

**Univerzita Karlova**  
**Přírodovědecká fakulta**

Studijní program: Reprodukční a vývojová biologie



**Bc. Lenka Sloupová**

Použití časoběrné mikroskopie ke sledování dynamiky fúze dělicího vřeténka v zygotách  
vzniklých křížením různých kmenů myší

Time-lapse microscopy study focused on the dynamics of spindle fusion  
in mouse inter-strain hybrid zygotes

Diplomová práce

Vedoucí práce: doc. MVDr. Martin Anger, Csc.

Praha, 2024

**Prohlášení:**

Prohlašuji, že jsem závěrečnou práci zpracovala samostatně a že jsem uvedla všechny použité informační zdroje a literaturu. Na získání výsledků týkajících se vlivu verapamilu a barviv v oleji se podílely Mgr. Adéla Horáková a Mgr. Markéta Konečná. Tato práce ani její podstatná část nebyla předložena k získání jiného nebo stejného akademického titulu.

V Praze, 6. 8. 2024

Podpis

**Poděkování:**

Chtěla bych poděkovat svému vedoucímu práce doc. MVDr. Martinovi Angerovi, Csc. za trpělivost a cenné rady při zpracovávání této práce, a také Mgr. Adéle Horákové a Mgr. Markétě Konečné za jejich podíl na získání výsledků týkajících se vlivu verapamilu a barviv v oleji.

Díky také patří Ing. Andrejovi Šušorovi, Ph.D. a celé Laboratoři biochemie a molekulární biologie zárodečných buněk v Liběchově, kteří mi poskytli svůj prostor a čas pro učení se práci s oocyty.

V neposlední řadě také děkuji své rodině za nepostradatelnou podporu během studia.

## **Abstrakt**

Správná segregace chromozomů v zygotě je klíčová pro další úspěšný vývoj embrya. Různé kmeny myši se mohou lišit úspěšností preimplantačního vývoje a také bylo zjištěno, že pro rozdělení chromozomů v první mitóze používá tento druh fúze dělicích vřetének. Tato práce se zabývá srovnáním dynamiky sestavení dělicího vřeténka s využitím časosběrné mikroskopie a vitálních barviv procházejících přes membránu. Pro srovnání byly použity zygoty vzniklé křížením samic kmene CD-1 a samců stejného kmene, nebo kmene B6D2F1/JRccHsd. Zároveň byla za pomoci imunodetekce sledována také lokalizace a intenzita signálu Mad2 před rozpadem prvojader u obou skupin. Analýza dat získaných z časosběrné mikroskopie a imunodetekce Mad2 ukázala, že zygoty vzniklé křížením dvou různých kmenů se od zygot s oběma rodiči ze stejného kmene ve sledovaných parametrech zřejmě významně neliší.

**Klíčová slova:** časosběrná mikroskopie, myši kmeny, dělicí vřeténko, segregace chromozomů, zygota, vitální barviva

## **Abstract**

Accurate chromosome segregation in zygotes is crucial for further successful development of an embryo. Mouse strains may differ in their preimplantation development success rate. In mice, during their first mitosis, two spindles assemble around each set of parental chromosomes, eventually forming a single mitotic spindle. This thesis is focused on the comparison of spindle formation in zygotes with both parents from the CD-1 strain and hybrid zygotes created by crossing B6D2F1/JRccHsd males with CD-1 females. Confocal time lapse imaging and vital dyes visualizing DNA and tubulin allowed for real time spindle assembly tracking. Localization and signal intensity of the protein Mad2 were assessed in interphase of the first embryonic division after fertilization using immunodetection with a specific antibody. The data obtained from time lapse imaging and Mad2 immunodetection revealed that in selected parameters hybrid zygotes created by crossing B6D2F1/JRccHsd males with CD-1 females and zygotes with both parents from the CD-1 strain exhibit similar behavior.

**Keywords:** time lapse imaging, mouse strains, spindle, chromosome segregation, zygote, vital dyes

# Obsah

Seznam zkratk	6
Úvod	10
1 Literární přehled	11
1.1 Vývoj myšního oocytu	11
1.2 Sestavení vřetének v myších oocytech	17
1.2.1 Sestavení vřeténka myších oocytů v meióze I	17
1.2.2 Sestavení vřeténka myších oocytů v meióze II	24
1.3 Regulační mechanismy spojené se segregací chromozomů	26
1.3.1 Kontrolní bod sestavení dělicího vřeténka	26
1.3.2 Regulace oddělení sesterských chromatid	30
1.4 Rozdíly mezi myším a lidským oplozením	34
1.5 Vznik prvojader a sestavení dělicího vřeténka v zygotě	37
2 Cíle práce	42
3 Materiál a metody	43
3.1 Zvířata	43
3.2 Izolace oocytů a embryí	44
3.3 Imunodetekce	45
3.4 Barvení pomocí vitálních barviv	46
3.5 Mikroskopie	47
3.6 Analýza obrazu	48
3.7 Statistické zpracování dat	49
4 Výsledky	50
4.1 Imunodetekce Mad2 v prvojádrech zygot	50
4.2 Proby procházející přes membránu	52
4.3 Subfertilita samců kmene C57BL/6JOlaHsd	57
4.4 Časoběrné snímání	58
4.4.1 Prvojádra zygot	58
4.4.2 Fúzní vřeténka	67
4.4.3 Délka mitózy	70
5 Diskuze	71
Závěr	77
Seznam literatury	79

## Seznam zkratek

aMTOC	acentriolar Microtubule Organizing Centers acentriolární mikrotubuly organizující centra
AurkA	Aurora kinase A Aurora kináza A
AurkC	Aurora kinase C Aurora kináza C
APC/C	Anaphase-promoting complex/cyclosome Komplex podporující vstup do anafáze
BDF1 x CD-1	zygota vzniklá křížením samce kmene CD-1 se samicí kmene CD-1
Bub3	Mitotic checkpoint protein BUB3 protein kontrolního bodu mitózy BUB3
BubR1	MAD3/BUB1-related protein kinase MAD3/BUB1-příbuzná proteinkináza
CaMKII	Ca <sup>2+</sup> /calmodulin-dependent protein kinase II Ca <sup>2+</sup> /kalmodulin-dependentní proteinkináza II
cAMP	cyclic adenosine monophosphate cyklický adenosinmonofosfát
CD-1 x CD-1	zygota vzniklá křížením samce kmene CD-1 se samicí kmene CD-1
Cdc20	Cell division cycle protein 20 homolog

Homolog proteinu 20 buněčného cyklu

Cdc25A	Dual specificity phosphatase Cdc25A fosfatáza Cdc25A s duální specificitou
Cdc25B	Dual specificity phosphatase Cdc25B fosfatáza Cdc25B s duální specificitou
Cdh1	Cdh1/Hct1 homolog
Cdk1	Cyclin-dependent kinase 1 cyklin-dependentní kináza 1
Cdk2	Cyclin-dependent kinase 2 cyklin-dependentní kináza 2
Cep[číslo]	Centrosomal protein of [number] kilodaltons Centrozomální protein [číslo]
C-Nap1	Centrosomal Nek2-Associated Protein 1 Centrozomální protein 1 asociovaný s Nek2
DAPI	4',6-diamidin-2-fenylindol
Emi1	Early mitotic inhibitor 1 Časný mitotický inhibitor 1
Emi2	Endogenous meiotic inhibitor 2 Endogenní meiotický inhibitor 2



GV	Germinal vesicle zárodečný váček
GVBD	Germinal Vesicle Break-Down rozpad zárodečného váčku
HURP	Hepatoma up-regulated protein homolog Homolog proteinu Hepatoma up-regulated
Mad1	MAD2-like protein 1 Protein 1 podobný MAD2
Mad2	Mitotic arrest deficient 2-like protein protein podobný Mitotic arrest deficient 2
MCC	Mitotic Checkpoint Complex Komplex kontrolního bodu mitózy
MAPK	Mitogen-activated protein kinase proteinkináza aktivovaná mitogeny
MPF	Maturation-Promoting Factor Faktor podporující maturaci
Mps1	Monopolar spindle 1 Monopolární vřetenko 1
NEDD1	Neural precursor cell expressed, developmentally down-regulated 1 Ve vývoji regulací snížen, exprimovaný v buňkách neurálních prekursorů

PKA	Protein kinase A proteinkináza A
Plk1	Polo-like kinase 1 Polo-like kináza 1
Plk4	Polo-like kinase 4 Polo-like kináza 4
PP2A	Protein phosphatase 2A proteinfosfatáza 2A
Prc1	Protein regulator of cytokinesis 1 Regulátor proteinů cytokineze 1
Ran-GTP	Ras-related nuclear protein-guanosine triphosphate Ras-příbuzný jaderný protein s navázaným guanosintrifosfátem
REC8	Meiotic recombination protein REC8 homolog Homolog meiotického rekombinačního proteinu REC8
SAC	Spindle Assembly Checkpoint kontrolní bod sestavení dělicího vřeténka
Wee1B	Wee1-like protein kinase 1B Wee1-like proteinkináza 1B
Zw10	Centromere/kinetochore protein zw10 homolog Homolog centromerického/kinetochorového proteinu zw10

## Úvod

Pro úspěšný vývoj nového organismu je nutné, aby dělicí se buňky měly správný počet chromozomů. Pokud určitý chromozom chybí, nebo naopak přebývá, vzniká aneuploidie. U člověka jsou tři kopie chromozomu 13, 18, 21 či aneuploidie pohlavních chromozomů ve všech buňkách jedince slučitelné se životem, ale tito jedinci se mohou potýkat se závažnými zdravotními problémy. Aneuploidie ostatních chromozomů vede k zastavení vývoje (Tosh et al. 2022). První dělení oplozeného vajíčka (neboli zygoty) je z hlediska segregace chromozomů klíčové, což motivuje k jeho podrobnému poznání. Buněčným aparátem využívaným pro rozchod chromozomů je dělicí vřeténko, jehož abnormality tedy mohou vést ke vzniku aneuploidii. U kříženců různých kmenů myši dochází k aneuploidii významně častěji než u potomků myši stejného kmene (Koehler et al. 2006), proto se tato práce zabývá dynamikou sestavení dělicího vřeténka v zygotách kříženců různých myších kmenů.

# 1 Literární přehled

## 1.1 Vývoj myšího oocytu

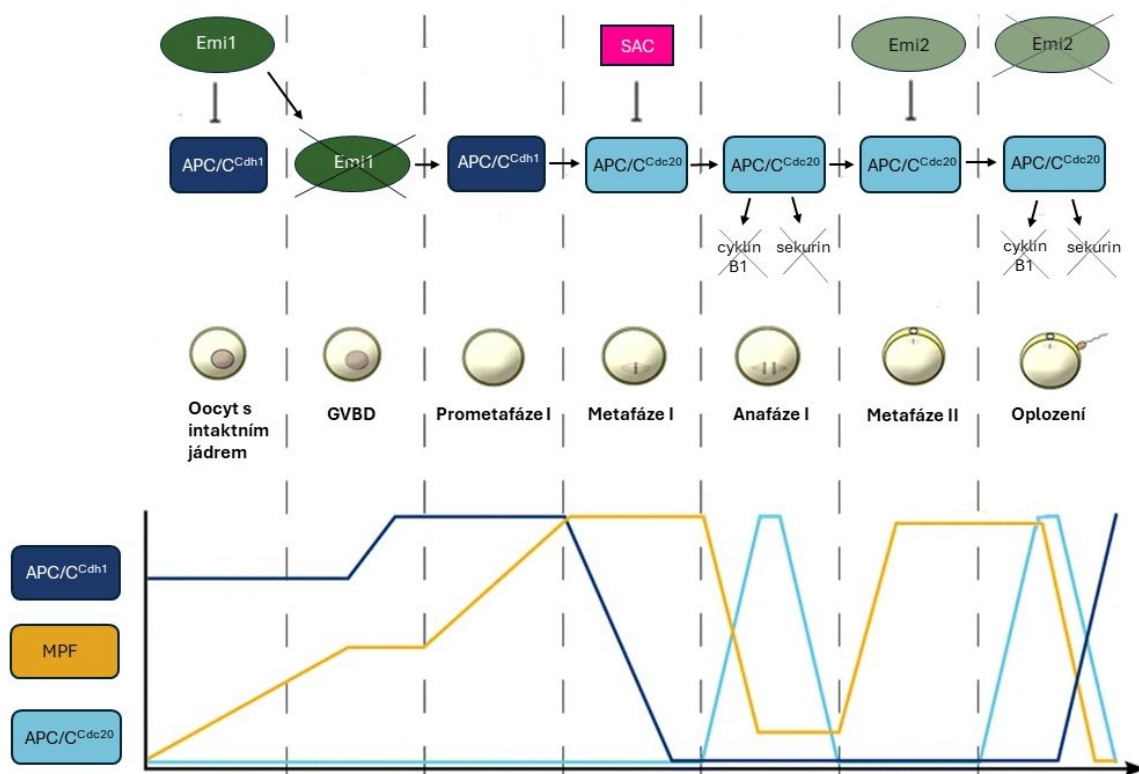
Cesta vedoucí ke vzniku oocytů začíná už v embryonálním vývoji. Primordiální zárodečné buňky v době 10,5 dne embryonálního vývoje migrují do oblasti genitálních rýh (Molyneaux et al. 2001). Zde se diferencují do silně mitoticky aktivních oogonií, které tvoří cysty propojené cytoplazmatickými můstky (Pepling a Spradling 1998). 13,5 dne embryonálního vývoje poté začínají první meiotická dělení (Bullejos a Koopman 2004), kterými se vytváří primárními oocyty. Primární oocyty jsou obklopeny vrstvou somatických buněk, které se později diferencují do buněk folikulárních (Odor a Blandau 1969). Rozpad cyst a apoptóza některých oocytů následně umožňuje vznik samostatných primordiálních folikulů (Pepling a Spradling 2001).

Do 1. meiotického bloku začínají buňky vstupovat 18. den myšího prenatálního vývoje (Borum 1961), ale kompetenci pokračovat v meióze I získávají až v období puberty (Kusuhara et al. 2021). Mechanismus udržení bloku závisí na stádiu probíhající folikulogeneze. Pro oocyt v antrálním folikulu je nutná přítomnost receptoru 3 spojeného s G-proteinem, který v předchozích stádiích (primordiálního, primárního a sekundárního folikulu) nebyl potřebný. Receptor aktivuje vazebný protein guaninového nukleotidu Gs (Freudzon et al. 2005), jehož důležitost pro udržení bloku je ilustrována překonáním tohoto bloku při inhibici Gs specifickou protilátkou (Mehlmann et al. 2002). Dalším krokem je aktivace adenylyl cyklázy typu 3 a produkce cyklického adenosinmonofosfátu (cAMP, cyclic adenosine monophosphate) (Horner et al. 2003). K udržení vysoké hladiny cAMP je potřebná vysoká hladina cyklického guanosinmonofosfátu přicházejícího do oocyty vodivými spoji z kumulárních buněk (Norris et al. 2009). Injekce fosfodiesterázy (rozkládající cAMP) nebo 2-deoxy-cAMP, který neumožňuje vázat regulační podjednotku proteinkinázy A (PKA, Protein kinase A), vede k rozpadu zárodečného váčku (GVBD, Germinal Vesicle Break-Down), tedy přerušení bloku. Druhá z možností zároveň ukazuje na aktivaci PKA pomocí cAMP (Bornslaeger et al. 1986). PKA fosforyluje Wee1-like proteinkinázu 1B (Wee1B, Wee1-like protein kinase 1B), která dále inhibičně fosforyluje komplex cyklin-dependentní kinázy 1 (Cdk1, Cyclin-dependent kinase 1) s cyklinem B (Han et al. 2005). Dále PKA také fosforyluje fosfatázu Cdc25B s duální specificitou (Cdc25B, Dual specificity phosphatase Cdc25B) (Pirino et al. 2009).

V prvním meiotickém bloku také dochází k aktivnímu exportu cyklinu B z jádra do cytoplazmy (Marangos a Carroll 2004). Nejde ale o jediný mechanismus udržení jeho nízké

koncentrace, protože zatímco injekce cRNA cyklinu B1 vede k GVBD po 5 hodinách pouze u 15 % oocytů, tak při kombinaci s inhibítorem proteasomu a morpholino oligonukleotidy proti Cdh1/Hct1 homologu (Cdh1) vede k významnému nárůstu počtu oocytů procházejících GVBD. Na udržení bloku v meióze I se tak zřejmě podílí i degradace cyklinu B1 díky Komplexu podporujícímu vstup do anafáze (APC/C, Anaphase-promoting complex/cyclosome) s navázaným kofaktorem Cdh1 (Reis et al. 2006).

Řízení průběhu meiózy myšního oocyty je závislé na aktivitě Faktoru podporujícího maturaci (MPF, Maturation-Promoting Factor; komplex Cdk1 a cyklinu B (Adhikari et al. 2012)) a proteinkinázy aktivované mitogeny (MAPK, Mitogen-activated protein kinase). Po GVBD, které je znakem znovuzahájení meiózy, aktivita MPF narůstá až na dvojnásobnou hodnotu aktivity před GVBD. Nárůst MAPK aktivity začíná asi 2 až 3 hodiny po GVBD. Maxima aktivit lze detekovat asi 5-6 hodin po GVBD (Verlhac et al. 1994). Před vyloučením 1. pólóvého tělíska MPF aktivita klesá (Choi et al. 1991; Kubiak et al. 1992; Verlhac et al. 1994), zatímco aktivita MAPK zůstává stále vysoká (Verlhac et al. 1994). MPF aktivita 60-75 minut po vyloučení pólóvého tělíska znovu narůstá, ale v meióze II je její maximum nižší než v meióze I (pro představu průběhu aktivity MPF vizte Obr. 1) (Kubiak et al. 1992).



