

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



**Spolupráce mitotických kináz AURKA a PLK1
v meiotickém zrání myších oocytů**

Diplomová práce

Autor práce: Bc. Štěpán Hladký

Konzultant práce: RNDr. Petr Šolc, Ph.D.

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

Čestné prohlášení

Prohlašuji, že svou diplomovou práci "Spolupráce mitotických kináz AURKA a PLK1 v meiotickém zrání myších oocytů" jsem vypracoval samostatně pod vedením 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 autor uvedené diplomové práce dále prohlašuji, že jsem v souvislosti s jejím vytvořením neporušil autorská práva třetích osob.

V Praze dne 11. dubna 2014

Poděkování

Rád bych touto cestou poděkoval prof. Mgr. Ing. Markétě Sedmíkové, Ph.D. za cenné rady a připomínky v průběhu zpracování této diplomové práce.

RNDr. Petru Šolcovi, Ph.D., vedoucímu Laboratoře integrity DNA z Ústavu živočišné fyziologie a genetiky AVČR, v.v.i. v Liběchově, za zasvěcení do problematiky a umožnění experimentální činnosti pro účely této práce.

Velké poděkování patří Mgr. Adéle Brzákové za odborné vedení a pomoc v průběhu zpracování všech experimentů, především v oblasti konfokální mikroskopie, vyhodnocení a zpracování dat. Dále za odborné konzultace nad textem této práce.

Spolupráce mitotických kináz AURKA a PLK1 v meiotickém zrání myších oocytů

AURKA and PLK1 functional cooperation during meiotic maturation of mouse oocytes

Souhrn

Kinázy AURKA (Aurora A) a PLK1 (Polo-like kináza 1) hrají v buněčném cyklu klíčovou roli ve zrání centrozomu, výstavbě dělicího vřeténka nebo segregaci chromozomů. Ačkoli je známo, že AURKA ovlivňuje aktivaci PLK1, dosavadní studie těchto kináz jsou zaměřeny především na jejich samostatné funkce. Není proto zcela jasné, do jaké míry se tyto kinázy vzájemně ovlivňují, případně zastupují a jaká je síla jejich spolupráce.

Cílem této diplomové práce bylo prostřednictvím vhodných experimentů ověřit funkce obou kináz se zaměřením na jejich spolupráci a zastupitelnost na modelu myších oocytů.

Pomocí metod zobrazování živých buněk (LCI) a akutní inaktivace kináz vhodnými inhibitory jsme ukázali, že kinázy Aurora A a PLK1 jsou důležité pro znovuzahájení meiotického zrání myších oocytů, ovlivňují proces výstavby dělicího vřeténka a jsou důležité pro progresi zrání v dalších fázích meiózy I. Inhibice AURKA, PLK1 i jejich kombinace od počátku zrání způsobuje v myších oocytech zpožděný začátek kondenzace chromozomů a rozpadu jaderné membrány, a také vede k delší době trvání těchto dvou jaderných událostí. Ve srovnání s kontrolními oocyty tvoří oocyty s inhibovanou Aurorou A nebo PLK1 menší dělicí vřeténka a v případě inhibice obou kináz je tento efekt ještě výraznější. Oocyty s inhibovanou PLK1 (samostatně nebo v kombinaci s AURKA inhibicí) navíc nikdy neseparují chromozomy a nevydělují pólové tělísko.

Kinázy AURKA a PLK1 tedy regulují postup myších oocytů prvním meiotickým dělením. Jejich inhibice vede k podobným fenotypům, což znamená, že se zřejmě srovnatelnými mechanismy podílí na stejných meiotických událostech. A jak indikuje aditivní efekt dvojité inhibice AURKA a PLK1 na výstavbu dělicího vřeténka, v některých z těchto událostí se mohou i vzájemně zastupovat.

Klíčová slova: kináza AURKA, kináza PLK1, meióza, myš, oocyt

AURKA and PLK1 functional cooperation during meiotic maturation of mouse oocytes

Summary

AURKA (Aurora A) and PLK1 (Polo-like kinase 1) play key roles in cell cycle progression – they participate in the centrosome maturation, spindle assembly or chromosome segregation. Although it is known that AURKA influences PLK1 activation, previous studies exploring functions of these two kinases have been targeted mainly on their separate functions. So it is still not clear to what extent AURKA and PLK1 cooperate or how they are mutually substitutable. Moreover, AURKA and PLK1 have been studied mainly on somatic cells.

The goal of this diploma thesis has been to explore functions of PLK1 and AURKA with focus on their cooperation on the model of mouse oocytes.

On basis of of Live Cell Imaging (LCI) experiments and acute kinase inhibition, we have shown that kinases AURKA and PLK1 are important for meiotic resumption of mouse oocytes, participate in spindle assembly and have part in subsequent meiotic progression. The inhibition of AURKA or PLK1 or the simultaneous inhibition of both kinases leads to delay in the beginning of chromosome condensation and nuclear envelope breakdown and also to prolonged duration of these two nuclear events. In Aurora A or/and PLK1 inhibited oocytes assembled spindles gain only reduced volume in comparison to untreated control group. Finally, oocytes with inhibited PLK1 (alone or in combination with AURKA inhibition) do not separate chromosomes and never extrude the first polar body.

So kinases AURKA and PLK1 regulate the propagation of meiosis I in mouse oocytes. Their inhibition causes similar phenotypes, which means that they might participate in the same meiotic events. Moreover, the additive effect of the simultaneous inhibition of AURKA and PLK1 on spindle assembly indicates that in some of the events they might even substitute each other.

Keywords: AURKA, PLK1, meiosis, mouse, oocyte

Obsah

1. Úvod	1
2. Cíl práce	1
3. Literární přehled	2
3.1 Buněčný cyklus somatických buněk a jeho regulace.....	2
3.1.1 Regulace buněčného cyklu	3
3.1.2 MPF	5
3.2. Meióza	7
3.3 Oogeneze a folikulogeneze	8
3.3.1 Fáze množení	8
3.3.2 Fáze růstu	8
3.3.3 Meiotická kompetence	10
3.3.4 Fáze zrání	11
3.4 Polo-like kinázy	14
3.4.1 Struktura polo-like kináz	15
3.4.2 Tkáňově specifická exprese savčích PLK	16
3.5. Polo-like kináza 1	17
3.5.1 PLK1 v mitóze	18
3.5.2 PLK1 v biologii nádorového bujení.....	23
3.5.3 PLK1 v meióze	24
3.6. Aurora kinázy	27
3.6.1 Struktura a lokalizace.....	27
3.7 Aurora A	28
3.7.1 AURKA v mitóze	28
3.7.2 AURKA v biologii nádorového bujení.....	34
3.7.3 AURKA v meióze.....	35
3.8. Spolupráce kináz AURKA a PLK1	38
4. Materiál a metody	40
4.1 Izolace a kultivace oocytů.....	40
4.2. Kinázové inhibitory	40
4.3 RNA.....	41
4.4 Mikroinjekce.....	41

4.5 Zobrazování živých buněk – LCI (Live Cell Imaging)	41
4.6 Editace dat.....	42
4.7 Statistické analýzy	43
5. Výsledky	44
5.1 PLK1 a AURKA hrají roli v načasování znovuzahájení meiózy	44
5.2 PLK1 a AURKA se účastní výstavby dělicího vřeténka	51
5.3 PLK1 inhibované oocyty nepodstupují anafázi	54
6. Diskuse	56
6.1 PLK1 a AURKA hrají roli v načasování znovuzahájení meiózy	56
6.2 PLK1 a AURKA se účastní výstavby dělicího vřeténka	57
6.3 PLK1 inhibované oocyty nepodstupují anafázi	58
7. Závěr	60
8. Seznam literatury	61

1. Úvod

V průběhu buněčného cyklu, během mitotického i meiotického dělení je průběh událostí pečlivě koordinován tak, aby bylo zajištěno, že obě dceřiné buňky získají veškerý genetický materiál potřebný pro další růst a vývoj. Stabilita genomu všech eukaryotických organismů závisí na bezchybné segregaci chromozomů. Objev cyklin-dependentních kináz (Cdk) jako evolučně zachovaných regulátorů buněčného cyklu začal novou éru v našem chápání buněčného cyklu. V důsledku tohoto objevu se pozornost obrátila i na jiné proteinové kinázy, které spolupracují s Cdk v řízení buněčného dělení. Klíčové události spojené s mitózou i meiózou, jako je výstavba dělicího vřeténka, segregace chromozomů a cytokineze jsou způsobeny aktivací řady dalších proteinových kináz, včetně členů rodin Aurora a Polo-like kináz.

Kinázy AURKA (Aurora A) a PLK1 (Polo-like kináza 1) hrají v buněčném cyklu klíčovou roli ve zrání centrozomu, výstavbě dělicího vřeténka nebo segregaci chromozomů. Obě serin / threoninové kinázy také přitahují značnou pozornost jako potenciální cíle v protinádorové léčbě, což vede k vytváření několika účinných a selektivních inhibitorů. Dosavadní experimenty s použitím různých genetických a biochemických modelových systémů vedou k detailnímu porozumění těmto proteinům.

2. Cíl práce

Ačkoli je známo, že AURKA ovlivňuje aktivaci PLK1, dosavadní studie těchto kináz jsou zaměřeny především na jejich samostatné funkce. Není proto zcela jasné, do jaké míry se tyto kinázy vzájemně ovlivňují, případně zastupují a jaká je síla jejich spolupráce.

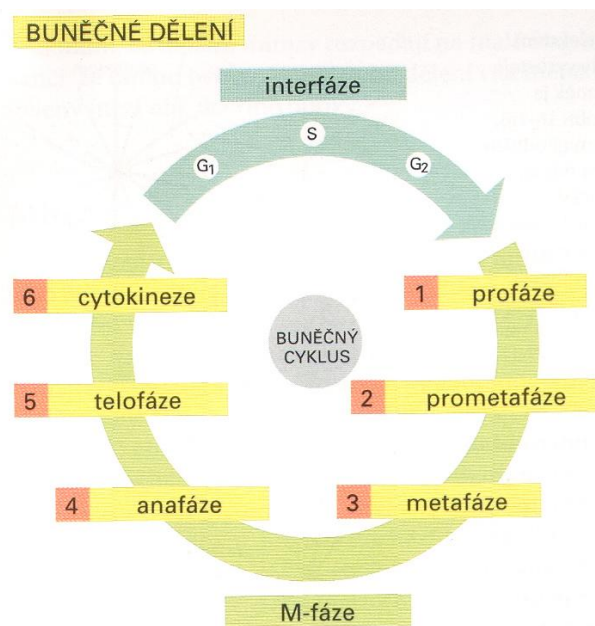
Cílem této diplomové práce bylo prostřednictvím vhodných experimentů ověřit funkce obou kináz v meiotickém zrání se zaměřením na jejich spolupráci a zastupitelnost na modelu myších oocytů.

3. Literární přehled

3.1 Buněčný cyklus somatických buněk a jeho regulace

Buněčný cyklus je proces, který slouží k rozdělení mateřské buňky na dvě buňky dceřiné se shodnou genetickou informací v procesu zvaném mitóza. Tento proces provází všechny somatické buňky. Buněčný cyklus se dělí na část interfázní (G₁, S a G₂ fáze buněčného cyklu), mitotickou (mitózu a cytokinezi) a postmitotickou (G₀ stacionární fázi buněčného cyklu). V G₁ fázi buňka roste a zvětšuje svůj objem, dochází ke kontrole a opravám DNA, zvýšené biosyntéze, buňka se zvětšuje a připravuje se na vstup do S fáze tvorbou nových nukleotidů. Název G₁ pochází s anglického gap (= mezera, pauza) nebo také growth (= růst). Poté buňka přechází do S (syntetické) fáze, ve které se replikuje jaderná DNA, dochází ke zdvojení chromozomů tvořených sesterskými chromatidami a syntetizují se specifické proteiny asociující s DNA (histony). Následná G₂ fáze, kdy buňka opět roste, předchází samotné mitóze. V G₂ fázi buněčného cyklu je syntetizováno velké množství proteinů, které jsou potřebné pro mitózu. Zdvojnásobuje se počet organel a nukleují se další mikrotubuly. V závěru této fáze se formuje svazek mikrotubulů před vlastní profází (Alberts et al., 1998; Morgan, 2007).

Rozdělení buňky na dvě buňky dceřiné se odehrává v M-fázi. M-fáze je tvořena jaderným dělením (mitóza) s následným cytoplazmatickým dělením (cytokineze) (Obr. 1)



Obrázek 1. Buněčné dělení. (Převzato z Alberts et al., 1998)

Mitóza je tradičně rozdělována do pěti stadií, z nichž každé představuje určitý stupeň rozdělení genomu:

- 1) V profázi se zreplikované chromozómy, každý sestávající ze dvou sesterských chromatid spojených v oblasti centroméry, kondenzují. Jaderný obal zůstává neporušený. Vně jádra se centrozómy, jež se zdvojily v interfázi, pohybují k opačným pólům buňky.
- 2) Prometafáze začíná rozpadem jaderného obalu. Kondenzované chromozómy se připojují svými kinetochóry (struktura umístěná v centroměře) k mikrotubulům vřeténka vybíhajícím z centrozomů.
- 3) V metafázi jsou chromozómy srovnány v ekvatoriální rovině vřeténka uprostřed mezi jeho póly. Sesterské chromatidy jsou připojeny k opačným pólům vřeténka.
- 4) V anafázi se sesterské chromatidy synchronně oddělují. Vlákna vřeténka (kinetochorové mikrotubuly) připojená k chromozómům se zkracují a dceřiné chromozómy jsou taženy k opačným pólům vřeténka. Kinetochorové mikrotubuly se zkracují a póly vřeténka se oddalují, což obojí přispívá k separaci chromozomů.
- 5) Během telofáze se obě sady dceřiných chromozomů dostanou k pólům vřeténka a dekondenzují. Tvoří se nový jaderný obal, který uzavírá každou sadu chromozomů.

Následuje cytokineze, kdy se cytoplazma rozdělí do dvou buněk kontraktálním prstencem aktinu a myozinu II, který se stáhne, a tak vytvoří dvě dceřiné buňky, každou s jedním jádrem. Hlavním problémem cytokineze je, že dělení musí nastat ve správném okamžiku (po separaci chromozomů) a na správném místě (aby bylo zajištěno, že každá dceřiná buňka dostane kompletní sadu chromozomů). Začátek cytokineze je regulován kinázami z rodiny polo. Tvorba kontraktálního prstence začíná po ztrátě aktivity M-Cdk (uvedeno níže). Po mitóze je pozice kontraktálního prstence určována pozicí mitotického vřeténka. Kontraktální prsteneček se vytváří v rovině metafázní destičky, v pravém úhlu k podélné ose mitotického vřeténka (Alberts et al., 1998; Morgan, 2007).

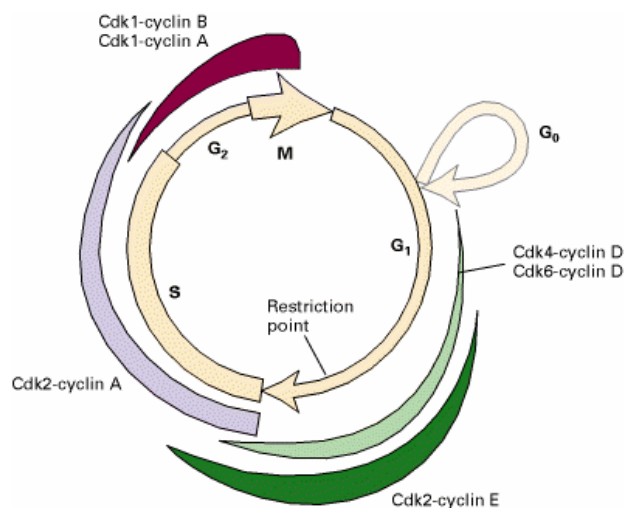
3.1.1 Regulace buněčného cyklu

Průběh buněčného cyklu je komplexně řízený a kontrolovaný různými mechanismy hlavně v tzv. kontrolních bodech; signálními molekulami ve vazbě s receptory, nebo molekulami, které jsou syntetizované v cyklující buňce (cykliny, cyklin-dependentní proteinkinázy). Tato síť musí reagovat na velikost buňky, replikaci genomu a extracelulární signály. Musí zajišťovat, že DNA je duplikována v cyklu pouze jedenkrát, a že buňka bude po

replikaci rozdělena. Buňky si vyvinuly systém regulace založený na kontrolních bodech – specifická místa buněčného cyklu, kde buňka ověřuje, zda všechny předchozí události (např. DNA replikace) proběhly správně. Pokud některý děj v předchozím kroku nebyl dokončen, buňka se v tomto kontrolním bodě zastaví. (Alberts et al., 1998; Nigg, 2001; Morgan, 2007;).

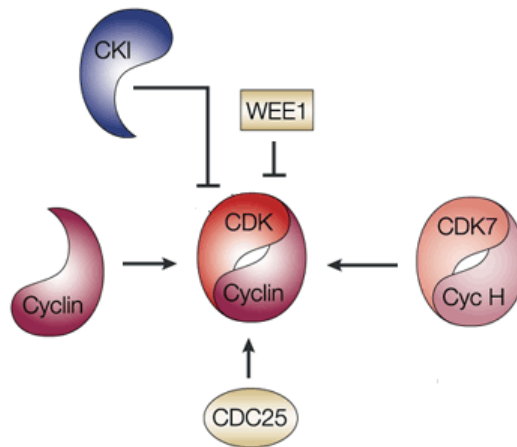
Systém regulace buněčného cyklu je založen na cyklicky aktivovaných enzymech – proteinkinázách, známých jako cyklin-dependentní kinázy (Cdk). Aktivita těchto kináz je závislá na jejich regulátorech – cyklinech, které během buněčného cyklu prodělávají cyklus syntézy a degradace. U vyšších živočichů je dosud známo 8 cyklinů, které jsou označeny písmeny A – H a 7 typů Cdk protein kináz (Cdk1 – Cdk7). V jednotlivých fázích buněčného cyklu jsou přítomné určité typy cyklinů v komplexu s určitou Cdk kinázou. Cyklické spojení nebo zrušení vazby jednotlivých typů cyklinů s Cdk molekulami a jejich následná degradace, je hlavní reakce, která umožňuje navození postupných fází buněčného cyklu (Nigg, 2001; Malumbres et Barbacid, 2005).

Jednotlivé Cdk protein kinázy vykazují odlišné funkce v závislosti na fázích buněčného cyklu. Aktivita Cdk kináz je založena na fosforylaci serinů a treoninů cílových proteinů, ale jedině pokud Cdk kinázy vytvoří komplex s příslušnými cykliny. Bez této vazby jsou Cdk molekuly inaktivní. Jak ukazuje obr. 2, pro každou fázi buněčného cyklu jsou specifické určité komplexy Cdk/cyklin (Malumbres et Barbacid, 2005; Besson et al., 2008; Lindqvist et al., 2009).



Obrázek 2. Aktivita jednotlivých komplexů Cdk/cyklin během buněčného cyklu. (Převzato z Lodish et al., 1999).

Aktivita Cdk je dále regulována Cdk aktivujícími kinázami (CAK – pozitivní regulace), Wee1 kinázou (negativní regulace) a Cdc25 fosfatázou (pozitivní regulace – odstraňuje inhibující fosfát přidaný Wee1 kinázou) (Obr. 3). Cyklin-Cdk komplexy jsou inaktivovány různými Cdk inhibičními proteiny (CKI) a degradací cyklinové podjednotky v určitém stádiu buněčného cyklu. Aktivovaný Cdk-cyklinový komplex pak fosforyluje a aktivuje cílové proteiny, které hrají klíčové úlohy v různých stádiích buněčného cyklu (Malumbres et Barbacid, 2001; Besson et al., 2008).



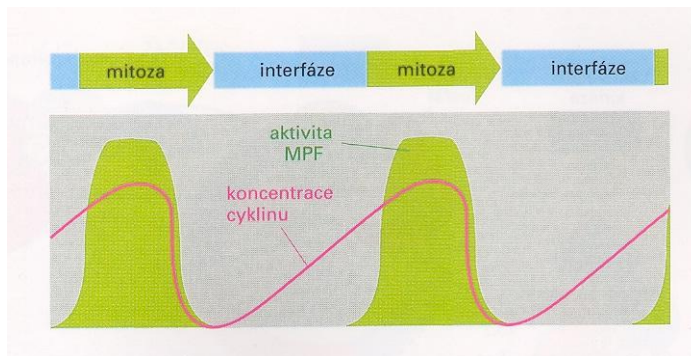
Obrázek 3. Regulace Cyklin-dependentních kináz (Převzato z Malumbres et Barbacid, 2001)

Každý cyklin se hromadí pouze v určitém stádiu buněčného cyklu a aktivuje příslušného Cdk partnera. Koncentrace každého typu cyklinu vzrůstá, a pak v určité fázi buněčného cyklu prudce klesá. Zatímco hladina Cdk se nemění, cykliny prodělávají cyklus syntéz a degradace v každém buněčném cyklu. Proteolytická degradace cyklinu probíhá ubikvitin-dependentním mechanismem. Aktivovaný enzymový komplex rozezná určité aminokyselinové sekvence na cyklinu a přidá k nim ubikvitin, čímž označí protein pro degradaci v proteazomech. Enzymový komplex SCF je zodpovědný za degradaci G1/S-cyklinů a anaphase promoting complex (APC) za odbourání M-cyklinů na konci mitózy (Nigg, 2001; Lindqvist et al., 2009).

3.1.2 MPF

MPF (M-phase-promoting factor) byl na počátku sedmdesátých let dvacátého století identifikován jako faktor nezbytný pro vstup buněk do mitózy. V následující dekádě byla pak odhalena jeho struktura, která byla charakterizována jako komplex cyklinu B a Cdk 1. Pro aktivaci Cdk1 je nezbytná vazba cyklinu B, ten je syntetizován od S-fáze a vrcholu dosahuje

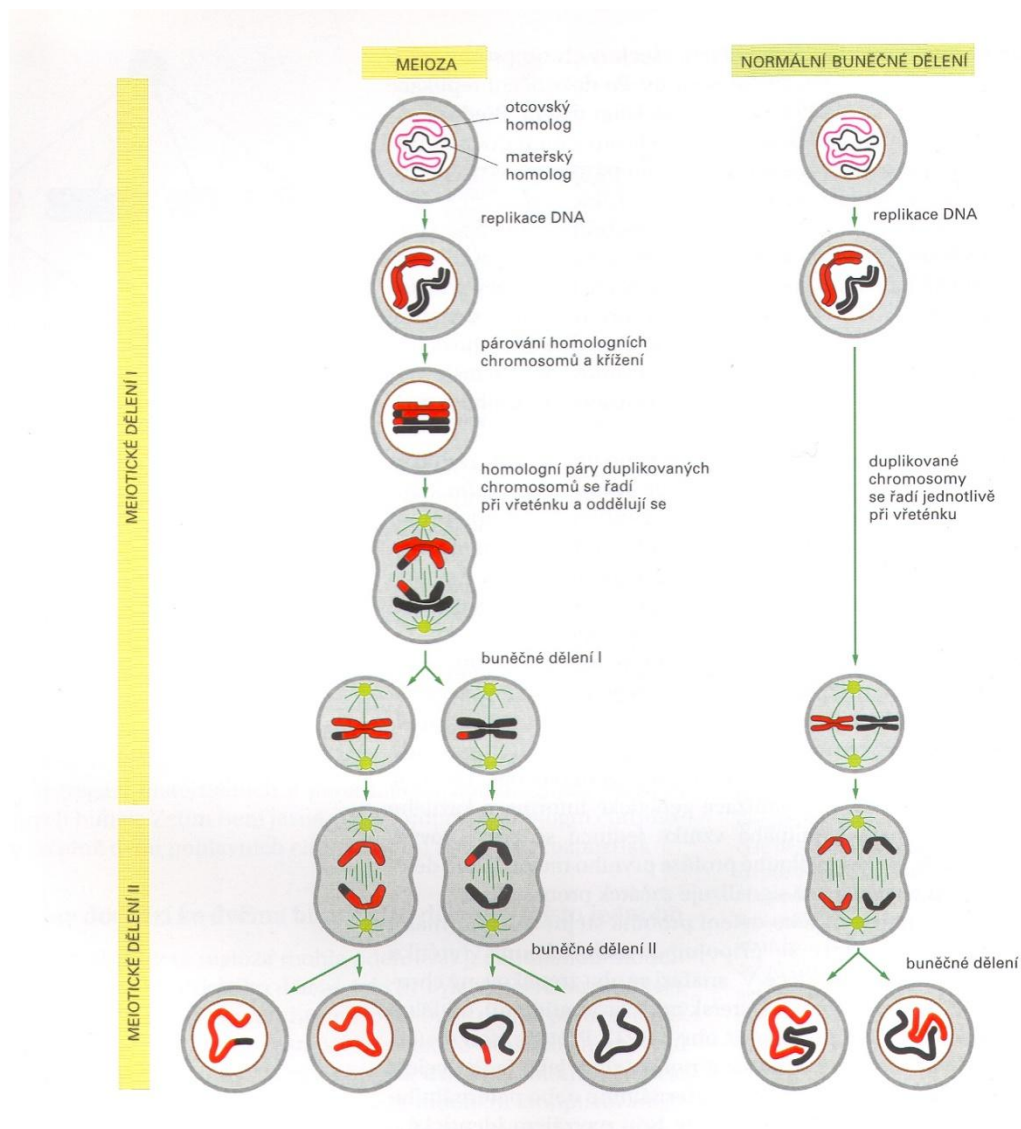
na konci G2-fáze téhož cyklu, kdy jeho hladina dosahuje kritické hodnoty nutné pro aktivaci Cdk1. Samotná vazba cyklinu B ale ještě není dostačující pro aktivaci Cdk1, ta je během G2 blokována přetrvávající fosforylací dvou aminokyselinových zbytků (T14 a Y15), za což jsou zodpovědné Wee1/Myt1 kinázy. Proti nim působí Cdc25 fosfatázy (Cdc25A, Cdc25B, Cdc25C) odstraňující inhibiční fosforylaci, jejichž vliv na počátku M-fáze převáží. Zásadní pro aktivaci MPF je také fosforylace T161 v T-aktivační smyčce kinázy zajišťovaná Cdk-aktivující kinázou (CAK) (Nigg, 2001; Lindqvist et al., 2009).



Obrázek 4: Nárůst a pokles aktivity MPF a koncentrace cyklinu během buněčného cyklu. Zatímco aktivita MPF roste a klesá během každé mitózy, koncentrace cyklinu se pozvolna zvyšuje během interfáze, vrcholí v mitóze a rychle klesá na konci mitózy. Koncentrace MPF se během buněčného cyklu nemění, mění se pouze její aktivita (Převzato z Alberts et al., 1998).

