, A., Johansen, J., Johansen, K. M., Mariato, H. 2009. Spatiotemporal control of mitosis by the conserved spindle matrix protein Megator. *Journal of Cell Biology*. 184 (5). 647 – 657.
- Liu, H. L., Aoki, F. 2002. Transcriptional activity associated with meiotic competence in fully grown mouse GV oocytes. *Zygote*. 10 (4). 327 – 332.

- Lou, L. L., Lloyd, S. J., Schulman, H., 1986. Activation of the multifunctional Ca<sup>2+</sup>/calmodulin-dependent protein-kinase by autophosphorylation – ATP modulates production of an autonomous enzyme. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 83 (24). 9497 – 9501.
- Mader, S., Lee, H., Pause, A., Sonenberg, N. 1995. The translation initiation factor eIF-4E binds to a common motif shared by the translation factor eIF-4-gamma and the translational repressors 4E-binding proteins. *Molecular and Cellular Biology*. 15 (9). 4990 – 4997.
- Makker, A., Goel, M. M., Mahdi, A. A. 2014. PI3K/PTEN/Akt and TSC/mTOR signaling pathways, ovarian dysfunction, and fertility: an update. *Journal of Molecular Endocrinology*. 53 (3). R103 – R118.
- Manning, B. D., Cantley, L. C. 2003. Rheb fills a GAP between TSC and TOR. *Trends in Biochemical Sciences*. 28 (11). 573 – 576.
- Manning, B. D., Cantley, L. C. 2007. Akt/PKB signaling: Navigating downstream. *Cell*. 129 (7). 1261 – 1274.
- Mayer, S., Wrenzycki, C., Tomek, W. 2014. Inactivation of mTOR arrests bovine oocytes in the metaphase-I stage, despite reversible inhibition of 4E-BP1 phosphorylation. *Molecular Reproduction and Development*. 81 (4). 363 – 375.
- Means, A. R. 1994. Calcium, calmodulin and cell-cycle regulation. *FEBS Letters*. 347 (1). 1 – 4.
- Minich, W. B., Balasta, M. L., Goss, D. J., Rhoads, R. E. 1994. Chromatographic resolution of in-vivo phosphorylated and nonphosphorylated eukaryotic translation initiation-factor eIF-4E – increased cap affinity of the phosphorylated form. *Proceeding of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 91 (16). 7668 – 7672.
- Morley, S. J., Naegele, S. 2002. Phosphorylation of eukaryotic initiation factor (eIF) 4E is not required for de novo protein synthesis following recovery from hypertonic stress in human kidney cells. *Journal of Biological Chemistry*. 277 (36). 32855 – 32859.
- Murray, A. 1995. Cyclin ubiquitination: the destructive end of mitosis. *Cell*. 81 (2). 149 – 152.
- Okumura, E., Fukuhara, T., Yoshida, H., Hanada, S., Kozutsumi, R., Mori, M., Tachibana, K., Kishimoto, T. 2002. Akt inhibits Myt 1 signalling pathway that leads to meiotic G2/M-phase transitions. *Nature Cell Biology*. 4 (2). 111 – 116.

- Palmer, A., Gavin, A. C., Nebreda, A. R., 1998. A link between MAP kinase and p34(cdc2)/cyclin B during oocyte maturation: p90(rsk) phosphorylates and inactivates the p34(cdc2) inhibitory kinase Myt1. *EMBO Journal*. 17 (17). 5037 – 5047.
- Parker, L. L., Piwnica-Worms, H. 1992. Inactivation of the p34(cdc2)-cyclin B complex by the human WEE1 tyrosine kinase. *Science*. 257 (5078). 1955 – 1957.
- Pepling, M. E. 2012. A novel maternal mRNA storage compartment in mouse oocytes. *Biology of Reproduction*. 82 (5). 807 – 808.
- Pepling, M. E., Wilhelm, J. E., O'Hara, A. L., Gephart, G. W., Spradling, A. C. 2007. Mouse oocytes within germ cell cyst and primordial follicles contain a Balbiani body. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 104 (1). 187 – 192.
- Pesce, M., Farrace, M. G., Piacentini, M., Dolci, S., De Felici, M. 1993. Stem cell factor and leukemia inhibitory factor promote primordial germ cell survival by suppressing programmed cell death (apoptosis). *Development*. 118 (4). 1081 – 1094.
- Pincus, G., Enzmann, E. V. 1935. The comparative behavior of mammalian eggs in vivo and in vitro. *Journal of Experimental Medicine*. 62 (5). 665 – 675.
- Piqué, M., López, J. M., Foissac, S., Guigó, R., Méndez, R. 2008. A combinatorial code for CPE-mediated translational control. *Cell*. 132 (2). 434 – 448.
- Radford, H. E., Meijer, H. A., de Moor, C. H. 2008. Translational control by cytoplasmic polyadenylation in *Xenopus* oocytes. *Biochimica et Biophysica Acta – Gene Regulatory Mechanisms*. 1779 (4). 217 – 229.
- Rasmussen, C. D., Means, A. R. 1989. Calmodulin is required for cell cycle progression during G1 and mitosis. *EMBO Journal*. 8 (1). 73 – 82.
- Resnick, J. L., Ortiz, M., Keller, J. R., Donovan, P. J. 1998. Role of fibroblast growth factors and their receptors in mouse primordial germ cell growth. *Biology of Reproduction*. 59 (5). 1224 – 1229.
- Rhoads, R. E. 1993. Regulation of eukaryotic protein synthesis by initiation factors. *Journal of Biological Chemistry*. 268 (5). 3017 – 3020.