**Obr. 1** Zjednodušené znázornění chování vybraných proteinů a komplexů během vývoje oocyty a po oplození. Před GVBD je komplex APC/C<sup>Cdh1</sup> inhibován pomocí Časného mitotického inhibítora 1

(Emi1, Early mitotic inhibitor 1), což umožňuje nárůst aktivity MPF. Degradace Emi1 poté vede na dosažení maxima aktivace APC/C<sup>Cdh1</sup> a jeho aktivitu v prometáfázi I. Po dosažení maxima aktivace MPF v metafázi I se stává relevantním komplex APC/C s kofaktorem Homolog proteinu 20 buněčného cyklu (Cdc20, Cell division cycle protein 20 homolog), jehož plná aktivace je ale oddalována pomocí kontrolního bodu sestavení dělicího vřeténka (SAC, Spindle Assembly Checkpoint). Dosažení plné aktivace APC/C<sup>Cdc20</sup> poté umožní degradaci cyklinu B1 (tedy pokles aktivity MPF) a sekurinu, což vede na rozchod homologických chromozomů v anafázi I. Později dochází k inhibici APC/C<sup>Cdc20</sup> pomocí Endogenního meiotického inhibitoru 2 (Emi2, Endogenous meiotic inhibitor 2) což umožní opětovný vzrůst aktivity MPF do svého maxima v metafázi II. Po oplození je Emi2 degradován a aktivní APC/C<sup>Cdc20</sup> znovu degraduje cyklin B1 (což vede na pokles aktivity MPF) a sekurin, čímž umožní oddělení sesterských chromatid v anafázi II. Upraveno (Karabinova et al. 2011).

Pro správný průběh meiózy I však nestačí pouze Cdk1. Inhibice cyklin-dependentní kinázy 2 (Cdk2, Cyclin-dependent kinase 2) 10  $\mu\text{mol/l}$  K03861 před i po GVBD vede k neschopnosti vyloučit 1. pólové tělísko a brání aktivaci APC/C zřejmě díky zapojení do regulace kontrolního bodu sestavení dělicího vřeténka (SAC, Spindle Assembly checkpoint) (Li et al. 2022). Blokace APC/C může být způsobená také inhibicí Polo-like kinázy 1 (Plk1, Polo-like kinase 1) (100  $\text{nmol/l}$  BI2536), na rozdíl od Cdk2 se ale nejedná o regulaci SAC. Substrátem Plk1 je totiž Early mitotic inhibitor 1 (Emi1), jehož fosforylace (vedoucí na jeho degradaci) je potřebná k aktivaci APC/C (vizte Obr. 1) (Solc et al. 2015). Zároveň i samotná Plk1 musí být před degradací pomocí APC/C chráněna, čemu nejspíš napomáhá kináza p21-activated kinase 2 (Zeng et al. 2023).

Interakčním partnerem Cdk1 zřejmě může být v meióze I jak cyklin B1, tak i cyklin B2 (Li et al. 2018; Daldello et al. 2019). Podmíněný knock-out cyklinu B1 umožňuje myším oocytům dojít až do stádia vyloučení 1. pólového tělíska. Do II. meiotického bloku dojdou však pouze při overexpresi cyklinu B2, což ukazuje na jeho schopnost plně kompenzovat nepřítomnost cyklinu B1 v meióze I, ale v meióze II je jeho fyziologická koncentrace pro plnou kompenzaci zřejmě moc nízká (Li et al. 2018). Naopak knock-out cyklinu B2 vede k významnému snížení aktivity Cdk1, ke zpoždění GVBD a zastavení v meióze I u 70 % oocytů (Daldello et al. 2019).

Překonání prvního meiotického bloku je umožněno až v krátké době před ovulací (Eppig et al. 1983). Reakcí na významné zvýšení koncentrace luteinizačního hormonu je inhibice permeability vodivých spojů, které byly vytvořeny během maturace mezi oocylem a kumulárními buňkami. Konkrétně je zde pro uzavření uplatňována fosforylace konexinu 43

skrze MAPK dráhu (Norris et al. 2008). Uzavření vodivých spojů zastavuje transport cyklického guanosinmonofosfátu, což vede na aktivaci fosfodiesterázy 3A (Norris et al. 2009), která umožňuje rozklad cAMP (Masciarelli et al. 2004). Naměřený fyziologický pokles koncentrace cAMP v antrálním folikulu (z asi 660 nmol/l na 140 nmol/l) je dostatečný pro významné snížení aktivity PKA (Norris et al. 2009).

Zatímco na úspěšném průběhu meiózy I se podílí jak Cdk1, tak i Cdk2, pro překonání I. meiotického bloku je kritickou zřejmě pouze Cdk1 (Adhikari et al. 2012; Li et al. 2022). Inhibice Cdk1 inhibitorem RO3306 (10  $\mu$ mol/l) zcela zabraňuje GVBD, zatímco inhibice Cdk2 nemá žádný efekt (Li et al. 2022). Stejně tak podmíněný knock-out Cdk1 neumožňuje GVBD (Adhikari et al. 2012).

Součástí GVBD tedy musí být aktivace Cdk1, která byla doteď inhibičně fosforylována. Cdk1 může být defosforylována fosfatázou Cdc25B, u které knock-out či substituce v katalytické doméně vede k zabránění GVBD (Ferencova et al. 2022; Lincoln et al. 2002). Její overexprese v oocytech zastavených v meióze I také vede k GVBD, konkrétně v 79 % případů (Solc et al. 2008). Při překonání I. meiotického bloku se Cdc25B přesouvá do jádra a naopak jádro opouští Wee1B (Oh et al. 2010), která se podílela na inhibiční fosforylaci Cdk1 (Han et al. 2005). Pro import Cdc25B do jádra je důležité snížení míry fosforylace pomocí PKA, jelikož mutace ve fosforylované oblasti významně zvyšuje míru lokalizace Cdc25B v jádře (Oh et al. 2010). Před GVBD také lze detekovat, že dochází k importu cyklinu B1 do jádra (Marangos a Carroll 2004).

V jádře poté zřejmě dochází k fosforylaci Cdc25B pomocí Serum/glucocorticoid-regulated kinase 1 buď přímo, nebo pomocí dráhy které se účastní. Tato fosforylace by měla aktivovat Cdc25B, aby mohla odstranit inhibiční fosfáty z Cdk1 (deLlano et al. 2022). Aktivovaný MPF nakonec může fosforylovat laminy A/C, což povede na rozpad jaderné membrány (Adhikari et al. 2012).

Jedním z mechanismů udržení bloku v meióze I je také degradace cyklinu B1 díky APC/C<sup>Cdh1</sup> (komplex APC/C s Cdh1 jako kofaktorem, vizte Obr. 1) (Reis et al. 2006). Podobný mechanismus je zřejmě uplatňován i u cyklinu B2. Pro překonání bloku je však dostupnost cyklinů B nutná. U komplexu Cdk1-cyklin B2 se zdá, že by zde mohl mít protektivní účinek před degradací pomocí APC/C<sup>Cdh1</sup> protein sororin, jehož schopnost interakce s cyklinem B2 byla ověřena koimunoprecipitací. Použití morpholino nukleotidů proti sororinu totiž vede

k významnému snížení aktivity Cdk1 i množství cyklinu B2 na úrovni proteinu a naopak inhibice proteazomu vede k navýšení množství cyklinu B2 (Zhou et al. 2021).

Během meiózy I dochází k tvorbě prvního meiotického vřetenka (kapitola 1.2.1) a oocyt používá Kontrolní bod dělicího vřetenka (kapitola 1.3.1). Poté dochází k aktivaci komplexu APC/C kofaktorem Cell division cycle protein 20 homolog (Cdc20), což vede na ubikvitinylaci například cyklinu B1 a sekurinu (vizte Obr. 1) (Herbert et al. 2003; Jin et al. 2010). Zároveň je ale nutná i inhibice Cdk1, kterou umožňuje Centrozomální protein 55 (Cep[číslo], Centrosomal protein of [number] kilodaltons) zřejmě přes dráhu blokující fosfatázu Cdc25B (Zhou et al. 2019). Cdc25B ale nesmí být zablokována příliš, protože její deplece vede k problémům v anafázi I (Ferencova et al. 2022). Degradace cyklinu B a inaktivace Cdk1 se tedy podílí na dosažení minima aktivity MPF, které nastává s vyloučením prvního pólového tělíska (Choi et al. 1991; Kubiak et al. 1992; Verlhac et al. 1994).

Dokončením meiózy I a vyloučením poloviny homologních chromozomů (vždy jednoho homologu z páru) do I. pólového tělíska vstupuje oocyt do meiózy II a zastavuje se v metafázi (Donahue 1968). V metafázi II setrvává až do oplození. Ve II. meiotickém bloku je aktivní komplex MPF, ale maximum jeho aktivity je nižší než v meióze I (Kubiak et al. 1992). Jedním ze substrátů Cdk1 je separáza, jejíž inaktivaci zajišťuje inhibitor sekurin (Nabti et al. 2008) ve spolupráci s inhibiční fosforylací pomocí komplexu Cdk1-cyklin B2 (Li et al. 2021). Tato spolupráce umožňuje zabránit předčasné separaci sesterských chromatid.

Dalším významným substrátem Cdk1 je Emi2 (Wu et al. 2007). Zatímco u kontrolních oocytů dochází po vyloučení 1. pólového tělíska k nárůstu množství cyklinu B1, při knock-downu Emi2 k němu nedochází, což je ale možné zvrátit expresí nedegradabilního cyklinu B1. Přítomnost Emi2 je tedy nutná pro ochranu cyklinu B1 před degradací (pro zjednodušené znázornění vizte Obr. 1) (Madgwick et al. 2006). Během MII bloku probíhá syntéza nového cyklinu B, ale jeho celková hladina je udržována konstantní, takže v nízké míře k jeho degradaci dochází. Zajištění správné míry degradace zřejmě souvisí právě s fosforylací Emi2. Pokud je přidán exogenní cyklin B, zvýšení aktivity Cdk1 vede ke zvýšení míry fosforylace Emi2, což způsobuje snížení množství Emi2 interagujících s APC/C<sup>Cdc20</sup> a umožní degradaci přebytečného cyklinu. Aby ale nedošlo k degradaci přílišného množství cyklinu, tak je následně Emi2 pravděpodobně defosforylován díky proteinfosfatáze 2A (PP2A, Protein phosphatase 2A) (Wu et al. 2007).



Emi2 je také regulován pomocí cyklinu B3. Cyklin B3 je exprimován pouze v meióze I (Han et al. 2017), kde v komplexu s Cdk1 fosforyluje Emi2, což umožňuje následnou fosforylací pomocí Plk1 a navedení na degradaci. Naopak komplex Cdk1-cyklin B1 účinnou degradaci neumožňuje (Bouftas et al. 2022). Při injekci mRNA cyklinu B3 myši oocyty pokračují rovnou (bez zablokování v metafázi II) až do vyloučení 2. pólového tělíska ve významně vyšším množství případů než kontroly. Zároveň je u nich možné detekovat významně vyšší míru inhibiční fosforylace Cdk1, kterou je možné zvrátit inhibicí Wee1B nebo Cdk2 (Meng et al. 2020). Nepřítomnost cyklinu B3 v meióze II tedy umožňuje stabilizaci Emi2 a udržení II. meiotického bloku (Bouftas et al. 2022).

K zajištění dostatečné aktivity Cdk1 v II. meiotickém bloku nejspíš také přispívají fosfatáza Cdc25A s duální specificitou (Cdc25A, Dual specificity phosphatase Cdc25A) a Cdc25B (Kang et al. 2013; Oh et al. 2013). RNA interference využívající dsRNA proti Cdc25A vede k překonání bloku a významně snížené aktivitě Cdk1 i MAPK. Na Cdk1 lze v tomto případě detekovat významně vyšší míru inhibiční fosforylace na tyrosinu 15 oproti kontrolám, kterou je možné zvrátit použitím morpholino oligonukleotidů proti Wee1B (Oh et al. 2013).

Dokončení meiózy II nastává po oplození. Faktorem přinášeným spermií je fosfolipáza  $\zeta$ , konkrétně důležitá kvůli své katalytické funkci, kterou je umožnění štěpení fosfatidylinositol-4,5-bisfosfátu na inositoltrisfosfát a diacylglycerol vedoucí na oscilace  $\text{Ca}^{2+}$  iontů (Saunders et al. 2002). Zdá se však, že přítomnost fosfolipázy  $\zeta$  není pro aktivaci vajíčka zcela kritická, protože knock-out samci stále mohou mít potomky. Jejich počet je ale významně nižší než u kontrol a navíc se při použití knock-outovaných myši ve významně vyšší míře než u kontrolních myši vyskytuje polyspermie a abnormální aktivace vajíčka (Nozawa et al. 2018). Po oscilacích  $\text{Ca}^{2+}$  iontů dochází k aktivaci  $\text{Ca}^{2+}$ /calmodulin-dependentní proteinkinázy II (CaMKII,  $\text{Ca}^{2+}$ /calmodulin-dependent protein kinase II) (Madgwick et al. 2005). Substrátem CaMKII je Wee1B, jejíž aktivace umožňuje inhibiční fosforylací Cdk1, což znamená inaktivaci MPF (Oh et al. 2011) a tedy překonání MII bloku. Exprese CaMKII exogenního původu navíc vede k degradaci APC/C inhibitoru Emi2, ale pouze pokud má funkční svou katalytickou aktivitu (Medvedev et al. 2014). Injekce konstitutivně aktivní CaMKII vede ke srovnatelné míře degradace cyklinu B1 a sekurinu jako u oplozených vajíček (Madgwick et al. 2005), což ukazuje důležitost CaMKII aktivity pro umožnění pozdějšího rozchodu sesterských chromatid v anafázi II, a tedy i dokončení meiózy II a vyloučení 2. pólového tělíska.

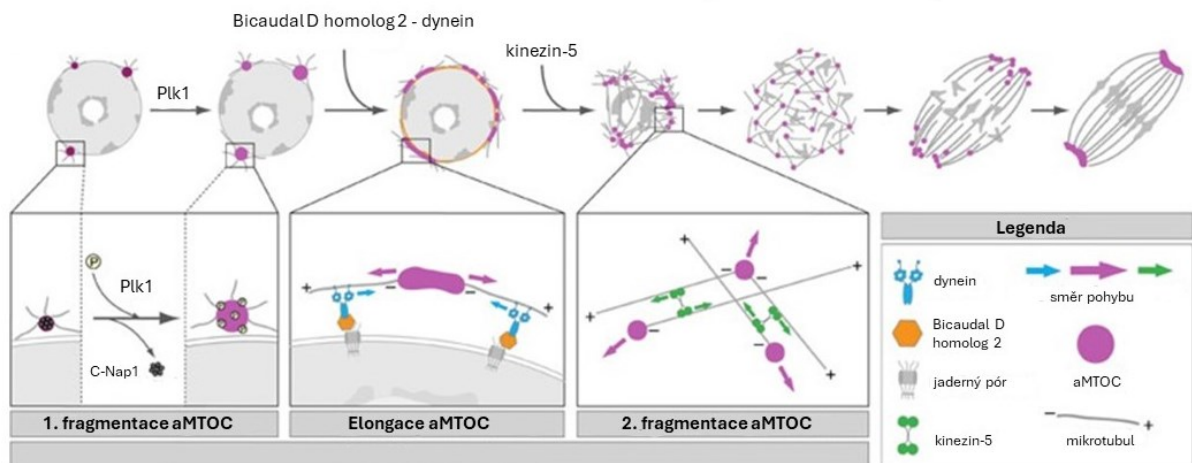
## 1.2 Sestavení vřetének v myších oocytech

### 1.2.1 Sestavení vřeténka myších oocytů v meióze I

V průběhu zrání myších oocytů dochází k eliminaci centrozomů. Nejdříve je možné detekovat oddálení centriol a rozpad prvního páru. Degradace druhého páru ve významné míře nastává až po GVBD (Simerly et al. 2018).

Během profáze I. meiotického dělení následně vzniká de novo velké množství nových acentriolárních mikrotubuly organizujících center (aMTOC, acentriolar Microtubule Organizing Centers) detekovatelných díky obsahu pericentrinu (Schuh a Ellenberg 2007). Součástí aMTOC jsou kromě pericentrinu i další známé pericentriolární proteiny, například  $\gamma$ -tubulin (Clift a Schuh 2015; Baumann et al. 2017), centrozomální proteiny Cep152 (Lee et al. 2018), Cep192 (Clift a Schuh 2015; Lee et al. 2018), Cep215, a proteinu Ve vývoji regulací sníženého, exprimovaného v buňkách neurálních prekursorů (NEDD1, Neural precursor cell expressed, developmentally down-regulated 1) (Baumann et al. 2017). Při depleci Cep152 nebo Cep192 RNA interferencí dochází k významnému zmenšení pozorovatelných ohnisek pericentrinu na aMTOC (Lee et al. 2018). Pericentrin samotný je zřejmě důležitý pro nábor ostatních zmíněných pericentriolárních proteinů, protože jeho podmíněný knock-out vede ke ztrátě NEDD1, Cep215 a významnému snížení koncentrace  $\gamma$ -tubulinu z aMTOC (Baumann et al. 2017). Kromě pericentriolárních proteinů najdeme na aMTOC i kinázy zapojující se do regulace sestavení meiotických vřetének jako jsou Plk1, Aurora kináza A (AurkA, Aurora kinase A) (Lee et al. 2018) a Aurora kináza C (AurkC, Aurora kinase C) (Balboula et al. 2016).