3.2. Meióza

Meiόza (zrací dělení) je proces redukčního dělení buňky, který probíhá ve dvou po sobě následujících děleních a jehož výsledkem jsou, na rozdíl od buněk somatických, buňky s haploidním počtem chromozomů (Obr. 5). Meiotickým dělením vznikají pohlavní buňky (gamety). Význam meiόzy spočívá v náhodném rozdělení otcovských a mateřských chromozomů do pohlavních buněk, a tím umožněné genetické variabilitě. Ta je zvýšená mechanismem crossing-overu (Alberts et al., 1998).



Obrázek 5. Porovnání meiόzy a mitózy. (Převzato z Alberts et al., 1998)

Redukční dělení pohlavních buněk můžeme stejně jako dělení somatických buněk (mitózu) rozdělit do několika fází, které jsou podrobněji popsány v následujících kapitolách.

3.3 Oogeneze a folikulogeneze

Vývoj samičích zárodečných buněk (oocytů) začíná již během fetálního vývoje samice v procesu zvaném oogeneze a ukončen je až na konci její pohlavní aktivity. Proces oogeneze zahrnuje tři fáze – množení zárodečných buněk, jejich růst a zrání (Bukovsky et al., 2005; Palma et al., 2012).

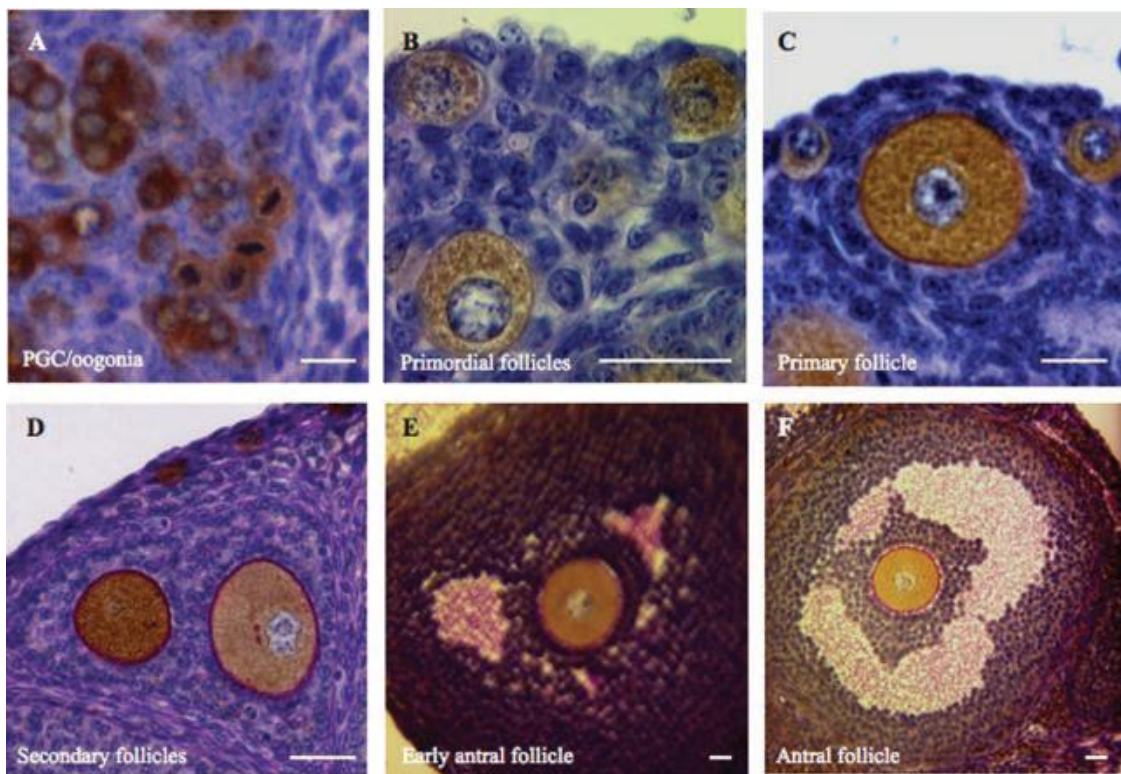
3.3.1 Fáze množení

Oocyty pocházejí z malého počtu kmenových buněk – primordiálních zárodečných buněk (Primordial Germ Cells – PGC), které se během embryonálního vývoje mitoticky množí a mění se na oogonie (Obr. 6). Oogonie následně prochází několika cykly mitotického dělení a posléze vstupují do stádia preleptotene – profáze prvního meiotického dělení a stávají se z nich primární oocyty. Profáze prvního meiotického dělení se člení na několik stádií: leptotene, zygotene, pachytene a diplotenní stádium. Vlastní dělení je zahájeno vstupem do stádia leptotene, kdy chromozómy v jádře částečně kondenzují a stávají se mikroskopicky patrné. Ve druhém stádiu, zygotene, se párují homologní chromozómy do bivalentů. Propojení laterálně i transverzálně je označováno jako synaptonemální komplex, který zipovým způsobem spojuje oba homology. V dalším období první meiotické profáze, pachytene, se homologní chromozómy zkracují a tloustnou a jsou zřetelně rozděleny na dvě sesterské chromatidy, vzniká tak čtveřice spojených chromatid – tetráda (složená ze dvou k sobě přiložených homologních chromozómů – bivalentů). Nesesterské chromatidy spárovaných chromozómů se překřížují (crossing-over) a nastává výměna nesesterských chromatid mezi homologními chromozómy v bivalentech (rekombinace). V následujícím diplotenním stádiu profáze se chromatidy díky rozpouštění synaptického komplexu začínají od sebe oddělovat, jsou však ještě k sobě poutány v místech, kde došlo k překřížení a zapletení nesesterských chromatid, tzv. chiazmatech. Ve fázi diplotene, dochází k zastavení prvního meiotického dělení až do hormonální iniciace dalšího zrání v době pohlavní dospělosti (Eppig, 2001; Fair, 2003).

3.3.2 Fáze růstu

V diplotenním stádiu, kdy je dočasně zabržděno meiotické zrání, se oocyty obalují jednou vrstvou plochých pre-granulózních buněk, a vzniká tak klidový primordiální folikul

(Obr. 6). Po dosažení pohlavní dospělosti vždy určitá skupina primordiálních folikulů vstupuje do růstové fáze. Primordiální folikul se mění na primární folikul, který je složen z oocytu a jedné vrstvy kubických folikulárních buněk, jež vznikly postupnou přeměnou původních plochých buněk (Palma et al., 2012). V této fázi se zahajuje intenzivní růst oocytu. Kubické folikulární buňky označované jako granulózní ovlivňují expresi proteinů na úrovni transkripce i translace a bez jejich přítomnosti nejsou oocyty schopné růst. (Vanderhyden, 2002). V okamžiku, kdy je oocyt obklopen více než jednou vrstvou granulózních buněk, se folikul označuje jako sekundární folikul. Až do vytvoření sekundárního folikulu není tento proces závislý na přítomnosti FSH, ale další vývoj už na FSH závislý je a dochází k němu tedy až ve chvíli, kdy je organismus schopen si dostatečnou hladinu hormonu vytvořit. Vlivem FSH konvertují granulózní buňky androgeny na estrogény, které vyvolávají růst a dělení granulózních buněk. Vytváří se dutinka nazývaná *antrum folliculi*, která se začíná plnit folikulární tekutinou a formuje se antrální folikul, někdy také označovaný jako terciální nebo Graafův folikul. (Rodrigues et al., 2008; Skinner, 2005). Buňky v terciálním folikulu se dají rozlišit na dva typy: buňky bezprostředně obklopující oocyt jsou buňky kumulární a vnější granulózní buňky lemující stěnu antrálního folikulu theca folliculi se pak nazývají murální granulózní buňky. (Eppig, 2001; Rodrigues et al., 2008). Kumulární buňky jsou citlivé na LH a uvolňují různé substance, jež kontrolují jaderné a cytoplazmatické zrání oocytu. Kumulární buňky, které po zvýšení hladiny hormonu LH expandují, zůstávají s oocytem asociovány i po následné ovulaci až do doby oplození. Tyto buňky tvoří tzv. cumulus (Eppig, 2001; Fair, 2003).



Obrázek 6. Vývoj folikulu a růst oocyty z oogonie (A) přes primordiální folikul (B), primární folikul (C), sekundární folikul (D), raný antrální folikul (E) až po antrální folikul (F). Měřítka na obrázku 20 μm . (Převzato z Rodrigues et al., 2008)

3.3.3 Meiotická kompetence

Na začátku růstové fáze, před vznikem antrální dutiny, nejsou oocyty schopné znovuzahájit zrání a jsou označovány jako meioticky nekompetentní. Později v dalších fázích růstu jsou sice schopny zrání zahájit, nikoli však dokončit, jsou částečně meioticky kompetentní. Teprve oocyty s ukončeným růstem mají plně vyvinutou meiotickou kompetenci a jsou schopny dosáhnout stádia druhé meiotické metafáze (Motlík et al., 1984; Motlík and Fulka, 1986).

Meiotická kompetence se tedy vyvíjí postupně, zvyšuje se s velikostí oocyty, u prepubertálních zvířat s věkem. Schopnost dokončit jaderné zrání se objevuje u oocyty v době, kdy dosáhne přibližně finální velikost. U hlodavců se objevuje v době tvorby antra, u ostatních dosud studovaných druhů v časných antrálních folikulech. Oocyty prasat izolované z antrálních folikulů o průměru 1 – 1,5 mm mají schopnost zahájit jaderné zrání, což se projevuje rozpadem zárodečného váčku - jaderné membrány (GVBD, germinal vesical breakdown) a většina z nich dosáhne stádia metafáze I. Nejsou však schopny vstoupit do

druhého meiotického dělení a dosáhnout metafáze II. Teprve plně dorostlé prasečí oocyty o velikosti 120 μm , z folikulů o průměru 2 mm jsou již zcela meioticky kompetentní, což znamená, že jsou schopny po znovuzahájení meiózy dosáhnout až metafáze II, kdy jsou následně oplozeny a jako zygota vstupují do raného embryonálního vývoje (Motlík et al., 1984; Fair, 2003). Podobné výsledky byly získány i pro oocyty skotu a králíků (Motlík and Fulka, 1986).

U myši má meioticky kompetentní oocyt velikost 75 μm (Eppig, 2001). Nástup meiotické kompetence koreluje s formováním kompaktního jádérka. V době tvorby antra u prasete (fol. 0,5 mm), krátce před kompaktizací nukleolu, má oocyt velmi omezenou schopnost znovuzahájení meiózy a není schopen ji dokončit, má jen částečnou meiotickou kompetenci (schopnost GVBD). Oocyty s plně kompaktním nukleolem z 50% dosáhnou metafáze II (Motlík et al., 1984).

Z výše uvedeného tedy jasně vyplývá, že získání vývojové kompetence je postupný proces, který probíhá během vývoje a růstu oocyty v rostoucím folikulu. Znovuzahájení meiózy meioticky kompetentních oocytů je až do doby preovulačního zvýšení LH inhibováno folikulárním prostředím.

3.3.4 Fáze zrání

Meiotické zrání umožňuje přeměnu nezralých oocytů v antrálních folikulech v oocyty zralé, oplození schopné. Plně narostlé meioticky kompetentní oocyty jsou ve folikulu drženy v profázi I ve stádiu pozdní diplotene, dokud nedojde pod vlivem hormonálního stimulu k znovuzahájení meiózy a následně ovulaci (Palma et al., 2012).

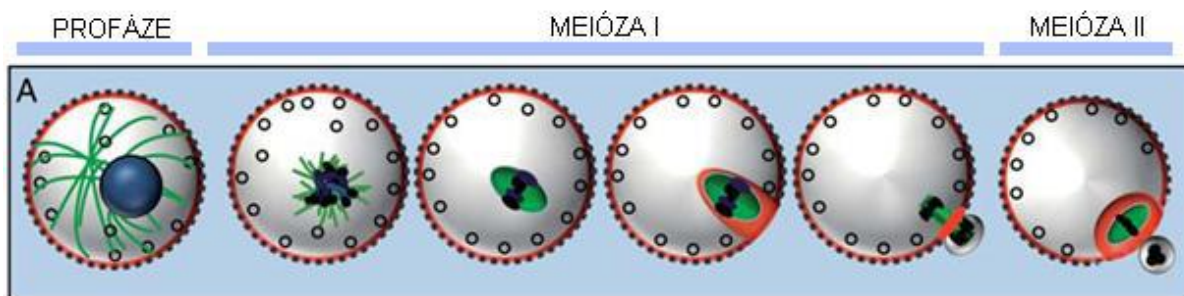
Proces meiotické maturace tedy zahrnuje znovuzahájení meiózy, charakteristické rozpadem jaderné membrány (GVBD), dosažení metafáze I, přechod z metafáze I do metafáze II, kdy dojde k vydělení 1. pólového tělíska. Druhé pólové tělísko se vydělí až po úspěšném oplození. Za zralý je možné považovat oocyt s prvním pólovým tělískem, který je zastaven ve druhé meiotické fázi (Kishimoto, 2003).

Signál pro vstup do fází meiotického cyklu spouští celou řadu dějů, především zvýšení hladin hypofyzárních hormonů FSH a LH, při kterých dochází k morfologickým i biochemickým změnám oocytů. U všech živočišných druhů je k znovuzahájení meiózy nutná aktivace CDK1/cyklin B komplexu, který byl historicky označen jako MPF (M-phase promoting factor). Prvním viditelným znakem tohoto procesu je rozpad jaderné membrány, tzv. GVBD (germinal vesicle breakdown). Rozpad jaderné membrány probíhá, stejně jako u

somatických buněk, ve dvou krocích a je v něm zapojena celá řada proteinů včetně komplexu Cdk1/cyklinB. Nejdříve se začnou uvolňovat periferní nukleoporiny z jaderných pórů, čímž se zvyšuje jejich permeabilita, následuje fosforylace a rozpad laminů, a tím i definitivní rozpad jaderné membrány (Lenart et al., 2003).

Souběžně s GVBD a kondenzací chromozómů se objevují centroméry spojené s mikrotubuly. Kinetochor je spojen s každou chromatidou všech homologních chromozómů a spolu s mikrotubuly probíhajícími od pólu k pólu tvoří dělicí vřetenko (Brunet et al., 1999). Na rozdíl od většiny somatických buněk, chybí na obou vrcholech dělicího vřetenka oocyty centrioly, tím pádem tedy i centrosomy a v oocytech tak roli centrozómů obvykle nahrazují mikrotubuly organizující centra (MTOC). Absence centrozómů v samičí meióze byla zjištěna u řady druhů včetně myši nebo člověka (Szollosi et al., 1972). Při mitóze je připojení chromosomů k mikrotubulům pod kontrolou kinetochorů. K nim se připojí mikrotubuly (K-mikrotubuly), které se spojí s opačnými póly dělicího vřetenka, a když je toho dosaženo, chromosom se ustálí v ekvatoriální rovině. V myších oocytech ale přichází ke slovu poněkud odlišný mechanismus. Jelikož kinetochory tu nejsou po většinu M I aktivní, ujímají se úkolu dopravit chromosomální bivalenty do středu dělicího vřetenka mikrotubuly vřetenka, které interagují přímo s raménky chromosomů a pomocí mikrotubulárních asociovaných motorů je stabilizují v ekvatoriální rovině. Ke kontaktu kinetochorů a mikrotubulů dochází až na konci první meiotické metafáze, což umožní konečné ustálení chromosomů ve středu ekvatoriální roviny (Brunet et al., 1999).

Následuje anafáze I, kdy se podélně štěpí centroméry, ale k pólům vřetenka se rozcházejí z ekvatoriální roviny jednotlivé dvouchromatidové chromozómy z bivalentů. Redukuje se chromozómová sada z diploidní na haploidní (Eppig, 1991). V telofázi I jsou oddělené sady chromozómů v každém pólu vřetenka a v ekvatoriální oblasti se vytvoří tzv. midbody, což je masa bazofilních granulí. Následuje vydělení pólového tělíska, které obsahuje polovinu chromozómů z původní genetické výbavy (Bukovsky et al., 2005). Po vydělení prvního pólového tělíska se v oocytu rychle vytvoří nové vřetenko složené z krátkých mikrotubulů těsně nahloučených okolo zkondenzovaných chromosomů. Oproti prvnímu vřetenku je výrazně užší, plazmatická membrána v jeho blízkosti je hladká, zatímco ostatní povrch oocyty je zřasený (Kubiak et al., 1992). Oocyt se nachází v metafázi II.



Obrázek 7. Schéma událostí probíhajících v meióze: rozpad jaderné membrány a formování dělicího vřeténka, jeho migrace ke kortexu oocytu, vydělení prvního pólového tělíska a vytvoření MII-dělicího vřeténka pod plasmatickou membránou. (Převzato z Brunet et Verlhac, 2011)

Výrazné změny se projevují také v uspořádání kumulárního obalu oocytu. Buňky odpovídají na LH signál produkcí značného množství kyseliny hyaluronové, čímž se prostory mezi kumulárními buňkami začínají zvětšovat, jsou vyplněny muciózní hmotou, dochází k tzv. expanzi kumulu (Bukovsky et al., 2005).

Meiotické zrání většiny savčích oocytů je spontánně zastaveno ve stádiu metafáze II (Obr. 7). V této fázi jsou oocyty obalené expandovaným kumulem a při ovulaci opouštějí folikul. Meióza II je dokončena pouze po oplodnění (fertilizaci). Až po fertilizaci je druhé meiotické dělení ukončeno, vznikne oocyt s vyděleným druhým polárním tělískem. Chromosomy vajíčka a spermie vytvoří prvojádra obalená jadernou membránou. Prvojádra fúzí a vznikne diploidní zygota. Chromosomy zygoty se replikují a zygota se následně mitoticky rozdělí na dvě dceřiné buňky. Tím je zahájen embryonální vývoj (Eppig, 2001; Rodrigues et al., 2008).

3.4 Polo-like kinázy










Stabilita genomu všech eukaryotických organismů závisí na bezchybné segregaci chromozomů při mitotickém a meiotickém dělení buňky. Objev cyklin-dependentních kináz (Cdk) jako evolučně zachovaných regulátorů buněčného cyklu začal novou éru v našem chápání buněčného cyklu. V důsledku tohoto objevu se pozornost obrátila i na jiné proteinové kinázy, které spolupracují s Cdk v řízení buněčného dělení. Prominentní mezi těmito enzymy jsou Polo-like kinázy (Barr et al., 2004).

Polo-like kinázy (PLK) tvoří skupinu strukturně příbuzných serin-treoninových kináz, které se nacházejí v buňkách všech eukaryotních organismů s výjimkou rostlin a výtrusovců - *Apicomplexa* (De Carcer et al., 2011). Tyto kinázy byly poprvé popsány v roce 1988 u klasického modelového organismu genetického výzkumu *Drosophila melanogaster*, přesněji v mutaci polo, podle které byla celá skupina pojmenována (Sunkel et Glover, 1988). Mutanti v lokusu pro polo vykazovali problémy v buněčném dělení a disponovali obvykle jen abnormálními dělicími vřeténky. Následně byly PLK nalezeny u mnoha eukaryotních organismů (Tab. 1) a bylo prokázáno, že mají hlavní úlohu při vstupu do mitózy, při formování mikrotubulárního aparátu dělicího vřeténka, chromozomové segregaci a cytokinezi (Glover et al., 1998; Barr et al., 2004).

Organismus	PLK	Hlavní funkce
SAVCI	PLK1	mnoho rolí při mitóze a cytokinezi
	PLK2 (Snk)	reakce při DNA poškození, regulace přechodu mezi G1 a S fází
	PLK3 (Fnk, Prk)	reakce při DNA poškození, regulace přechodu mezi G1 a S fází
	Sak (PLK4)	dokončení mitózy
<i>Xenopus laevis</i>	Plx1	role při mitotickém vstupu a výstupu
	Plx2	nebyly zjištěny žádné specifické funkce
	Plx3	nebyly zjištěny žádné specifické funkce
<i>Drosophila melanogaster</i>	Polo	regulace mitózy a cytokineze
<i>Caenorhabditis elegans</i>	Plc1, Plc2, Plc3	nutné pro rozpad jádra
<i>Schizosaccharomyces pombe</i>	Plo1p	regulace mitózy a cytokineze
<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	Cdc5	regulace mitózy a cytokineze

Tabulka 1. Polo-like kinázy u jednotlivých živočišných druhů a jejich funkce (Převzato z Barr et al., 2004).

Rodina polo-like kináz nejdříve zahrnovala protein Cdc5 u pivovarské kvasinky *Saccharomyces cerevisiae*, Plo1 u *Schizosaccharomyces pombe* a původní Polo detekovaná u octomilky (*Drosophila melanogaster*) (Obr. 8). Ale později bylo zjištěno, že zatímco organismy jako kvasinka či octomilka mají jen jednu Polo kinázu, buňky hlístice (*Caenorhabditis elegans*) disponují třemi Polo kinázami (Plc1, Plc2 a Plc3), a stejně tak u drápatky (*Xenopus laevis*) jsou popsány Plx1, Plx2 a Plx3 (Glover et al., 1998; Barr et al., 2004). U savců byl první analogický protein objeven až na začátku 90. let, nejprve u myši. Tento enzym byl identifikován jako kináza objevující se při diferenciaci a v průběhu buněčného cyklu hematopoetických progenitorových buněk a byl nazván PLK. Sekvenčně i funkčně příbuzná kináza byla později nalezena i u člověka. Dnes je u savců známo 5 proteinů jednoduše označených PLK1 – PLK5, které patří do jedné rodiny Polo kináz. Tyto kinázy jsou také sekvenčně vysoce homologní (Glover et al., 1998; Winkles et Alberts, 2005; De Carcer et al., 2011).

	KVASINKY		ROSTLINY	BEZOBRATLÍ			OBRATLOVCI			
										
	<i>S. pombe</i>	<i>S. cerevisiae</i>	<i>A. thaliana</i>	<i>C. elegans</i>	<i>Drosophila</i>	<i>S. purpuratus</i>	<i>D. rerio</i>	<i>Xenopus</i>	<i>H. sapiens</i>	
Podskupiny	PLK1	plo1	Cdc5	-	plk-1 plk-2 plk-3	polo	PLK1	plk1	Plx1	PLK1
	PLK2	-	-	-	-	-	PLK2	plk2b plk3	Plx2 Plx3 Plx5	PLK2 PLK3 PLK5
	SAK	-	-	-	zyg-1	sak	SAK	plk4	Plx4	PLK4

Obrázek 8. Polo-like kinázy u různých taxonů. (Převzato z De Carcer et al., 2011).

3.4.1 Struktura polo-like kináz

Hlavní charakteristikou všech Polo kináz je přítomnost fylogeneticky velmi konzervativní aminokyselinové sekvence na C-terminálním konci molekuly, která obsahuje přibližně 30 aminokyselinových zbytků a je nazvána polo-box doména (PBD) (Lee et al., 1998). Polo-box doména určuje lokalizaci kinázy, a tím zajišťuje i její správnou funkci a zvyšuje účinnost katalytické domény. Většina Polo kináz disponuje dvěma polo-boxy, s výjimkou PLK4 (Sak), která obsahuje pouze jeden polo-box, který však má stejnou funkci jako polo-boxy ostatních Polo kináz. Aby se PBD vážala na určený substrát, vyžaduje tzv.

„priming fosforylaci“ (pThr/pSer), čili předchozí fosforylaci příslušných aminokyselinových zbytků na cílové molekule (Elia et al., 2003).

Přestože funkce Polo kináz nejsou ještě zdaleka osvětleny, je třeba pohlížet na každého člena rodiny Polo kináz samostatně. Každá Polo kináza má svoji specifickou funkci, i když exprese mRNA a vlastního proteinu jednotlivých kináz se v průběhu buněčného cyklu velmi často překrývají (Petronczki et al., 2008).

3.4.2 Tkáňově specifická exprese savčích PLK

Savčí Polo-like kinázy mají odlišnou, tkáňově specifickou expresi (Winkles et Alberts, 2005). Lidská PLK1 a PLK4 jsou vysoce exprimovány ve všech embryonálních tkáních, které vykazují vysokou míru proliferace, a také u dospělých jedinců jsou převážně v proliferčních tkáních, jako jsou např. varlata a kostní dřev. Přítomnost PLK1 nebyla zjištěna v jiných tkáních, jako jsou játra, ledviny, mozek či plíce, což znamená, že PLK1 je hlavním tahounem buněčné proliferace (De Carcer et al., 2011). Exprese PLK4 mRNA byla zjištěna pouze v několika málo tkáních, a sice na nejvyšší úrovni ve varlatech, na střední úrovni ve slezině a brzlíku. Stejně jako u PLK1, nebyla exprese zjištěna v mozku, srdci, ledvinách, játrech, nebo ve vaječnicích (Winkles et Alberts, 2005).

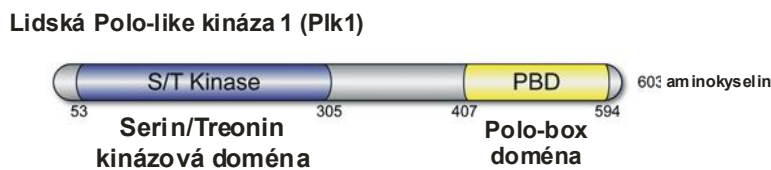
Naproti tomu jsou PLK2 a PLK3 široce rozšířeny v různých proliferčních i neproliferčních tkáních. Přítomnost PLK2 byla detekována v mozku, srdci a plicích, ale ne v brzlíku, slezině, játrech, ledvinách, střevech, varlatech, prsní žláze, děloze, průdušnici (Simmons et al., 1992). Dále je PLK2 vysoce exprimována v centrálním nervovém systému a je zapojena do synaptické homeostázy a diferenciace neuronů. PLK2 je nejvíce exprimována v mozkové kůře, hippocampu a bazálních gangliích, ale překvapivě není skoro žádná exprese v mozečku. Exprese PLK3 mRNA probíhá na relativně nízké úrovni ve většině typů tkání dospělých savců, vysoké hladiny byly zjištěny pouze v kůži, plicích a mozku. V lidských tkáních byla nalezena relativně vysoká úroveň exprese PLK3 mRNA v placentě, vaječnicích a plicích (Li et al., 1996).

Exprese PLK5 byla zjištěna pouze v několika málo neproliferčních tkáních. PLK5 je vysoce exprimována v centrálním nervovém systému, a to především v mozku, kortikálních neuronech, gliových buňkách a v granulární vrstvě mozečku. Je zajímavé, že kinázy PLK2 a PLK3, další polo-like kinázy, které plní neuronální funkci, v mozečku téměř chybí. To naznačuje, že PLK5 přebírá v mozečku roli PLK2. Dále byla zjištěna přítomnost PLK5 ve

vysoce diferencovaných tkáních, jako jsou například serózní buňky průdušnice, distální a proximální tubuly v ledvinách a tubuly semenné žlázy (De Carcer et al., 2011).