- Romasko, E. J., Amarnath, D., Midic, U., Latham, K. E. 2013. Association of maternal mRNA and phosphorylated eIF4EBP1 variants with the spindle in mouse oocytes: Localized translational control supporting female meiosis in mammals. *Genetics*. 195 (2). 349 – 4SI.
- Ruvinsky, I., Meyuhas, O. 2006. Ribosomal protein S6 phosphorylation: from protein synthesis to cell size. *Trends in Biochemical Sciences*. 31 (6). 342 – 348.
- Santella, L. 1998. The role of calcium in the cell cycle: Facts and hypotheses. *Biochemical and Biophysical Research Communications*. 224 (2). 317 – 324.
- Sedmíková, M., Burdová, J., Petr, J., Etrych, M., Rozinek, J., Jílek, F. 2003. Induction and activation of meiosis and subsequent partenogenetic development of growing pig oocytes using calcium ionophore A23187. *Theriogenology*. 60 (9). 1609 – 1620.
- Shi, Y., Vattem, K. M., Sood, R., An, J., Liang, J., Stramm, L., Wek, R. C. 1998. Identification and characterization of pancreatic eukaryotic kinase, PEK, involved in translational control. *Molecular and Cellular Biology*. 18 (12). 7499 – 7509.
- Scheper, G. C, van Kollenburg, B., Hu, J. Z., Luo, Y. J., Goss, D. J., Proud, C. G. 2002. Phosphorylation of eukaryotic initiation factor 4E markedly reduces its affinity for capped mRNA. *Journal of Biological Chemistry*. 277 (5). 3303 – 3309.
- Schwab, M. S., Kim, S. H., Terada, N., Edfjall, C., Kozma, S. C., Thomas, G., Maller, J. L. 1999. p70(S6K) controls selective mRNA translation during oocyte maturation and early embryogenesis in *Xenopus laevis*. *Molecular and Cellular Biology*. 19 (4). 2485 – 2494.
- Sorensen, R. A., Wassarman, P. M. 1976. Relationship between growth and meiotic maturation of mouse oocyte. *Developmental Biology*. 50 (2). 531 – 536.
- Su, Y. Q., Eppig, J. J. 2002. Evidence that multifunctional calcium/calmodulin-dependent protein kinase II (CaM KII) participates in the meiotic maturation of mouse oocytes. *Molecular Reproduction and Development*. 61 (4). 560 – 569.
- Šušor, A., Jansová, D., Černá, R., Danylevská, A., Anger, M., Toralová, T., Malík, R., Šupolíková, J., Cook, M. S., Oh, J. S., Kubelka, M. 2015. Temporal and spatial regulation of translation in the mammalian oocyte via the mTOR-eIF4F pathway. *Nature Communications*. 6. Číslo článku 6078.
- Takei, N., Nawa, H. 2014. mTOR signaling and its role in normal and abnormal brain development. *Frontiers in Molecular Neuroscience*. 7. Číslo článku 28.