Po vytvoření dostatečného množství aMTOC dochází ke vzniku takzvané mikrotubulární koule. aMTOC se pohybují k intaktnímu jádru, pokrývají jeho povrch a z nich nukleující mikrotubuly tvoří síť na povrchu jádra (Schuh a Ellenberg 2007). V tomto stádiu byla detekována na povrchu aMTOC aktivovaná forma AurkA, která je fosforylována na threoninu 288. Další kinázou nalezenou v této fázi je Polo-like kináza 4 (Plk4, Polo-like kinase 4), která částečně sdílí lokalizaci s Cep192 a navíc se nachází i v oblasti chromatinu (Bury et al. 2017).



**Obr. 2** Navržený model chování aMTOC. Při první fragmentaci aMTOC dochází k uvolňování C-Nap1 díky Plk1. Poté následuje elongace aMTOC závislá na dyneinech kotvených přes Bicaudal D homolog 2. Pro druhou fragmentaci je klíčový kinesin-5. Následně dochází k separaci aMTOC a vytvoření dvou pólů dělicího vřeténka. Upraveno (Clift a Schuh 2015).

Následuje 1. fragmentace aMTOC (vizte Obr. 2), při které z nich disociuje Centrozomální protein 1 asociovaný s Nek2 (C-Nap1, Centrosomal Nek2-Associated Protein 1). Jeho uvolňování je zřejmě řízeno Plk1, jelikož při použití jejího inhibitoru BI 2536 (250 nmol/l) zůstává C-Nap1 asociován s aMTOC (Clift a Schuh 2015), stejně jako při použití podmíněného knock-outu Plk1 (Little a Jordan 2020). Klíčovou složkou pro fragmentaci je zde tedy Plk1, protože její inhibice vede k tomu, že k fragmentaci aMTOC vůbec nedochází, zatímco zvýšená koncentrace C-Nap1 fragmentaci nezabraňuje (Clift a Schuh 2015). Samotná Plk1 by mohla být regulována skrze aktivitu Aurka, protože u podmíněného knock-outu Aurka protein C-Nap1 zůstává na rozdíl od kontrol na aMTOC i po GVBD. Také podmíněné knock-outy vykazují o 60 % menší míru fosforylace Plk1 oproti kontrolním oocytům v metafázi I (Blengini et al. 2021). Inhibice Plk1 vede u 95 % oocytů k vytvoření dočasně monopolárního vřeténka a poté asymetrického bipolárního vřeténka, jehož převedení na symetrické bipolární dělicí vřeténko trvá významně delší dobu než u kontrol. Fragmentace aMTOC pomocí Plk1 je tedy nutná pro včasnou tvorbu symetrického bipolárního vřeténka (Kitajima et al. 2011).

Fragmentované aMTOC se prodlužují a tvoří “stužky“ okolo jaderné obálky (vizte Obr. 2). Prodlužování je závislé na mikrotubulech nacházejících se na jaderné obálce, jelikož přidání 1  $\mu\text{mol/l}$  nokodazolu prodlužování zabraňuje. Z hlediska motorových proteinů, které by toto

prodlužování mohly umožňovat, byl testován kinezin-5 a dynein. Aktivita kinezinu-5 zřejmě není pro natahování kriticky nutná, protože při inhibici monastrole (100  $\mu\text{mol/l}$ ) nedochází k významnému snížení míry elongace aMTOC. Naopak inhibice dyneinu expresí P150-CC1 vede k naprosté blokaci natahování (Clift a Schuh 2015). Dynein je v jaderné obálce kotven adaptérovým proteinem Bicaudal D Homolog 2 (Clift a Schuh 2015; Kitajima et al. 2011). Použití adaptérového proteinu, který nemůže vázat dynein vede k abnormální distribuci mikrotubulů, ale bipolární vřeténko se ustavuje ve srovnatelném čase s kontrolními oocyty. Bylo tedy navrženo, že natažení aMTOC není nutné pro tvorbu bipolárního vřeténka, ale mohlo by se zapojovat do zajištění symetrického rozložení mikrotubulů pro pozdější efektivní připojení chromozomů (Kitajima et al. 2011).

Po elongaci aMTOC na mikrotubulární kouli může dojít k GVBD. Pro normální rychlost GVBD je zřejmě potřeba pericentrin, jelikož podmíněné knock-out oocyty vykazují významně delší dobu nutnou pro dokončení GVBD než kontroly (Baumann et al. 2017). Statisticky významně delší dobu ve srovnání s kontrolami trvá GVBD také v případě inhibice Cep192 díky RNA interferenci (Lee et al. 2018). Při GVBD byl mezi aMTOC a chromozomy detekován Homolog proteinu Hepatoma up-regulated (HURP, Hepatoma up-regulated protein homolog). Jeho lokalizace v této době nebyla odlišná u HURP knock-out a kontrol, ale u knock-out oocytů nedošlo později k vytvoření dvou souměrných pólů vřeténka. Část aMTOC zůstala mezi póly, což znamená, že by HURP mohl být důležitý pro správné rozložení aMTOC na póly (Breuer et al. 2010). Cep192, AurkA a Plk1 i po GVBD stále sdílejí pozici s pericentrinem na aMTOC, která se budou shlukovat ve vznikající póly vřeténka. Naopak Cep152 po GVBD z pólů mizí a lze ho detekovat podél mikrotubulů vřeténka (Lee et al. 2018).

Rozpad jaderné membrány umožňuje uvolnění jaderných faktorů, což by mohlo být vysvětlením masivního nárůstu nukleace mikrotubulů z aMTOC po GVBD. V čase 25 minut po GVBD byl detekován 35x vyšší počet mikrotubulů nukleovaných z aMTOC okolo chromozomů, což teoreticky odpovídá asi 2000x více mikrotubulů na jednom aMTOC oproti počtu v době GVBD. Blokace Ras-příbuzného jaderného proteinu s navázaným guanosintrifosfátem (Ran-GTP, Ras-related nuclear protein-guanosine triphosphate) díky RanT24N vedla k zablokování nárůstu počtu mikrotubulů do 2 hodin po GVBD, ale po uplynutí tohoto času se počet mikrotubulů začal zvedat a dělicí vřeténko bylo vytvořeno, i když s polovičním počtem mikrotubulů oproti kontrole (Schuh a Ellenberg 2007). Po použití RanT24N nebylo možné detekovat protein HURP (Breuer et al. 2010) a zpoždění nárůstu

nukleace díky RanT24N bylo zaznamenáno i v dalších experimentech (Baumann et al. 2017; Bury et al. 2017; Dumont et al. 2007).

Výše uvedená zjištění vedla k představě, že Ran-GTP dráha se na tvorbě vřeténka podílí, ale není pro ni klíčová. Tento pohled byl zpochybněn, protože při použití RanT24N byla oproti kontrole detekována významně vyšší koncentrace volného carga importinu  $\beta$  (jakými jsou i faktory zapojující se do sestavení dělicího vřeténka). K vyvázání carga importinu  $\beta$  je však potřeba funkční Ran-GTP, který by při použití inhibitoru neměl být v dostatečné koncentraci k dispozici. Díky koprecipitaci bylo zjištěno, že RanT24N zřejmě váže endogenní importin  $\beta$ , což znamená zvýšení koncentrace volného carga i bez přítomnosti Ran-GTP. RanT24N byl tedy označen za nespecifický inhibitor. Použití nově vytvořeného RanT24N s dodatečnou substitucí threoninu 42 za alanin vedlo k detekci vzniklých vřetének s vyšší mírou poškození. Zatímco při použití původního RanT24N nebyl rozdíl v počtu chyb v segregaci chromozomů oproti kontrole, tak nová varianta ukázala významně vyšší počet chyb v segregaci oproti kontrolním oocytům (Drutovic et al. 2020). Ran-GTP dráha je tedy zřejmě významným hráčem podílejícím se na tvorbě dělicího vřeténka.

Po dokončení GVBD nastává druhá fáze fragmentace aMTOC (vizte Obr. 2). Tato aMTOC jsou následně separována a shlukují se do dvou pólů vznikajícího vřeténka. Druhá fragmentace není na rozdíl od první řízena dyneinem, protože inhibice jeho adaptérového proteinu Bicaudal D Homolog 2 před GVBD naprosto zabraňuje fragmentaci, zatímco po GVBD fragmentace probíhá srovnatelně s kontrolními oocyty. Naopak v oocytech s inhibovaným kinezinem-5 (monastrolem v koncentraci 100  $\mu\text{mol/l}$ ) není 1. fáze fragmentace ovlivněna, ale po GVBD k fragmentaci nedochází a aMTOC splývají v jeden velký monoaster (Clift a Schuh 2015). Pro druhou fázi fragmentace nutnou pro rozdělení aMTOC mezi dva póly je tedy klíčovým motorovým proteinem kinezin-5 (Clift a Schuh 2015; Kitajima et al. 2011; Schuh a Ellenberg 2007).

Po skončení GVBD dochází zároveň s fragmentací k uvolňování Cep152 z aMTOC. Při depleci Cep152 pomocí RNA interference dochází předčasně k druhé fázi fragmentace. Při inhibici Cdk1 (10  $\mu\text{mol/l}$  RO3306) je kolokalizace Cep152 s pericentrinem po GVBD stále pozorovatelná, zatímco u kontrolních oocytů dochází k disociaci Cep152 z aMTOC. Při zvýšení aktivity Cdk1 v oocytech dochází k druhé fázi fragmentace už před GVBD a také Cep152 disociuje z aMTOC už před GVBD. Uvolňování Cep152 a fragmentace po GVBD jsou tedy zřejmě regulovány pomocí Cdk1 (Lee et al. 2018).

Přibližně do 60 minut po GVBD dochází k individualizaci bivalentů, které vytváří schránku na povrchu mikrotubulární koule (Kitajima et al. 2011). Po 2. fázi fragmentace aMTOC dochází k agregaci aMTOC do několika shluků (Clift a Schuh 2015) a ohniska  $\gamma$ -tubulinu lze detekovat na povrchu i uvnitř koule. V časovém rozmezí 2 hodin 45 minut až 3 hodin 5 minut po GVBD dochází k shluknutí aMTOC do dvou dominantních pólů (Schuh a Ellenberg 2007), přičemž na rovnoměrném rozdělení se zřejmě podílí HURP (Breuer et al. 2010).

Na bipolarizaci vřeténka se také podílí kinetochory chromozomů, klíčové kinázy a fosfatáza. Podmíněný knock-out kinetochorového komplexu Nuclear division cycle 80 vedl u všech 58 studovaných oocytů k absolutní neschopnosti vytvořit bipolární vřeténko v meióze I. Je to zřejmě proto, že rekrutuje na kinetochory crosslinker antiparalelních mikrotubulů Regulator proteinů cytokineze 1 (Prcl, Protein regulator of cytokinesis 1), který je nutný právě pro včasnou bipolarizaci vřeténka (Yoshida et al. 2020). Inhibice Haspin kinázy 5-iodotubercidinem (500 nmol/l) vede u 42 % oocytů v metafázi I k lokalizaci minimálně jednoho aMTOC mimo dominantní póly, což u kontrolních oocytů nebylo pozorováno. Efekt způsobený inhibicí Haspin kinázy lze částečně zvrátit přidáním cRNA AurkC (Balboula et al. 2016). U 40 % oocytů s podmíněným knock-outem kinázy Plk1 k tvorbě bipolárního vřeténka vůbec nedochází (Little a Jordan 2020). Knock-out obou izoforem podjednotky C proteinfosfatázy 2A vede k tvorbě významně delších vřetének než u kontrolních oocytů a je možné detekovat aMTOC i mimo dominantní póly (Tang et al. 2016). Po bipolarizaci vřeténka může začít elongace (Schuh a Ellenberg 2007).

Bivalenty se přesouvají a tvoří elipsovité uspořádání okolo vřeténka. Dochází ke kongresi bivalentů a začíná biorientace chromozomů, pro kterou 86 % chromozomů potřebuje 2 a více pokusů. Inhibice Aurora kináz B a C 200 nmol/l hesperadinu vede ke snížení počtu pokusů o biorientaci, rychlejšímu nástupu anafáze I ve srovnání s kontrolou a ve 100 % případů k neúspěšné segregaci chromozomů (Kitajima et al. 2011). Množství špatně připojených chromozomů je při specifické inhibici AurkC významně vyšší než u kontrolních oocytů, ale srovnatelné s oocyty mikroinjikovanými cRNA dvojité mutantní alely AurkC, která narušuje fungování AurkC i Aurora kinázy B. Proto lze spekulovat, že AurkC je z dvojice Aurora kináza B a AurkC pro umožnění správného připojení chromozomů na mikrotubuly I. meiotického vřeténka tou klíčovou kinázou (Balboula a Schindler 2014). Pro regulaci připojení kinetochorů k mikrotubulům je důležitý také pericentrin, jelikož jeho podmíněný knock-out vede k významně vyššímu počtu nesprávných připojení (Baumann et al. 2017).

Chromozomy se následně dostávají dovnitř vřeténka, dochází ke zvětšování interkinetochorové vzdálenosti mezi dvojicemi sesterských chromatid a vytváří se metafázická destička (Kitajima et al. 2011). V metafázi I lze typicky pozorovat kromě korektního připojení kinetochorů bivalentů k mikrotubulům dělicího vřeténka i připojení nekorektní, konkrétně takzvané merotelické a syntelické připojení. Korektně připojené chromozomy jsou biorientované, přičemž jeden pár sesterských chromatid (které jsou vzájemně koorientované, tedy jejich kinetochory směřují stejným směrem) je navázán k jednomu pólu dělicího vřeténka a druhý pár sesterských chromatid je navázán k druhému pólu. Naopak merotelické připojení znamená, že dochází k připojení kinetochoru na mikrotubuly obou pólů dělicího vřeténka zároveň a syntelické značí připojení obou homologických chromozomů bivalentu ke stejnému pólu vřeténka (Balboula a Schindler 2014).

Jak dochází ke kontrole správného navázání kinetochorů na mikrotubuly? Inhibice Aurora kináz B a C (20  $\mu\text{mol/l}$  ZM447439) vede ke stabilizaci téměř 100 % detekovatelných připojení kinetochorů na mikrotubuly, což ukazuje na jejich schopnost tato spojení destabilizovat. Destabilizace je spojena s fosforylací substrátů na kinetochorech (Davydenko et al. 2013). Rušení vazby kinetochorů na mikrotubuly však v meióze I myších oocytů nefunguje zřejmě jako čistě korekční mechanismus, protože se ukázalo, že dochází k destabilizaci i korektních připojení (Yoshida et al. 2015).

Navržený mechanismus tedy předpokládá, že před zvětšením interkinetochorové vzdálenosti je nutná vysoká kinázová aktivita Aurora kináz B/C, protože v této fázi je velká pravděpodobnost špatného připojení (Davydenko et al. 2013). Po zvětšení interkinetochorové vzdálenosti se však Aurora kinázy B/C dostávají do blízkosti spojení kinetochorů s mikrotubuly, což zřejmě způsobuje destabilizaci i správných připojení (Yoshida et al. 2015). Načasování připojení kinetochorů k mikrotubulům je řízeno pomocí Cdk1 (Davydenko et al. 2013). Konkrétně se do systému regulace pomocí Aurora kináz zřejmě Cdk1 zapojuje díky fosforylaci MAD3/BUB1-příbuzné proteinkinázy (BubR1, MAD3/BUB1-related protein kinase) (Yoshida et al. 2015). BubR1, zároveň fosforylovaná také díky Plk1 (Solc et al. 2015), rekrutuje komplex jehož součástí je PP2A (Yoshida et al. 2015). Tento komplex by pravděpodobně poté měl defosforylovat kinetochorové proteiny a umožnit tím stabilizaci připojení. Model je však nabourán zjištěním, že pokud je do oocytu s podmíněně knock-outovanou BubR1 injikována mRNA BubR1, která se nedokáže vázat na kinetochory, tak se stejně obnovuje tvorba stabilních připojení kinetochorů na mikrotubuly (Touati et al. 2015).

Finální podobu I. meiotického vřeténka, tedy acentrozomální vřeténko barelovitého tvaru se dvěma jasně definovanými póly, lze pozorovat přibližně od 3 hodin a 39 minut po GVBD (Schuh a Ellenberg 2007). Na pólech I. meiotického vřeténka se nachází proteiny  $\gamma$ -tubulin (Balboula et al. 2016), pericentrin (Lee et al. 2018), Cep192 (Lee et al. 2018; Little a Jordan 2020), AurkA (Blengini et al. 2021; Lee et al. 2018), AurkC (Balboula et al. 2016), Plk1 (Lee et al. 2018; Little a Jordan 2020) a NEDD1 (Little a Jordan 2020). Na sestavení vřeténka se podílí i doména podobná tekutině (liquid-like spindle domain) (So et al. 2019), pro jejíž formování je klíčová AurkA (Blengini et al. 2021) a zdá se, že funkci má i Plk1 (Little a Jordan 2020).