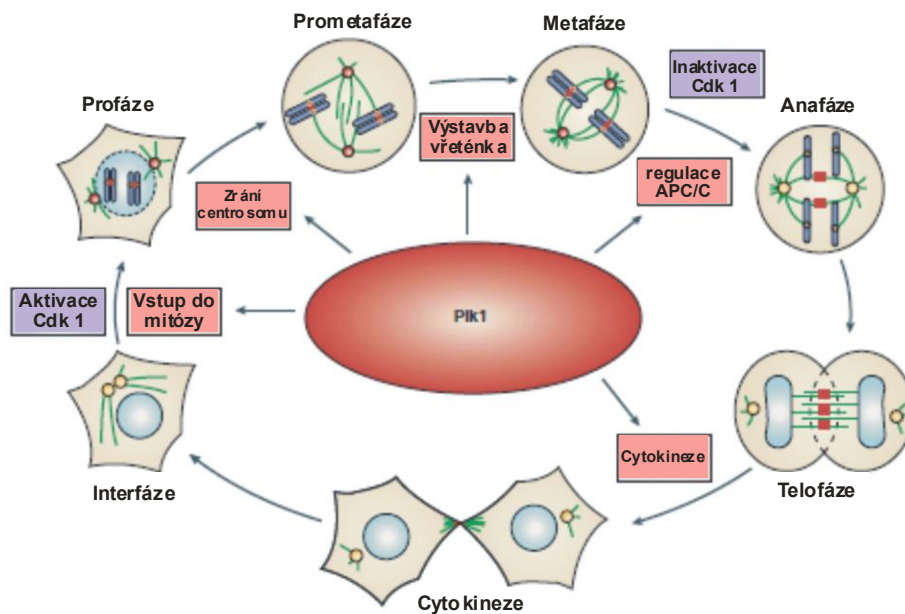
3.5. Polo-like kináza 1

Nejvíce prostudovanou kinázou z rodiny PLK je bezesporu PLK1 (Obr. 9) jako důležitý regulátor buněčného cyklu, který má hned několik fyziologických funkcí. (Barr et al., 2004; Petronczki et al., 2008).



Obrázek 9. Struktura lidské PLK1, čísla vymezují domény v odpovídajících pozicích aminokyselin (Převzato z Petronczki et al., 2008).

PLK1 se podílí na aktivaci komplexu Cdk-1-cyklin B, která je podmínkou vstupu buňky do mitózy i meiózy a ovlivňuje jejich průběh. Způsobuje maturaci centrosomu a přispívá k formaci a stabilizaci bipolárního vřeténka. Dále uvolňuje kohezin z chromosomálního raménka, umožňuje exit z mitózy a cytokinezi formací aktinu. Souhrnně lze tedy označit PLK1 jako regulátor přechodu buněk z G2 do M - fáze. Nejpozoruhodnějším rysem PLK1 je její měnící se lokalizace do různých subcelulárních struktur během mitotické progresy. Nejprve se v profázi PLK1 objeví na centrosomech, v prometáfázi a metafázi se váže na kinetochory. Později během anafáze se pak koncentruje na pólech dělicího vřeténka a v telofázi je v ekvatoriální oblasti, kde obohacuje tzv. midbody (Obr. 10) (Barr et al., 2004; Winkles et Alberts, 2005; Petronczki et al., 2008).



Obrázek 10. Funkce a lokalizace PLK1 během buněčného cyklu (Převzato z Barr et al., 2004).

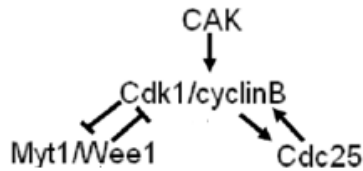
Podíváme-li se na expresi PLK1 v průběhu buněčného cyklu, mRNA transkript pro PLK1 můžeme detekovat v S-fázi, maximální hladina se objevuje v G2/M přechodu, je udržována během M-fáze a v G1 fázi zcela mizí (Petronczki et al., 2008).

3.5.1 PLK1 v mitóze

3.5.1.1 PLK1 při vstupu do mitózy

PLK1 se podílí na aktivaci řady molekul se zásadním významem pro úspěšný vstup buňky do mitózy. Každá fáze buněčného cyklu je primárně řízena cyklin-dependentními kinázami (Cdk) a jejich regulátory – cykliny. Hlavní kinázou, která řídí průběh M-fáze při mitóze, nebo meióze je Cdk1. Jak už bylo popsáno, tak pro aktivaci Cdk1 je nezbytná vazba cyklinu B, ten je syntetizován od S-fáze a vrcholu dosahuje na konci G2-fáze téhož cyklu, kdy jeho hladina dosahuje kritické hodnoty nutné pro aktivaci Cdk1. Samotná vazba cyklinu B ale ještě není dostačující pro aktivaci Cdk1, ta je během G2 blokována přetrvávající fosforylací dvou aminokyselinových zbytků (T14 a Y15), za což jsou zodpovědné kinázy Wee1 a Myt1. Proti nim působí Cdc25 fosfatázy odstraňující inhibiční fosforylacii, jejichž vliv na počátku M-fáze převáží. Činnost CAK (Cdk-aktivující kináza) zůstává konstantní

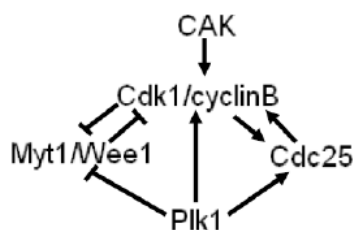
v průběhu celého buněčného cyklu, a ačkoli je její aktivita potřebná pro aktivaci Cdk1, nemá regulační funkci. Naproti tomu, buněčný cyklus je přímo závislý na činnosti kináz Myt1, Wee1 a fosfatáz Cdc25. Ty jsou totiž přímo odpovědné za regulaci Cdk1 aktivity (Nigg, 2001; Lindqvist et al., 2009).



Obrázek 11. Zjednodušené schéma aktivace Cdk1 při vstupu do mitózy.

PLK1 se podílí na primární aktivaci Cdk1 tím, že fosforyluje mnoho z jeho raných regulátorů. PLK1 také fosforyluje cyklin B, z čehož se usuzovalo, že právě to umožní jeho přemístění z cytoplasmy do jádra a dovolí tak aktivaci Cdk1, tedy MPF. Pozdější studie ale jakoukoli roli PLK1 v řízení přesunu cyklinu B do jádra zpochybnily, jelikož ani overexprese PLK1 (Jackman et al., 2003), ani inhibice kinázy BI2536 inhibiátorem (Lenart et al., 2007), nebrání translokaci cyklinu B do jádra. Zdá se však, že fosforylace cyklinu B PLK1 přispívá ke vstupu do mitózy tím, že aktivuje Cdk1 na centrozomech (Jackman et al., 2003). PLK1 rovněž přispívá k degradaci kinázy Wee1, což je kináza přímo inhibující Cdk1. Během mitózy je Wee1 nejprve fosforylována právě svým substrátem Cdk1 a až následně PLK1, které tak vytvoří tzv. phosphodegron, na který se váže F-box protein β -TrCP – součást SCF E3 ubiquitin ligázy, a nasměruje tím Wee1 k degradaci v proteasomu (Watanabe et al., 2005). Také Myt1 kinázy mohou být fosforylovány PLK1, ale fyziologická úloha této fosforylace zatím není příliš známa (Nakajima et al., 2003).

Taktéž fosforylace Cdc25B a Cdc25C fosfatáz je závislá na PLK1. V případě Cdc25B je to přesun do jádra, který indukuje fosforylace PLK1 (Obr. 12) (Lobjois et al., 2009).



Obrázek 12. Role PLK1 při aktivaci Cdk1 při vstupu do mitózy.

Přes všechny tyto regulační role PLK1 na aktivaci Cdk1, nebrání její inhibice vstupu buňky do mitózy. (Lenart et al., 2007; Santamaria et al., 2007; Steegmaier et al., 2007; Van Horn et al., 2010). I když tedy není PLK1 v buněčném cyklu nutná pro vstup do mitózy, je nepostradatelná pro kontrolní bod v G2 fázi, kdy dochází ke kontrole genomu a jeho postreplikačním opravám. Buňky po poškození DNA nejsou schopny vstoupit do mitózy bez funkční PLK1. (Macůrek et al., 2008; van Vugt et al., 2010).

3.5.1.2 PLK1 na centrozomech a při výstavbě dělicího vřeténka

Centrozom je specializované organizační centrum, které v buňce kontroluje počet mikrotubulů, jejich umístění a orientaci v cytoplasmě. Centrozomy obsahují stovky prsténčitých útvarů, tvořených jedním typem tubulinů, zvaný γ -tubulin. Každý z γ -tubulinových prstenců slouží jako počáteční bod, neboli nukleační místo, odkud vyrůstá jeden mikrotubulus. Pokud buňka vstupuje do mitózy, cytoplasmatické mikrotubuly se rozpadají a vytváří dělicí vřeténko. Ke konci S-fáze buňka svůj centrozom duplikuje a vznikají dva dceřiné centrozomy. Na začátku profáze se od sebe oba centrozomy oddělují a pohybují se k opačným pólům buňky (Alberts et al., 1998).

První fenotyp popsáný v souvislosti s PLK1 v buněčném cyklu byl charakterizován přítomností abnormálního a především monopolárního dělicího vřeténka (Sunkel et Glover, 1988). Zdálo se tedy, že PLK1 musí hrát nějakou roli v cyklu centrozomu nebo v procesu výstavby dělicího vřeténka. PLK1 se váže na centrozomy v pozdní G2 a rané M-fázi a tady podněcuje rozpojení centriol, které se koná v pozdní M-fázi. (Tsou et al., 2009). Dělicí vřeténka v buňkách s depletovanou PLK1 nejsou asociována s centrozomy a tvoří monopolární vřeténka, která navíc nedisponují astrálními mikrotubuly. Stejně tak přidání inhibitoru BI2536 k buňkám, kde už je normální dělicí vřeténko vytvořeno, vedlo k jeho rozpadu (Sumara et al, 2004; Lenart et al., 2007). Jedním z možných vysvětlení selhání výstavby bipolárního dělicího vřeténka a vytvoření monopolárního pravděpodobně spočívá v neschopnosti centrozomů se v buňkách se zablokovanou PLK1 rozdělit na počátku M-fáze (Lenart et al., 2007). Další z možností vysvětlující takovýto dopad inhibice PLK1 na strukturu dělicího vřeténka je její vliv na Bora, která funguje mimo jiné jako aktivátor Aurory A (Hutterer et al., 2006). V buňkách bez aktivní PLK1 totiž není Bora správně a dostatečně degradována, a její vysoká hladina pak vede k defektům v aktivitě a lokalizaci AURKA, kinázy mající nepopiratelný vliv na výstavbu dělicího vřeténka. (Hutterer et al., 2006; Chan et al., 2008)

Další funkcí PLK1 na centrozomech je přijímání γ -tubulinu do centrozomů během profáze. Sumara et al. (2004) popsali, že při inhibici PLK1 dochází ke zmenšení velikosti centrozomů způsobené právě nedostatkem navázaného γ -tubulinu.

Inhibice PLK1 v somatických buňkách ukázala další zajímavý rozdíl mezi buňkami s funkční PLK1 a buňkami s inhibovanou PLK1, a to načasování začátku výstavby dělicího vřeténka. Kontrolní buňky tvoří astrální mikrotubuly cca 10 min před GVBD, a pak rychle tvoří bipolární vřeténka. V buňkách s inhibovanou PLK1 vznikly mitotické mikrotubuly teprve po GVBD a bipolární vřeténko se nevytvořilo nikdy (Lenart et al., 2007).

Funkce PLK1 na centrozomech ukazuje, že její přítomnost je esenciální pro zdárný průběh výstavby dělicího vřeténka. PLK1 je důležitá pro separaci a maturaci centrozomů, pro udržení jejich integrity, a tím i pro udržení integrity dělicího vřeténka (Sumara et al., 2004; Lenart et al., 2007; Tsou et al., 2009).

3.5.1.3 PLK1 v APC/C a při separaci chromozomů

APC - anaphase-promoting complex či cyklosom je důležitý regulační enzymatický komplex, pracující jako ubikvitin-ligáza. Má rozhodující roli v průběhu buněčného dělení na hranici mezi metafází a anafází, kde pracuje především jako spouštěč rozestupu chromozomů do dceřiných buněk. Aktivaci APC při vstupu do anafáze umožňuje navázání takzvané podjednotky Cdc20 na APC komplex. Následkem této události začne APC/C provádět ubikvitinaci některých důležitých regulačních a signálních proteinů, především cyklinu B a sekurinu, což způsobí degradaci těchto proteinů v proteazomu a spustí anafázi. To se však nestane do doby, než je každý chromozom správně připojen pomocí kinetochoru na mikrotubuly dělicího vřeténka – v jiném případě je APC/C aktivita zablokována. Degradace sekurinu aktivuje separázu, a ta na oplátku rozloží kohezinový komplex (jenž drží chromatidy pospolu). Toto je mechanismus, jak zřejmě dojde k oddělení chromatid a může začít anafáze. (Vodermaier, 2004).

Za bezchybný průběh této operace je odpovědný kontrolní bod SAC (spindle assembly checkpoint). Pokud nejsou kinetochory s chromozomy správně připojeny na mikrotubuly dělicího vřeténka, SAC zastaví buněčný cyklus tím, že negativně reguluje Cdc20, a tím brání ubikvitinaci APC/C (Musacchio et Salmon, 2007).

PLK1 hraje také roli v regulaci aktivity APC/C. Důkaz o významu PLK1 pro aktivaci APC/C a pro degradaci některých mitotických proteinů přináší zjištění, že deplece PLK1 pomocí RNAi vede ke zvýšené aktivitě Cdk1, je totiž zpomalena degradace cyklinu B, čímž

se brzdí i postup mitózou. Navíc v buňkách s depletovanou PLK1 vážně i degradace securinu, a tím pádem se vyskytují potíže v segregaci chromozomů (Sumara et al., 2004). Inhibice PLK1 sice blokuje degradaci cyklinu B a securinu, ale nikoliv cyklinu A. Blok v metafázi I po PLK1 inhibici je zřejmě způsoben spíš přetrvávajícím SAC než neaktivním APC/C (Lenart et al., 2007). Pokud je totiž v somatických buňkách inhibován SAC (inhibitorem Hesperadin) i PLK1 zároveň, blok v metafázi I nenastává a buňky podstupují anafázi (Sumara et al., 2004; Santamaria et al., 2007). Aktivace APC/C s pomocí PLK1 během M-fáze není ale důležitá jen pro destrukci cyklinu B, či securinu, buňky s depletovanou PLK1 vykazovaly na konci mitózy například také zvýšenou hladinu Aurory A (van Leuken et al., 2009).

PLK1 také zodpovídá za fosforylaci kohezinu v profázi jako prvního kroku k separaci sesterských chromatid (Sumara et al., 2002; Shintomi et Hirano, 2010). Dalším faktorem důležitým pro separaci chromozomů je DNA replikační faktor Cdc6. Ten je také fosforylován PLK1, a tato fosforylace umožňuje vazbu Cdc6 na Cdk1, což vede k útlumu aktivity Cdk1. Deplece Cdc6 či mutace jeho PLK1-fosforylovaných míst vede ke zvýšenému výskytu selhání separace chromozomů. Takže PLK1 je důležitá pro separaci chromozomů i vzhledem k její roli v aktivaci Cdc6 (inhibitor Cdk1) (Yim et Erikson, 2010).

3.5.1.4 PLK1 v cytokinezi

Cytokineze je závěrečná fáze komplikovaného procesu buněčného dělení, při které se mateřská buňka fyzicky rozdělí na dvě dceřiné buňky. První viditelnou známkou cytokineze je vytvoření dělicí rýhy během anafáze. Dělicí rýha je vždy kolmá k podélné ose dělicího vřeténka, což zajišťuje oddělení dceřiných chromosomů a obě dceřiné buňky tak získají jednu kompletní identickou sadu. V místě rýhy se pak vytvoří kontraktilní prstenec, který je tvořen z překrývajících se svazků aktinových a myozinových filament. (Alberts et al., 1998).

Proces cytokineze musí být přísně regulován, protože při jejím narušení může dojít např. k nekontrolovatelnému nádorovému bujení a vzniku rakoviny. Bylo prokázáno, že PLK1 je jedním z hlavních regulátorů buněčného dělení, protože její inhibice vede k selhání cytokineze. (Santamaria et al., 2007; Petronczki et al., 2008).

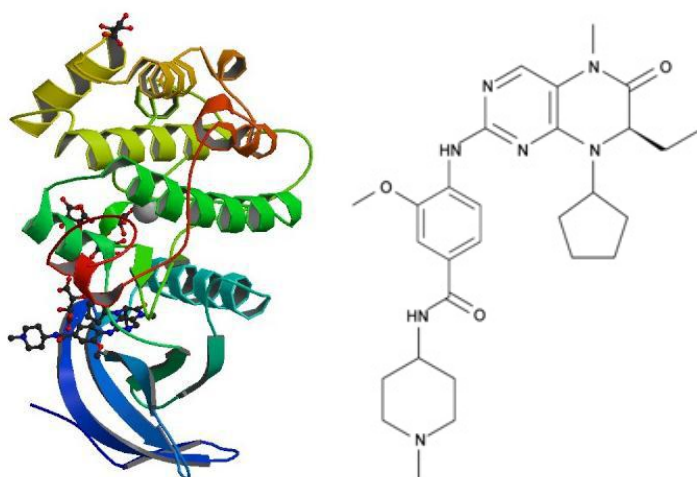
PLK1 fosforyluje důležité proteiny, které jsou nutné v komplexu bílkovin zodpovědných za zdárný průběh rozdělení. Během anafáze se PLK1 váže na mikrotubuly v centrální rovině vřeténka v tzv. midzone, a později v telofázi mění svoji lokalizaci a váže se na jednotlivá vlákna vřeténka. Když je PLK1 inhibována BI2536 (nebo jiný inhibitorem) vytrácí se z těchto struktur, což znamená, že zde chybí i další důležité cytokinetické

regulátory. PLK1 je tedy nutná pro vlastní lokalizaci těchto důležitých regulátorů. Delokalizace tolika bílkovin účastnících se cytokineze způsobuje selhání procesu vytvoření dělicí rýhy během anafáze, což vede k nedokončení celého procesu (Brennan et al., 2007; Santamaria et al., 2007).

3.5.2 PLK1 v biologii nádorového bujení

Polo-like kináze 1 připadá také významná úloha v biologii nádorového bujení. Bylo prokázáno, že zvýšená exprese PLK1 je prognosticky nepříznivým faktorem (Klener, 2011). Aberantní exprese PLK1, která byla prokázána až u 80 % nádorových onemocnění, způsobí „mitotický chaos“ a je odpovědná za ztrátu kontroly nádorového růstu a buněčné diferenciace. Inhibitory PLK blokují různé etapy mitózy, těžce poškodí průchod buněčným cyklem a vedou ke smrti buňky následnou apoptózou. Proto se inhibice PLK1 stala logicky jedním z perspektivních prostředků protinádorové léčby a předmětem intenzivního výzkumu. (Lens et al., 2010; Klener, 2011).

Teoretické předpoklady o protinádorovém účinku PLK1 byly v posledních letech intenzivně zkoumány v četných preklinických studiích. Z inhibitorů PLK1 je nejvíce prostudovaný volasertib, derivát dihydropteridinonu 2. generace (BI-6727) a inhibitor 1. generace (BI-2536) (Obr 13).



A

B

Obrázek 13. Struktura PLK1 s inhibitorem BI2536 (A) a struktura inhibitoru BI2536 (B) (Převzato z Kothe et al., 2007).

Tyto látky blokují mitózu jiným mechanismem než dosavadní používaná léčiva, mohou tak být užitečným rozšířením palety protinádorových léčiv. Mezi tato léčiva lze kromě inhibitorů polo-like kináz řadit inhibitory aurora kináz a inhibitory kinezinů. Kineziny

zejména tzv. KSP (kinesin spindle protein), mají hlavní úlohu při formaci bipolárního vřeténka a jeho inhibice vede k zástavě mitózy a k apoptóze. Aurora kinázy mají důležitou funkci při separaci chromosomů během mitózy. Inhibitory KSP a inhibitory Aurora kináz by tak mohly být vedle inhibitorů PLK1 další perspektivní terapeutickou skupinou cílenou na blokádu mitózy, která na rozdíl od dosavadních inhibitorů nemá neuropatické účinky. Vzájemné interakce těchto inhibitorů mitózy jsou předmětem výzkumu (Lens et al., 2010; Klener, 2011)

3.5.3 PLK1 v meióze

Stejně jako je tomu u mitózy, kde je role PLK1 nepostradatelná pro klíčové fáze buněčného cyklu, tak i v meióze plní PLK1 důležité funkce, které jsou do jisté míry podobné. Odlišnost je dána rozdílností obou způsobů buněčného dělení.

Přítomnost a funkce PLK1 v zárodečných buňkách (oocytech) byla potvrzena a zkoumána u zavedených laboratorních modelů, zejména u myši (Wianny et al., 1998; Pahlavan et al., 2000; Tong et al., 2002), ale i u drápatky *Xenopus laevis* (Karaiskou et al., 2004) či u mořské hvězdice *Asterina pectinifera* (Okano-Uchida et al., 2003).

Aktivace PLK1 stejně jako v mitóze opět závisí na aktivitě Cdk1. Bylo prokázáno, že v oocytech s inhibovaným MPF se PLK1 neaktivuje, a to jak u myši (Pahlavan et al., 2000), tak u mořské hvězdice (Okano-Uchida et al., 2003).

Expresce PLK1 se během meiotického zrání oocyty výrazně nemění (Wianny et al., 1998; Pahlavan et al., 2000; Tong et al., 2002). Její aktivní fosforylovaná forma se objevuje těsně před GVBD a během GVBD také dosahuje svého vrcholu, ani během MI/MII přechodu pak v zásadě nekolísá a svou hladinu si udržuje až do oplození, kdy exprese PLK1 prudce klesá, a to jak v myších oocytech (Pahlavan et al., 2000; Tong et al., 2002), tak i u hvězdice (Okano-Uchida et al., 2003).

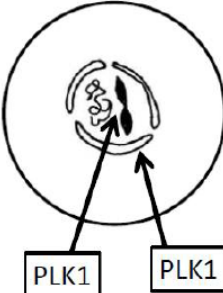
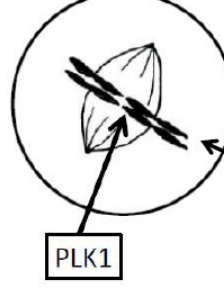
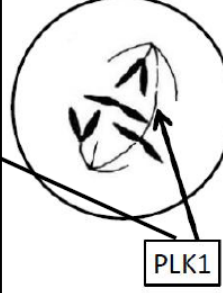
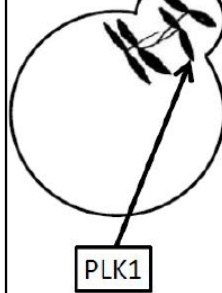
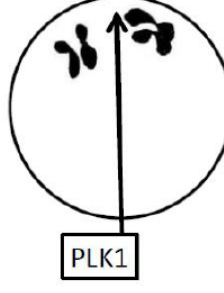
Lokalizace PLK1 během meiotického zrání je také velmi podobná jako během mitózy v somatických buňkách. Před rozpadem zárodečného váčku je PLK1 difuzně rozprostřena v cytoplasmě i v jádře, a po GVBD se pak soustředí v okolí kondenzovaných chromosomů. V metafázi se PLK1 kondenzuje na pólech dělicího vřeténka a od anafáze až do telofáze je lokalizovaná v rovině budoucího dělení buňky (Wianny et al., 1998; Pahlavan et al., 2000; Tong et al., 2002).

Oocyty mnoha druhů savců, včetně myši nebo člověka, neobsahují skutečné centrozomy a jejich roli nahrazují mikrotubuly organizující centra (MTOC). Přesné složení a

struktura těchto MTOC není přesně charakterizována (Dumont et Desai, 2012). MTOC jsou rozptýleny v cytoplazmě a po GVBD jsou reorganizovány tak, aby bylo vytvořeno bipolární dělicí vřetenko (Schuh et Ellenberg, 2007). PLK1 se váže přímo na tyto MTOC, které tvoří dělicí vřetenko a při metafázi se kondenzuje na pólech vřetenka. Na rozdíl od somatických buněk, inhibice PLK1 v myších oocytech nebrání výstavbě bipolárního dělicího vřetenka, ale pravděpodobně přispívá k nukleaci mikrotubulů v MTOC, což má vliv na jeho konečný objem (Šolc et al., under revision). PLK1 inhibované oocyty mají ve srovnání s kontrolními oocyty podstatně menší dělicí vřetenka a tyto oocyty zůstávají zastaveny v metafázi I. Na rozdíl od somatických buněk kdy je blok v metafázi I po PLK1 inhibici způsoben přetrvávajícím SAC a při inhibici PLK1+SAC blok v metafázi I nenastává (Sumara et al., 2004; Santamaria et al., 2007), tak oocyty s inhibovanou PLK1 nepodstupují anafázi nikdy a to i přes inhibici SAC (Šolc et al., under revision).

Inhibice PLK1 v myších oocytech také ukázala závažné problémy při separaci chromozomů. PLK1 je potřebná při zahájení separace chromozomů tím, že se podílí na degradaci sekurinu, která je nutná pro aktivaci APC/C (Kudo et al., 2009). Pokud je PLK1 inhibovaná v oocytech v pozdějších fázích a oocyty přeci jen projdou anafází, nevydělí plnohodnotné polární tělísko a nedokončí tak cytokinezi (Šolc et al., under revision) (Obr. 14).

Jak ukazuje obrázek 14, tak pokusy s použitím inhibitoru BI2536 v myších oocytech potvrzují, že PLK1 je pro meiotické zrání oocytů neméně důležitá jako při mitotickém dělení v buňkách somatických.