- Tashima, K., Yamamoto, H., Setoyama, C., Ono, T., Miyamoto, E. 1996. Overexpression of Ca<sup>2+</sup>/calmodulin-dependent protein kinase II inhibits neurite outgrowth of PC12 cells. *Journal of Neurochemistry*. 66 (1). 57 – 64.
- Tombes, R. M., Krystal, G. 1995. G1 cell cycle arrest and apoptosis are induced in NIH 3T3 cells by KN93, a CaMKII inhibitor. *Molecular Biology of the Cell*. 6. 1063 – 1070.
- Tomek, W., Smiljakovic, T. 2005. Activation of Akt (protein kinase B) stimulates metaphase I to metaphase II transition in bovine oocytes. *Reproduction*. 130 (4). 423 – 430.
- Tomek, W., Sterza, F. A. M., Kubelka, M., Wollenhaupt, K, Torner, H., Anger, M., Kanitz, W. 2002. Regulation of translation during in vitro maturation of bovine oocytes: The role of MAP kinase, eIF4E (cap binding protein) phosphorylation, and eIF4E-BP1. *Biology of Reproduction*. 66 (5). 1274 – 1282.
- Vaccari, S., Horner, K., Mehlmann, L. M., Conti, M. 2008. Generation of mouse oocytes defective in cAMP synthesis and degradation: Endogenous cyclic AMP is essential for meiotic arrest. *Developmental Biology*. 316 (1). 124 – 134.
- van den Hurk, R., Zhao J. 2005. Formation of mammalian oocytes and their growth, differentiation and maturation within ovarian follicles. *Theriogenology*. 63 (6). 1717 – 1751.
- Vanderhyden, B. 2002. Molecular basis of ovarian development and function. *Frontiers of Bioscience*. 7. D2006 – D2022.
- Vazquez-Martin, A., Oliveras-Ferraros, C., Bernado, L., Lopez-Bonet, E., Menendez, J. A. 2009. The serine 2481-autophosphorylated form of mammalian target of rapamycin (mTOR) is localized to midzone and midbody in dividing cancer cells. *Biochemical and Biophysical Research Communications*. 380 (3). 638 – 364.
- Verlhac, M. H., Kubiak, J. Z., Clarke, H. J., Maro, B. 1994. Microtubule and chromatin behavior follow MAP kinase activity but not MPF activity during meiosis in mouse oocytes. *Development*. 120 (4). 1017 – 1025.
- Verlhac, M. H., Kubiak, J. Z., Weber, M., Geraud, G., Colledge, W. H., Evans, M. J., Maro, B. 1996. Mos is required for MAP kinase activation and is involved in microtubule organization during meiotic maturation in the mouse. *Development*. 122 (3). 815 – 822.

- Vigneron, C., Perreau, C., Dupont, J., Uzbekova, S., Prigent, C., Mermillod, P. 2004. Several signaling pathways are involved in the control of cattle oocyte maturation. *Molecular Reproduction and Development*. 69 (4). 466 – 474.
- Vogel, H. J. 1994. The Merck Frost Adward Lecture 1994: Calmodulin – a versatile calcium mediator protein. *Biochemistry and Cell Biology-Biochimie et Biologie Cellulaire*. 72 (9 – 10). 357 – 376.
- Wang, J. H., Pallen, C. J., Sharma, R. K., Adachi, A. M. 1985. The calmodulin regulatory system. *Current Topics in Cellular Regulation*. 27. 419 – 436.
- Wassarman, P. M. 1999. Mammalian Fertilization: Molecular Aspects of Gamete Adhesion, Exocytosis, and Fusion. *Cell*. 96 (2). 175 – 183.
- Wassarman, P. M., Albertini, D. F. 1994. The Mammalian Ovum. In: Knobil, E., Neill, J. D. (eds.). *The Physiology of Reproduction*. Raven Press. New York. 79 – 122. ISBN: 978-0781700863.
- Webb, R. J., Brains, H., Cruttwell, C., Carroll, J. 2002. Gap-junctional communication in mouse-oocyte complexes: implications for the mechanism of meiotic maturation. *Reproduction*. 123 (1). 41 – 52.
- White, Y. A. R., Woods, D. C., Takai, Y., Ishihara, O., Seki, H., Tilly, J. L. 2012. Oocyte formation by mitotically active germ cells purified from ovaries of reproductive-age women. *Nature Medicine*. 18 (3). 413 – U176.
- Williams, C. J. 2002. Signalling mechanisms of mammalian oocyte activation. *Human Reproduction Update*. 8 (4). 313 – 321.
- Wiza, C., Nascimento, E. B. M., Ouwens, D. M. 2012. Role of PRAS40 in Akt and mTOR signaling in health and disease. *American Journal of Physiology-Endocrinology and Metabolism*. 302 (12). E1453 – E1460.
- Yang, C. R., Wei, Y. C., Zhang, Y., Zheng, K. J., Li, N., Yan, Y. Q. 2009. The expression and effect of mTOR during mouse oocyte maturation. *Progress in Biochemistry and Biophysics*. 36 (10). 1334 – 1339.
- Yang, D. Q., Kastan, M. B. 2000. Participation of ATM in insulin signalling through phosphorylation of eIF-4E-binding protein 1. *Nature Cell Biology*. 2 (12). 893 – 898.