Do lokalizace  $\gamma$ -tubulinu a AurkA se zřejmě zapojuje kinesin-like protein KIFC3, protože při jeho inhibici protilátkou nedochází ke koncentraci těchto proteinů na póly vřeténka (Ju et al. 2024). Pozice AurkC je pravděpodobně řízena Haspin kinázou, při její inhibici 5-iodotubercidinem (500 nmol/l) totiž lze pozorovat významně nižší množství AurkC na pólech vřeténka než v oocytech bez inhibitoru (Balboula et al. 2016). Plk1 ovlivňuje lokalizaci Cep192 a NEDD1, protože při podmíněném knock-outu Plk1 v 70 % oocytů nelze detekovat žádný Cep192 a v 74 % případů ani žádný NEDD1 (Little a Jordan 2020).



### 1.2.2 Sestavení vřeténka myších oocytů v meióze II

Meiotická vřeténka v meióze I a II se zřejmě liší svým mechanismem bipolarizace. Bipolární vřeténko v meióze I bylo pozorováno 3 hodiny 39 minut po GVBD (Schuh a Ellenberg 2007), ale II. meiotické vřeténko už za méně než 1 hodinu po vyloučení prvního pólového tělíska (Dumont et al. 2007). Zatímco pro tvorbu vřeténka v meióze I jsou klíčové kinetochory, tak v meióze II je možné vytvořit bipolární vřeténka i při podmíněném knock-outu kinetochorového komplexu Nuclear division cycle 80, který se podílí na rekrutování Prc1. V meióze II je totiž významně vyšší celková koncentrace Prc1 než v meióze I. Pokud je exprese v meióze I zvýšena na úroveň exprese v meióze II, tak tyto oocyty sestaví I. meiotické vřeténko významně rychleji než kontroly. Toto vřeténko je ale morfologicky podobnější vřeténku meiózy II a také u těchto oocytů dochází k výrazně vyšší incidenci aneuploidii než u kontrol s koncentrací Prc1 typickou pro meiózu I. Pravděpodobně je tedy pomalejší sestavení dělicího vřeténka v meióze I nutné pro správný rozchod chromozomů (Yoshida et al. 2020).

Na jeho pólech vřeténka v meióze II lze detekovat  $\gamma$ -tubulin, pericentrin (Baumann et al. 2017), AurkA (Lee et al. 2018; Wang et al. 2021), a Cep192 (Lee et al. 2018). Podobně jako u I. meiotického vřeténka, i v meióze II je pericentrin důležitý pro akumulaci proteinů na pólech a tvorbu vřeténka s normální morfologií (Baumann et al. 2017; Wang et al. 2021). Na rozdíl od vřeténka v meióze I je ale Cep152 lokalizován pouze podél mikrotubulů vřeténka (Lee et al. 2018) a HURP se nachází ve střední části bipolárního vřeténka (Breuer et al. 2010).

Podobně jako v meióze I i v meióze II je vřeténko ovlivněno činností kináz. AurkA lokalizovaná na pólech vřeténka je i v meióze II důležitá pro udržení domény podobné tekutině (Wang et al. 2021). Oocyty s podmíněně knock-outovanými MAPK (konkrétně Extracellular signal-regulated kinase 1 a 2) mají v meióze I srovnatelnou morfologii vřeténka s kontrolami, ale v meióze II vytváří vřeténka abnormálních tvarů (Zhang et al. 2015). Také při podmíněném knock-outu cyklinu A2 nebyly pozorovány žádné problémy s tvorbou I. meiotického vřeténka, zatímco v meióze II vznikala ve významně vyšším počtu případů ve srovnání s kontrolami vřeténka multipolární, s abnormální lokalizací chromatinu a s menším počtem správně připojených kinetochorů k mikrotubulům (Zhang et al. 2017).

Některé podjednotky fosfatáz ovlivňují tvorbu vřeténka pouze v meióze II. Podmíněný knock-out podjednotky A u izofomy  $\alpha$  fosfatázy 2A (Hu et al. 2014) ani podjednotky C fosfatázy 6 (Hu et al. 2015) totiž nevede k žádným významným problémům s formováním I. meiotického vřeténka. V meióze II však nefunkční podjednotka A PP2A vede k tvorbě významně delšího vřeténka ve srovnání s kontrolami, u kterého se navíc netvoří kompaktní

metafázická destička a chromozomy jsou rozptýleny po vřeténku (Hu et al. 2014). Podmíněně knock-outovaná C podjednotka fosfatázy 6 také způsobuje tvorbu II. meiotického vřeténka abnormálního tvaru. Toto vřeténko má AurkA lokalizovanou na rozdíl od kontrolních oocytů i mimo póly. Při částečné inhibici AurkA 20 nmol/l MLN8237 je tvar vřeténka i lokalizace AurkA srovnatelná s kontrolami, což zřejmě znamená, že fosfatáza 6 reguluje aktivitu AurkA (Hu et al. 2015).

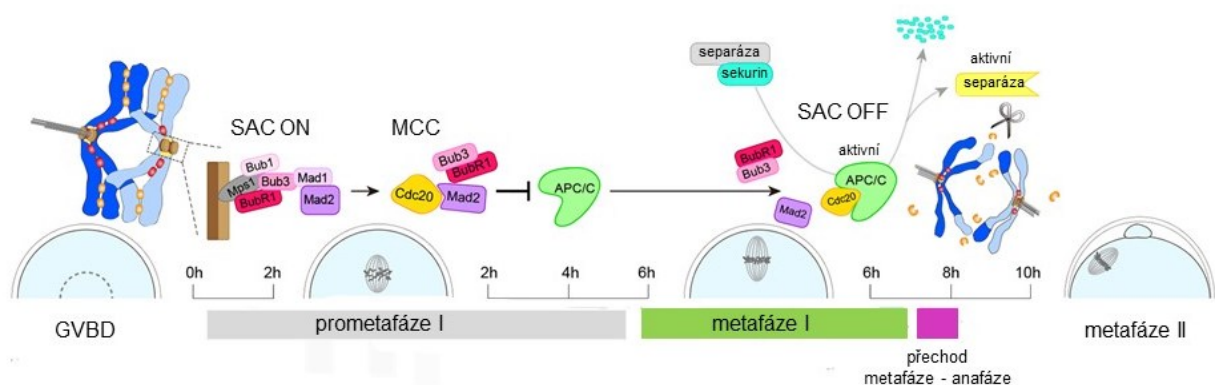
Oocyty zastavené v metafázi meiózy II mají vytvořené barelovitě vřeténko umístěné paralelně ke kortexu buňky. Po oplození dochází k překonání bloku a v anafázi II vřeténko migruje ještě blíže ke kortexu. Sesterské chromatidy jsou rozděleny na opačné póly vřeténka a aktivita mikrofilament umožňuje vřeténku rotovat z paralelní do vertikální pozice vůči povrchu oocytu. V telofázi II se vřeténko prodlužuje a následně dochází k oddělení druhého pólového tělíska (Zhu et al. 2003).

## 1.3 Regulační mechanismy spojené se segregací chromozomů

### 1.3.1 Kontrolní bod sestavení dělicího vřeténka

Jedním z předpokladů pro úspěšné rozdělení chromozomů v mitóze je vazba kinetochor na mikrotubuly dělicího vřeténka. Správný průběh tohoto procesu zajišťuje SAC. Na kinetochoru je katalyzováno sestavování Komplexu kontrolního bodu mitózy (MCC, Mitotic Checkpoint Complex), jehož součástí jsou protein podobný Mitotic arrest deficient 2 (Mad2, Mitotic arrest deficient 2-like protein), protein kontrolního bodu mitózy BUB3 (Bub3, Mitotic checkpoint protein BUB3), BubR1 a Cdc20. Limitující reakcí je zde tvorba komplexu Mad2-Cdc20, pro jehož tvorbu je důležitý komplex skládající se z Proteinu 1 podobnému MAD2 (Mad1, MAD2-like protein 1) a Mad2. Komplexy Mad1-Mad2 se v interfázi nachází v oblasti jaderných pórů a v mitóze se dostávají na neobsazené kinetochory. Mad2 v komplexu Mad1-Mad2 je v tzv. uzavřené formě a jako součást tohoto komplexu umožňuje rekrutovat cytoplazmatický Mad2 v otevřené formě, který na kinetochoru bude moci tvořit komplex s Cdc20 (Lara-Gonzalez et al. 2021).

Sestavené komplexy poté difundují a slouží jako inhibitory APC/C<sup>Cdc20</sup>. Tato inhibice je klíčová, jelikož brání vstupu do anafáze, pro kterou je typická degradace substrátů jako je sekurin a cyklin B právě díky ubikvitin ligázovému komplexu APC/C<sup>Cdc20</sup>. Po stabilní vazbě kinetochoru dochází k ukončení tvorby MCC a inhibice ustává. Teprve navázání všech kinetochorů na mikrotubuly umožňuje pokračování cyklu do anafáze (Lara-Gonzalez et al. 2021). Funguje ale SAC (naznačený na Obr. 3) i v myších oocytech procházejících meiózou?



**Obr. 3** Model kontrolního bodu sestavení dělicího vřeténka (SAC) u myších oocytů procházejících meiózou. V prometáfázi I se na nenavázaném kinetochoru sestavuje MCC, který potom slouží jako difuzní inhibitor APC/C. Po ukončení SAC aktivní APC/C vede na degradaci svých substrátů, jako je například sekurin, který umožňuje aktivaci separázy. Upraveno (Qiao et al. 2023).

Některé klasické komponenty SAC byly v myších oocytech identifikovány. Jsou jimi například Bub1 (McGuinness et al. 2009), Bub3 (Li et al. 2009), BubR1 (Wei et al. 2010), Mad2 a kináza Monopolární vřetenko 1 (Mps1, Monopolar spindle 1) (Hached et al. 2011). Pozornost je zaměřena i na hledání proteinů, které s nimi interagují. Mezi nalezenými je Wings apart-like protein homolog, který je vazebným partnerem Bub3 (Zhou et al. 2020), stejně jako kinesin-like protein KIFC3, u kterého se předpokládá jeho zapojení do lokalizace Bub3 a BubR1 na kinetochory (Ju et al. 2024). Homolog centromerického/kinetochorového proteinu (Zw10, Centromere/kinetochore protein zw10 homolog), se zřejmě zapojuje do rekrutování Mad2 na kinetochory (Park et al. 2019), což je také jednou z funkcí již zmíněné Mps1 (Hached et al. 2011). Typická lokalizace komponent SAC v meióze obnáší přítomnost na kinetochorech od prometafáze I do anafáze I, poté ztrátu detekovatelného signálu a znovu dochází k obnovení až v meióze II (příkladem může být Bub3 (Li et al. 2009) nebo BubR1 ((Wei et al. 2010; Zhou et al. 2020)).

Při narušení fungování komponent předpokládaného SAC u myších oocytů dochází k ovlivnění anafáze I. Výsledkem podmíněného knock-outu Mps1 je významně zrychlený nástup anafáze I (průměrně jde o 2,5 hodiny oproti kontrole), ale tento efekt lze injekcí exogenní Mps1 zvrátit (Hached et al. 2011). Knock-down Bub3 díky RNA interferenci vede u 65 % oocytů (ve srovnání s méně jak 20 % u kontrol) k problematické segregaci v anafázi I. Jeho overexprese umožňuje dojít do meiózy I pouze 10 % oocytů, jejichž Bub3 navíc není lokalizován na kinetochorech, ale mezi chromozomy v rámci bivalentu (Li et al. 2009).

Dále je ovlivněno vyloučení 1. pólového tělíska. Podmíněný knock-out Bub1 umožnil 75 % oocytů vyloučit 1. pólové tělísko v přítomnosti 5  $\mu\text{mol/l}$  nokodazolu. Žádný kontrolní oocyt však v těchto podmínkách pólové tělísko nevyloučil (McGuinness et al. 2009). V případě Mps1 dochází při podmíněném knock-outu k vyšší frekvenci výskytu významně větších pólových tělísek ve srovnání s kontrolami. Autoři spekulují, že důvodem by mohl být nedostatečný čas pro migraci dělicího vřetenka (Hached et al. 2011). Příliš rychlé vyloučení 1. pólového tělíska lze pozorovat také při použití BubR1 s mutovanou doménou zajišťující vazbu na kinetochory (Wei et al. 2010), RNA interferenci zaměřené na Zw10 (Park et al. 2019) či depleci Wings apart-like protein homologu pomocí morpholino oligonukleotidů (Zhou et al. 2020). Při overexpresi Bub3 byly u 5 z 9 oocytů v 1. pólovém tělísku nalezeny pouze bivalenty, což ukazuje na možné zapojení Bub3 do udržování chromozomů v bivalentech (Li et al. 2009).

Narušení předpokládaného SAC v myších oocytech také vede k pozorování zvýšeného výskytu aneuploidií. Fyziologickým stavem v meióze II pro *Mus musculus* je přítomnost 20

dyád. Při podmíněném knock-outu Bub1 však lze ve významně větším počtu případů než u kontrol pozorovat různé typy aneuploidií. Konkrétně nondisjunkci (zůstává intaktní bivalent), předčasně oddělené sesterské chromatidy či kombinaci obou předchozích (přenesení celého bivalentu, který se následně rozpadne na 4 samostatné chromatidy) (McGuinness et al. 2009). Zvýšená míra aneuploidií byla pozorována také v případě experimentů s Bub3 (Li et al. 2009), Mps1 (Hached et al. 2011), Zw10 (Park et al. 2019) a Wings apart-like protein homologem (Zhou et al. 2020). Při kondicionálním knock-outu Mad2 však byla významně zvýšená míra aneuploidií pozorována pouze při kultivaci v nízké teplotě, což by mohlo ukazovat na zapojení do ochrany před stresovými podmínkami (Qiao et al. 2023).

Tyto informace tedy naznačují, že by v myších oocytech mohl být přítomen funkční SAC. Problémem však je, že u myši bylo zjištěno, že oocyty mohou začít anafázi I i v případě, že není vytvořena kompaktní metafázní destička (Kolano et al. 2012; Nagaoka et al. 2011) a všechny chromozomy nejsou správně připojeny na mikrotubuly (Nagaoka et al. 2011).

Možnost zahájit anafázi I v myších oocytech i v případě špatně navázaných chromozomů může být také součástí vysvětlení problémů oocytů starých samic. U oocytů CD-1 myši ve věku 19-25 měsíců byly detekovány univalenty, ale délka meiózy I se u nich nijak nelišila od oocytů mladých CD-1 myši (2-5 měsíců), které univalenty neobsahovaly. Křížením *Mus musculus* a *Mus spretus* vznikly hybridní oocyty, které měly významně větší počet numerických chromozomálních aberací než mladé CD-1 myši. Tyto hybridní oocyty měly v 80 % případů v době vstupu do anafáze I chromozomy mimo metafázní destičku. Stejný fenomén byl pozorován i u 50 % starých CD-1 oocytů, na rozdíl od mladých CD-1 oocytů, které všechny vytvořily před vstupem do anafáze metafázickou destičku kompaktní (Sebestova et al. 2012).

Z výše uvedeného se tedy může zdát, že SAC v oocytech není plně funkční. Alternativou k této představě je vytvoření vlastního modelu. Tento model nenahlíží na SAC jako na vypínač s možnostmi ANO-NE, ale jako na jemnou brzdu řídící délku meiózy I. Inhibice Cdk1 vede k významnému zkrácení délky trvání meiózy I myších oocytů, což ukazuje na její důležitost pro správné načasování. Pokud je použit inhibitor Cdk1 flavopiridol (5  $\mu\text{mol/l}$ ), je možné pozorovat dvojnásobnou míru degradace cyklinu B1 oproti kontrole. Nárůst míry degradace cyklinu B1 nastává také při inhibici Mps1, Aurora kináz i Mad2 (Lane a Jones 2014; Qiao et al. 2023). Zdá se tedy, že degradace cyklinu B1 pomocí APC/C při normálním průběhu meiózy I v myších oocytech nedosahuje svého možného maxima a působení komponent SAC řídí délku meiózy I díky schopnosti oddálit nástup anafáze I. Oddálení anafáze poté nejspíš pomáhá minimalizovat míru aneuploidie díky poskytnutí časového okna pro

opravu špatného navázání kinetochorů na mikrotubuly dělicího vřeténka (Lane a Jones 2014), ale pro postup do anafáze není správné připojení všech chromozomů vyžadováno.

Myší oocyty s inhibovanými Aurora B/C kinázami pomocí ZM447439 vykazovaly zvýšenou míru degradace cyklinu B (Lane a Jones 2014) a sekurinu (Nikalayevich et al. 2022). Zapojují se tedy Aurora B/C kinázy do aktivace SAC? Při inhibici Aurora B/C kináz pomocí ZM447439 (10  $\mu\text{mol/l}$ ) a přidání nokodazolu (400  $\text{nmol/l}$ ) je SAC aktivován, takže přímá aktivace nevypadá pravděpodobně. Aurora B/C kinázy jsou ale součástí korekčního mechanismu připojení kinetochorů k mikrotubulům aktivovaného detekcí nízké tenze bivalentů. Mohly by se tedy podílet na aktivaci SAC nepřímo, protože umožňují zrušení připojení kinetochorů na mikrotubuly a tyto volné kinetochory by mohly už přímo spouštět sestavení SAC (Vallot et al. 2018).