PLK1 inhibition from the beginning of meiotic maturation of mouse oocytes		PLK1 inhibition on the metaphase I/anaphase I transition in mouse oocytes		
delay, desynchronization, prolonged duration of NEBD and CC	reduced spindle volume Metaphase I arrest	arrest with chromatin in metaphase I, error-prone anaphase	attempt for polar body (pb) extrusion	failed cytokinesis – pb reabsorption
				

Obrázek 14. Inhibice PLK1 od počátku zrání myších oocytů: a) Zpoždění, desynchronizace, prodloužená délka rozpadu jaderné membrány (NEBD) a kondenzace chromatinu (CC) b) Snížený objem dělicího vřeténka, zastavení v metafázi I; **Inhibice PLK1 v myších oocytech na přechodu metafáze I a anafáze:** a) Zastavení chromatinu v metafázi, náchylné k chybám anafáze b) Pokus o vydělení polárního tělíska c) Nedokončení cytokineze - reabsorpce polárního tělíska (Převzato z Šolc et al., under revision).

3.6. Aurora kinázy

Rodina Aurora protein kináz je další významnou skupinou serin-threoninových kináz regulující buněčné dělení v savcích buňkách. Svůj název získaly podle lokalizace v průběhu dělení buňky, vyskytují se na pólech mitotického vřeténka (podobně jako polární záře – *Aurora borealis* - na severním pólu Země). Členové této rodiny hrají významnou roli při kontrolních procesech buněčného cyklu od funkce centrosomu, přes separaci chromozómů až po cytokinezi. Na buněčné úrovni, může dysfunkce těchto kináz vést k aneuploidii a neřízená regulace těchto kináz je spojena s nádorovým buněčným dělením. (Vader et Lens, 2008).

Savčí genom obsahuje tři geny kódující Aurora kinázy, označovány jako Aurora A, Aurora B a Aurora C. Přehled nomenklatury Aurora kináz je uveden v následující tabulce 2.

Table 2 | **Nomenclature and properties of aurora family kinases**

Nomenclature guide*						
Mammals	Other names	<i>Xenopus</i>	<i>C. elegans</i>	<i>Drosophila</i>	<i>S. cerevisiae</i>	
Aurora-A	Aurora-2, HsAIRK1, ARK1, Aik, BTAK, STK-15 (human); ARK1, Ayk1, IAK1 (mouse)	Eg2	AIR-1	aurora	Ipl1p [†]	
Aurora-B	Aurora-1, HsAIRK2, ARK2, Aik2, AIM-1, STK-12 (human); ARK2, STK-1 (mouse); AIM-1 (rat)	AIRK2	AIR-2	IAL		
Aurora-C	Aurora-3, HsAIRK3, AIE2, Aik3, STK-13 (human); AIE1 (mouse)					

Tabulka 2. Nomenklatura aurora kináz. (Převzato z Nigg, 2001).

Zakládající člen rodiny Aurora kináz byl nalezen u *Drosophily*. Jedná se o Aurora kinázu, která byla objevena v roce 1995 a byla identifikována jako gen zapojený do výstavby dělicího vřeténka (Glover et al., 1995). Kvasinky mají jen jednu Aurora kinázu (Ipl1 v *Saccharomyces cerevisiae* a Ark1 v *Schizosaccharomyces pombe*), která funkčně souvisí s Aurora B kinázou ve vyšších organismech. Savci mají třetí gen s názvem Aurora C (Nigg, 2001).

3.6.1 Struktura a lokalizace

Aurora kinázy obsahují dvě důležité domény. Jsou jimi regulační doména na N-konci a katalytická doména na C-konci. Regulační doména se mezi jednotlivými typy kináz různí,

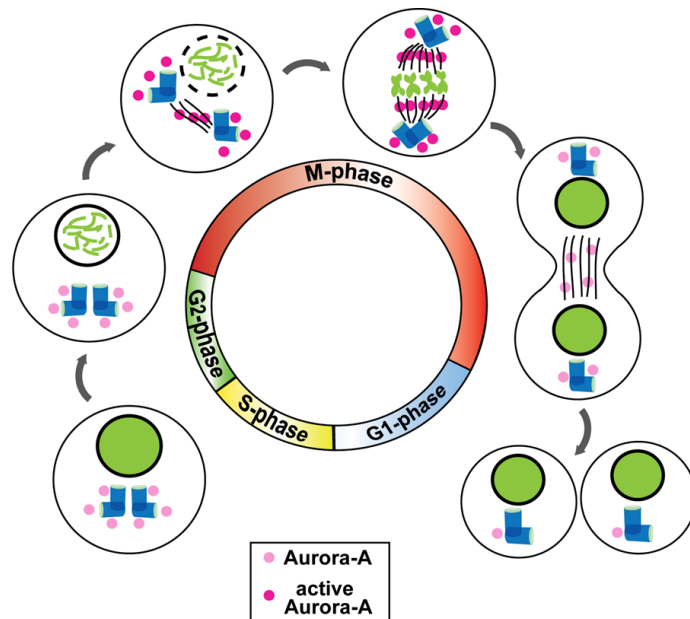
ale struktura domény katalytické zůstává v podstatě zachována - tři savčí Aurora kinázy sdílí až 80% homologie, přičemž ATP vázající místo se mezi jednotlivými kinázami prakticky neliší. Aurora kinázy také obsahují tzv. D a A boxy směřující je k degradaci přes APC (Fu et al., 2009).

Aurora kinázy A a B jsou exprimovány v proliferujících buňkách a nadměrně exprimovány v nádorových buňkách. V buněčném cyklu dosahuje aktivita Aurory A vrcholu před Aurorou B, což je dáno rozdílnou subcelulární lokalizací. Míra exprese Aurory A je těsně svázána s postupem buněčného cyklu, vrcholu dosahuje v přechodu G2 a M fáze a s koncem mitózy zase prudce klesá, v zásadě tak kopíruje expresi cyklinu B. Od profáze do anafáze je lokalizovaná na centrozomech a pólech dělicího vřeténka (Marumoto et al., 2002). Aurora B kináza je lokalizována na vnitřních centriolách a v oblasti kinetochorů až do anafáze, nachází se i na ramenech chromozomů (Giet et Prigent, 1999; Wang et al., 2011). Aurora C je vysoce exprimována ve varlatech, ale byla také nalezena v nádorových buněčných liniích, kde byla lokalizována na mikrotubulech dělicího vřeténka během anafáze. (Kimura et al., 1999).

3.7 Aurora A

3.7.1 AURKA v mitóze

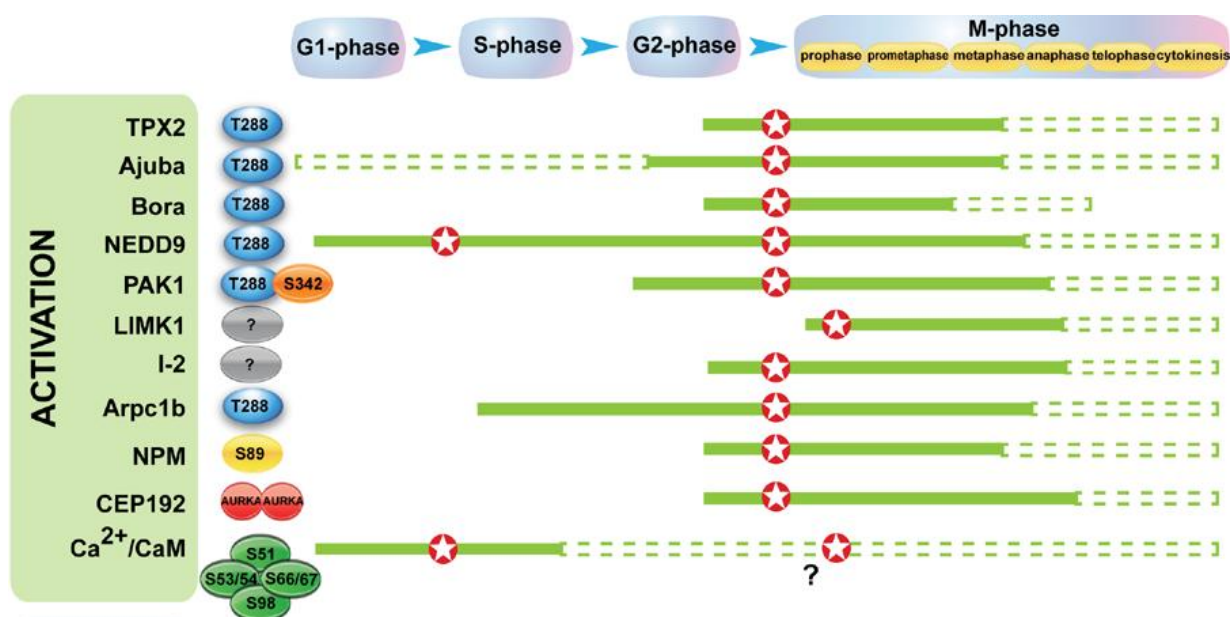
Procesy regulované Aurorou A v mitóze zahrnují zránění a dělení centrozomu, výstavbu bipolárního dělicího vřeténka, regulaci vstupu do mitózy, srovnání chromozomů v metafázi, cytokinezi a návrat do G1 fáze (Nikonova et al., 2013) (Obr. 15).



Obrázek 15: Aurora A v buněčném cyklu. Aurora A se v S fázi začíná významně hromadit na centrozomech a je aktivována v přechodu mezi G2 a M fázi. Aktivní Aurora A se dále šíří podél mitotického vřeténka v telofázi do midzone, kde je inaktivována a degradována v cytokinezi. Jen nízká úroveň je detekovatelná na počátku G1 fáze. (Převzato z Nikonova et al., 2013).

3.7.1.1 Aktivace AURKA

Aktivaci Aurory A při vstupu buněk do mitózy zajišťují prostorově i časově oddělené interakce s několika partnerskými proteiny. Proteiny regulující tento proces, jsou uvedeny na obrázku 16.



Obrázek 16. Proteiny zodpovědné za aktivaci Aurory A během buněčného cyklu. (Převzato z Nikonova et al., 2013).

Nejvíce byly studovány interakce, které indukují Aurora A autofosforylaci. Příslušnými partnerskými proteiny pro tuto fosforylaci jsou TPX2 (target protein for Xenopus kinesin-like protein 2), Ajuba, NEDD9 a Bora (Zhao et al., 2005). Zásadním a nejprostudovanějším aktivátorem AURKA je TPX2. TPX2 byl původně identifikován jako protein asociovaný s mikrotubuly dělicího vřeténka potřebný k nukleaci mikrotubulů okolo chromozomů a u kinetochorů v závislosti na koncentraci RanGTP (Wittmann et al., 2000). Později bylo prokázáno, že se TPX2 na mikrotubulech dělicího vřeténka váže na Auroru A, která zabraňuje jeho zpětné defosforylaci a aktivuje tak nukleaci mikrotubulů z centrozomů (Ducat et Zheng, 2004).

3.7.1.2 AURKA na centrozomech

Během S-fáze, po duplikaci centrozomu, se Aurora A hromadí na centrozomech. Jak somatické buňky postupují buněčným cyklem směrem k zahájení mitózy, centrozomy podstupují proces zrání, který je činí schopnými vytvořit nukleární místa pro mikrotubuly, které tvoří dělicí vřeténko, a také jim umožňuje fungovat jako signální platforma pro mitotické regulační orgány (Palazzo et al., 2000; Mahen et Venkitaraman, 2012). Během tohoto procesu zrání, který je nejvíce patrný na konci fáze G2, centrozomy zvětší svůj průměr v důsledku narůstání tzv. PCM (pericentriolar material), složený z komplexu γ -tubulinových prstenců a dalších regulačních proteinů (Mahen et Venkitaraman, 2012). AURKA pomáhá

při navázání γ -tubulinu na centrozomy a je nutná pro správné umístění a funkci centrosomálních složek, jako je centrosomin, NDEL1, LATS a TACC proteinů (Barros et al., 2005; Abe, Y. et al., 2006). Některé z těchto proteinů jsou přímo odpovědné za zrání centrozomu (např. centrosomin), zatímco jiné jsou považovány za podpůrné při nukleaci mikrotubulů. Například fosforylace TACC v *Drosophila* je na centrozomech nezbytná pro řádné spojení minus-konců mikrotubulů s centrozomem (Barros et al., 2005). LATS2, kterou AURKA fosforyluje, je zase nutná pro navázání γ -tubulinu na centrozomy, na čemž pracuje v součinnosti s Ajuba, aktivátorem Aurory A (Abe, Y. et al., 2006).

3.7.1.3 AURKA při vstupu do mitózy

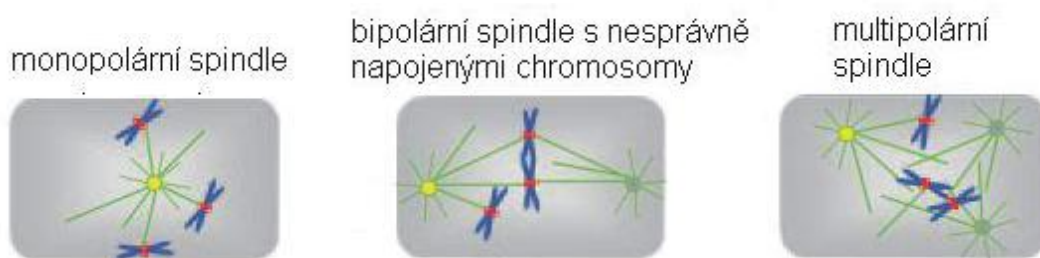
Vstup buňky do mitózy je přímo závislý na aktivitě Cdk1, potažmo komplexu Cdk1/cyclinB. Souběžně se zráním centrozomu Aurora A také podporuje aktivaci komplexu Cdk1/cyclinB, který je na přelomu G2 a M fáze aktivován právě na centrozomech (Jackman et al., 2003). V poslední době bylo prokázáno, že Aurora A podporuje aktivaci Polo-like kinázy-1 prostřednictvím přímé fosforylace v rámci aktivační T-smyčky PLK1 (Chan et al., 2008; Seki et al., 2008; Macůrek et al., 2008). Zajímavé je, že tato fosforylace konkrétně požaduje přítomnost kofaktoru Aurory A Bora, a není závislá na ostatních kofaktorech jako je například TPX2 (Macůrek et al., 2008). Bora se naváže na PLK1 a odhalí tak aktivační smyčku kinázy, která mimo jiné obsahuje také Thr210 určený k fosforylaci Aurorou A (Seki et al., 2008). AURKA tedy s pomocí Bory aktivuje PLK1, aktivní PLK1 následně fosforyluje Boru a směřuje ji tak k degradaci (Chan et al., 2008). PLK1 řídí činnost Cdk1/Cyclin-B prostřednictvím fosforylace fosfatázy Cdc25B a zároveň fosforyluje a směřuje k degradaci Wee1 – kinázu s inhibičním vlivem na Cdk1. Kromě toho, Aurora A také přímo fosforyluje a podporuje aktivaci fosfatázy Cdc25B na centrozomech (Cazales et al., 2005). Vzhledem k tomu, že Cdc25B je nutná pro počáteční centrosomální aktivaci komplexu Cdk-1/Cyclin-B v přechodu G2/ M fázi, tak Aurora-A vstupuje do tohoto procesu i prostřednictvím Cdc25B.

Při inhibici Aurory A pomocí RNAi nebo specifických inhibitorů byl na buňkách pozorován zpožděný vstup do mitózy (Seki et al., 2008) a také prodloužení doby trvání jednotlivých mitotických fází, především profáze, prometáfáze a metafáze (Marumoto et al., 2002). Tyto výsledky naznačují vliv Aurory A na počáteční aktivaci Cdk1, ale jsou i studie, které toto vyvracejí. Van Horn et al. (2010) popisují, že inaktivace Aurory A nebo PLK1 v průběhu buněčného cyklu nevykazuje žádný významný účinek na aktivaci Cdk1 a vstupu do mitózy. Nicméně, současná inaktivace obou kináz AURKA a PLK1 výrazně zpožďuje

aktivaci Cdk1 a vstup do mitózy, což naznačuje, že AURKA a PLK1 mohou mít zástupné funkce při aktivaci Cdk1.

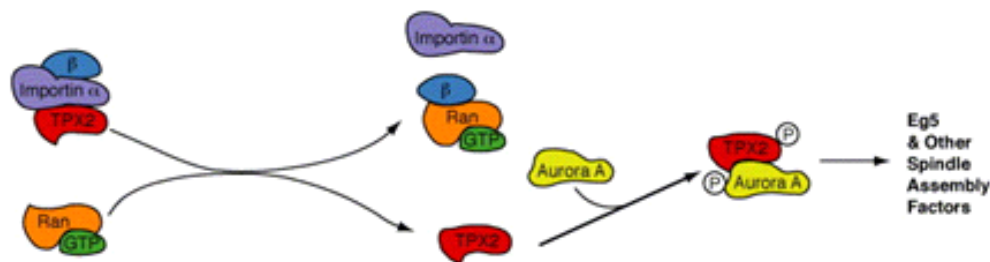
3.7.1.4 AURKA při výstavbě dělicího vřeténka

Aurora A je zodpovědná za správný průběh maturace a separace centrozomů a zodpovídá také za délku a četnost astrálních mikrotubulů (Giet et al., 2002). Ve všech studovaných organismech vedla inhibice nebo deplece AURKA k tvorbě abnormálně organizovaných dělicích vřetének, včetně charakteristických monopolárních struktur a k přítomnosti slabých, řídkých nebo krátkých astrálních mikrotubulů (Obr. 17) (Glover et al., 1995; Hannak et al., 2001; Giet et al., 2002; Liu et Ruderman, 2006; Hoar et al., 2007). Vliv Aurory A na výstavbu mitotického dělicího vřeténka se stal terčem intenzivního studia.



Obrázek 17. Dopad inhibice Aurory A na morfologii dělicího vřeténka. (Převzato z Hoar et al., 2007).

Mikrotubuly dělicího vřeténka potřebují ke svému vzniku nukleační místa – γ -tubulinové prstence v centrozomech, a dále potřebují dostat vhodný iniciační pokyn. Aurora-A je schopna vyvolat tvorbu mikrotubulů dělicího vřeténka interakcí s TPX2 a skupinou proteinů, včetně HURP, XMAP215 a EG5 (Wong et al., 2008). Za fyziologických podmínek jsou tyto vzájemné vztahy včetně aktivace Aurory A stimulovány Ran-GTP, který je obohacen v blízkosti kinetochoru a chromatinu. Malé RanGTPázy jsou proteiny známy především v souvislosti s transportem mezi jádrem a cytoplazmou, ale zde hrají důležitou roli při nukleaci a organizaci mikrotubulů, tvorbě dělicího vřeténka a organizaci jeho regulačních faktorů (Obr. 18) (Ducat et Zheng, 2004; Gruss et Vernos, 2004).

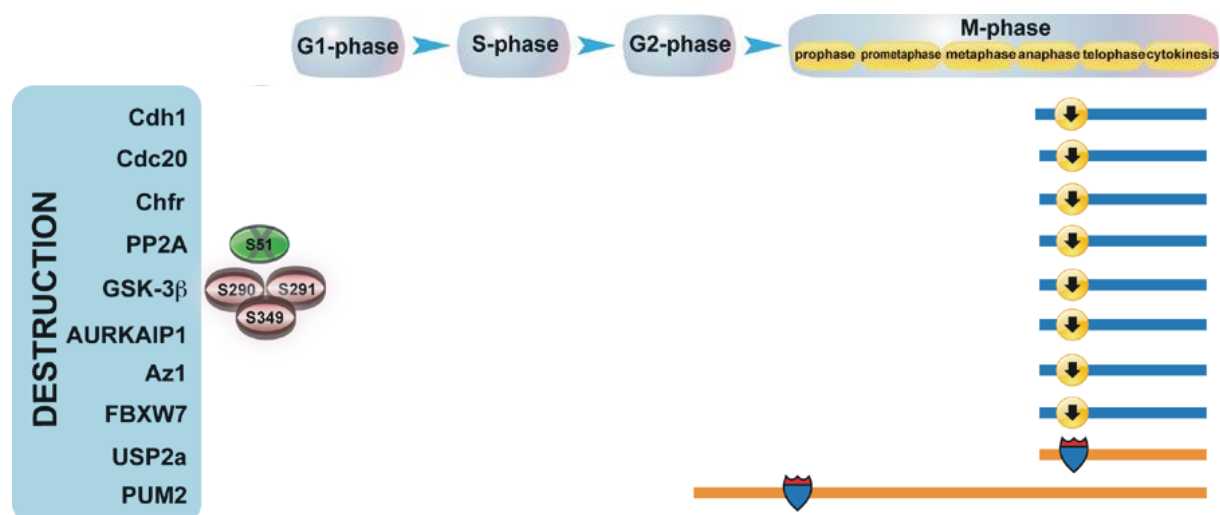


Obrázek 18. RanGTP a Aurora A jsou zapojeny do výstavby vřeténka přes společnou cestu. RanGTP stimuluje uvolňování TPX2 z inhibičního Importinu α / β . Uvolněný TPX2 se pak může vázat na Auroru A a stimulovat její aktivaci přes autofosforylaci. Aktivní Aurora A pak může regulovat bipolaritu vřeténka prostřednictvím dalších proteinů, například EG5 (Převzato z Ducat et Zheng, 2004).

V přítomnosti exogenní Ran-GTP je AURKA v interakci s TPX2 schopna řídit výstavbu struktur bipolárního vřeténka i bez centrozomů a chromatinu tím, že podporuje polymeraci mikrotubulů (Tsai et Zheng 2005). To naznačuje, že aktivita AURKA je rozhodující hnací silou při výstavbě dělicího vřeténka.

3.7.1.5 Degradace AURKA na konci mitózy

Degradace AURKA je také regulována pomocí interakce s partnerskými proteiny, jejichž přehled je uveden na obrázku 19.



Obrázek 19. Proteiny zodpovědné za degradaci Aurory A během buněčného cyklu. (Převzato z Nikonova et al., 2013).

Aurora A je degradována v proteazomu v pozdní anafázi, přičemž inhibice proteazomu cyklujících buněk vede k hromadění ubiquitinovaných forem Aurory A (Walter et al., 2000; Honda et al., 2000). K degradaci Aurory A dochází prostřednictvím interakce s komplexem APC/C (Honda et al., 2000). Aktivaci APC/C při vstupu do anafáze umožňuje navázání takzvané podjednotky Cdc20 na komplex. Následkem této události začne APC/C provádět ubikvitinaci některých důležitých regulačních a signálních proteinů především cyklinu B a securinu, ale i Aurory A, což způsobí degradaci těchto proteinů v proteazomu a spustí anafázi. Na aktivaci APC/C se v této fázi buněčného cyklu podílí i PLK1 (van Leuken et al., 2009).

3.7.2 AURKA v biologii nádorového bujení

V roce 1998 dvě nezávislé studie poprvé popsaly zvýšenou expresi Aurory A jako společný rys několika běžných nádorových onemocnění, včetně kolorektálního karcinomu, karcinomu prsu, vaječníků, prostaty a děložního čípku, neuroblastomu jak v primární nádorové tkáni, tak v buněčných liniích (Bischoff et al., 1998; Zhou et al., 1998).

Dosavadní studie na myších popisují, že zvýšená exprese Aurory A se v nádorových buňkách projevuje zesílením centrozomu, tvorbou kolonií buněk a růstem nádoru (Bischoff et al., 1998; Zhou et al., 1998; Meraldi et al., 2002). Meraldi et al. (2002) ve své práci popsali, že zvýšená exprese Aurory A má nepřímý účinek na selhání cytokineze a generuje tetraploidní buňky se dvěma centrozomy. Zvýšená exprese Aurory A však v primárních buňkách není silný induktor buněčné transformace, což naznačuje, že Aurora A vyžaduje další onkogenní událost (Zhou et al., 1998). Zatím není zcela jasné, jak Aurora A přispívá k buněčné transformaci a tumorigenezi a jakou hraje roli v průběhu tohoto procesu.

Popsaný je těsný vztah mezi Aurorou A a proteinem p53 a jejich vliv na buněčné procesy a tumorigenezi (Katayama et al., 2004; Liu et al., 2004). Protein p53 je produktem genu TP53, který reaguje na poškození DNA a různé typy stresu (např. hypoxie) zvýšenou expresí právě p53. To vede k pozastavení buněčného cyklu, následné opravě genetického materiálu nebo navození apoptózy. AURKA přímo fosforyluje p53, kontroluje jeho stabilitu a transkripční aktivitu. Kromě toho, některé studie ukázaly, že p53 může přímo inhibovat funkci Aurory A prostřednictvím jeho vazby na katalytickou oblast Aurory A (Katayama et al., 2004; Liu et al., 2004). Společně tyto nálezy naznačují úzkou souvislost mezi p53 a Aurorou A při zástavě buněčného cyklu v reakci na poškození DNA. Účinek zvýšené exprese

Aurory A v lidských nádorech i myších modelech ukazuje jasnou korelaci s p53 (Meraldi et al., 2002; Mao et al., 2007).

Inhibice kinázy Aurory A výrazně inhibuje růst nádorových buněk v buněčných kulturách, a proto se logicky stala jedním z perspektivních prostředků protinádorové léčby a předmětem intenzivního výzkumu (Vader et Lens, 2008). Jednou z látek, která dokáže už v poměrně nízkých dávkách Auroru A inhibovat, je molekula s názvem MLN8054, která má tu výhodu, že nevykazuje inhibiční vliv na příbuzné kinázy a ovlivňuje pouze kinázovou aktivitu Aurory A (Manfredi et al., 2007). Tato inhibice vede k závažnému fenotypovému projevu. Buňka ošetřená MLN8054 vykazuje defekty v morfologii dělicího vřeténka až v 95% případech, objevují se monopolární i polypolární vřeténka (Hoar et al., 2007). Inhibitory Aurora kináz by tak mohly být vedle inhibitorů PLK1 další perspektivní terapeutickou skupinou cílenou na blokádu mitózy. Vzájemné interakce těchto inhibitorů mitózy jsou předmětem výzkumu (Lens et al., 2010; Klener, 2011).

3.7.3 AURKA v meióze

Zatímco role Aurory A v mitotickém cyklu je poměrně dobře popsána, výzkum kináz v meiotickém zrání savčích oocytů byl zaměřen především na role cyklin-dependentní kinázy (Cdk1) a mitogenem aktivované protein kinázy (MAPK) (Motlík et al., 1998; Abrieu et al., 2001) a jen relativně malá pozornost, v souvislosti s meiotickým zráním savčích oocytů, byla věnována AURKA.