- Ying, Y., Liu, X. M., Marble, A., Lawson, K. A., Zhao, G. Q. 2000. Requirement of Bmp8b for the generation of primordial germ cells in the mouse. *Molecular Endocrinology*. 14 (7). 1053 – 1063.
- Ying, Y., Qi, X., Zhao, G. Q. 2001. Induction of primordial germ cells from murine epiblasts by synergistic action of BMP4 and BMP8B signalling pathways. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 98 (14). 7858 – 7862.
- Yu, J., Yaba, A., Kasiman, C., Thomson, T., Johnson, J. 2011. mTOR controls ovarian follicle growth by regulating granulosa cell proliferation. *Plos One*. 6 (7).
- Zhang, P. C., McGrath, B. C., Reinert, J., Olsen, D. S., Lei, L., Gill, S., Wek, S. A., Vattam, K. M., Wek, R. C., Kimball, S. R., Jefferson, L. S., Cavener, D. R. 2002. The GCN2 eIF2 alpha kinase is required for adaptation to amino acid deprivation in mice. *Molecular and Cellular Biology*. 22 (19). 6681 – 6688.
- Zuccotti, M., Ponce, R. H., Boiani, M., Guizzardi, S., Govoni, P., Scandroglio, R., Garagna, S., Redi, C. A. 2002. The analysis of chromatin organisation allows selection of mouse antral oocytes competent for development to blastocyst. *Zygote*. 10 (1). 73 – 78.
- Zuccotti, M., Rossi, P. G., Martinez, A., Garagna, S., Forabosco, A., Redi, C. A. 1998. Meiotic and developmental competence of mouse antral oocytes. *Biology of Reproduction*. 58 (3). 700 – 704.
- Zykova, T. A., Zhu, F., Zhang, Y. G. Bode, A. M., Dong, Z. G. 2007. Involvement of ERKs, RSK2 and PKR in UVA-induced signal transduction toward phosphorylation of eIF2 alpha (Ser51). *Carcinogenesis*. 28 (7). 1543 – 1551.

## 9. Seznam použitých zkratek

3'UTR – nepřekládaná oblast na 3' konci mRNA

4E-BP1 – jeden z 4E-BPs, protein vázající eIF4E

4E-BPs – proteiny vázající eIF4E

5'UTR – nepřekládaná oblast na 5' konci mRNA

AIP – inhibitor CaMKII

AKT/PKB – protein kináza B

BMP – kostní morfogenetický protein

CaM – kalmodulin

CaMKII – kalcium/kalmodulin-dependentní protein kináza II

CaMKII $\alpha,\gamma$  – isoformy CaMKII

cAMP – cyklický adenosin monofosfát

CCNB1 – cyklin B1

CDC25 – fosfatáza pro CDK1 (Thr 14, Tyr 15)

CDK1 – cyklin dependentní kináza 1

CPE – cytoplazmatický polyadenylační element

CPEB1 – protein 1 vázající CPE

CSF – cytostatický faktor

DNA – deoxyribonukleová kyselina

EGF – epidermální růstový faktor

eIF2 $\alpha$ , 2 $\alpha$  – podjednotka  $\alpha$  eukaryotního iniciačního faktoru 2

eIF4E (4E), eIF4G (4G), eIF4A (4A) – eukaryotní iniciační faktory, podjednotky eIF4F