Je tedy možné shrnout, že SAC v myších oocytech funguje, ale zřejmě ne na zcela stejném principu jako v mitoticky se dělících buňkách. Je možné, že má také další specifické funkce. Kromě již zmíněného byla zaznamenána například schopnost SAC zastavit progresi meiózy do anafáze I po detekci poškození DNA. V meióze II už však tento mechanismus není uplatňován (Lane et al. 2017). Navíc je možné, že bude muset dojít k revizi také základního modelu mitotických buněk, aby došlo k začlenění nových poznatků, jako jsou například samostatně fungující subdomény kinetochoru (Sacristan et al. 2024).

### 1.3.2 Regulace oddělení sesterských chromatid

Pro úspěšný rozchod bivalentů v anafázi I je třeba přerušit spojení držící chromozomy u sebe. V důsledku výměny části ramen jsou chromozomy v této chvíli spojeny kohezinovým komplexem distálně od chiazmat. Štěpení fosforylovaného kohezinového proteinu Homolog meiotického rekombinačního proteinu REC8 (REC8, Meiotic recombination protein REC8 homolog) zajišťuje separázu (Kudo et al. 2006). Podmíněný knock-out separázy v 98 % případů oocytům neumožňuje vyloučení 1. pólového tělíska (Ogushi et al. 2021) a chromozomy zůstávají stále ve formě bivalentů (Gryaznova et al. 2021). Nahrazení separázy za proteolyticky neaktivní formu také zabraňuje oddělení homologických chromozomů (Ogushi et al. 2021). Kromě separázy je pro odstranění REC8 také potřeba jeho fosforylace Aurora B/C kinázami, protože při použití jejich inhibitoru ZM447439 zůstávají některé chromozomy i v metafázi II ve formě bivalentů a lze u nich detekovat neodstraněný REC8 v oblasti ramének (Nikalayevich et al. 2022).

Jak je zajištěno, že v anafázi I nedochází rovnou i k oddělení sesterských chromatid? REC8 lze detekovat podél ramének chromozomů v bivalentu a v rámci chromatid konkrétně v centromerických i pericentromerických oblastech. Po začátku anafáze I dochází k jeho ztrátě z ramének chromozomů. V telofázi I lze pozorovat centromerický a pericentromerický REC8. Naopak při vstupu do meiózy II se nachází už jen v malém množství v pericentromerické oblasti, kde umožňuje soudržnost sesterských chromatid. Při podmíněném knock-outu separázy zůstávají všechny tři populace REC8 (na raménkách, v centromerické a pericentromerické oblasti) neodstraněny (Kudo et al. 2006; Ogushi et al. 2021). Zdá se tedy, že centromerický a pericentromerický kohezin je nějakým způsobem před aktivitou separázy v anafázi I chráněn.

Protektivním prvkem by zde mohl být protein Shugoshin 2, který interaguje s fosfatázou PP2A (Rattani et al. 2013; Xu et al. 2009). V oocytu s knock-outovaným Shugoshinem 2 po anafázi I dochází k rozštěpení všech tří typů REC8 kohezinu (Ogushi et al. 2021) a lze detekovat předčasně oddělené sesterské chromatidy (Rattani et al. 2013). Injekce mRNA Shugoshinu 2 schopné interagovat s PP2A tento efekt zvrátí, zatímco pokud jde o formu neschopnou díky substituci vázat PP2A, tak předčasně oddělené chromatidy zůstávají (Rattani et al. 2013). Fosfatáza PP2A by tedy mohla defosforylovat pericentromerickou oblast, čímž by ji chránila před štěpením separázou.

Pro dopravení Shugoshinu 2 do pericentromerické a centromerické oblasti z cytoplazmy je důležitá Mps1 (El Yakoubi et al. 2017; Gryaznova et al. 2021), při její inhibici reversinem (0,5  $\mu\text{mol/l}$ ) obsahovalo 82 % oocytů předčasně oddělené sesterské chromatidy (El Yakoubi et

al. 2017). S Mps1 spolupracuje Bub1, ale na rozdíl od ní zřejmě není klíčovou složkou, protože oocyty exprimující Bub1 bez kinázové aktivity sice mají sníženou míru lokalizace Shugoshinu 2 na pericentromerických i centromerických oblastech, ale neobsahují předčasně oddělené chromatidy (El Yakoubi et al. 2017).

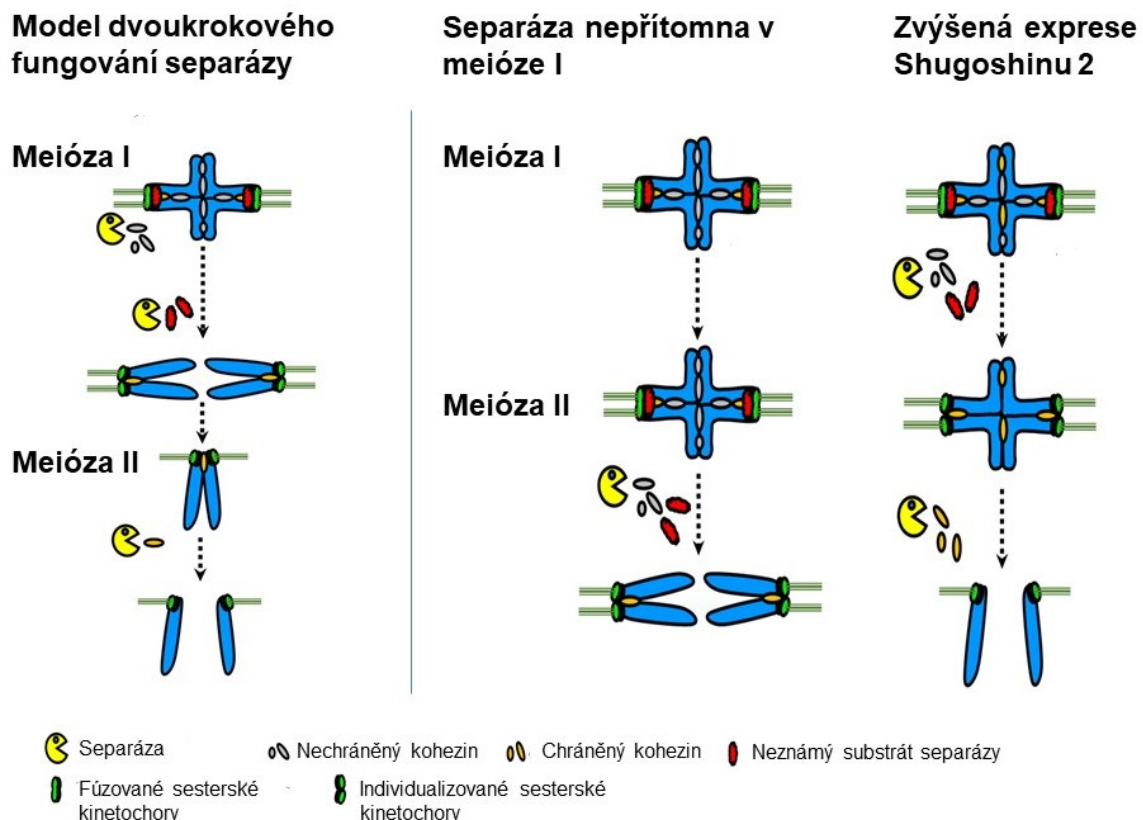
REC8 není jediným substrátem štěpeným separázou. Separáza také odstraňuje N-terminální oblast proteinu meikin (Maier et al. 2021), který se zřejmě zapojuje do regulace Shugoshinu 2 (Kim et al. 2015). Meikin dokáže rekrutovat Plk1 do centromerické oblasti (Kim et al. 2015; Maier et al. 2021), ale po jeho rozštěpení se jeho afinita k Plk1 snižuje (Maier et al. 2021). Inhibice Plk1 (100 nmol/l BI 2536) způsobuje u více jak 50 % testovaných oocytů problémy se správným navázáním v meióze II, zřejmě díky předčasnému oddělení sesterských chromatid (Kim et al. 2015). Exprese meikinu rezistentního proti separáze vede v meióze II ke zvýšení množství Plk1 a Bub1 na kinetochorech a významně vyššímu procentu oocytů se špatně navázanými chromozomy než v kontrole. Vyšší míra fosforylace meikin v meióze I pomocí Plk1 pravděpodobně slouží jako ochrana před degradací díky APC/C (Maier et al. 2021).

Model fungování proteinu meikin vypadá tedy takto: V meióze I se navazuje na kinetochory komplex meikin-Plk1, který je díky fosforylaci chráněn před APC/C degradací. Tento komplex rekrutuje Bub1, který se dále podílí na dopravě Shugoshin 2-PP2A na pericentromerický kohezin a zajišťuje ochranu před separázou. V anafázi I dochází ke štěpení meikin pomocí separázy, meikin ztrácí afinitu k Plk1 a v anafázi II může být degradován pomocí APC/C. Nepomáhá tedy s nábořem Bub1, který by zajistil příchod Shugoshin 2-PP2A. Pericentromerický kohezin už není chráněn před aktivitou separázy a může dojít k rozchodu sesterských chromatid (Maier et al. 2021).

Princip ochrany soudržnosti sesterských chromatid v anafázi I je však pravděpodobně složitější než jen defosforylace chráněných oblastí pomocí PP2A (vizte Obr. 4). Pokud je u oocytu s podmíněným knock-outem separázy přidána funkční mRNA separázy až v metafázi II, dochází pouze k rozpadu bivalentu, ale sesterské chromatidy zůstávají spojeny i přesto, že už by neměly být v této fázi před separázou chráněny (Gryaznova et al. 2021). Není také jasné proč dochází k protekci centromerického kohezinu pouze do telofáze I, zatímco pericentromerický kohezin vydrží až do anafáze II (Ogushi et al. 2021). Klíčovým jevem pro správné načasování rozdělení sesterských chromatid by mohla být takzvaná kinetochorová individualizace (vizte Obr. 4) (Gryaznova et al. 2021).



Už v anafázi I je možné detekovat kinetochory sesterských chromatid jako dva samostatné body (Gryaznova et al. 2021), což ukazuje, že na jejich oddělení není potřeba tvorba bipolární tenze, která nastává až v meióze II. Bipolární síly dělicího vřeténka se nepodílí ani na deprotekcii kohezinu v meióze II jak bylo dříve navrženo (Mengoli et al. 2021). Pro individualizaci kinetochorů je zřejmě kritická právě aktivita separázy, protože podmíněný knock-out separázy v oocyty způsobuje kromě výskytu nerozdělených bivalentů v meióze II také neoddělené kinetochory sesterských chromatid. Uměle zvýšená exprese Shugoshinu 2 v meióze I zabránila odstranění kohezinu z chromozomálních ramének, takže chromozomy zůstaly v bivalentech až do meiózy II, ale nezabránila individualizaci kinetochorů. V těchto oocytech došlo v anafázi II rovnou k rozpadu na jednotlivé chromatidy. Naopak u oocyty s podmíněně knock-outovanou separázou přidání funkční separázy až v meióze II vede pouze k rozpadu bivalentů na jednotlivé chromozomy, ne rovnou na sesterské chromatidy. Separáza tedy zřejmě z nějakého důvodu není schopná najednou zajistit jak individualizaci kinetochorů, tak i odstranění kohezinu držícího sesterské chromatidy pohromadě (Gryaznova et al. 2021).



**Obr. 4** Model dvoukrokového fungování separázy. Upraveno (Gryaznova et al. 2021). V meióze I dochází k individualizaci kinetochorů sesterských chromatid a oddělení bivalentů. V meióze II se pak

rozcházejí samotné sesterské chromatidy. Pokud separáza není v meióze I přítomna a je přidána až v meióze II, dochází poté v meióze II zřejmě pouze k provedení prvního kroku, tedy individualizaci kinetochorů a oddělení bivalentů, ne rovnou k rozpadu až na sesterské chromatidy. Naopak zvýšená exprese Shugoshinu 2 brání pouze oddělení bivalentů, ale ne individualizaci kinetochorů, která pak v meióze II umožní rozpad přímo až na jednotlivé sesterské chromatidy.

## 1.4 Rozdíly mezi myším a lidským oplozením

Laboratorní myš je jedním z nejčastějších modelových organismů používaných pro studium savců, a tedy i člověka. I přesto existují mezi myším a lidským oplozením některé významné rozdíly.

Akrozomální reakce je jedním z klíčových kroků umožňujících spermii úspěšné oplození. S hledáním místa jejího průběhu *in vivo* ale u myši pomohlo až vytvoření transgenických spermií obsahujících fluorescenční protein Enhanced Green Fluorescent Protein v akrozomu. Nejdříve bylo zjištěno, že u 77 % kapacitovaných spermií *in vivo* v době dosažení oblasti kumulárních buněk už proběhla akrozomální reakce. Žádná z 9 spermií, které se dostaly až na zonu pellucidu neměla intaktní akrozom (Jin et al. 2011). V pozdějším experimentu bylo detekováno 62 % spermií po akrozomální reakci už v oblasti horního isthmusu vejcovodu a 95 % v ampulle (La Spina et al. 2016). Při použití myši bez hormonální simulace bylo dokonce ve 3 ze 4 případů zachyceno v ampulle 100 % spermií, které už podstoupily akrozomální reakci (ve 4. případě jich bylo 98 %) (Hino et al. 2016). U člověka tento experiment není možné provést, a proto se stále předpokládá, že akrozomální reakce je indukována glykoproteiny zony pellucidy, což je mechanismus pozorovatelný *in vitro* (Hoshi et al. 1993).

U myši byla zjištěna odlišná struktura zony pellucidy. Zatímco myš má zonu pellucidu tvořenou třemi druhy glykoproteinů (Bleil a Wassarman 1980), u člověka byly nalezeny čtyři (Lefièvre et al. 2004). U myši (konkrétně například *Mus musculus*) totiž zřejmě došlo k mikrodeleci v genu pro Zona pellucida sperm-binding protein 4, která způsobila posun čtecího rámce a vytvoření STOP kodonu, což ve výsledku znamenalo pseudogenizaci (Goudet et al. 2008). Některé druhy spadající do *Murinae* ale mají Zona pellucida sperm-binding protein 4 zachovaný, příkladem může být *Mastomys coucha*. Jeho nepřítomnost na oocytech *Mus musculus* nicméně pro *in vitro* fertilizaci spermii *Mastomys coucha* není limitujícím faktorem (Izquierdo-Rico et al. 2021).

U člověka bylo zjištěno, že Zona pellucida sperm-binding protein 4 exprimovaný bakulovirem byl schopný indukovat akrozomální reakci kapacitovaných lidských spermií (Chakravarty et al. 2005), což ukazuje na možnou roli v oplození. Při použití králíka se však ukázalo, že rychlost prvotního rýhování presumptivních zygot vytvořených *in vitro* fertilizací se nelišila u knock-out jedinců a kontrol (Lamas-Toranzo et al. 2019).

Dalším rozdílem je zřejmě odlišná důležitost některých homologních proteinů pro oplození. Příkladem může být akrosin. Knock-out myši samci mají normální počet mláďat,

protože spermie bez akrosinové aktivity zřejmě jen penetrují zonu pellucidu pomaleji (Adham et al. 1997). U člověka však inhibice akrosinu sójovým trypsinovým inhibitorem (2 mg/ml média se spermii) naprosto brání penetraci zony pellucidy (Liu a Baker 1993). U myši bylo později zjištěno, že proteolytická aktivita akrosinu vede pouze k remodelaci Zona pellucida sperm-binding proteinu 2, ne jeho degradaci jak bylo dříve předpokládáno (Kuske et al. 2021). Lidský akrosin je navíc schopen *in vitro* proteolýzy Zona pellucida sperm-binding proteinu 4, který se, jak bylo zmíněno výše, u myši na zoně pellucidě nenachází (Saldívar-Hernández et al. 2015).

Strukturně se myší a lidské oocyty liší i na úrovni oolemy. Zatímco lidský oocyt je homogenně pokrytý mikrovilli (Santella et al. 1992), u myši se vytváří tzv. microvilli-free region. Tato oblast se nachází u ovulovaných oocytů nad dělicím vřeténkem meiózy I a je velmi bohatá na aktin. K jejímu vzniku zřejmě dochází v průběhu vývoje oocytu, protože nezralé myší oocyty mají mikrovilli rozložené rovnoměrně po celém povrchu a při inhibici GVBD je možné tvorbě microvilli-free regionu zabránit (Longo a Chen 1985). Spermie se do oblasti bez mikrovilli téměř nikdy nevážou a absence mikrovilli tak zřejmě slouží u myši jako pojistka před srážkou s dělicím vřeténkem (Talansky et al. 1991). I přes rovnoměrné rozložení mikrovilli na oocytu se ani u lidí nevážou spermie všude se stejnou pravděpodobností, čímž vznikají preferovaná místa. Zřejmě je důležité, aby daný úsek obsahoval lipidické rafty s dostatečným obsahem sfingolipidu monosialotetrahexosylgangliosidu, bez něhož téměř nikdy nedochází k úspěšné fúzi (Van Blerkom a Caltrider 2013).