3.7.3.1 Exprese a subcelulární lokalizace AURKA během zrání oocytů

Aurora A se zdá být dominantní isoformou Aurora kináz v savčích oocytech. Její přítomnost v savčích oocytech byla prokázána napříč modelovými organismy (Yao et al., 2004; Swain et al., 2008; Šašková et al., 2008; Uzbekova et al., 2008). Její lokalizace a exprese se během meiotického dělení přirozeně mění v návaznosti na postup procesu. Šašková et al. (2008) popisují nízkou expresi AURKA v myších oocytech ve fázi GV, zvýšení její hladiny během GVBD, která pak zůstává v podstatě konstantní až do fáze MII. Toto zjištění ovšem kontrastuje s prací Yao et al. (2004), kteří uvádějí nejvyšší koncentraci AURKA během GV a MII a nižší, ale konstantní hladinu v ostatních fázích. Vzniklý rozpor vysvětlují autoři použitím odlišných protilátek (Šašková et al., 2008). V oocytech ve fázi GV je Aurora A difuzně rozptýlena v cytoplazmě a koncentruje se v zárodečném váčku. Krátce po GVBD je AURKA zřejmě už ve své aktivní formě distribuována ke kondenzovanému

chromatinu navázána na mikrotubuly-organizující centra (MTOCs). V další fázi se pak kináza stěhuje na póly dělicího vřeténka, a to až do ukončení anafáze I (Yao et al., 2004; Šašková et al., 2008).

Tyto výsledky jsou podobné těm v somatických buňkách, kde exprese AURKA je závislá na buněčném cyklu, dosáhne maximální hodnoty v M-fázi, a je lokalizována v cytoplazmě, jakož i na centrozomech a dělicím vřeténku (Nikonova et al., 2013).

3.7.3.2 AURKA při znovuzahájení meiózy

Myší oocyty nemají klasické centrozomy obsahující centrioly (Szollosi et al., 1972), ale mají jedno až tři mikrotubuly-organizující centra (MTOCs), která obsahují pericentrin a γ -tubulin (Gueth-Hallonet et al., 1993; Schuh et Ellenberg, 2007). Po GVBD MTOCs zvyšují svůj počet a shlukují se v blízkosti kondenzovaných chromozómů. Nárůst celkového počtu MTOC během znovuzahájení meiózy (Schuh et Ellenberg, 2007) lze považovat za analogický proces se zráním a dělením centrozomu v somatických buňkách, jako proces, který vyžaduje aktivitu AURKA (Palazzo et al., 2000; Mahen et Venkitaraman, 2012). Zvýšená aktivace Aurory A je zřejmě omezena pouze na MTOCs, protože v cytoplazmě nebyly ve vyšší fosforylované AURKA zjištěny žádné významné změny. Bylo popsáno, že předčasná aktivace AURKA vede k předčasnému zvýšení počtu MTOCs, což má za následek vytvoření vadného multipolárního vřeténka a zastavení buněčného cyklu (Šašková et al., 2008; Šolc et al., 2012).

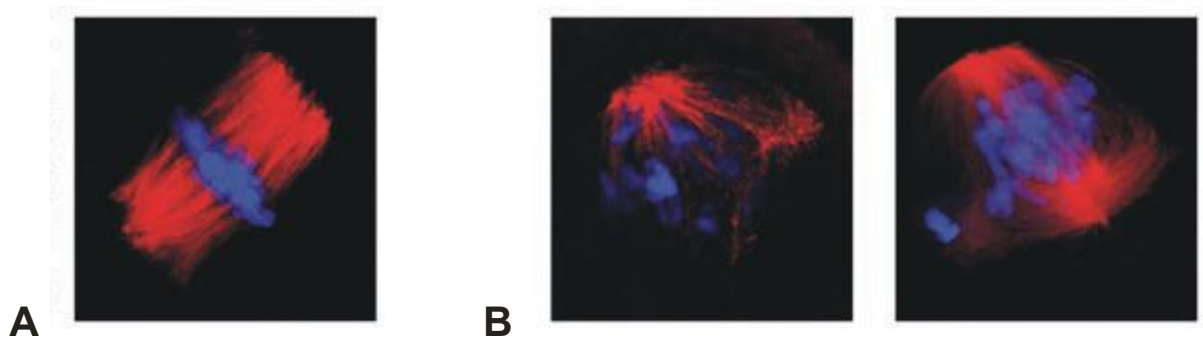
V somatických buňkách, působí AURKA během normálního mitotického vstupu jako pozitivní regulátor Cdc25B a urychluje vstup do mitózy, ačkoli není pro vstup do mitózy nutná (Dutertre et al., 2004). Aurora A je ale nezbytná pro „G2-checkpoint recovery“ - znovuzahájení buněčného cyklu po DNA poškození v G2 fázi (Macůrek et al., 2008). Znovuzahájení meiózy oocytů se v mnoha ohledech podobá právě „G2-checkpoint recovery“ (Šolc et al., 2010). Cdc25B je nezbytná pro aktivaci Cdk1 a zahájení meiózy (Lincoln et al., 2002). AURKA je aktivována fosforylací na T288 poprvé těsně před GVBD na MTOCs a tato aktivace AURKA je dvoufázová. Počáteční aktivace nevyžaduje aktivitu Cdc25B-Cdk1, zatímco plná aktivace, která je nezbytná pro zvýšení počtu MTOCs, závisí na činnosti Cdk1 (Šolc et al., 2012). Současné výsledky potvrzují, že aktivní AURKA hraje klíčovou roli jak ve zrání a dělení centrozomu v somatických buňkách, tak i ve zrání MTOCs v oocytech (Yao et al., 2004; Šašková et al., 2008).

Dosavadní publikované práce popisující vliv inhibice AURKA na zahájení meiózy nejsou zcela jednotné. Někteří autoři popisují v oocytech s inhibovanou AURKA zpoždění rozpadu jaderné membrány (GVBD) (Yao et al., 2004; Šašková et al., 2008). Jiné práce ale toto tvrzení nepotvrzují a sledávají vliv inhibice Aurory A na GVBD v podstatě zanedbatelným, jelikož jak kontrolní, tak ošetřené oocyty vykazovaly v zásadě stejnou kinetiku GVBD i aktivace Cdk1/cyklinu B (Castro et al., 2003; Ding et al., 2011). O roli Aurory A ve znovuzahájení meiózy může vypovídat nejen inhibice kinázy, ale i její overexprese. Například mikroinjekce mRNA pro Auroru A do oocytů *Xenopa* způsobila urychlení nástupu GVBD, ovšem až po stimulaci oocytu progesteronem, samotná zvýšená exprese AURKA k aktivaci MPF nebo k rozpadu jaderné membrány nevedla (Andresson et Ruderman, 1998). Toto pozorování bylo potvrzeno i na myších oocytech inhibovaných (blokových v GV stádiu) vysokou hladinou cAMP (pomocí IBMX), kde overexprese AURKA k překonání meiotického bloku rovněž nestačila (Šašková et al., 2008). Podmíněná overexprese AURKA v oocytech tedy neovlivňuje zahájení meiózy, zrání a vývojovou kompetenci (Šolc et al., 2012).

3.7.3.3 AURKA při výstavbě dělicího vřeténka v meióze - přechod do MII

I když role Aurory A ve znovuzahájení meiózy není zrovna jasná, autoři se v zásadě shodnou na dopadu inhibice AURKA na následující procesy. Ve fázi MI činnost AURKA pozitivně reguluje délku dělicího vřeténka. Inhibice AURKA obvykle vede k nepřirozeně zvýšené míře defektů ve výstavbě dělicího vřeténka, a zřejmě právě tyto defekty často znemožňují oocytu s inhibovanou AURKA vydělit první pólové tělísko, a pokročit tak do fáze MII. (Yao et al., 2004; Šašková et al., 2008; Ding et al., 2011).

Inhibice Aurory A v myších oocytech vede ve zvýšení míře k nesprávné lokalizaci MTOC a k tvorbě abnormálního dělicího vřeténka s chromozomy špatně srovnanými v metafázní rovině (Obr. 20) (Šašková et al., 2008; Ding et al., 2011).



Obrázek 20: Fenotypy dělicího vřeténka ve fázi MI v myších oocytech. Dělicí vřeténko v kontrolních oocytech (A) a v oocytech s inhibovanou AURKA (B). (Převzato z Šašková et al., 2008).

Podobný efekt je popsán i u oocytů *Xenopa*, kde vyčerpávání AURKA (EG2), nebo jeho substrátu (TACC3 Maskin) vede k tvorbě kratší dělicích vřetének (Peset et al., 2005).

Jak inhibice, tak i příliš vysoká exprese AURKA vede k defektům ve výstavbě dělicího vřeténka. V oocytech s overexprimovanou Aurorou A se tvoří nadbytečná MTOC a to i přes inhibici „hlavní kinázy“ Cdk1, z čehož by se dalo soudit, že sama Aurora A je zodpovědná za amplifikaci MTOC, a alespoň tato její aktivita není závislá na aktivaci MPF. (Šašková et al., 2008; Ding et al., 2011). Ovšem i pokud Cdk1 inhibována není, způsobuje overexprese AURKA tvorbu abnormálních dělicích vřetének s výrazně prodlouženými rameny nebo multipolárními formacemi, které v každém případě způsobují zastavení zrání oocytu v metafazi I. (Šašková et al., 2008).

Na základě dosavadních poznatků lze konstatovat, že AURKA má, stejně jako v somatických buňkách, více rolí zásadních pro správné zrání oocytů. AURKA se podílí na regulaci MTOCs (násobení / zrání), zahájení meiózy, dynamice mikrotubulů dělicího vřeténka a organizaci metafázního dělicího vřeténka.

3.8. Spolupráce kináz AURKA a PLK1

Jak bylo popsáno v předešlých kapitolách, tak kinázy PLK1 a AURKA hrají klíčovou roli ve zrání centrozomu, výstavbě dělicího vřeténka a segregaci chromozomů během buněčného dělení. Obě kinázy patří do rodiny serin / threoninových kináz a jsou speciálně aktivovány v přechodu G2 a M fáze. Dosavadní studie AURKA a PLK1 jsou zaměřeny

především na každou kinázu zvlášť, a proto není zcela jasné, do jaké míry se tyto kinázy vzájemně ovlivňují, případně zastupují a jaká je síla jejich spolupráce.

Aktivace Cdk1 iniciuje vstup do mitózy a aktivuje kinázy AURKA a PLK1, které ve smyčce zpětnou vazbou na Cdk1 podporují rychlý a včasný vstup do mitózy a koordinovaně regulují různé aspekty mitózy, jako je formování bipolárního dělicího vřeténka (Van Horn et al., 2010). Zajímavé je, že samostatné inaktivace AURKA nebo PLK1 v průběhu buněčného cyklu, nevykazuje žádný významný účinek na aktivaci Cdk1 a vstupu do mitózy. Výrazné zpoždění aktivace Cdk1 a vstupu do mitózy přinesla až inaktivace obou kináz AURKA a PLK1 současně (Van Horn et al., 2010). To ukazuje, že některé konkrétní kroky vykonávají kinázy ve vzájemné spolupráci.

Při zrání centrozomu a výstavbě dělicího vřeténka byly popsány specifické i překrývající se role obou kináz: (1) AURKA a TPX2 jsou nutné pro soudržnost centriolů a bipolárního dělicího vřeténka, (2) TPX2, kromě jeho známé role v organizaci mikrotubulů se také podílí na zrání centrozomu, (3) PLK1 řídí lokalizaci AURKA na centrozomech, jakož i vazbu TPX2 na mikrotubuly (De Luca et al., 2006).

Dalším společným jmenovatelem obou kináz je malá molekula s názvem Bora. Bora působí jako koaktivátor PLK1, na kterou se naváže a odhalí tak aktivační smyčku kinázy, která mimo jiné obsahuje také Thr210 určený k fosforylaci Aurorou A (Seki et al., 2008). Aurora A tedy s pomocí Bory aktivuje PLK1 a PLK1 se vzápětí vlastně obrátí sama proti sobě, fosforyluje totiž Boru a směřuje ji tak k degradaci (Chan et al., 2008). V buňkách s depletovanou PLK1 dochází přirozeně k hromadění Bory a Aurora A se v odpověď oddělí od pólů vřeténka, dochází dokonce k nesprávné maturaci centrozomů. Vypadá to tedy, že Bora soupeří s TPX2 o vazbu Aurory A a zvýšené množství Bory tak vede k defektům spojeným s funkcí Aurory A závislých na vazbě kinázy k TPX2 (Chan et al., 2008). Katalytická aktivita PLK1 je tedy nutná pro správnou lokalizaci AURKA a TPX2, což ukazuje na hierarchický vztah mezi těmito kinázami (De Luca et al., 2006).

4. Materiál a metody

4.1 Izolace a kultivace oocytů

Pro experimenty byly použity transgenní myši kmene CD1. Vaječníky byly získány z myši starých 6-12 týdnů, které byly stimulovány PMSG (5IU PMSG na myš) 46 hodin před izolací. Po izolaci byly vaječníky přemístěny do manipulačního média (Tab. 3) doplněného 2,5 μ M Milrinone (inhibitor PDE3A; inhibicí PDE3A se zabraňuje štěpení cAMP a zachovává se tak první meiotický blok, oocyty by jinak po uvolnění z kumulů samovolně znovuzahájily meiózu). Z vaječnicků byly následně izolovány meioticky kompetentní oocyty (v terciálních folikulech), z nichž se mechanicky odstranily kumulární buňky. Oocyty bez kumulu byly následně uchovávány v kultivačním médiu (Tab. 3) doplněném 2,5 μ M Milrinone, a to po dobu 2 hod. před zahájením každého experimentu. Po mikroinjekci RNA byly oocyty ponechány v kultivačním médiu doplněném 2,5 μ M Milrinone po dobu 2 hodin. Následovalo promytí oocytů v kultivačním médiu bez Milrinone, aby oocyty mohly zahájit zrání. Poté byly oocyty vloženy do osmi-jamkových komůrek (Lab-Tek) s 500 μ l kultivačního média s příslušným inhibitorem, dány na LCI (Live Cell Imaging) a kultivovány 18 hod.

manipulační médium	M2 medium (Sigma), 45 mg/ml Penicilin, 60 mg/ml Streptomycin
kultivační médium	MEM medium (Sigma), 50 mg/ml Gentamycin, 4 mg/ml BSA, 375 μ l Pyruvát - do 15 ml

Tabulka 3. Média použita pro manipulaci a kultivaci oocytů.

4.2. Kinázové inhibitory

Pro studium funkce PLK1 v meióze u myších oocytů jsme použili postup akutní inaktivace kinázy specifickým molekulárním inhibitorem BI2536 (Lenart et al., 2007) v koncentraci 500 nM (Tab. 4). Pro studium funkce AURKA v meióze u myších oocytů jsme použili postup akutní inaktivace kinázy specifickým molekulárním inhibitorem MLN 8054 (Manfredi et al., 2007) v koncentraci 1 μ M (Tab. 4). Všechny inhibitory byly rozpuštěny v DMSO, také kultivační médium pro oocyty v kontrolní skupině bylo doplněno odpovídajícím způsobem zředěným DMSO.

kináza	inhibitor	výrobce	použitá koncentrace
PLK1	BI 2536	AxonLab	500 nM
AURKA	MLN 8054	Selleckchem	1 μ M

Tabulka 4. Použité kinázové inhibitory.

4.3 RNA

Vektory pro syntézu RNA byly štěpeny vhodnými nukleázami (New England BioLabs) (Tab 5). Linearizované vektory byly vyčištěny pomocí QIAquick Gel Extraction Kit (Qiagen), in vitro transkripce byla provedena pomocí mMESSAGING mMACHINE Kit (Invitrogen). Výsledná RNA byla vyčištěna pomocí RNeasy Mini Kit (Qiagen) a ředěna v RNase-free vodě (Ambion) na koncentraci potřebnou pro mikroinjekce (Tab 5).

	RNA	nukleáza	použitá koncentrace
1	H2B-mCherry (bez polyA)	Asc1	75 ng/ μ l
2	MAP4-EGFP (polyA)	Nhe1	125 ng/ μ l

Tabulka 5. Zdroje použitých vektorů, pro syntézu RNA: 1 (McGuinness et al., 2009), 2 (Schuh et Ellenberg, 2007).

4.4 Mikroinjekce

Pro mikroinjekce byly oocyty přeneseny do manipulačního média doplněného 2,5 μ M Milrinone. Do oocytů bylo injektováno 2-5 pl RNA pomocí MIS-5000 mikromanipulátoru (Burleigh, EXFO Life Sciences, USA) a PM 2000B4 mikroinjektoru (MikroData Instrument, USA). Mikropipety pro mikroinjekce byly připraveny na p97 Pipette Puller (Sutter Instrument Company, USA).

4.5 Zobrazování živých buněk – LCI (Live Cell Imaging)

Oocyty byly skenovány na laserovém konfokálním mikroskopu Leica SP5 pomocí olejového imerzního objektivu se zvětšením 40x, v bitovém formátu 1024x1024, rychlostí 600 Hz, konfokální řez 7,5 μ m. GFP signál (MAP4-GFP) byl excitován pomocí 488 nm argonového laseru a detekován v rozsahu vlnových délek 500 až 560 nm. Signál autofluorescencí (AF) cytoplazmy byl excitován 488 nm laserem a detekován v rozmezí od 490 do 499 nm. Signál mCherry byl excitován DPSS 561 nm laserem a detekován v rozsahu vlnových délek 580 až 650 nm. V experimentech, kde byl snímán signál mCherry společně se

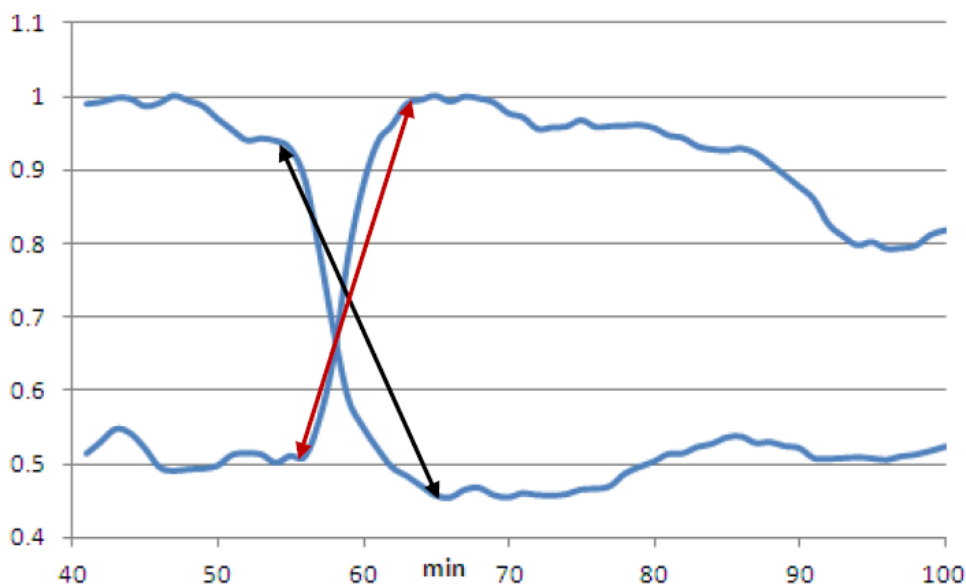
signálem GFP jsme použili sekvenčního snímání, aby se zabránilo spektrálnímu překryvu. Oocyty byly po dobu snímání na konfokálním mikroskopu kultivovány v osmi-jamkových komůrkách (Lab-Tek) v 500 μ l kultivačního média.

4.6 Editace dat

Údaje z konfokálního mikroskopu byly zpracovány v programu pro analýzu obrazu Fiji (Schindelin et al., 2012). Všechny výsledky vygenerované programem Fiji byly následně převedeny do Excelu pro další zpracování. Tyto výsledky byly nakonec podrobeny statistické analýze.

Proces GVBD byl měřen jako Mean Gray Value (MGV) signálu přirozené autofluorescence cytoplazmy ve vybrané oblasti v jádře v jednom konfokálním řezu, pohyby jádra byly pro účely měření eliminovány pomocí "Correct 3D drift" plug-in, který byl použit na každém oocytu zvlášť. Pak byly výsledky zpracovány v programu Excel: nejdříve byl aplikován klouzavý průměr z 5 časových bodů (pro vyhlazení budoucí křivky), pak byla data pro každý oocyt normalizována na maximální hodnotu a vynesena do grafu. Zlomové body křivek představující začátek a konec rozpadu jaderné membrány byly určeny manuálně (Graf1).

Kondenzace chromatinu - CC byla určena pomocí měření objemu chromatinu. Prostřednictvím tresholdu byl definován signál H2B- mCherry tak, aby se z měření vyloučilo pozadí. Objem tresholdovaného chromatinu byl měřen pomocí integrované denzity (ID), což je funkce sčítající hodnotu všech označených pixelů ve všech řezech. V Excelu byly sečteny hodnoty z jednotlivých řezů pro každý časový bod zvlášť. Pak byla data normalizována na maximální hodnotu, upravena pomocí klouzavého průměru a vynesena do grafu (Graf 1). Další postup byl totožný jako v případě GVBD.



Graf 1. GVBD znázorňuje rostoucí křivka, klesající křivka znázorňuje proces CC – kondenzace chromatinu; Začátek a konec GVBD a CC byl stanoven ručně ve zlomových bodech křivky: červená dvojitá šipka značí body startu a konce GVBD, černá dvojitá šipka značí body startu a konce CC.

Data potřebná pro odhad objemu dělicího vřeténka byla získána stejným postupem jak v případě CC, ovšem na signálu MAP4-EGFP. Pak byla data pro jednotlivé oocyty srovnána podle GVBD - GVBD je brán jako bod 0. Následně byly hodnoty vyděleny 256 (= hodnota 1 pixelu v 8bitovém tresholdovaném obrázku). Výsledek odpovídal celkové ploše všech řezů daného časového bodu. Pro odhad objemu byl použit tzv. Cavalieriho princip, který říká, že objem objektu lze odvodit pomocí součtu ploch pravidelně rozmístěných řezů a následným vynásobením plochy šířkou těchto řezů, v tomto případě 7,5 μm . Výsledná data byla opět vynesena do grafů. Pro statistické vyhodnocení byly použity výsledné objemy jednotlivých vřetének odečteny z grafů.

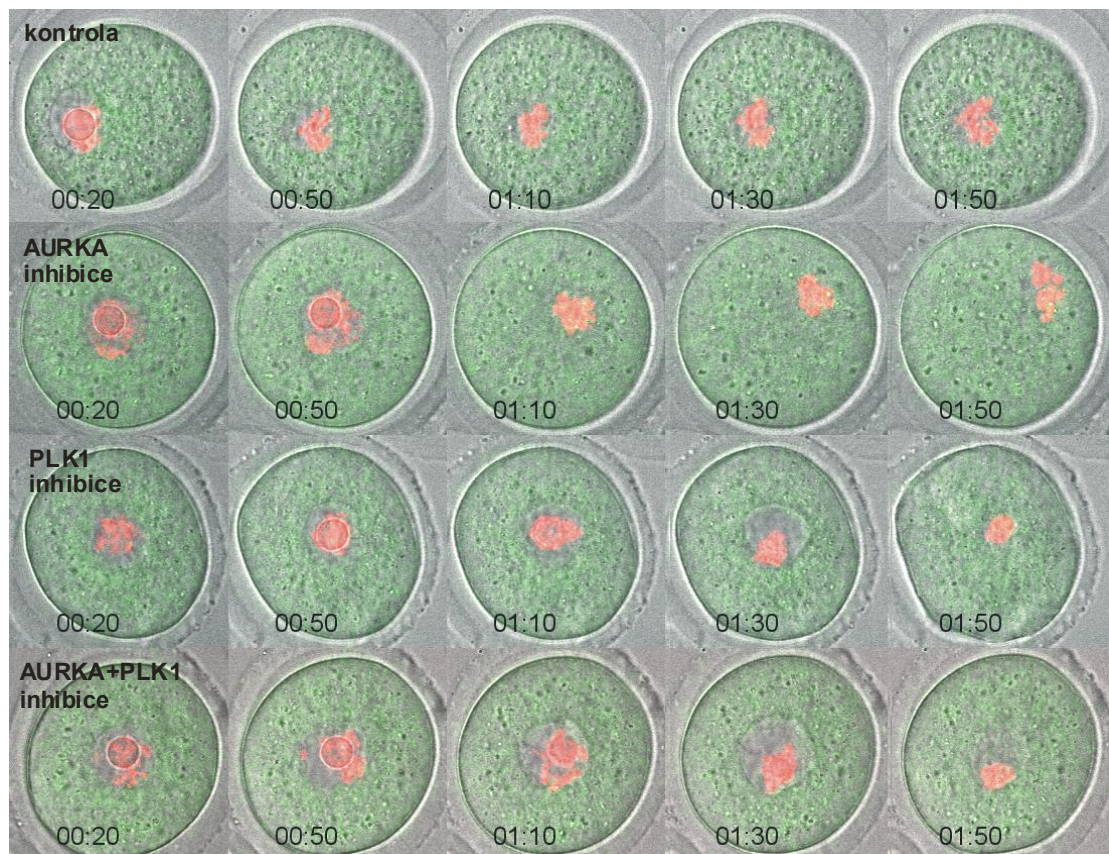
4.7 Statistické analýzy

Získaná data byla podrobena statistické analýze ve statistickém programu R (R Development Core Team 2012). Pro porovnání hodnot byl použit neparametrický dvouvýběrový Wilcoxon rank sum test pro případ srovnávání dvou skupin s jiným než normálním rozdělením, nebo Welch two sample T-test pro srovnání dvou skupin s normálním rozdělením. Rozdíly mezi skupinami byly považovány za statisticky významné, pokud byla p-hodnota nižší než 0,05.