eIF4F (4F) – eukaryotní iniciační faktor 4F, čepičku vázající komplex

FSH – folikulostimulační hormon

G1 fáze – růstová fáze buněčného cyklu

G2 fáze – premitotická fáze buněčného cyklu

GAPDH – glycerinaldehyd-3-fosfátdehydrogenáza

GDP – guanosindifosfát

GTP – guanosintrifosfát

GTPáza – hydroláza guanosintrifosfátu

GV – zárodečný váček, stádium zárodečného váčku

IBMX – 3-isobutyl-1-methylxanthin

ICC – imunocytochemie, imunocytochemické barvení

IRES – interní vstupní místo ribozomu

KN93 – inhibitor CaMKII

LH – luteinizační hormon

M16 – kultivační médium

MAPK – mitogenem aktivovaná protein kináza

M-fáze – mitotická fáze buněčného cyklu

MI – metafáze prvního meiotického dělení

MII – metafáze druhého meiotického dělení

MOS – Mos-*proto-onkogen*

MPF – faktor podporující metafázi

mRNA – mediátorová RNA

mTOR – „savčí cíl rapamycinu“

mTORC1 – mTOR komplex 1, mTOR – raptor komplex

mTORC2 – mTOR komplex 2, mTOR – rictor komplex

MYT 1, WEE 1 – inhibiční protein kinázy

NEBD – rozpad jaderného obalu

NSN – non-surrounded nucleolus

p-2 $\alpha$  – fosforylovaný protein 2 $\alpha$

p90RSK – ribozomální S6 kináza, MAP kinázou aktivovaná kináza 1

p-AKT – fosforylovaná forma kinázy AKT

PB1 – první pólové tělísko

PGCs – primordiální zárodečné buňky

PI3Ks – fosfoinositid-3-kinázy

p-mTOR – fosforylovaný mTOR

RHEB – obohacený homolog Ras v mozku

RNA – ribonukleová kyselina

RNPs – ribonukleoproteinové částice

S fáze – syntetická fáze buněčného cyklu

S6K – ribozomální S6 kináza, p70(rsk)

Ser – serin

SGs – stresová granula

SN – surrounded nucleolus

Thr – threonin

TM – transfer médium

TSC1 - hamartin

TSC2 – tuberin

Tyr – tyrosin

W7 – antagonist kalmodulinu

WB – western blot

## 10. Seznam obrázků

- Obrázek 1: Důležitá stádia v oogenezi u myši (str. 10)
- Obrázek 2: Myší oocyt ve stádiu GV (str. 11)
- Obrázek 3: Myší oocyty se SN a NSN (str. 12)
- Obrázek 4: MI a MII vřeténka u myších oocytů (str. 14)
- Obrázek 5: Myší oocyt s vyděleným prvním pólovým tělískem (str. 14)
- Obrázek 6: Diagram aktivity MPF a MAPK během jaderného zrání oocytu (str. 16)
- Obrázek 7: Mechanismus znovuoobnovení meiózy vyvolaného gonadotropiny (str. 17)
- Obrázek 8: Transkripční aktivita během oogeneze a rané embryogeneze (str. 20)
- Obrázek 9: Hyperfosforylace a uvolnění 4E-BP1 z vazby s eIF4E (str. 22)
- Obrázek 10: Komponenty mTOR komplexů (str. 24)
- Obrázek 11: Schéma buněčných procesů ovlivněných AKT signální kaskádou (str. 28)
- Obrázek 12: Lokalizace p-AKT při meiotickém zrání oocytů (str. 39)
- Obrázek 13: Lokalizace p-mTOR při meiotickém zrání oocytů (str. 40)
- Obrázek 14: Exprese a fosforylace isoform CaMKII v průběhu meiotického zrání (str. 41)
- Obrázek 15: Fenotyp oocytů po potlačení CaMKII (str. 44)
- Obrázek 16: Úroveň fosforylace mTOR při meiotickém zrání oocytů v KN93 (str. 45)
- Obrázek 17: Fosforylace proteinu 2 $\alpha$  při zrání oocytů v KN93 (str. 47)
- Obrázek 18: Imunocytochemické barvení proteinu p-2 $\alpha$  (str. 48)



## **11. Seznam grafů**

Graf 1: Vliv inhibitoru KN93 na rozpad jaderné membrány (str. 42)

Graf 2: Vliv inhibitoru KN93 na vydělení prvního pólového tělíska (str. 42)

Graf 3: Porovnání vlivu KN93 na jednotlivé pokusné skupiny (str. 43)

Graf 4: Statistické zhodnocení fosforylace mTOR při meiotickém zrání oocytů v KN93 (str. 46)

Graf 5: Vliv KN93 na fosforylaci proteinu eIF2 $\alpha$  (str. 47)

Graf 6: Vliv KN93 na fosforylaci proteinu 2 $\alpha$  – průměrná intenzita signálu při ICC (str. 49)