U lidského vajíčka se na oolemě navíc nachází na mikrovilli protein MAIA (také známý jako Fc receptor-like 3) zapojený do fúze membrány oocytu a spermie. MAIA na mikrovilli blíže asociuje s Juno a *in vitro* interaguje jak s Juno, tak i s Izumo1, který se nachází na spermii. Po vyvázání Juno z oolemy Izumo1 zřejmě prochází konformační změnou umožňující vazbu MAIA, která poté udělá vlastní konformační změnu a nejspíš se podílí na přiblížení membrán, což pomáhá umožnit fúzi. MAIA se u myši nenachází, ale podobnou funkci by mohl mít Fc receptor-like protein 5 (Vondrakova et al. 2022).

Významnou odlišností pro tuto práci je původ centriol embrya. Zatímco u myši dochází k jejich degradaci v průběhu vývoje (Manandhar et al. 1998; Simerly et al. 2016), lidská spermie je s sebou přináší při oplození (Sathananthan et al. 1991),

Myší centrioly jsou detekovatelné ještě ve stádiu spermatid a nejdříve bylo pozorováno, že distální centriola degraduje už ve varlatech, zatímco proximální až v nadvarlatech

(Manandhar et al. 1998). V novějším experimentu však byly obě centrioly ve varlatech intaktní a signál se začal ztrácet až v oblasti dolní corpus epididymis. Dokonce i když jsou do oocyty injikovány spermie z caput epididymis s ještě zachovalými centriolami, tak v zygotě nevytváří centrozomy a dochází k tvorbě vřeténka využívajícího aMTOC jako u kontrol (Simerly et al. 2016). Nové typické centrioly jsou vytvářeny *de novo* 3. den embryonálního vývoje a dochází k jejich maturaci až do 7. dne embryonálního vývoje, kdy se stávají efektivními MTOC (Xiao et al. 2021).

U člověka nejdříve panovala představa, že distální centriola je v průběhu vývoje degradována a do oocyty je předávána jen proximální (Manandhar et al. 2000). V roce 2018 však bylo zjištěno, že distální centriola nepodléhá degradaci, ale je pouze remodelována. Zřejmě je následně v zygotě také funkční, jelikož *in vitro* je schopna náboru proteinů pericentriolární matrix (Fishman et al. 2018). Kromě centriol přináší spermie také asociované centrozomální proteiny. Příkladem může být pericentrin, který je detekovatelný ve spermii a u *in vitro* oplozených vajíček, ale ne u partenogeneticky aktivovaných. U partenogeneticky aktivovaných byl zjištěn až v odpovídající 5. den embryonálního vývoje. To možná znamená, že došlo k jeho *de novo* syntéze ve významném množství až po majoritní reaktivaci genomu embrya (Amargant et al. 2021).

Rozdíly mezi myším a lidským oplozením mohou komplikovat také využití v diagnostice před asistovanou reprodukcí. Jednou z metod používaných v zahraničí je testování fertilizačního potenciálu spermií skrze měření schopnosti aktivace myšího oocyty (Heindryckx et al. 2005). Tato metoda by však nemusela být průkazná u všech případů, protože bylo zjištěno, že lidská fosfolipáza  $\zeta$  má významně vyšší aktivitu při *in vitro* štěpení fosfatidylinositol-4,5-bisfosfátu myšího oocyty oproti enzymu myšího původu (Nomikos et al. 2014). Jako efektivní řešení se u hraničních případů ukázalo použití měření aktivace po oplození lidských oocytů, které zbyly po asistované reprodukci jiných párů (Ferrer-Buitrago et al. 2018).

## 1.5 Vznik prvojader a sestavení dělicího vřeténka v zygotě

K fúzi myší spermie s oolemou dochází ve vzdálenosti větší jak 24  $\mu\text{m}$  od místa, kde se pod membránou nacházejí chromozomy oocyty. Po fúzi se paternální chromozomy pohybují podél periferie zygoty za pomoci mikrofilament. Bylo pozorováno jejich oddálení až o 43  $\mu\text{m}$ , ale nikdy se nedostávají zpět blíže než na 30  $\mu\text{m}$  k maternálním chromozomům (Mori et al. 2021).

Před anafází II vajíčka lze označené jádro spermie pozorovat jako intenzivní fluorescentní bod u periferie buňky v oblasti kde došlo ke vstupu spermie. V anafázi II vajíčka se pozorovatelný obsah jádra spermie zvětšuje díky dekonduzaci chromatinu a maxima dosahuje v době vyloučení 2. pólového tělíska (Adenot et al. 1991). Na dekonduzaci se podílí nucleoplasmin 2, který zřejmě umožňuje vyvázání protaminů (Inoue et al. 2011). Také nejspíše dochází k vyvázání spermatických histonů H3.3 a jejich vyloučení v rámci 2. pólového tělíska. Nahrazení probíhá histony H3.3 maternálního původu (Kong et al. 2018) pomocí chaperonu Hira (Lin et al. 2014). Následuje pomalá a rychlá fáze rekondenzace paternálního chromatinu. Vytvořením jaderné obálky okolo paternálních chromozomů nakonec vzniká samčí prvojádro (Adenot et al. 1991).

Ještě 2 hodiny po anafázi II zůstávají maternální chromozomy zcela kondenzovány (Zhou a Homer 2022) a dekonduzace začíná až v době rychlé rekondenzace samčího chromatinu (Adenot et al. 1991), což znamená, že maximum dekonduzace samčího i samičího chromatinu lze pozorovat až 4 hodiny po anafázi II (Zhou a Homer 2022). Správné načasování začátku dekonduzace samičích chromozomů je zřejmě závislé na aktivitě Cdk1 (Zhou a Homer 2022).

Po oplození se aktivita Cdk1 v průběhu 30 minut snižuje asi o 60-70 % díky proteolytické degradaci cyklinu B pomocí APC/C a inhibiční fosforylaci Cdk1 kinázou Wee1B, což umožňuje nástup anafáze II vajíčka. Po začátku anafáze II se aktivita Cdk1 stabilizuje na 30-40 % maxima po dobu asi 3 hodin. Tato stabilizace je nutná pro správné formování samčího prvojádra. Inhibice Cdk1 flavopiridolem totiž po konci 1. inaktivace zrychluje dekonduzaci samičího chromatinu o 2-3 hodiny, ale k dekonduzaci samčího chromatinu v této chvíli nedochází. Výsledkem jsou pak zpoždující se chromozomy v první mitóze u 6 z 11 zygot. Po 3 hodinách stabilní aktivity dochází k 2. fázi inaktivace, která už je řízena pouze inhibiční fosforylací Cdk1 kinázou Wee1B. Zajištění dostatečné doby stabilizace aktivity Cdk1 je zřejmě umožněno díky přesunu Wee1B z cytoplazmy do oblasti mezi rozcházejícími se chromatidami

(midzone) druhého meiotického vřeténka. Tady před 2. fází inaktivace Cdk1 dochází ke koncentraci Cep55, který pravděpodobně umožňuje konstrikci midzone. Tím dochází k uvolnění Wee1B do cytoplazmy, kde může inhibovat Cdk1 a umožnit spuštění dekondenzace samičího chromatinu ve správnou dobu (Zhou a Homer 2022).

Po vytvoření prvojader dochází k jejich migraci do středu buňky (Chaigne et al. 2016; Scheffler et al. 2021), která trvá asi 12-15 hodin (Chaigne et al. 2016). Maternální prvojádro se tvoří typicky blíže středu a v prvních 30 minutách migruje asi 6x pomaleji než paternální prvojádro. Pokud jsou u samičího prvojádra depolymerizovány mikrotubuly držící ho více u středu a dojde k jeho posunutí k periférii, tak zrychlí i na začátku migrace. Rychlá fáze pohybu je zřejmě umožněna díky tomu, že samčí prvojádro se tvoří v oblasti vniknutí spermie, která je obohacená o proteiny Spire a Formin-2. Tato kuželovitá oblast se zploští a tím postrčí prvojádro směrem dovnitř do buňky. Za prvojádrem se koncentruje Spire a Formin-2 nukleující aktin, který potom umožňuje pohyb prvojádra ke středu (Scheffler et al. 2021). Důležitost aktinu pro migraci ilustruje i neschopnost prvojader dostat se do středu a častá asymetrická první dělení po jeho inhibici cytochalasinem D (1 mg/ml) (Chaigne et al. 2016).

Podobnou rychlost obě prvojádra získávají asi v době 2-8 hodin od svého vytvoření a na této pomalejší fázi se kromě aktinu podílí i mikrotubuly a jejich dyneinové motory (Scheffler et al. 2021). Na začátku mitózy se prvojádra nachází zhruba ve středu buňky a každé prvojádro samostatně prochází rozpadem jaderné membrány a dochází v něm ke kondenzaci chromozomů. Kolem vznikajícího vřeténka se následně tvoří aktinová klec, která je v metafázi upevněna ke kortexu buňky, jehož kontrakce je převáděna na aktinovou klec motorovým proteinem myozinem II. To vede k vycentrování vřeténka do středu buňky (Chaigne et al. 2016).

U bovinních a možná i lidských zygot se na migraci podílejí centrozomy. U obou druhů je chromatin koncentrován v jedné části periferie prvojádra a při setkání prvojader ve středu buňky tyto koncentrované části směřují k sobě (Cavazza et al. 2021). U myši naopak zřejmě zůstává chromatin v prvojádře po celou dobu rovnoměrně rozložen (Courtois et al. 2012). Ve většině bovinních zygot byl nalezen alespoň jeden centrozom v oblasti styku prvojader, který byl asociovaný s chromozomy. Zygoty, které neměly v tomto místě přítomen ani jeden centrozom měly problém s koncentrací chromatinu ke stýkajícím se periferiím prvojader a následně častější výskyt problémů se segregací chromozomů. Díky studiu bovinních zygot byl vytvořen model ukazující na změnu rozložení komplexů proteinů propojujících nukleoskelet s cytoskeletem při migraci prvojader. Tyto proteiny zřejmě asociují s dyneiny a ty poté táhnou

prvojádro po mikrotubulech nukleovaných z centrozomů (Cavazza et al. 2021). V lidských zygotách ale neschopnost koncentrovat chromatin ke stýkajícím se periferiím prvojader zřejmě automaticky neznamená kritický vývojový problém. Tento fenomén byl detekován u 39,4 % zygot, vytvořených technikami asistované reprodukce, ze kterých nakonec vznikly živě narozené děti (Porokh et al. 2024).

U myši se okolo prvojader akumulují cytoplazmatické aMTOC (Reichmann et al. 2018). Pro akumulaci je nutná aktivita dyneinu (Courtois et al. 2012). V oblasti těchto aMTOC lze detekovat přítomnost Plk4 (Coelho et al. 2013), v oblastech samčího a samičího prvojádra pak fosforylovanou AurkA (Kovarikova et al. 2016) a Cep152 (Coelho et al. 2013). Na rozdíl od tvorby meiotického vřeténka zde nedochází k tvorbě jedné kompaktní mikrotubulární koule a chromozomy jsou stále pozorovatelné jako dvě odlišitelné masy (Courtois et al. 2012). Po rozpadu jaderných membrán se AurkA přesunuje do oblasti aMTOC (Kovarikova et al. 2016), kde navíc kolokalizují Plk4 s Cep152 (Coelho et al. 2013). Plk4, AurkA i Cep152 podobné rozložení vykazují i při formování I. meiotického vřeténka (vizte kapitolu Sestavení vřeténka myších oocytů v meióze I).

Pro první mitózu také pravděpodobně mohou být důležité produkty exprimované až v zygotě. Zatímco Regulator of G-protein signaling 14 není detekovatelný v oocytu v meióze II, tak v zygotě už ano. Knock-out homozygoti se nerodí, ale problém zřejmě není v dokončení meiózy II, protože u všech Regulator of G-protein signaling 14 negativních zygot bylo pozorováno úspěšné vyloučení 2. pólového tělíška. Okolo prvojader žádné z Regulator of G-protein signaling 14 negativních zygot se však následně nevytvořila denzní oblast mikrotubulů ani vřeténko barelovitého tvaru (Martin-McCaffrey et al. 2004).

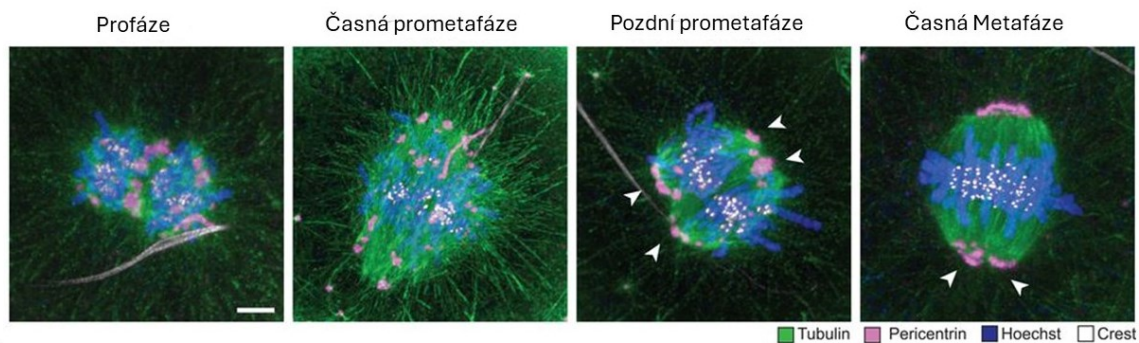
Po rozpadu jaderných membrán u myši dochází v prometafázi k tvorbě mikrotubulární monopolární masy, která se postupně organizuje (Courtois et al. 2012). Mikrotubuly však nejdříve nevychází z aMTOC, která obklopovala prvojádra. Nukleují z kinetochorů chromozomů, což umožňuje vytvoření 2 vřetének: jednoho pro maternální chromozomy a druhé pro paternální chromozomy (vizte Obr. 5). aMTOC jsou později atrahována na vznikající póly obou bipolárních vřetének (Reichmann et al. 2018).

Při inhibici Plk1 (Baran et al. 2016) nebo AurkA (Kovarikova et al. 2016) dochází ke zpoždění formování bipolárního vřeténka. Při depleci Plk4 pomocí dsRNA navíc ještě ke snížení nukleace mikrotubulů a tvorbě monopolárního vřeténka. Deplece Cep152 potom vykazuje podobný fenotyp, což bylo mohlo znamenat, že s Plk4 spolupracuje na bipolarizaci



(Coelho et al. 2013). Na ní se také zřejmě podílí kinezin-5, protože jeho inhibice vede k tvorbě monopolárního vřeténka (Courtois et al. 2012). Tvorba monoasteru nastává také při inhibici kinezinu-5 po GVBD v meióze I (Clift a Schuh 2015; FitzHarris 2009) a je tedy možné, že i v zygotě se podílí na rozložení aMTOC mezi póly vřetének.

Dvě vřeténka byla pozorována *in vivo* od časně prometafáze až do metafáze díky rozlišitelným pólům (ukázáno na Obr. 5). V rámci prometafáze dochází k paralelizaci vřetének, končící v metafázi tvorbou složeného barelovitého vřeténka (Reichmann et al. 2018), které se tvarem podobá meiotickému vřeténku (Courtois et al. 2012).



**Obr. 5** Sestavení dělicích vřetének v zygotě myši. Upraveno (Reichmann et al. 2018). Okolo maternálních i paternálních chromozomů se tvoří samostatné dělicí vřeténko. V prometafázi se vřeténka vyrovnávají (paralelizují) a v metafázi tvoří složené barelovité vřeténko. Tubulin je součástí mikrotubulů, pericentrin je součástí aMTOC, Hoechst označuje chromozomy a Crest značí kinetochory. Šipky ukazují na póly vřetének. Měřítko ukazuje vzdálenost 5  $\mu\text{m}$ .

Obě vřeténka jsou zřejmě funkčně nezávislá, protože pohyb maternálních chromozomů před metafází nevykazuje korelaci s pohybem paternálních chromozomů. Dokonce i po fúzi v jedno složené vřeténko lze v anafázi při pohybu chromozomů pozorovat vychýlení pozice maternální poloviny chromozomů vůči paternální, která putuje ke stejnému pólu. V časném embryonálním vývoji (asi do stádia 4 buněk) se poté maternální a paternální chromozomy nachází v odlišných kompartmentech jádra (Mayer et al. 2000; Reichmann et al. 2018).

Dvě vřeténka tvořící postupně jedno fúzní byla pozorována i u bovinních zygot vytvořených *in vitro* fertilizací. Možnost rozlišit dvě vřeténka ještě v metafázi závisela především na počáteční poloze prvojader. Pokud byla prvojádra blízko u sebe v profázi i prometafázi, bylo možné je rozlišit u 8 % zygot. Pokud však měla prvojádra v profázi a

prometafázi větší vzdálenost (22 % zygot), tak docházelo k tvorbě oddělených vřetének asi 30 - 65  $\mu\text{m}$  od sebe a bylo možné pozorovat i jejich segregaci chromozomů v anafázi (Schneider et al. 2021).

U bovinních zygot se na migraci prvojader pravděpodobně podílí centrozomy (Cavazza et al. 2021). Bovinní zygoty však mohou vytvářet vřeténka schopná zajistit rozchod chromozomů i s jedním, nebo žádným centrozomem. U všech pozorovaných zygot docházelo k nukleaci mikrotubulů z centrozomů před a v průběhu rozpadu jaderných membrán prvojader. V době 10 minut po rozpadu membrán se ale zdá, že většina mikrotubulů nukleovala na chromozomech (Schneider et al. 2021), což připomíná myší model. Centrozomy navíc zřejmě v rámci tvorby bipolárních vřetének mohou být mezi vřeténky přetahovány, či pokud jsou dostatečně blízko, tak dokonce i inkorporovány až do vzniklého fúzního vřeténka (Schneider et al. 2021).