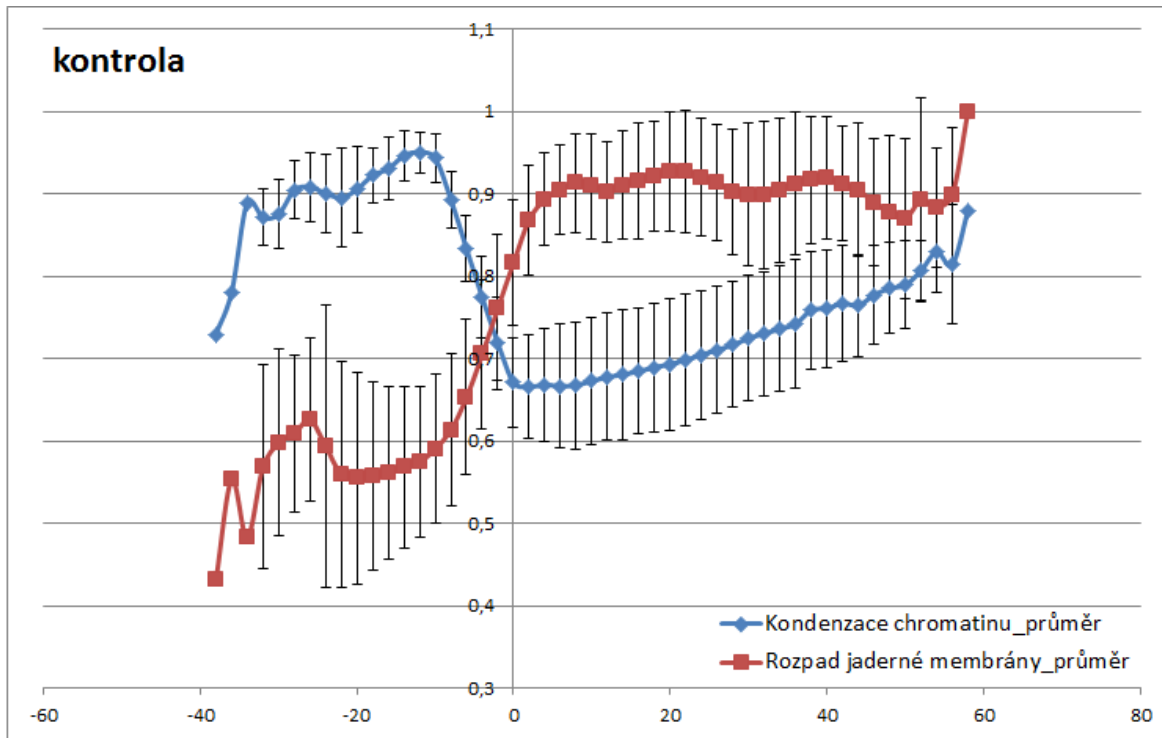
5. Výsledky

5.1 PLK1 a AURKA hrají roli v načasování znovuzahájení meiózy

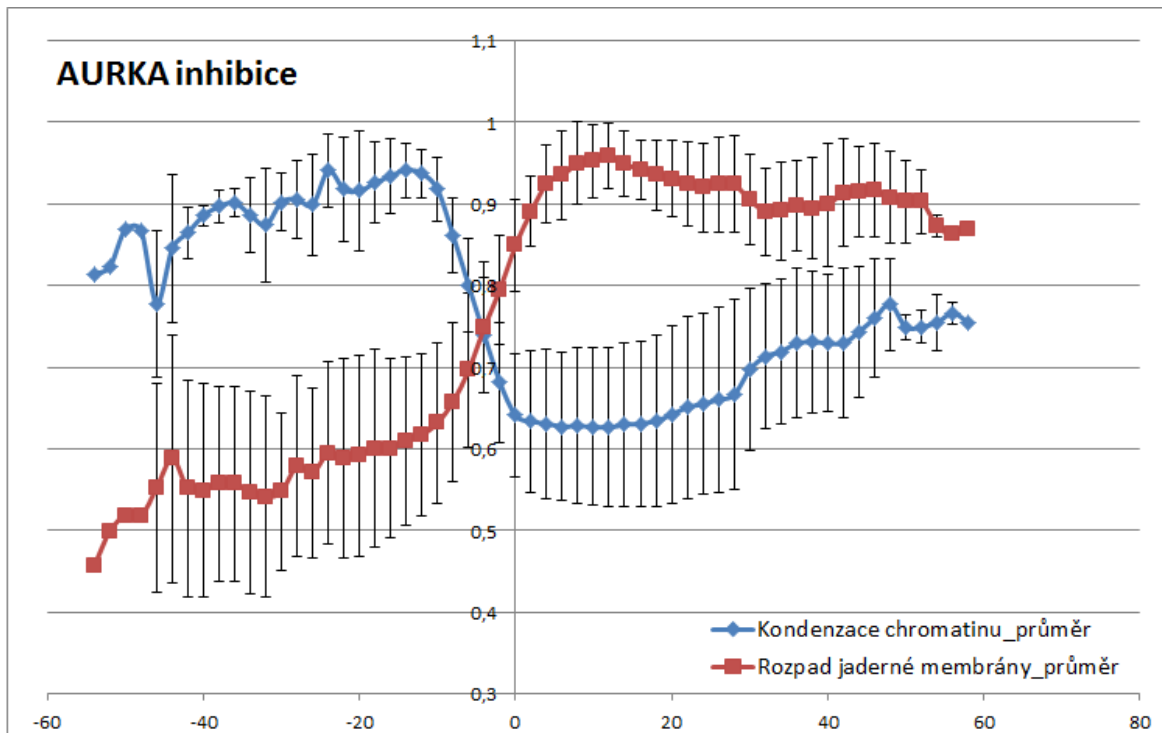
Inhibice PLK1 a AURKA od počátku zrání vede k výraznému zpoždění rozpadu jaderné membrány (GVBD) a kondenzace chromatinu (CC) a zároveň ovlivňuje délku těchto dvou prvních meiotických událostí (Obr. 21).



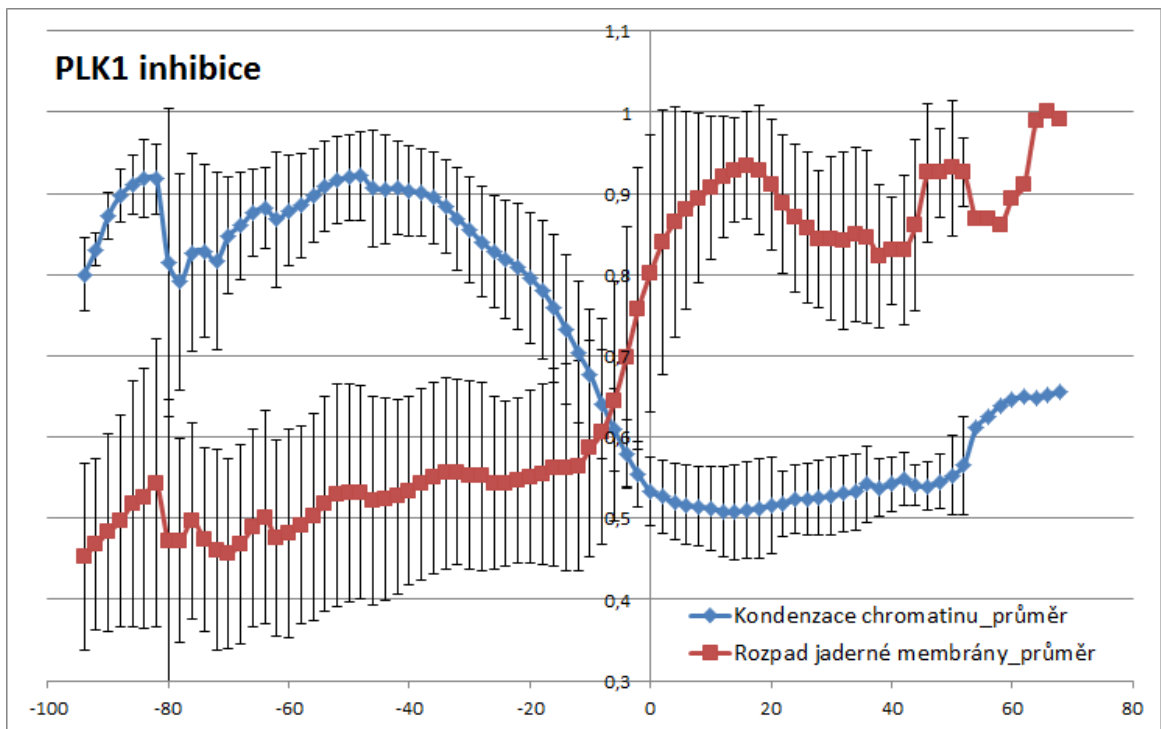
Obrázek 21. Snímky kontrolních oocytů a oocytů ošetřených inhibitory získané z LCI (Live cell imaging). Zeleně zbarvená je autofluorescence (AF) cytoplasmy a červený je chromatin. Proces GVBD je reprezentován expanzí zeleného signálu AF do tmavé oblasti jádra. Smršťování oblasti červeného signálu představuje kondenzaci chromatinu. V čase 50 minut po začátku zrání dokončují kontrolní oocyty proces GVBD a CC, naopak oocyty ošetřené inhibitory tyto procesy dokončují se různým zpožděním.



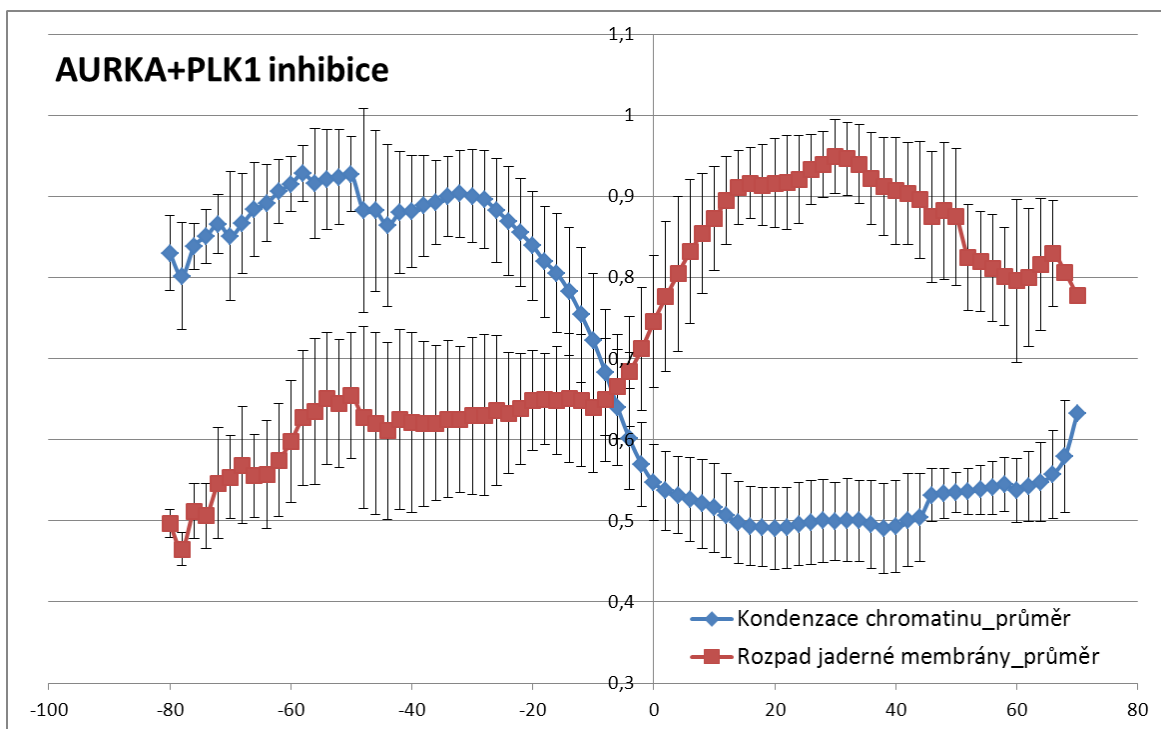
Graf 2. Průběh procesu kondenzace chromatinu a rozpadu jaderné membrány u kontrolních myších oocytů. Konec kondenzace chromatinu je na časové ose brán jako bod 0.



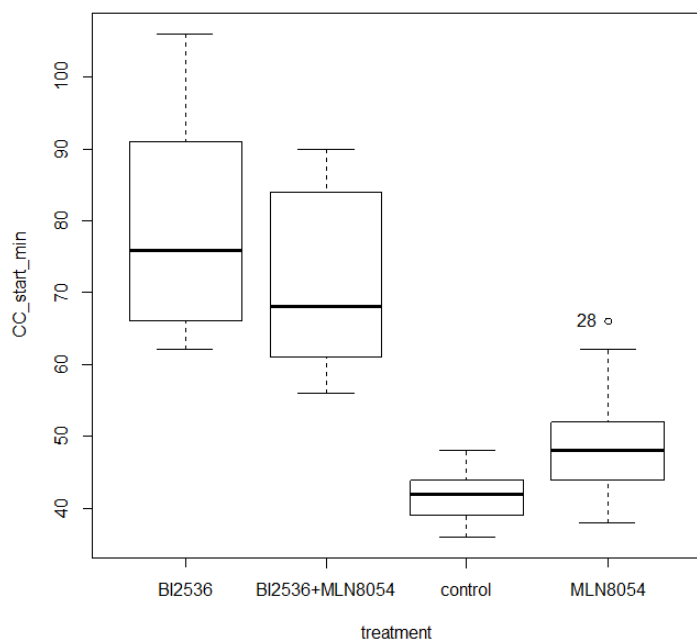
Graf 3. Průběh procesu kondenzace chromatinu a rozpadu jaderné membrány u myších oocytů s inhibovanou AURKA. Konec kondenzace chromatinu je na časové ose brán jako bod 0.



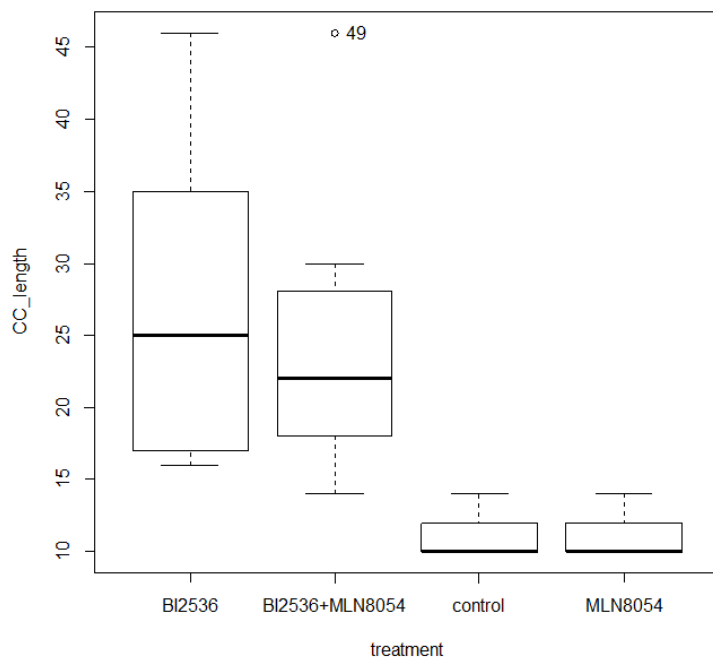
Graf 4 Průběh procesu kondenzace chromatinu a rozpadu jaderné membrány u myších oocytů s inhibovanou PLK1. Konec kondenzace chromatinu je na časové ose brán jako bod 0.



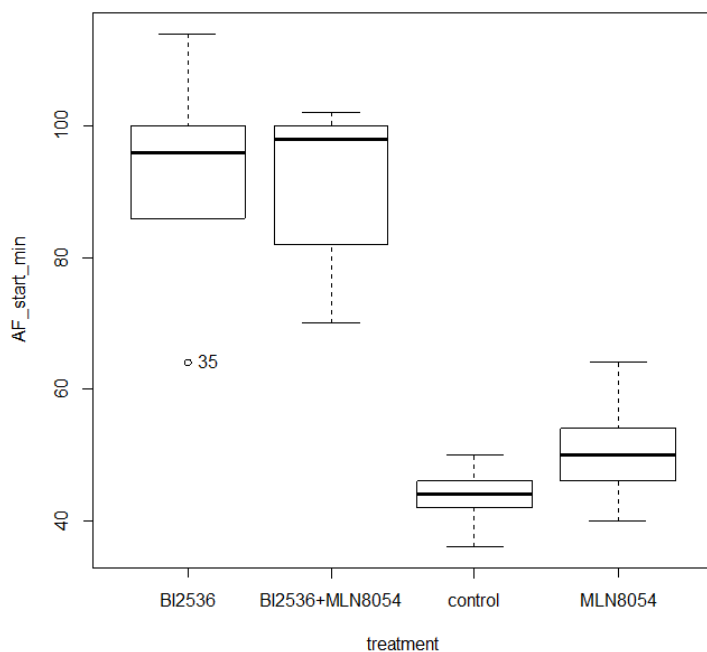
Graf 5. Průběh procesu kondenzace chromatinu a rozpadu jaderné membrány u myších oocytů s inhibovanými kinázami AURKA a PLK1. Konec kondenzace chromatinu je na časové ose brán jako bod 0.



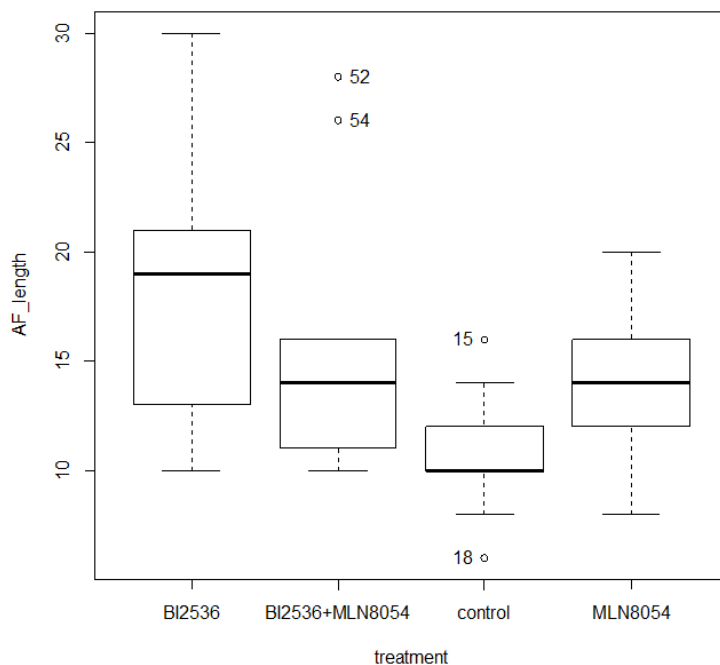
Graf 6. Začátek kondenzace chromatinu od počátku zrání myších oocytů. BI2536=inhibitor PLK1, MLN8054=inhibitor AURKA



Graf 7. Doba trvání kondenzace chromatinu myších oocytů. BI2536=inhibitor PLK1, MLN8054=inhibitor AURKA



Graf 8. Začátek rozpadu jaderné membrány od počátku zrání myších oocytů. BI2536=inhibitor PLK1, MLN8054=inhibitor AURKA



Graf 9. Doba trvání rozpadu jaderné membrány myších oocytů. BI2536=inhibitor PLK1, MLN8054=inhibitor AURKA

	Kontrola (15 oocytů)	AURKA inhibice (19 oocytů)	PLK1 inhibice (12 oocytů)	AURKA+PLK1 inhibice (11 oocytů)
začátek kondenzace chromatinu	42 min	49 min	79 min	72 min
trvání kondenzace chromatinu	10 min	10 min	25 min	22 min
začátek rozpadu jaderné membrány	44 min	49 min	94 min	98 min
trvání rozpadu jaderné membrány	11 min	14 min	18 min	14 min

Tabulka 6.: Časové údaje jednotlivých fází jaderných událostí u všech skupin oocytů.

začátek kondenzace chromatinu	kontrola	AURKA inhibice	PLK1 inhibice	AURKA+PLK1 inhibice
kontrola		0,0005627	1,675e-06	1,359e-05
AURKA inhibice	0,0005627		9,146e-06	0,0001081
PLK1 inhibice	1,675e-06	9,146e-06		0,2776
AURKA+PLK1 inhibice	1,359e-05	0,0001081	0,2776	
trvání kondenzace chromatinu	kontrola	AURKA inhibice	PLK1 inhibice	AURKA+PLK1 inhibice
kontrola		0,3738	7,069e-06	1,423e-05
AURKA inhibice	0,3738		2,568e-06	8,266e-06
PLK1 inhibice	7,069e-06	2,568e-06		0,4991
AURKA+PLK1 inhibice	1,423e-05	8,266e-06	0,4991	
začátek rozpadu jaderné membrány	kontrola	AURKA inhibice	PLK1 inhibice	AURKA+PLK1 inhibice
kontrola		0,004002	8,184e-09	1,913e-05
AURKA inhibice	0,004002		1,612e-08	6,946e-06
PLK1 inhibice	8,184e-09	1,612e-08		0,8035
AURKA+PLK1 inhibice	1,913e-05	6,946e-06	0,8035	
trvání rozpadu jaderné membrány	kontrola	AURKA inhibice	PLK1 inhibice	AURKA+PLK1 inhibice
kontrola		0,005298	0,001732	0,0479
AURKA inhibice	0,005298		0,04302	0,93
PLK1 inhibice	0,001732	0,04302		0,2142
AURKA+PLK1 inhibice	0,0479	0,93	0,2142	

Tabulka 7. Porovnání fází jaderných událostí mezi jednotlivými skupinami oocytů; vyjádřeno v p-hodnotách.

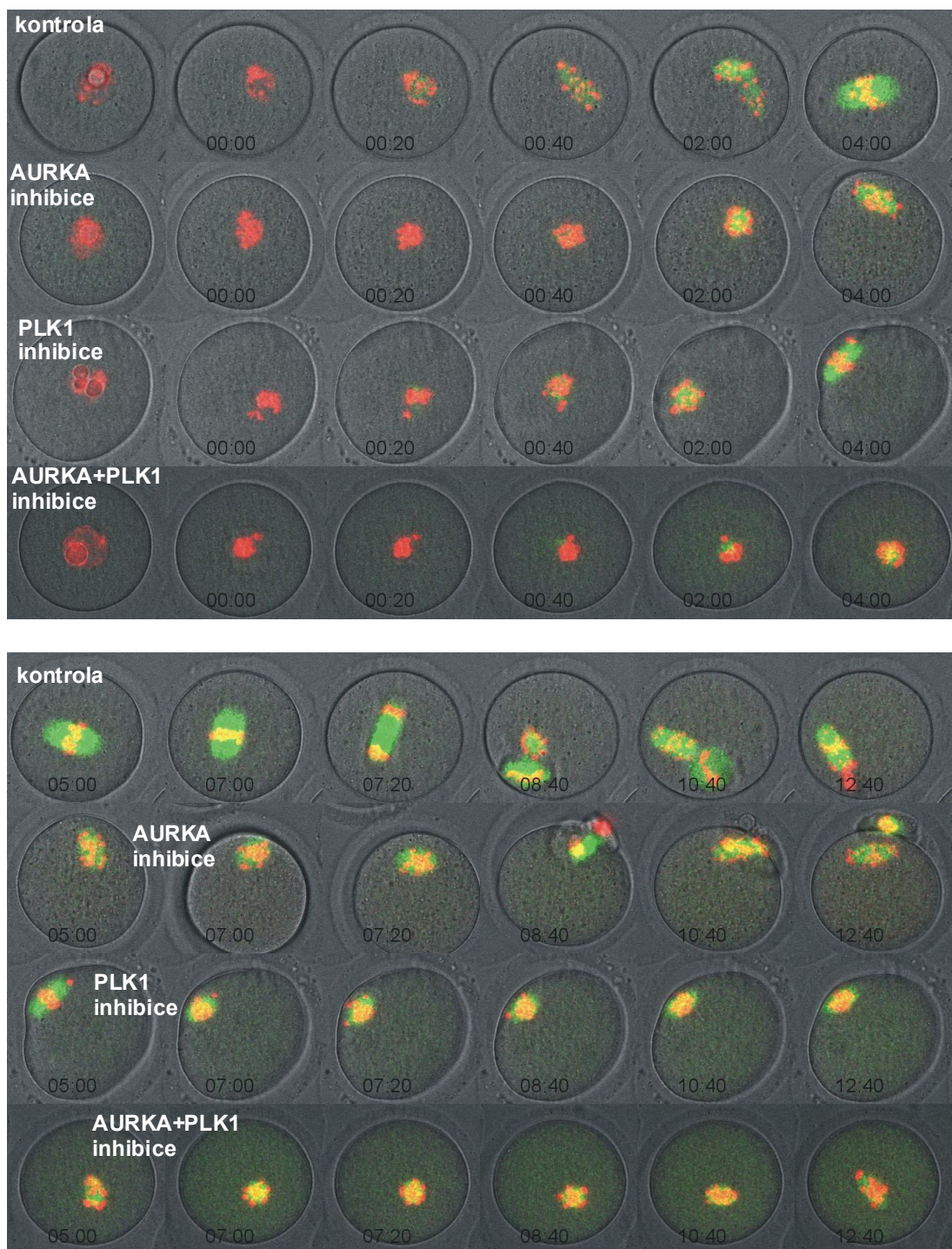
Kondenzace chromatinu (CC): Všechny myší oocyty ošetřené inhibitory vykazují signifikantní zpoždění zahájení kondenzace chromatinu oproti kontrolním oocytům bez inhibitorů (Graf 6, Tab. 6,7). Inhibice PLK1 a AURKA+PLK1 má v oocytech tentýž efekt, který je signifikantně větší než efekt samotné inhibice AURKA. Inhibice samotné AURKA nemá zásadní dopad na délku trvání kondenzace chromatinu na rozdíl od inhibice PLK1 nebo PLK1+AURKA, která oproti kontrolním oocytům bez inhibitorů signifikantně prodlužuje průběh kondenzace chromatinu. Mezi inhibicí PLK1 a PLK1+AURKA není v délce trvání CC žádný zásadní rozdíl, je ale opět signifikantně větší než efekt samotné inhibice AURKA (Graf 7, Tab. 7).

Rozpad jaderné membrány (GVBD): Inhibice AURKA i PLK1 v myších oocytech zásadně ovlivňuje čas zahájení rozpadu jaderné membrány oproti kontrolním oocytům (Graf 8, Tab. 6,7). Rozdíl v opoždění zahájení rozpadu je signifikantní i v případě PLK1 a PLK1+AURKA inhibice ve srovnání s inhibicí samotné AURKA. Doba trvání rozpadu jaderné membrány (resp. pronikání částic s AF do permeabilizovaného jádra) se signifikantně liší od kontrolních oocytů ve všech případech skupin oocytů s inhibitory (Graf 9, Tab. 6,7). Kombinace inhibitorů AURKA a PLK1 neprodlužuje oproti inhibici AURKA rozpad jaderné membrány. Samotná inhibice PLK1 má signifikantní dopad na dobu trvání GVBD ve srovnání s AURKA inhibicí. Signifikantní rozdíl mezi inhibicí PLK1 a kombinací inhibice PLK1 a AURKA není. (Graf 9, Tab. 7).

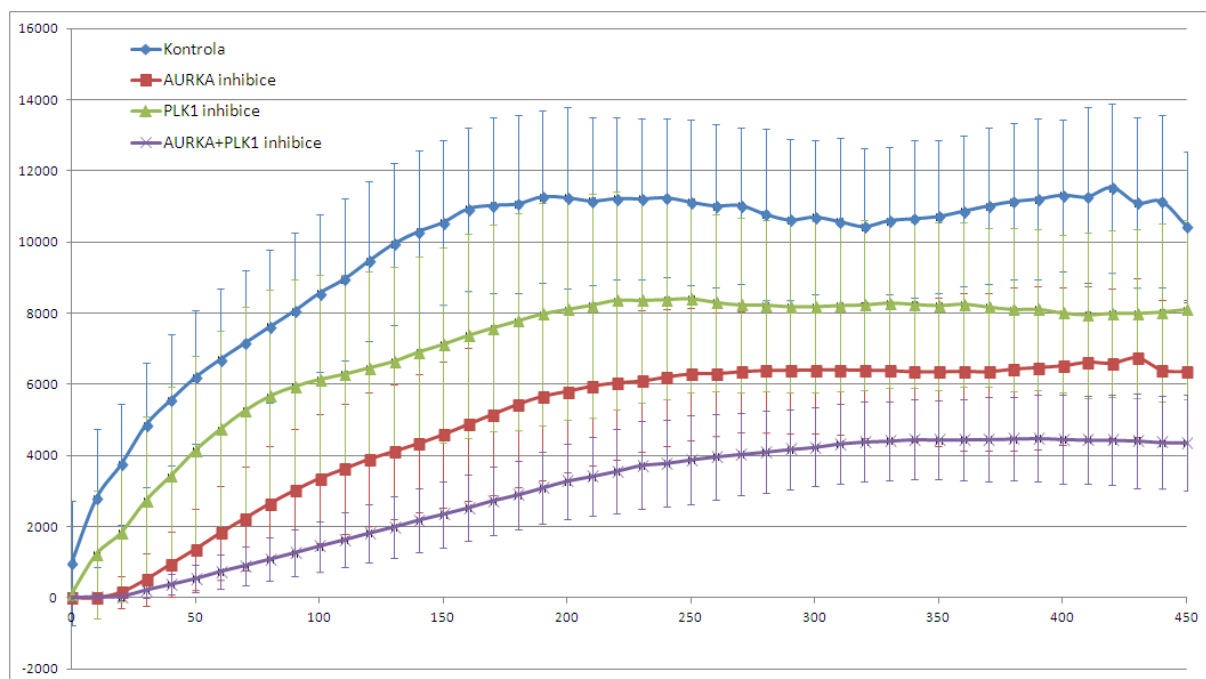
Inhibice AURKA, PLK1 i jejich kombinace od počátku zrání, způsobuje v myších oocytech zpožděný začátek kondenzace chromozomů a rozpadu jaderné membrány, a také vede k delší době trvání těchto dvou jaderných událostí. V kontrolních oocytech začne chromatin kondenzovat těsně před rozpadem jaderného obalu, v AURKA inhibovaných oocytech probíhá kondenzace současně s GVBD, ale v PLK1 inhibovaných oocytech GVBD nastane až tehdy, kdy je chromatin téměř úplně kondenzován (Tab. 6).

5.2 PLK1 a AURKA se účastní výstavby dělicího vřeténka

Inhibice AURKA a PLK1 v myších oocytech nebrání vzniku bipolárního dělicího vřeténka (Obr. 22), ale má vliv na jeho výsledný objem (Graf 10).



Obrázek 22. Výstavba dělicího vřeténka v kontrolních oocytech a oocytech ošetřených inhibitory; snímky získané z LCI (Live cell imaging); oocyty byly pro vizualizaci procesu výstavby dělicího vřeténka microinjectovány H2b-mCherry (červená, chromatin) a MAP4-GFP (zelená, vřeténko); GVBD se bere jako čas 0.



Graf 10. Výstavba dělicího vřeténka v kontrolních oocytech a oocytech ošetřených inhibitory; graf ukazuje rostoucí objem dělicího vřeténka měřený na MAP4 signálu; křivky představují průměrné hodnoty; uvedeny jsou směrodatné odchylky

	Kontrola (7 oocytů)	AURKA inhibice (8 oocytů)	PLK1 inhibice (9 oocytů)	AURKA+PLK1 inhibice (18 oocytů)
objem dělicího vřeténka na konci výstavby (μm^3)	11171.53	6383.749	8644.131	4219.958
začátek výstavby dělicího vřeténka	0 min	34.5 min	20 min	30 min
doba dosažení nejvyššího objemu dělicího vřeténka	164 min	223 min	214 min	258 min
doba výstavby dělicího vřeténka	161 min	190 min	200 min	223 min

Tabulka 8. Objem dělicího vřeténka a časové údaje (počítáno od okamžiku rozpadu jaderné membrány) jednotlivých fází výstavby dělicího vřeténka u všech skupin oocytů.

objem dělicího vřeténka na konci výstavby	kontrola	AURKA inhibice	PLK1 inhibice	AURKA+PLK1 inhibice
kontrola		0,000862	0,06097	8,67e-05
AURKA inhibice	0,000862		0,05522	0,0001081
PLK1 inhibice	0,06097	0,05522		0,000826
AURKA+PLK1 inhibice	8,67e-05	0,0001081	0,000826	
začátek výstavby dělicího vřeténka	kontrola	AURKA inhibice	PLK1 inhibice	AURKA+PLK1 inhibice
kontrola		0,001082	0,02469	0,000277
AURKA inhibice	0,001082		0,002281	1
PLK1 inhibice	0,02469	0,002281		0,000549
AURKA+PLK1 inhibice	0,000277	1	0,000549	
doba dosažení nejvyššího objemu dělicího vřeténka	kontrola	AURKA inhibice	PLK1 inhibice	AURKA+PLK1 inhibice
kontrola		0,00984	0,08268	1,54e-07
AURKA inhibice	0,00984		0,7603	0,09863
PLK1 inhibice	0,08268	0,7603		0,1255
AURKA+PLK1 inhibice	1,54e-07	0,09863	0,1255	
doba výstavby dělicího vřeténka	kontrola	AURKA inhibice	PLK1 inhibice	AURKA+PLK1 inhibice
kontrola		0,1541	0,1437	8,122e-05
AURKA inhibice	0,1541		0,7383	0,1363
PLK1 inhibice	0,1437	0,7383		0,3952
AURKA+PLK1 inhibice	8,122e-05	0,1363	0,3952	

Tabulka 9. Porovnání fází výstavby dělicího vřeténka mezi jednotlivými skupinami oocytů; vyjádřeno v p-hodnotách.

Maximální objem dělicího vřeténka na konci jeho výstavby (Graf 10): Na hladině významnosti 5% je oproti kontrole signifikantně menší dělicí vřeténko po inhibici AURKA a AURKA+PLK1 (Tab. 9). Pro PLK1 inhibici je oproti kontrole $p=0,06$, to znamená trend k menšímu dělicímu vřeténku. 5% hladinu u p-hodnoty také lehce přesahuje rozdíl mezi PLK1 a AURKA inhibicí (AURKA inhibice má menší dělicí vřeténko než PLK1 inhibice). Společná inhibice PLK1+AURKA vykazuje signifikantně menší dělicí vřeténko než samotná AURKA nebo PLK1 inhibice (Tab. 9).

Začátek formování dělicího vřeténka po rozpadu jaderné membrány: Všechny myší oocyty ošetřené inhibitory vykazují signifikantní zpoždění zahájení výstavby dělicího vřeténka oproti kontrolním oocytům bez inhibitorů (Tab. 8,9). AURKA inhibice opoždí zahájení výstavby dělicího vřeténka signifikantně oproti inhibici PLK1. Mezi inhibicí AURKA a PLK1+AURKA není rozdíl. PLK1+AURKA inhibované oocyty zahajují výstavbu dělicího vřeténka signifikantně později než jen PLK1 inhibované oocyty (Tab. 9).

Doba nejvyššího objemu dělicího vřeténka: Inhibice AURKA a AURKA+PLK1 ukazuje signifikantně pozdější dobu ukončení výstavby dělicího vřeténka než v kontrolní skupině oocytů. U inhibice PLK1 je trend ke zpoždění ($p=0,08$). Rozdíl mezi PLK1 a AURKA, stejně tak jako mezi inhibicí PLK1 a PLK1+AURKA, není signifikantní. PLK1+AURKA inhibice vykazuje trend k pozdějšímu ukončení výstavby oproti samotné AURKA inhibici ($p=0,098$) (Tab. 9).

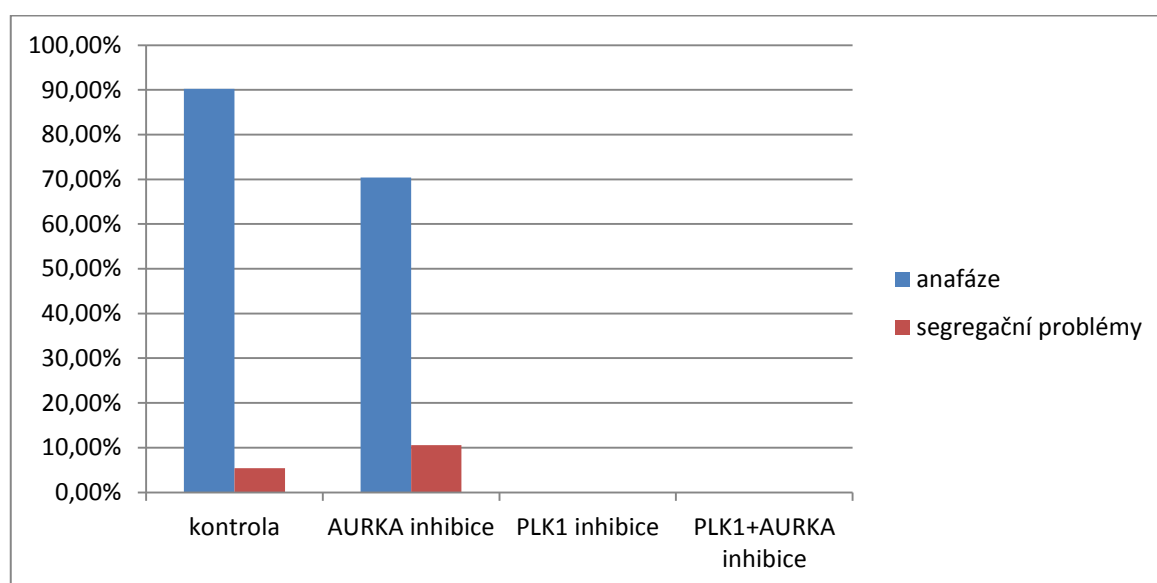
Doba výstavby dělicího vřeténka: Ve srovnání s kontrolními oocyty se dělicí vřeténko formuje déle jen při inhibici AURKA+PLK1. Rozdíly mezi dalšími skupinami oocytů nejsou statisticky významné (Tab. 9).

5.3 PLK1 inhibované oocyty nepodstupují anafázi

Myší oocyty ošetřené inhibitorem PLK1 na začátku zrání nikdy nedokončí proces cytokineze (Tab.10, Graf 11). Tyto oocyty nejsou schopny podstoupit anafázi a pokračovat tak v dalších fázích meiotického zrání.

	Kontrola (80 oocytů)	AURKA inhibice (48 oocytů)	PLK1 inhibice (11 oocytů)	AURKA+PLK1 inhibice (30 oocytů)
anafáze	90,24%	70,37%	0,00%	0,00%
anafáze se segregačními problémy	5,41%	10,53%		

Tabulka10: Procentuální vyjádření počtu oocytů, které podstupují anafázi.



Graf 11: Procentuální vyjádření počtu oocytů, které podstupují anafázi.

Blok v metafázi I přetrvával i poté, co jsme oocyty nechali zrát, inhibitor BI2536 jsme přidali až po 5 hodinách zrání a po další hodině jsme přidali inhibitor SAC – reversin (Santaguida, Tighe et al. 2010) (Tab. 11.)

	PLK1 inhibice od počátku zrání (11 oocytů)	PLK1 inhibice po 5 hod zrání + inhibice SAC (13 oocytů)
Blok v metafázi I	100%	100%

Tabulka 11. Procentuální vyjádření počtu oocytů, které zůstávají zastaveny v metafázi I.

Stejný efekt jako inhibice samotné PLK1 má společná inhibice obou kináz PLK1+AURKA. Většina myších oocytů s inhibovanou AURKA jsou schopny podstoupit anafázi i vydělit I. polární tělísko, avšak oproti kontrolním oocytům ve sníženém počtu a s vyššími segregačními problémy (Tab.10, Graf 11).

6. Diskuse

6.1 PLK1 a AURKA hrají roli v načasování znovuzahájení meiózy

V našich experimentech všechny myší oocyty ošetřené inhibitory BI2536 a MLN8054 od počátku zrání byly schopny znovuzahájení meiózy. Inhibice však v oocytech způsobuje zpožděný začátek kondenzace chromozomů a rozpadu jaderné membrány, a také vede k delší době trvání těchto dvou jaderných událostí. Tyto pokusy ukázaly, že k výraznému zpoždění dochází především v oocytech s inhibovanou PLK1.

Na somatických buňkách bylo prokázáno, že PLK1 je důležitá pro správné navázání mikrotubulů (MT), které se účastní GVBD, a že bez správné činnosti těchto MT je GVBD zpožděno (Beaudouin et al., 2002). V oocytech ale mikrotubuly nepřispívají k rozpadu jaderné membrány (Lenart et Ellenberg, 2003), takže zpoždění GVBD po inhibici PLK1 v meiotickém zrání není pravděpodobně způsobeno touto poruchou činnosti mikrotubulů.

U kondenzace chromatinu (CC) není popsán žádný mechanismus, který by ukazoval na to, že tento proces probíhá jinak v oocytech než v somatických buňkách. Lze tedy předpokládat, že molekuly, které se v mitóze účastní CC, mohou hrát roli také v kondenzaci chromatinu v oocytech. Kromě jiných molekul a molekulárních komplexů hraje v kondenzaci chromatinu roli molekula condensin. Ta je důležitá pro včasné zahájení CC. PLK1 je potřebná pro plnou aktivaci condensinu II v HeLa buňkách (Abe, S. et al., 2011), takže zpoždění kondenzace chromatinu, které bylo pozorováno v PLK1 inhibovaných myších oocytech může být způsobeno absencí PLK1 při fosforylaci condensinu.

Kromě toho, že inhibice PLK1 v myších oocytech od počátku zrání způsobuje zpožděný začátek kondenzace chromozomů a rozpadu jaderné membrány, nastává v PLK1 inhibovaných oocytech GVBD až tehdy, kdy je chromatin téměř úplně kondenzován. Na rozdíl od kontrolních oocytů, kdy začne chromatin kondenzovat těsně před rozpadem jaderného obalu. Tento důsledek inhibice PLK1 je v souladu s výsledky, které byly již popsány na HeLa buňkách. Tyto buňky také podstupují GVBD i několik hodin po kondenzaci chromozomů (Lenart et al., 2007).

Při inhibici Aurory A byl na somatických buňkách také popsán zpožděný vstup do mitózy a prodloužení doby trvání jednotlivých mitotických fází (Seki et al., 2008), avšak dosavadní publikované práce popisující vliv inhibice AURKA na zahájení meiózy nejsou zcela jednotné. Někteří autoři popisují v oocytech s inhibovanou AURKA zpoždění rozpadu jaderné membrány (Yao et al., 2004; Šašková et al., 2008). Jiné práce ale toto tvrzení

nepotvrzují a sledávají vliv inhibice Aurory A na GVBD v podstatě zanedbatelným (Castro et al., 2003; Ding et al., 2011). Naše experimenty ukázaly, že myší oocyty ošetřené inhibitorem MLN8054 vykazují signifikantní zpoždění zahájení kondenzace chromatinu ($p=0,00056$) i zahájení rozpadu jaderné membrány ($p=0,004$) oproti kontrolním oocytům, i když ne tak výrazné jako v případě inhibice PLK1. Inhibice samotné AURKA nemá zásadní dopad jen na délku trvání kondenzace chromatinu na rozdíl od inhibice PLK1 nebo PLK1+AURKA.

Potvrdilo se, že obě kinázy AURKA a PLK1 hrají zcela jistě roli v procesu znovuzahájení meiózy. Vstup do mitózy i meiózy iniciuje Cdk1, která aktivuje kinázy Auroru A a PLK1, které ve smyčce zpětnou vazbou na Cdk1 podporují rychlý a včasný vstup do mitózy i meiózy a koordinovaně regulují různé aspekty těchto událostí (Van Horn et al., 2010). Bez správné funkce kináz AURKA a PLK1 je tato koordinace narušena a dochází k závažným problémům již při samotném zahájení buněčného dělení.

6.2 PLK1 a AURKA se účastní výstavby dělicího vřeténka

Nejvýraznější efekt inhibice PLK1 a AURKA byl v somatických buňkách pozorován při výstavbě abnormálních a monopolárních dělicích vřetének (Sunkel et Glover, 1988; Glover et al., 1995). V našich experimentech jsme při inhibici PLK1 a AURKA v myších oocytech žádná taková dělicí vřeténka neviděli. Všechny oocyty ošetřené inhibitory BI2536 a MLN8054 byly schopny vytvořit dělicí vřeténka s dvěma oddělenými póly. Tento rozdíl je pravděpodobně způsoben tím, že oocyty nemají centrozomy, a tak nejsou při výstavbě dělicího vřeténka vystaveny všem problémům spojených s poruchami při zráním a dělení centrozomu, které se objevují po inhibici PLK1 a AURKA v somatických buňkách.

Navzdory skutečnosti, že tvorba dělicího vřeténka v myších oocytech není omezena žádným problémem souvisejícím se zráním a dělením centrozomu, lze v tomto procesu pozorovat jednu pozoruhodnou změnu. Po inhibici AURKA nebo PLK1, případně po inhibici obou kináz byl objem dělicího vřeténka podstatně menší než v kontrolních oocytech (AURKA $p=0,00086$, PLK1 $p=0,06$, AURKA+PLK1 $p=8,67e-05$). V somatických buňkách bylo prokázáno, že PLK1 je důležitá pro nukleaci mikrotubulů, kdy se účastní navazování γ -tubulinu do centrozomů během profáze (Sumara et al., 2004) a AURKA je zodpovědná za správný průběh maturace a separace centrozomů a zodpovídá také za délku a četnost astrálních mikrotubulů (Giet et al., 2002). Ačkoli myší oocyty disponují pouze mikrotubuly organizujícími centry (MTOC), může nějaký podobný mechanismus pro navazování γ -

tubulinu fungovat i zde. Nárůst celkového počtu MTOC během znovuzahájení meiózy (Schuh et Ellenberg, 2007) lze považovat za analogický proces se zráním a dělením centrozomu v somatických buňkách, jako proces, který vyžaduje aktivitu AURKA i PLK1 (Palazzo et al., 2000; Mahen et Venkitaraman, 2012). Inhibice AURKA a PLK1 v myších oocytech pravděpodobně snižuje schopnost MTOC vázat γ -tubulin, což má vliv na správnou nukleaci mikrotubulů, a to může být příčinou sníženého objemu dělicího vřeténka.

Problém při správné nukleaci mikrotubulů a zrání MTOC v oocytech zřejmě stojí i za zpožděním začátku výstavby dělicího vřeténka. V našich experimentech všechny myší oocyty ošetřené inhibitory vykazovaly signifikantní zpoždění zahájení výstavby dělicího vřeténka oproti kontrolním oocytům bez inhibitorů. Ve všech ukazatelích je také efekt inhibice AURKA při výstavbě dělicího vřeténka výraznější oproti inhibici PLK1. Toto zjištění koresponduje se současnými výsledky, které potvrzují, že aktivní AURKA hraje klíčovou roli jak ve zrání a dělení centrozomu v somatických buňkách, tak i ve zrání MTOC v oocytech (Yao et al., 2004; Šašková et al., 2008).

Kinázy AURKA a PLK1 tedy nejsou v myších oocytech nutné pro vytvoření bipolárního dělicího vřeténka, ale prostřednictvím regulace nukleární schopnosti mikrotubulů na MTOC ovlivňují proces jeho výstavby, podílí se na jeho růstu a mají vliv na jeho výsledný objem.

6.3 PLK1 inhibované oocyty nepodstupují anafázi

V našich experimentech všechny myší oocyty ošetřené inhibitorem PLK1 na začátku zrání nejsou schopny podstoupit anafázi, a pokračovat tak v dalších fázích meiotického zrání.

V somatických buňkách bylo prokázáno, že PLK1 je potřebná ke správnému připojení chromozomů na mikrotubuly dělicího vřeténka pomocí kinetochoru (Lenart et al., 2007). Za bezchybný průběh této operace je odpovědný kontrolní bod SAC (spindle assembly checkpoint). PLK1 je potřebná při zahájení separace chromozomů tím, že se podílí na degradaci sekurinu, která je nutná pro aktivaci APC/C (Kudo et al., 2009). V buňkách s inhibovanou PLK1 vážne degradace sekurinu, a tím pádem se vyskytují potíže v segregaci chromozomů (Sumara et al., 2004). Blok v metafázi I po PLK1 inhibici je zřejmě způsoben přetrvávajícím SAC než neaktivním APC/C (Lenart et al., 2007). Pokud je totiž v somatických buňkách inhibován SAC i PLK1 zároveň, blok v metafázi I nenastává a buňky podstupují anafázi (Sumara et al., 2004; Santamaria et al., 2007)

V myších oocytech jsme však stejný efekt neviděli. Blok v metafázi I přetrvával i poté, co jsme oocyty nechali zrát, inhibitor BI2536 jsme přidali až po 5 hodinách zrání a po další hodině jsme přidali inhibitor SAC – reversin. Oocyty nepodstupují anafázi i přes to, že ve srovnání s inhibicí AURKA dosahuje jejich dělicí vřeténko většího objemu. V oocytech musí tedy fungovat i jiný mechanismus, kromě SAC, který neumožní nesrovnaným chromozomům podstoupit anafázi a pokračovat v dalších fázích dělení.

Myší oocyty s inhibovanou AURKA jsou schopny podstoupit anafázi i vydělit I. polární tělísko, avšak oproti kontrolním oocytům ve sníženém počtu a s vyššími segregáčními problémy. Tyto oocyty mají funkční PLK1 a podstupují anafázi, ale oproti kontrolním oocytům však mají defektní dělicí vřeténka, která mohou tyto segregáční problémy způsobovat.

7. Závěr

Pomocí metod zobrazování živých buněk (LCI) a akutní inaktivace kináz vhodnými inhibitory jsme ukázali, že kinázy AURKA a PLK1 jsou důležité pro znovuzahájení meiotického zrání myších oocytů, ovlivňují proces výstavby dělicího vřeténka a jsou důležité pro progresi zrání v dalších fázích meiózy I.

Inhibice AURKA, PLK1 i jejich kombinace od počátku zrání způsobuje v myších oocytech zpožděný začátek kondenzace chromozomů a rozpadu jaderné membrány, a také vede k delší době trvání těchto dvou jaderných událostí. Ve srovnání s kontrolními oocyty tvoří oocyty s inhibovanou AURKA nebo PLK1 menší dělicí vřeténka a v případě inhibice obou kináz je tento efekt ještě výraznější. Oocyty s inhibovanou PLK1 (samostatně nebo v kombinaci s AURKA inhibicí) navíc nikdy neseparují chromosomy a nevydělují pólóvé tělísko.

Kinázy AURKA a PLK1 tedy regulují postup myších oocytů prvním meiotickým dělením. Jejich inhibice vede k podobným fenotypům, což znamená, že se zřejmě srovnatelnými mechanismy podílí na stejných meiotických událostech. A jak indikuje aditivní efekt dvojité inhibice Aurory A a PLK1 na výstavbu dělicího vřeténka, v některých z těchto událostí se mohou i vzájemně zastupovat. Poznání a pochopení principů těchto jejich interakcí během buněčného cyklu může být důležitým nástrojem v boji s mnoha lidskými chorobami.

8. Seznam literatury

- Abe, S., Nagasaka, K., Hirayama, Y., Kozuka-Hata, H., Oyama, M., Aoyagi, Y., Obuse, C., Hirota, T. 2011. The initial phase of chromosome condensation requires Cdk1-mediated phosphorylation of the CAP-D3 subunit of condensin II. *Genes and Development*. 25(8): 863-874.
- Abe, Y., Ohsugi, M., Haraguchi, K., Fujimoto, J., Yamamoto, T. 2006. LATS2-Ajuba complex regulates gamma-tubulin recruitment to centrosomes and spindle organization during mitosis. *FEBS Letters*. 580(3): 782-788.
- Abrieu, A., Doree, M., Fisher, D. 2001. The interplay between cyclin-B-Cdc2 kinase (MPF) and MAP kinase during maturation of oocytes. *Journal of Cell Science*. 114: 257-267.
- Alberts, B., Bray, D., Johnson, A., Lewis, J., Raff, M., Roberts, K., Walter, P. 1998. *Základy buněčné biologie*. Espero Publishing. ISBN 80-902906-0-4.
- Andresson, T., Ruderman, J.V. 1998. The kinase Eg2 is a component of the *Xenopus* oocyte progesterone-activated signaling pathway. *The EMBO Journal*. 17(19): 5627-5637.
- Barr, F.A., Silljé, H.H., Nigg, E.A. 2004. Polo-like kinases and the orchestration of cell division. *Nature Reviews, Molecular Cell Biology*. 5(6): 429-440.
- Barros, T.P., Kinoshita, K., Hyman, A.A., Raff, J.W. 2005. Aurora A activates D-TACC-Msps complexes exclusively at centrosomes to stabilize centrosomal microtubules. *The Journal of Cell Biology*. 170(7): 1039-1046.
- Beaudouin, J., Gerlich, D., Daigle, N., Eils, R., Ellenberg, J. 2002. Nuclear envelope breakdown proceeds by microtubule-induced tearing of the lamina. *Cell*. 108(1): 83-96.
- Besson, A., Dowdy, S.F., Roberts, J.M. 2008. CDK inhibitors: cell cycle regulators and beyond. *Developmental Cell*. 14(2): 159-169.
- Bischoff, J.R., Anderson, L., Zhu, Y., Mossie, K., Ng, L., Souza, B., Schryver, B., Flanagan, P., Clairvoyant, F., Ginther, C., Chan, C.S., Novotny, M., Slamon, D.J., Plowman, G.D. 1998. A homologue of *Drosophila* aurora kinase is oncogenic and amplified in human colorectal cancers. *The EMBO Journal*. 17: 3052-3065.
- Brennan, I.M., Peters, U., Kapoor, T.M., Straight, A.F. 2007. Polo-like kinase controls vertebrate spindle elongation and cytokinesis. *PLoS One*. 2(5): e409.
- Brunet, S., Maria, A.S., Guillaud, P., Dujardin, D., Kubiak, J.Z., Maro, B. 1999. Kinetochore fibers are not involved in the formation of the first meiotic spindle in mouse oocytes, but control the exit from the first meiotic M phase. *The Journal of Cell Biology*. 146(1): 1-12.
- Brunet, S., Verlhac, M.H. 2011. Positioning to get out of meiosis: the asymmetry of division. *Human Reproduction Update*. 17(1): 68-75.