Tvorba vřeténka v zygotě člověka není kvůli etickým a legálním problémům s výzkumem zatím jasná. Na klinikách lidské asistované reprodukce byla pozorována embrya jejichž blastomery mají špatný počet jader. To připomíná fenotyp myších zygot, u kterých velká počáteční vzdálenost mezi prvojádry vede na problém s paralelizací vřetének a tvorbě podobných embryí (Reichmann et al. 2018).

V roce 2019 bylo publikováno pozorování lidské fixované zygoty v anafázi, která měla dvě rozeznatelná vřeténka, ale autoři připouští, že neví, zda-li se jedná o abnormalitu (Xu et al. 2019). Při studiu lidských zygot se 3 prvojádry a čtyřmi centrozomy bylo zjištěno, že dochází k nukleaci mikrotubulů z MTOC značených pericentrinem (předpokládané centrozomy) těsně před rozpadem jaderných membrán a tyto mikrotubuly se poté prodlužují k nejbližším chromozomům bez ohledu na to, jestli byly maternálního, nebo paternálního původu. Výsledkem je vytvoření kvadrupolárního vřeténka (Kai et al. 2021). Multipolární vřeténka však mohou tvořit i lidské zygoty s normálním počtem centrozomů (Currie et al. 2022). Spekulaci o možné nukleaci mikrotubulů z chromozomů podobně jako u myších nebo bovinních zygot nahrává také mechanismus používaný při nukleaci mikrotubulů v lidských oocytech. Tvoří se zde totiž takzvané huMTOC (jehož součástí není pericentrin na rozdíl od myších aMTOC a centrozomů), které po GVBD fragmentuje a je rekrutováno na kinetochory chromozomů, kde nukleují mikrotubuly (Wu et al. 2022).

## 2 Cíle práce

- 1) Srovnat imunodetekci lokalizaci a relativní intenzitu signálu Mad2 proteinu u zygot CD-1 x CD-1 a BDF1 x CD-1 před rozpadem prvojader
- 2) Zjistit, zda je možné v zygotách myši využít proby SPY505-DNA a SiR-tubulin pro:
  - a) vizualizaci lokalizace a dynamiky chromozomů a tubulinu
  - b) sestavení dělicího vřeténka
- 3) Za pomoci těchto prob a časosběrné konfokální mikroskopie analyzovat časové a prostorové parametry první mitózy v zygotách kmene CD-1 a v zygotách kříženců BDF1 x CD-1

### 3 Materiál a metody

#### 3.1 Zvířata

S experimentálními zvířaty bylo pracováno podle Zákona č. 246/1992 Sb., na ochranu zvířat proti týrání. Zvoleným modelovým organismem byla myš domácí (*Mus musculus*). Jako matky zkoumaných zygot (a tedy i oocytů) byly vybrány samice outbredního kmene CD-1 zakoupené z Chovného a uživatelského zařízení laboratorních zvířat Lékařské fakulty Masarykovy univerzity v Brně, staré vždy alespoň 3 měsíce. Otcí zygot byly samci buďto znovu kmene CD-1 (označení zygot CD-1 x CD-1), či samci kmene B6D2F1/JRccHsd (označení zygot BDF1 x CD-1) zakoupení ze společnosti AnLab v Praze.

Původním plánem bylo zařadit také samce inbredních kmenů C57BL/6 a C3H. Přípuštění samců kmene C57BL/6JOlaHsd (AnLab, Praha) k samicím CD-1 však ve většině případů nevedla k tvorbě zygot. Při použití párů CD-1 x C3H (AnLab, Praha) zygoty vznikaly, ale v době vypracovávání diplomové práce došlo k výpadku chovů, a tak po zestárnutí původních rodičovských párů nebylo možné samce nahradit novými.

### 3.2 Izolace oocytů a embryí

Samicím kmene CD-1 bylo intraperitoneálně injikováno 5 IU gonadotropinu ze séra březích klisen (Pregnant Mare Serum Gonadotropin; RP1782725000, Biovendor, Česká republika). Po 44-48 hodinách byly dále stimulovány injekcí lidského choriového gonadotropinu (human chorionic gonadotropin; CG10, Merck, Německo) a připuštěny k CD-1 nebo BDF1 samcům.

Další den po připuštění bylo u samic zkontrolováno jestli došlo k vytvoření vaginálních zátek a 16-27 hodin po aplikaci lidského choriového gonadotropinu byly izolovány zygoty a embrya.

Pro izolaci byly nejprve samice usmrceny cervikální dislokací a *post mortem* z nich byly vypreparovány vejcovody a vaječníky. Při manipulaci s buňkami byl používán stereomikroskop Stemi 508 (Zeiss, Německo).

Se zygotami bylo pracováno ve dvou skupinách, odlišených podle kmene samce (CD-1 či BDF1). Izolace zygot byla provedena narušením ampully vejcovodu v M2 médiu (M7167, Merck, Německo) preparačními jehlami. Vyplavené zygoty byly poté inkubovány v 30  $\mu$ l kapce M2 média s 1 mg/ml hyaluronidázy (H1115000, Merck, Německo) než došlo k uvolnění kumulárních buněk. Poté byly zygoty promyty v kapce stejného objemu čistého M2 média. Následně byly zygoty dále přeneseny přes tři 30  $\mu$ l kapky KSOM média (MR-121, Merck, Německo) překrytého olejem (NO-100, Nidacon, Švédsko) a inkubovány ve 37 °C a 5% CO<sub>2</sub> dokud nebyly dále použity.

Izolace GV oocytů (Germinal vesicle; oocytů ve stádiu zárodečného váčku) byla provedena narušením vaječníků preparačními jehlami v M2 médiu s 1  $\mu$ l/ml 3-isobutyl-1-methylxanthinu (410957, Sigma-Aldrich, Merck, Německo). Vybrané oocyty byly následně přeneseny do 30  $\mu$ l kapky M16 média (M7292, Merck, Německo) s 0,5  $\mu$ l/ml 3-isobutyl-1-methylxanthinu a promyty přes tři další kapky. Poté byly v tomto médiu po dobu 1 hodiny inkubovány ve 37 °C a 5% CO<sub>2</sub>. Následně byly z těchto oocytů mechanicky pipetou odstraněny kumulární buňky v 30  $\mu$ l kapce čistého M16 média a poté byly oocyty přeneseny přes 3 kapky čistého M16 média a ponechány inkubovat ve výše zmíněných podmínkách do dalšího použití.

### 3.3 Imunodetekce

Oocyty a zygoty byly rozděleny do dvou skupin podle kmene samce (CD-1 či BDF1). Obě skupiny pak byly fixovány po dobu 20 minut v pokojové teplotě v blokovacím roztoku (složeném z 0,1% bovinního sérového albuminu a 0,01% Tween 20 v fosfátovém pufru Phosphate-Buffered Saline) s 2% paraformaldehydem (ve fosfátovém pufru Phosphate-Buffered Saline) ve skleněných nádobkách překrytých parafilmem. Následně byly buňky na destičkách promyty ve 3 po sobě jdoucích kapkách blokovacího roztoku a umístěny do 4. kapky s 0,1 % Tritonem X-100 ředěným ve fosfátovém pufru Phosphate-Buffered Saline. Destičky pak byly přeneseny na 15 minut do vlhkých komůrek, aby mohlo dojít k permeabilizaci.

Po permeabilizaci následovaly další promytí přes 3 po sobě jdoucí kapky blokovacího roztoku a znovu umístění do vlhkých komůrek po dobu 15 min, aby došlo k zablokování nespecifických vazebných míst. Buňky byly posléze inkubovány přes noc v lednici ve skleněných nádobkách zakrytých parafilmem s primární protilátkou Rabbit anti-MAD2 (PLA0087-100UL, Merck, Německo) ředěnou v poměru 1 : 250 v blokovacím roztoku.

Následující den byly buňky přeneseny ze skleněných nádobek na destičky do kapky blokovacího roztoku. V blokovacím roztoku byly buňky promyty a následně byly destičky inkubovány 15 min ve vlhkých komůrkách. Tento postup byl poté ještě dvakrát zopakován (celkem tedy 3 promytí pro každou skupinu).

Po uplynutí 15 min od 3. promytí byly buňky přeneseny do skleněných nádobek obsahujících sekundární protilátku Goat anti-Rabbit Alexa Fluor 488 (A-11070, Invitrogen, ThermoFisher Scientific, Spojené státy americké), ředěnou 1 : 500 v blokovacím roztoku, a 4',6-diamidin-2-fenylindol, známý také pod zkratkou DAPI, (10236276001, Merck, Německo) ředěný 1 : 1000 ve stejném roztoku. Skleněné nádobky překryté parafilmem byly poté ponechány po dobu 1 hodiny ve tmě v pokojové teplotě.

Následně byly buňky přeneseny na destičky do kapky blokovacího roztoku, promyty, a inkubovány po dobu 15 minut ve vlhkých komůrkách. Toto promytí a inkubace bylo ještě dvakrát zopakováno (celkem tedy 3 promytí stejně jako při promývání po primární protilátce).

Z poslední promývací kapky pak byla každá skupina přenesena do vlastní 3  $\mu$ l kapky blokovacího roztoku na společnou 35mm imaging misku s 14mm jamkou a překryta olejem. Buňky byly poté snímány na konfokálním mikroskopu.

### 3.4 Barvení pomocí vitálních barviv

Pro barvení pomocí vitálních barviv byly použity zygoty a oocyty izolované výše uvedeným způsobem. U zygot (rozdělených na dvě skupiny podle kmene otce) byla ve stereomikroskopu zkontrolována přítomnost prvojader.

Zygoty s viditelnými prvojádry byly přeneseny do 30  $\mu$ l kapky KSOM obsahující vitální barviva SPY505-DNA (SC101, Spirochrome, Švýcarsko) (ředěno 1 : 1000 ze zásobního roztoku, kde je barva naředěná 1 : 1000 v dimethylsulfoxidu) a SiR-tubulin (SC002, Spirochrome, Švýcarsko) (ředěno na koncentraci 1  $\mu$ l/ml, zásobní roztok byl podle návodu připraven v koncentraci 1 milimol/l v dimethylsulfoxidu) a inkubovány po dobu 90 minut ve 37 °C a 5 % CO<sub>2</sub>. To samé bylo provedeno s oocyty. Následně byly zygoty přeneseny na imaging misku do dvou 3  $\mu$ l kapek KSOM s barvivy (jedna kapka pro zygoty s otcem z CD-1 kmene, druhá pro zygoty s otcem z BDF1 kmene) překrytých olejem.

Pro experiment zkoumající možnost uvolňování prob do oleje byly použity stejné koncentrace prob v oleji jako ve výše uvedeném médiu určeném pro snímání.

V případě experimentu zkoumajícího vliv verapamilu byla použita koncentrace 10  $\mu$ mol/l verapamilu ve výše zmíněném KSOM médiu obsahujícím proby. Tato koncentrace je doporučena v datasheetu patřícím k barvivu SiR-tubulin.

### 3.5 Mikroskopie

Signál Mad2 a DAPI byl měřen na konfokálním mikroskopu Leica STELLARIS 5. Oocyty byly skenovány bez zamontování ve vodném roztoku, a proto byl použit HC PL APO CS2 40x/1.1 vodní imerzní objektiv. Absorbance byla měřena s použitím excitace ve vlnových délkách 405 nm (pro DAPI) a 499 nm (pro Alexa Fluor 488). Detekce byla provedena za pomoci hybridních detektorů HyD S v rozsahu 420–504 nm a 658–808 nm. Pro každou zygotu bylo použito 101 optických řezů, přičemž tloušťka jednoho řezu činila 792 nm.

Data z časosběrné mikroskopie zygot byla získána na konfokálním mikroskopu Leica STELLARIS 5 vybaveném EMBL inkubátorem (EMBL, Německo) udržujícím 37 °C a 5 % CO<sub>2</sub>. Použit byl HC PL APO CS2 40x/1.1 vodní imerzní objektiv. Absorbance byla měřena s použitím excitace ve vlnových délkách 505 nm (pro SPY505-DNA) a 642 nm (pro SiR-tubulin). Detekce byla provedena za pomoci hybridních detektorů HyD S v rozsahu 510–619 nm a 651–750 nm. Každá zygota byla snímána v 17 optických řezech, s tloušťkou řezu 4,128 μm, v 5 minutových intervalech.

Experimenty věnující se vlivu oleje a verapamilu byly provedeny na konfokálním mikroskopu Leica SP5 s EMBL inkubátorem (EMBL, Německo) v podmínkách 37 °C a 5 % CO<sub>2</sub>. Použit byl HCX PL APO CS2 40x/1.1 vodní imerzní objektiv. Absorbance byla měřena s použitím excitace ve vlnových délkách 496 nm (pro SPY505-DNA) a 633 nm (pro SiR-tubulin). Detekce byla provedena za pomoci hybridních detektorů. U experimentu věnujícímu se vlivu oleje bylo pro každý oocyt použito 60 optických řezů s tloušťkou jednoho řezu činící 990 nm. V experimentu zabývajícím se vlivem verapamilu bylo použito 19 optických řezů pro každý oocyt, s tloušťkou jednoho řezu činící 3,26 μm, v 5 minutových intervalech.



## **3.6 Analýza obrazu**

### **3.6.1 Analýza dat z imunodetekce**

Data byla analyzována v programu Fiji (U. S. National Institutes of Health, Spojené státy americké.) Relativní intenzita signálu Mad2 byla měřena na středním snímku obsahujícím průřez prvojádrem. Pro výběr celého prvojádra viditelného na snímku byla použita metoda segmentace obrazu na základě úrovně signálu (anglicky Tresholding-Based Image Segmentation), která umožňuje vybrat ROI (region of interest), která odpovídá specifickému tvaru prvojádra, protože intenzita signálu Mad2 není v celém prvojádře homogenní a použití manuálně umístěného ROI by mohlo vést k výběru nereprezentativní oblasti. V případě, že prahování nebylo možné použít v Mad2 kanálu, byl výběr stejným způsobem proveden v kanálu DAPI a poté aplikován na odpovídající snímek Mad2 kanálu. Pokud ani jedna z těchto metod prvojádru nebyla schopna prvojádru správně vybrat, bylo toto prvojádru z analýzy vyřazeno. Naměřená intenzita signálu v prvojádře byla následně korigována pomocí odečtení intenzity naměřené ve stejně velkém výběru v cytoplazmě.

Pro analýzu dat týkajících se vlivu prob v oleji a účinku verapamilu na CD-1 oocyty byly použity manuální výběry (regions of interest) v oblasti pólu vřeténka a na chromozomech metafázické destičky. V případě zkoumání relativní intenzity signálu proby SiR-tubulin v cytoplazmě oocyty v experimentu zabývajícím se účinkem verapamilu byl také použit manuální výběr, a navíc byla také provedena korekce na pozadí díky odečtení intenzity naměřené ve stejně velkém výběru mimo buňku.

### **3.6.2 Analýza dat z časoběrného snímání**

Data z časoběrného snímání byla analyzována v programu Imaris 10.0.1 (Oxford Instruments, Velká Británie).

Objem a vzdálenost prvojader byly měřeny v posledním časovém bodě v chromozomálním kanálu (detekovaném skrze SPY505-DNA), kde byla prvojádru ještě intaktní. Čas anafáze byl poté určen podle prvního časového bodu kde byl viditelný rozchod chromozomů.

Pro měření objemů prvojader, jejich vzdálenosti a délky a šířky fúzních vřetének byly vytvořeny trojrozměrné modely pomocí označení daných objektů ve všech optických řezech kde byly v daném časovém bodě viditelné. Vzdálenost prvojader byla určena jako vzdálenost středů trojrozměrných modelů. Délka a šířka vřeténka byly měřeny v časovém bodě anafáze – 2 (tj. 2 snímky, tedy 10 minut před anafází dané zygoty).