- Bukovsky, A., Caudle, M.R., Svetlikova, M., Wimalasena, J., Ayala, M.E., Dominguez, R. 2005. Oogenesis in adult mammals, including humans: a review. *Endocrine*. 26(3): 301-316.
- Castro, A., Mandart, E., Lorca, T., Galas, S. 2003. Involvement of Aurora A kinase during meiosis I-II transition in *Xenopus* oocytes. *The Journal of Biological Chemistry*. 278(4): 2236-2241.
- Cazales, M., Schmitt, E., Montembault, E., Dozier, C., Prigent, C., Ducommun, B. 2005. CDC25B phosphorylation by Aurora-A occurs at the G2/M transition and is inhibited by DNA damage. *Cell Cycle*. 4(9): 1233-1238.
- Chan, E.H., Santamaria, A., Silljé, H.H., Nigg, E.A. 2008. Plk1 regulates mitotic Aurora A function through betaTrCP-dependent degradation of hBora. *Chromosoma*. 117(5): 457-469.
- De Carcer, G., Manning, G., Malumbres, M. 2011. From Plk1 to Plk5: functional evolution of polo-like kinases. *Cell Cycle*. 10(14): 2255-2262.
- De Luca, M., Lavia, P., Guarguaglini, G. 2006. A functional interplay between Aurora-A, Plk1 and TPX2 at spindle poles: Plk1 controls centrosomal localization of Aurora-A and TPX2 spindle association. *Cell Cycle*. 5(3): 296-303.
- Ding J, Swain JE, Smith GD. 2011. Aurora kinase-A regulates microtubule organizing center (MTOC) localization, chromosome dynamics, and histone-H3 phosphorylation in mouse oocytes. *Molecular Reproduction and Development*. 78(2): 80-90.
- Ducat, D., Zheng, Y. 2004. Aurora kinases in spindle assembly and chromosome segregation. *Experimental Cell Research*. 301(1): 60 – 67.
- Dumont, J., Desai, A. 2012. Acentrosomal spindle assembly and chromosome segregation during oocyte meiosis. *Trends in Cell Biology*. 22(5): 241-249.
- Dutertre, S., Cazales, M., Quaranta, M., Froment, C., Trabut, V., Dozier, C., Mirey, G., Bouché, J.P., Theis-Febvre, N., Schmitt, E., Monsarrat, B., Prigent, C., Ducommun, B. 2004. Phosphorylation of CDC25B by Aurora-A at the centrosome contributes to the G2-M transition. *Journal of Cell Science*. 117: 2523-2531.
- Elia, A.E., Cantley, L.C., Yaffe, M.B. 2003. Proteomic screen finds pSer/pThr-binding domain localizing Plk1 to mitotic substrates. *Science*. 299(5610): 1228-1231.
- Eppig, J.J. 1991. Maintenance of meiotic arrest and the induction of oocyte maturation in mouse oocyte-granulosa cell complexes developed in vitro from preantral follicles. *Biology of Reproduction*. 45(6): 824-830.
- Eppig, J.J. 2001. Oocyte control of ovarian follicular development and function in mammals. *Reproduction* 122:829-38.
- Fair, T. 2003. Follicular oocyte growth and acquisition of developmental competence. *Animal Reproduction Science*. 78: 203-216.

- Fu, J., Bian, M., Liu, J., Jiang, Q., Zhang, C. 2009. A single amino acid change converts Aurora-A into Aurora-B-like kinase in terms of partner specificity and cellular function. *Proceedings of the National Academy of Science USA*. 106(17): 6939-6944.
- Giet, R., Prigent, C. 1999. Aurora/Ipl1p-related kinases, a new oncogenic family of mitotic serine–threonine kinases. *Journal of Cell Science*. 112: 3591–3601.
- Giet, R., McLean, D., Descamps, S., Lee, M.J., Raff, J.W., Prigent, C., Glover D.M. 2002. *Drosophila* Aurora A kinase is required to localize D-TACC to centrosomes and to regulate astral microtubules. *The Journal of Cell Biology*. 156: 437–451.
- Glover, D.M., Leibowitz, M.H., McLean, D.A., Parry, H. 1995. Mutations in aurora prevent centrosome separation leading to the formation of monopolar spindles. *Cell*. 81(1): 95-105.
- Glover, D.M., Hagan, I.M., Tavares, A.A. 1998. Polo-like kinases: A team that plays throughout mitosis. *Genes and Development*. 12:3777–3787.
- Gruss, O.J., Vernos, I. 2004. The mechanism of spindle assembly: functions of Ran and its target TPX2. *The Journal of cell biology*. 166: 949–955.
- Gueth-Hallonet, C., Antony, C., Aghion, J., Santa-Maria, A., Lajoie-Mazenc, I., Wright, M., Maro, B. 1993. Gamma-Tubulin is present in acentriolar MTOCs during early mouse development. *Journal of Cell Science*. 105(Pt 1): 157–166.
- Hannak, E., Kirkham, M., Hyman, A.A., Oegema, K. 2001. Aurora-A kinase is required for centrosome maturation in *Caenorhabditis elegans*. *The Journal of cell biology*. 155: 1109–1116.
- Hoar, K., Chakravarty, A., Rabino, C., Wysong, D., Bowman, D., Roy, N., Ecsedy, J.A. 2007. MLN8054, a small-molecule inhibitor of Aurora A, causes spindle pole and chromosome congression defects leading to aneuploidy. *Molecular and Cellular Biology*. 27(12): 4513-4525.
- Honda, K., Mihara, H., Kato, Y., Yamaguchi, A., Tanaka, H., Yasuda, H., Furukawa, K., Urano, T. 2000. Degradation of human Aurora2 protein kinase by the anaphase-promoting complex-ubiquitinproteasome pathway. *Oncogene*. 19: 2812–2819.
- Hutterer, A., Berdnik, D., Wirtz-Peitz, F., Zigman, M., Schleiffer, A., Knoblich, J.A. 2006. Mitotic activation of the kinase Aurora-A requires its binding partner Bora. *Developmental Cell*. 11(2): 147-157.
- Jackman, M., Lindon, C., Nigg, E.A., Pines, J. 2003. Active cyclin B1-Cdk1 first appears on centrosomes in prophase. *Nature Cell Biology*. 5(2): 143-148.
- Karaiskou, A., Leprêtre, A.C., Pahlavan, G., Du Pasquier, D., Ozon, R., Jesus, C. 2004. Polo-like kinase confers MPF autoamplification competence to growing *Xenopus* oocytes. *Development*. 131(7): 1543-1552.

- Katayama, H., Sasai, K., Kawai, H., Yuan, Z.M., Bondaruk, J., Suzuki, F., Fujii, S., Arlinghaus, R.B., Czerniak, B.A., Sen, S. 2004. Phosphorylation by aurora kinase A induces Mdm2-mediated destabilization and inhibition of p53. *Nature Genetics*. 36(1): 55-62.
- Kimura, M., Matsuda, Y., Yoshioka, T., Okano, Y. 1999. Cell cycle-dependent expression and centrosome localization of a third human aurora/Ipl1-related protein kinase, AIK3. *The Journal of Biological Chemistry*. 274(11): 7334-7340.
- Kishimoto, T. 2003. Cell-cycle control during meiotic maturation. *Current Opinion in Cell Biology*. 15: 654-663.
- Klener, P. 2011. Volasertib (BI 6727) a jeho možné uplatnění v protinádorové léčbě. *Farmakoterapie* 7(5): 511-513.
- Kothe, M., Kohls, D., Low, S., Coli, R., Rennie, G.R., Feru, F., Kuhn, C., Ding, Y.H. 2007. Selectivity-determining residues in Plk1. 2007. *Chemical Biology & Drug Design* 70(6): 540-546.
- 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.
- Lee, K.S., Grenfell, T.Z., Yarm, F.R., Erikson, R.L. 1998. Mutation of the polo-box disrupts localization and mitotic functions of the mammalian polo kinase Plk. *Proceedings of the National Academy of Science USA*. 95(16): 9301-9306.
- Lenart, P., Ellenberg, J. 2003. Nuclear envelope dynamics in oocytes: from germinal vesicle breakdown to mitosis. *Current Opinion in Cell Biology*. 15(1): 88-95.
- Lenart, P., Rabut, G., Daigle, N., Hand, A.R., Terasaki, M., Ellenberg, J. 2003. Nuclear envelope breakdown in starfish oocytes proceeds by partial NPC disassembly followed by a rapidly spreading fenestration of nuclear membranes. *The Journal of Cell Biology*. 160(7): 1055-1068.
- Lenart, P., Petronczki, M., Steegmaier, M., Di Fiore, B., Lipp, J.J., Hoffmann, M., Rettig, W.J., Kraut, N., Peters, J.M. 2007. The small-molecule inhibitor BI 2536 reveals novel insights into mitotic roles of polo-like kinase 1. *Current Biology* 17(4):304-15.
- Lens, S.M., Voest, E.E., Medema, R.H. 2010. Shared and separate functions of polo-like kinases and aurora kinases in cancer. *Nature Reviews Cancer* 10(12): 825-841.
- Li, B., Ouyang, B., Pan, H., Reissmann, P.T., Slamon, D.J., Arceci, R., Lu, L., Dai, W. 1996. Prk, a cytokine-inducible human protein serine/threonine kinase whose expression appears to be down-regulated in lung carcinomas. *The Journal of Biological Chemistry*. 271(32): 19402-19408.

- Lincoln, A.J., Wickramasinghe, D., Stein, P., Schultz, R.M., Palko, M.E., De Miguel, M.P., Tessarollo, L., Donovan, P.J. 2002. Cdc25b phosphatase is required for resumption of meiosis during oocyte maturation. *Nature Genetics*. 30(4): 446-449.
- Lindqvist, A., Rodríguez-Bravo, V., Medema, R.H. 2009. The decision to enter mitosis: feedback and redundancy in the mitotic entry network. *The Journal of Cell Biology*. 185(2): 193-202.
- Liu, Q., Kaneko, S., Yang, L., Feldman, R.I., Nicosia, S.V., Chen, J., Cheng, J.Q. 2004. Aurora-A abrogation of p53 DNA binding and transactivation activity by phosphorylation of serine 215. *The Journal of Biological Chemistry*. 279(50): 52175-52182.
- Liu, Q., Ruderman, J.V. 2006. Aurora A, mitotic entry, and spindle bipolarity. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA*. 103: 5811–5816.
- Lobjois, V., Jullien, D., Bouché, J.P., Ducommun, B. 2009. The polo-like kinase 1 regulates CDC25B-dependent mitosis entry. *Biochimica et Biophysica Acta*. 1793(3): 462-468.
- Lodish, H., Berk, A., Zipursky, S.L., Matsudaira, P., Baltimore, D., Darnell, J.E. 1999. *Molecular Cell Biology*. 4th ed. New York: W. H. Freeman & Co.
- Macûrek, L., Lindqvist, A., Lim, D., Lampson, M.A., Klompaker, R., Freire, R., Clouin, C., Taylor, S.S., Yaffe, M.B., Medema, R.H. 2008. Polo-like kinase-1 is activated by aurora A to promote checkpoint recovery. *Nature*. 455(7209): 119-123.
- Mahen, R., Venkitaraman, A.R. 2012. Pattern formation in centrosome assembly. *Current Opinion in Cell Biology*. 24:14–23.
- Malumbres, M., Barbacid, M. 2001. To cycle or not to cycle: a critical decision in cancer. *Nature Reviews. Cancer*. 1(3): 222-231.
- Malumbres, M., Barbacid, M. 2005. Mammalian cyclin-dependent kinases. *Trends in Biochemical Sciences*. 30(11): 630-641.
- Manfredi, M.G., Ecsedy, J.A., Meetze, K.A., Balani, S.K., Burenkova, O., Chen, W., Galvin, K.M., Hoar, K.M., Huck, J.J., LeRoy, P.J., Ray, E.T., Sells, T.B., Stringer, B., Stroud, S.G., Vos, T.J., Weatherhead, G.S., Wysong, D.R., Zhang, M., Bolen, J.B., Claiborne, C.F. 2007. Antitumor activity of MLN8054, an orally active small-molecule inhibitor of Aurora A kinase. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA*. 104(10): 4106-4111.
- Mao, J.H., Wu, D., Perez-Losada, J., Jiang, T., Li, Q., Neve, R.M., Gray, J.W., Cai, W.W., Balmain, A. 2007. Crosstalk between Aurora-A and p53: frequent deletion or downregulation of Aurora-A in tumors from p53 null mice. *Cancer Cell*. 11(2): 161-173.
- Marumoto T, Hirota T, Morisaki T, Kunitoku N, Zhang D, Ichikawa Y, Sasayama T, Kuninaka S, Mimori T, Tamaki N, Kimura M, Okano Y, Saya H. Roles of aurora-A kinase in mitotic entry and G2 checkpoint in mammalian cells. *Genes to Cells*. 2002 Nov;7(11):1173-82.

- McGuinness, B.E., Anger, M., Kouznetsova, A., Gil-Bernabé, A.M., Helmhart, W., Kudo, N.R., Wuensche, A., Taylor, S., Hoog, C., Novak, B., Nasmyth, K. 2009. Regulation of APC/C activity in oocytes by a Bub1-dependent spindle assembly checkpoint. *Current Biology*. 19(5): 369-380.
- Meraldi, P., Honda, R., Nigg, E.A. 2002. Aurora-A overexpression reveals tetraploidization as a major route to centrosome amplification in p53^{-/-} cells. *The EMBO Journal*. 21(4): 483-492.
- Morgan, D.O. (2007). *The cell cycle: Principles of control*. Oxford University Press. ISBN 0878935088.
- Motlik, J., Crozet, N., Fulka, J. 1984. Meiotic competence in vitro of pig oocytes isolated from early antral follicles. *Journal of Reproduction and Fertility*. 72(2): 323-328.
- Motlik, J., Fulka, J. 1986. Factors affecting meiotic competence in pig oocytes. *Theriogenology*. 25, 87-96.
- Motlik, J., Pavlok, A., Kubelka, M., Kalous, J., Kalab, P. 1998. Interplay between CDC2 kinase and MAP kinase pathway during maturation of mammalian oocytes. *Theriogenology* 49: 461-469.
- Musacchio, A., Salmon, E.D. 2007. The spindle-assembly checkpoint in space and time. *Nature Reviews, Molecular Cell Biology*. 8(5): 379-393.
- Nakajima, H., Toyoshima-Morimoto, F., Taniguchi, E., Nishida, E. 2003. Identification of a consensus motif for Plk (Polo-like kinase) phosphorylation reveals Myt1 as a Plk1 substrate. *The Journal of Biological Chemistry*. 278(28): 25277-25280.
- Nigg, E.A. 2001. Mitotic kinases as regulators of cell division and its checkpoints. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*. 2(1): 21-32.
- Nikonova, A.S., Astsaturov, I., Serebriiskii, I.G., Dunbrack, R.L. Jr., Golemis, E.A. 2013. Aurora A kinase (AURKA) in normal and pathological cell division. *Cellular and Molecular Life Sciences*. 70(4): 661-687.
- Okano-Uchida, T., Okumura, E., Iwashita, M., Yoshida, H., Tachibana, K., Kishimoto T. 2003. Distinct regulators for Plk1 activation in starfish meiotic and early embryonic cycles. *The EMBO Journal*. 22(20): 5633-5642.
- Pahlavan, G., Polanski, Z., Kalab, P., Golsteyn, R., Nigg, E.A., Maro, B. 2000. Characterization of polo-like kinase 1 during meiotic maturation of the mouse oocyte. *Dev Biol*. 220(2): 392-400.
- Palazzo, R.E., Vogel, J.M., Schnackenberg, B.J., Hull, D.R., Wu, X. 2000. Centrosome maturation. *Current Topics in Developmental Biology*. 49: 449-470.

- Palma, G.A., Argañaraz, M.E., Barrera, A.D., Rodler, D., Mutto, A.Á., Sinowatz, F. 2012. Biology and biotechnology of follicle development. *The Scientific World Journal*. Volume 2012, 1-14.
- Peset, I., Seiler, J., Sardon, T., Bejarano, L.A., Rybina, S., Vernos, I. 2005. Function and regulation of Maskin, a TACC family protein, in microtubule growth during mitosis. *The Journal of Cell Biology*. 170: 1057–1066.
- Petronczki, M., Lenart, P., Peters, J.M. 2008. Polo on the Rise-from Mitotic Entry to Cytokinesis with Plk1. *Developmental Cell*. 14(5): 646-659.
- Ryan, K.M., Phillips, A.C., Vousden, K.H. 2001. Regulation and function of the p53 tumor suppressor protein. *Current Opinion in Cell Biology*. 13(3): 332-337.
- Rodrigues, P., Limback, D., McGinnis, L.K., Plancha, C.E., Albertini, D.F. 2008. Oogenesis: Prospects and challenges for the future. *Journal of Cellular Physiology*. 216(2): 355-365.
- Santaguida, S., Tighe, A., D'Alise, A.M., Taylor, S.S., Musacchio, A. 2010. Dissecting the role of MPS1 in chromosome biorientation and the spindle checkpoint through the small molecule inhibitor reversine. *The Journal of Cell Biology*. 190(1): 73-87.
- Santamaria, A., Neef, R., Eberspächer, U., Eis, K., Husemann, M., Mumberg, D., Prechtel, S., Schulze, V., Siemeister, G., Wortmann, L., Barr, F.A., Nigg, E.A. 2007. Use of the novel Plk1 inhibitor ZK-thiazolidinone to elucidate functions of Plk1 in early and late stages of mitosis. *Molecular Biology of the Cell*. 18(10): 4024-4036.
- Schindelin, J., Arganda-Carreras, I., Frise, E., Kaynig, V., Longair, M., Pietzsch, T., Preibisch, S., Rueden, C., Saalfeld, S., Schmid, B., Tinevez, J.Y., White, D.J., Hartenstein, V., Eliceiri, K., Tomancak, P., Cardona, A. 2012. Fiji: an open-source platform for biological-image analysis. *Nature Methods*. 9(7): 676-682.
- Schuh, M., Ellenberg, J. 2007. Self-organization of MTOCs replaces centrosome function during acentrosomal spindle assembly in live mouse oocytes. *Cell*. 130(3): 484-498.
- Seki, A., Coppinger, J.A., Jang, C.Y., Yates, J.R., Fang, G. 2008. Bora and the kinase Aurora cooperatively activate the kinase Plk1 and control mitotic entry. *Science*. 320(5883): 1655-1658.
- Shintomi, K., Hirano, T. 2010. Sister chromatid resolution: a cohesin releasing network and beyond. *Chromosoma*. 119(5): 459-467.
- Simmons, D.L., Neel, B.G., Stevens, R., Evett, G., Erikson, R.L. 1992. Identification of an early-growth-response gene encoding a novel putative protein kinase. *Molecular and Cellular Biology*. 12(9): 4164-4169.
- Skinner, M.K., 2005. Regulation of primordial follicle assembly and development. *Human Reproduction Update*. 11(5): 461-471.

- Sumara, I., Vorlaufer, E., Stukenberg, P.T., Kelm, O., Redemann, N., Nigg, E.A., Peters, J.M. 2002. The dissociation of cohesin from chromosomes in prophase is regulated by Polo-like kinase. *Molecular Cell*. 9(3): 515-525.
- Sumara, I., Giménez-Abián, J.F., Gerlich, D., Hirota, T., Kraft, C., de la Torre, C., Ellenberg, J., Peters, J.M. 2004. Roles of polo-like kinase 1 in the assembly of functional mitotic spindles. *Current Biology*. 14(19): 1712-1722.
- Sunkel, C.E., Glover, D.M. 1988. Polo, a mitotic mutant of *Drosophila* displaying abnormal spindle poles. *Journal of Cell Science* 89(Pt 1): 25-38.
- Swain, J.E., Ding, J., Wu, J., Smith, G.D. 2008. Regulation of spindle and chromatin dynamics during early and late stages of oocyte maturation by aurora kinases. *Molecular Human Reproduction*. 14(5): 291-299.
- Szollosi, D., Calarco, P., Donahue, R.P. 1972. Absence of centrioles in the first and second meiotic spindles of mouse oocytes. *Journal of Cell Science*. 11(2): 521-541.
- Šašková, A., Šolc, P., Baran, V., Kubelka, M., Schultz, R.M., Motlík, J. 2008. Aurora kinase A controls meiosis I progression in mouse oocytes. *Cell Cycle*. 7(15): 2368-2376.
- Šolc, P., Schultz, R.M., Motlík, J. 2010. Prophase I arrest and progression to metaphase I in mouse oocytes: comparison of resumption of meiosis and recovery from G2-arrest in somatic cells. *Molecular Human Reproduction*. 16(9): 654-664.
- Šolc, P., Baran, V., Mayer, A., Böhmová, T., Panenková-Havlová, G., Šašková, A., Schultz, R.M., Motlík, J. 2012. Aurora kinase A drives MTOC biogenesis but does not trigger resumption of meiosis in mouse oocytes matured in vivo. *Biology of Reproduction*. 87(4):85, 1–12.
- Šolc, P., Kitajima, T.S., Yoshida, S., Brzaková, A., Baran, V., Mayer, A., Samalová, P., Motlík, J., Ellenberg, J. PLK1 couples NEBD with chromosome condensation and is required for acentriolar spindle assembly and APC/C activation in mammalian oocytes. Under revision.
- Tong, C., Fan, H.Y., Lian, L., Li, S.W., Chen, D.Y., Schatten, H., Sun, Q.Y. 2002. Polo-like kinase-1 is a pivotal regulator of microtubule assembly during mouse oocyte meiotic maturation, fertilization, and early embryonic mitosis. *Biology of Reproduction* 67(2): 546-554.
- Tsai, M.Y., Zheng, Y. 2005. Aurora A kinase-coated beads function as microtubule-organizing centers and enhance RanGTP-induced spindle assembly. *Current biology*. 15: 2156–2163.
- Tsou, M.F., Wang, W.J., George, K.A., Uryu, K., Stearns, T., Jallepalli, P.V. 2009. Polo kinase and separase regulate the mitotic licensing of centriole duplication in human cells. *Developmental Cell*. 17(3): 344-354.

- Uzbekova, S., Arlot-Bonnemains, Y., Dupont, J., Dalbiès-Tran, R., Papillier, P., Pennetier, S., Thélie, A., Perreau, C., Mermillod, P., Prigent, C., Uzbekov, R. 2008. Spatio-temporal expression patterns of aurora kinases a, B, and C and cytoplasmic polyadenylation-element-binding protein in bovine oocytes during meiotic maturation. *Biology of Reproduction*. 78(2): 218-233.
- Vader, G., Lens, S.M. 2008. The Aurora kinase family in cell division and cancer. *Biochimica et Biophysica Acta*. 1786(1): 60-72.
- Van Horn, R.D., Chu, S., Fan, L., Yin, T., Du, J., Beckmann, R., Mader, M., Zhu, G., Toth, J., Blanchard, K., Ye, X.S. 2010. Cdk1 activity is required for mitotic activation of aurora A during G2/M transition of human cells. *The Journal of Biological Chemistry*. 285(28): 21849-21857.
- Van Leuken, R., Clijsters, L., van Zon, W., Lim, D., Yao, X., Wolthuis, R.M., Yaffe, M.B., Medema, R.H., van Vugt, M.A. 2009. Polo-like kinase-1 controls Aurora A destruction by activating APC/C-Cdh1. *PLoS One*. 4(4): e5282.
- Van Vugt, M.A., Gardino, A.K., Linding, R., Ostheimer, G.J., Reinhardt, H.C., Ong, S.E., Tan, C.S., Miao, H., Keezer, S.M., Li, J., Pawson, T., Lewis, T.A., Carr, S.A., Smerdon, S.J., Brummelkamp, T.R., Yaffe, M.B. 2010. A mitotic phosphorylation feedback network connects Cdk1, Plk1, 53BP1, and Chk2 to inactivate the G(2)/M DNA damage checkpoint. *PLoS Biology*. 8(1): e1000287.
- Vanderhyden, B. 2002. Molecular basis of ovarian development and function. *Frontiers in Bioscience*. 1;7: 2006-2022.
- Vodermaier, H.C. 2004. APC/C and SCF: controlling each other and the cell cycle. *Current Biology*. 14(18): R787-796.
- Walter, A.O., Seghezzi, W., Korver, W., Sheung, J., Lees, E. 2000. The mitotic serine/threonine kinase Aurora2/AIK is regulated by phosphorylation and degradation. *Oncogene*. 19: 4906–4916.
- Watanabe, N., Arai, H., Iwasaki, J., Shiina, M., Ogata, K., Hunter, T., Osada, H. 2005. Cyclin-dependent kinase (CDK) phosphorylation destabilizes somatic Wee1 via multiple pathways. *Proceedings of the National Academy of Science USA*. 102(33): 11663-11668.
- Wianny, F., Tavares, A., Evans, M.J., Glover, D.M., Zernicka-Goetz, M. 1998. Mouse polo-like kinase 1 associates with the acentriolar spindle poles, meiotic chromosomes and spindle midzone during oocyte maturation. *Chromosoma* 107(6-7): 430-439.
- Winkles, J.A., Alberts, G.F. 2005. Differential regulation of polo-like kinase 1, 2, 3, and 4 gene expression in mammalian cells and tissues. *Oncogene*. 24(2): 260-266.
- Witmann, T., Wilm, M., Karsenti, E., Vernos, I. 2000. A novel *Xenopus* MAP involved in spindle pole organization. *The Journal of Cell Biology*. 149(7): 1405 – 1418.

- Wong, J., Lerrigo, R., Jang, C.Y., Fang, G. 2008. Aurora A regulates the activity of HURP by controlling the accessibility of its microtubule-binding domain. *Molecular biology of the cell*. 19: 2083–2091.
- Yao, L.J., Zhong, Z.S., Zhang, L.S., Chen, D.Y., Schatten, H., Sun, Q.Y. 2004. Aurora-A is a critical regulator of microtubule assembly and nuclear activity in mouse oocytes, fertilized eggs, and early embryos. *Biology of Reproduction* 70(5): 1392-1399.
- Yim, H., Erikson, R.L. 2010. Cell division cycle 6, a mitotic substrate of polo-like kinase 1, regulates chromosomal segregation mediated by cyclin-dependent kinase 1 and separase. *Proceedings of the National Academy of Science USA*. 107(46): 19742-19747.
- Zhao, Z.S., Lim, J.P., Ng, Y.W., Lim, L., Manser, E. 2005. The GIT-associated kinase PAK targets to the centrosome and regulates Aurora-A. *Molecular cell*. 20: 237–249.
- Zhou, H., Kuang, J., Zhong, L., Kuo, W.L., Gray, J.W., Sahin, A., Brinkley, B.R., Sen, S. 1998. Tumour amplified kinase STK15/BTAK induces centrosome amplification, aneuploidy and transformation. *Nature genetics*. 20: 189–193.