### **3.7 Statistické zpracování dat**

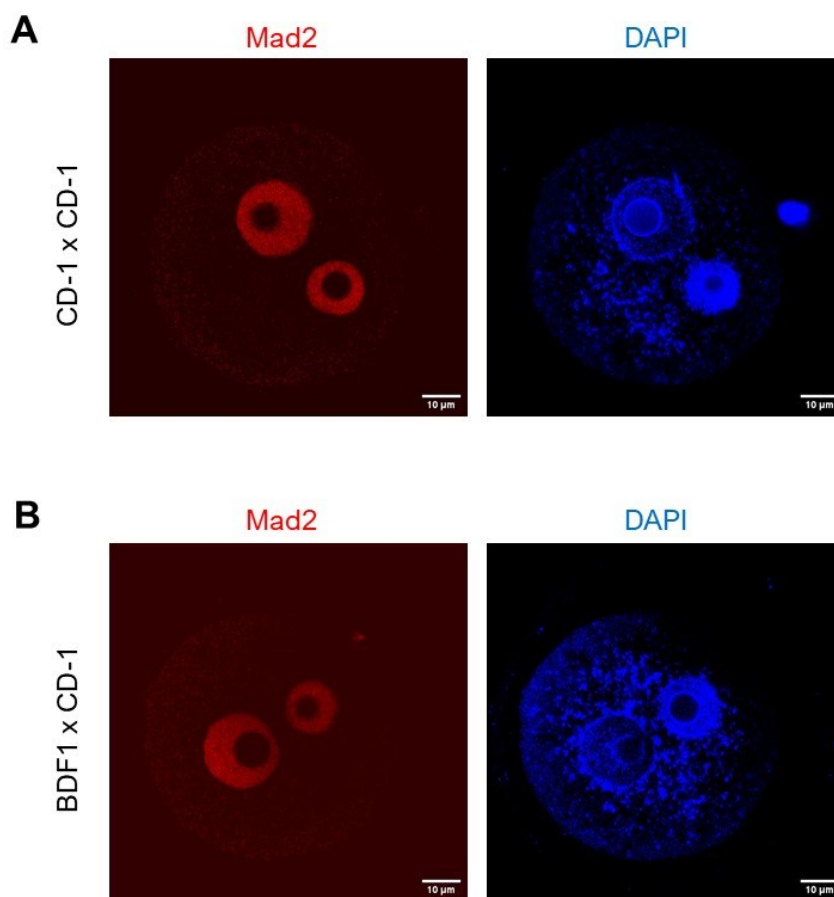
Statistická analýza byla provedena na datech v programu GraphPad Prism 10 (GraphPad Software, Boston, Massachusetts, Spojené státy americké) pomocí Mannova-Whitneyho testu.

## 4 Výsledky

### 4.1 Imunodetekce Mad2 v prvojádrech zygot

Srovnání zygot CD-1 x CD-1 a BDF1 x CD-1 pomocí imunodetekce mělo být původně zaměřeno na aktivitu SAC díky měření relativní intenzity signálu SAC proteinu na metafázických chromozomech, ale v průběhu zpracování této práce kolegové z laboratoře publikovali článek ukazující významně nižší úroveň relativní intenzity signálu SAC proteinu Mad1 v zygotách ve srovnání s oocyty, což spolu s dalšími zjištěními ukazovalo, že v zygotě zřejmě SAC není funkční (Horakova et al. 2024). Pro tuto práci proto nakonec bylo vybráno srovnání relativní intenzity signálu Mad2 před rozpadem prvojader.

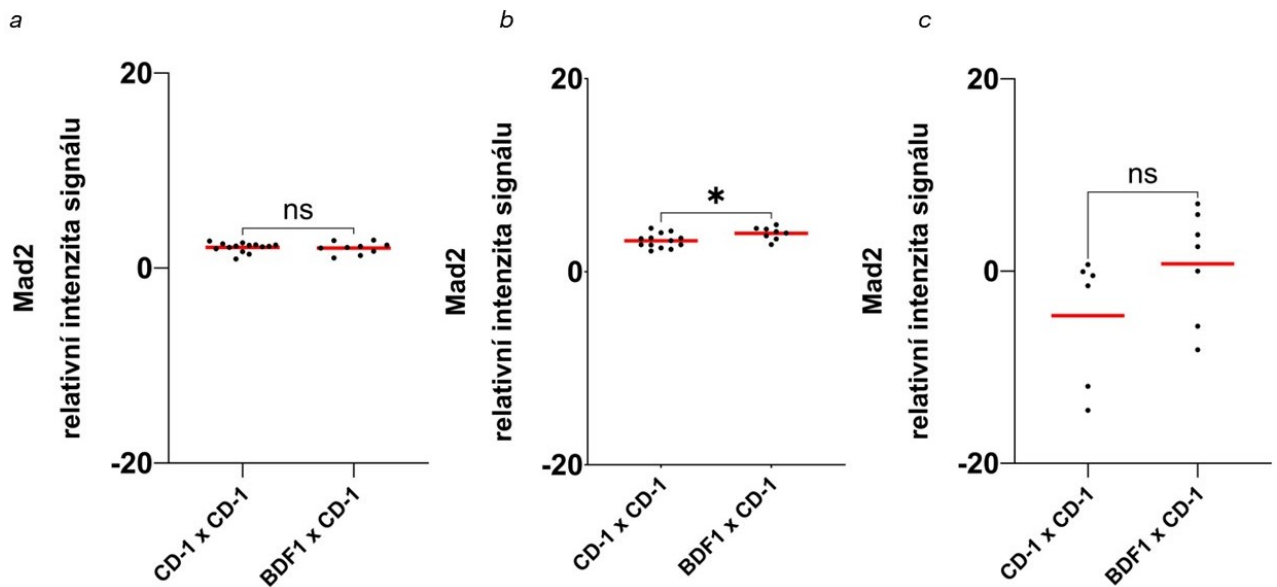
Lokalizace Mad2 proteinu před rozpadem prvojader se mezi CD-1 x CD-1 a BDF1 x CD-1 zygotami nelišila, v obou případech byl signál Mad2 detekován v oblasti obou prvojader s výjimkou jadérek (vizte Obr. 6).



**Obr. 6** Imunodetekce Mad2 v zygotách v interfázi. **(A)** Lokalizace Mad2 v zygotě CD-1 x CD-1, vpravo pro srovnání lokalizace DAPI používaného pro značení DNA. **(B)** Lokalizace Mad2 v zygotě BDF1 x CD-1, vpravo pro srovnání lokalizace DAPI používaného pro značení DNA. Měřítko ukazuje délku 10 µm.

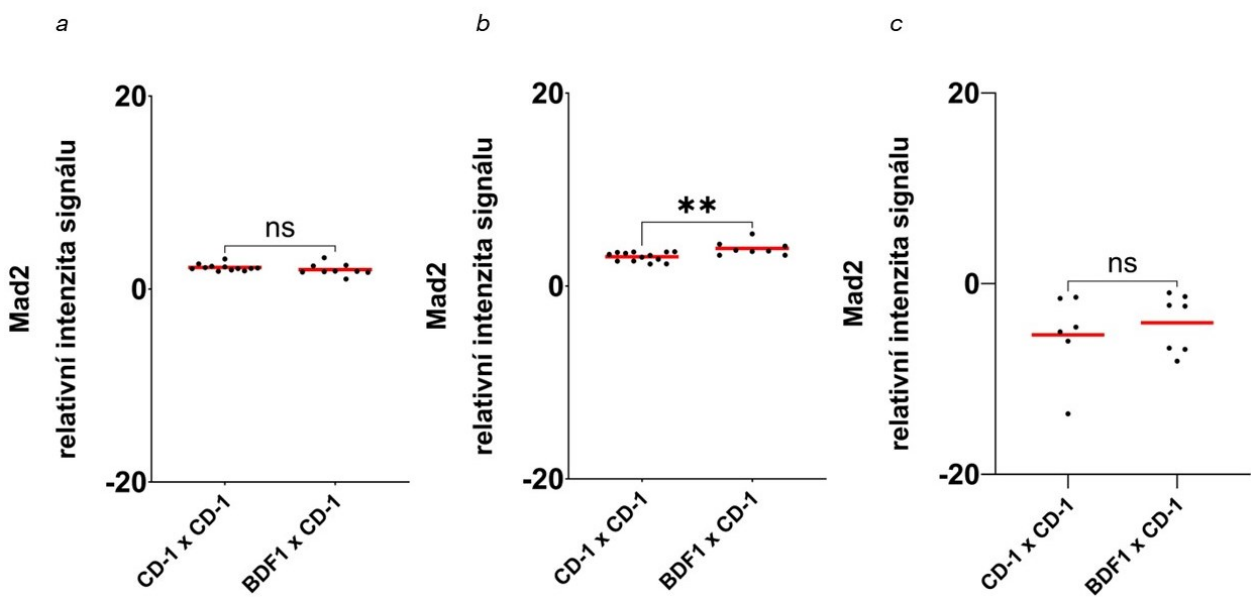
Relativní intenzita signálu Mad2 se mezi CD-1 x CD-1 a BDF1 x CD-1 zygotami významně lišila v jednom ze 3 nezávislých experimentů, a to jak v případě maternálních (vizte Obr. 7), tak i paternálních prvojader (vizte Obr. 8).

Srovnání signálu Mad2 maternálních prvojader



**Obr. 7** Srovnání signálu Mad2 maternálních prvojader po odečtení relativní intenzity signálu Mad2 v cytoplasmě. \*:  $p < 0,05$ . Červené úsečky značí průměr dané skupiny.

Srovnání signálu Mad2 paternálních prvojader

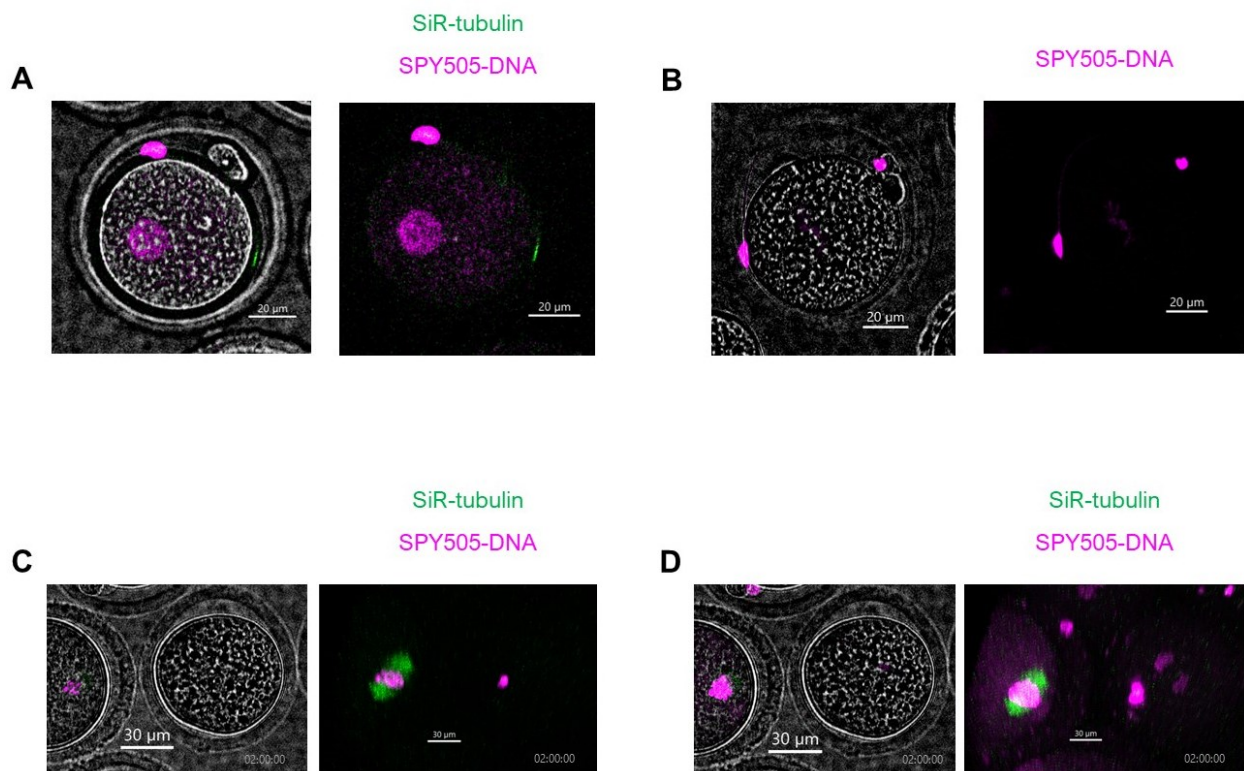


**Obr. 8** Srovnání signálu Mad2 paternálních prvojader po odečtení relativní intenzity signálu Mad2 v cytoplasmě. \*:  $p < 0,025$ . Červené úsečky značí průměr dané skupiny.

## 4.2 Proby procházející přes membránu

Proby procházející přes membránu SPY505-DNA (dále v celé práci zobrazené magentou) a SiR-tubulin (zeleně) se podařilo použít k zobrazení DNA a tubulinu ve skupině CD-1 x CD-1 zygot i BDF1 x CD-1 zygot, ale ukázalo se, že práce s nimi má potenciální nevýhody.

Při časosběrném snímání zygot obou skupin bylo možné pozorovat buňky, které měly v perivitelinním prostoru spermie, zřejmě zachycené díky bloku polyspermie. Spermie byly probami SPY505-DNA a SiR-tubulin také nabarveny, přičemž hlavička spermie byla probou SPY505-DNA detekována významně lépe než DNA embryí (vizte Obr. 9 část A a B), a to jak v případě srovnání s ještě nerozpadlým prvojádrém embrya, tak i s chromozomy tvořícími metafázickou destičku.

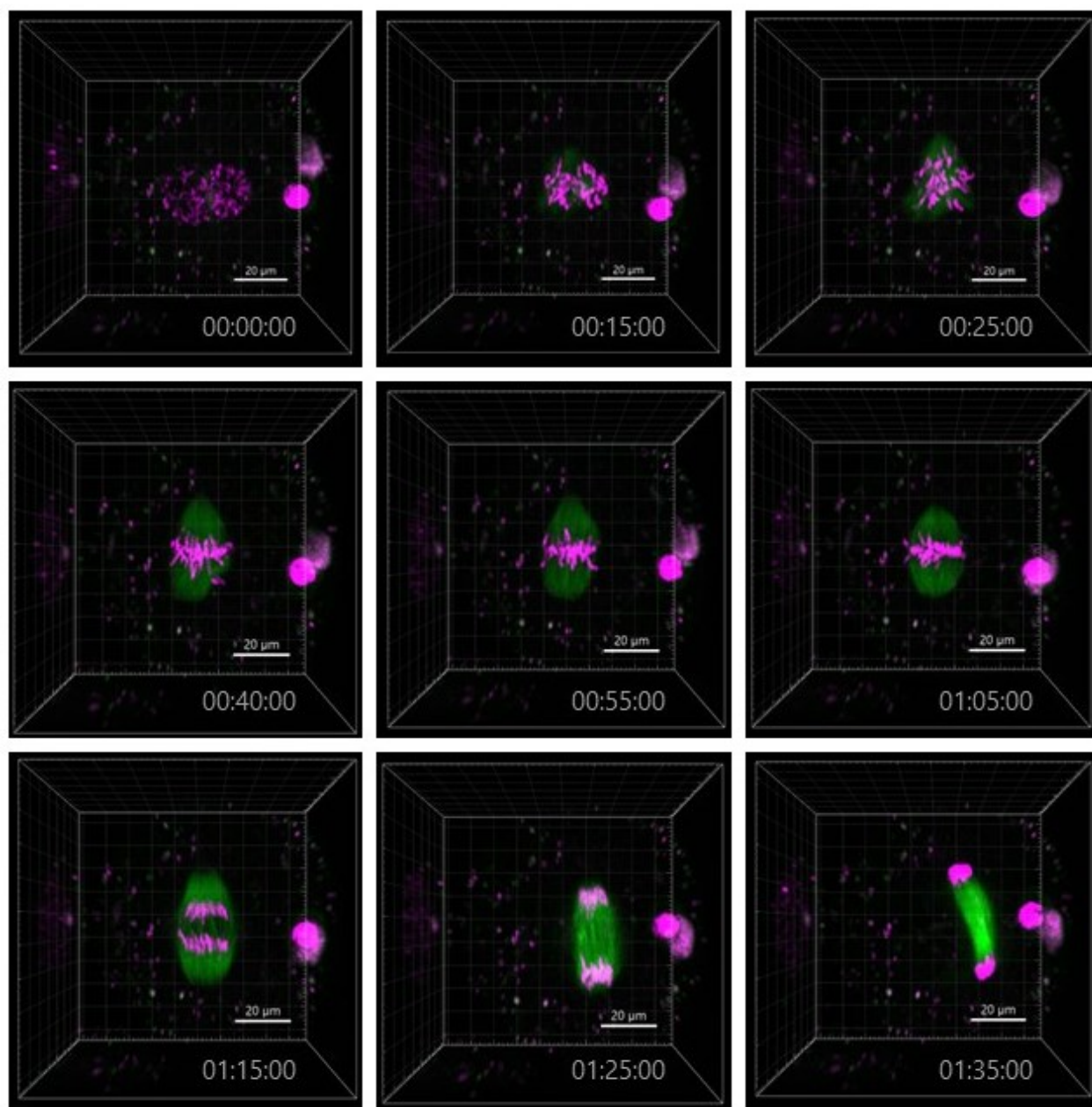


**Obr. 9** Srovnání detekce probami u zygot, spermií a oocytů **(A)** CD-1 x CD-1 zygota s viditelnou spermii v perivitelinním prostoru ve stádu ještě nerozpadlých prvojader. **(B)** BDF1 x CD-1 zygota s viditelnou spermii v perivitelinním prostoru a chromozomy uspořádanými do metafázické destičky. **(C)** Srovnání CD-1 oocytu s BDF1 x CD-1 zygotou při optimalizaci viditelnosti vřeténka oocytu. Vedlejší zygota zrovna postupuje anafázi, ale chromozomy nejsou viditelné. **(D)** Srovnání CD-1 oocytu s BDF1 x CD-1 zygotou (stejně buňky jako v C) při optimalizaci viditelnosti chromozomů zygoty podstupující anafázi. Čas je vyjádřen ve formátu hh:mm:ss od rozpadu prvojader.

Pozorovatelný rozdíl byl i při srovnání CD-1 oocytů se zygotami. Při změně parametrů jasů a kontrastu při prohlížení nasnímaných buněk je možné vidět, že při zaměření se na nejlepší viditelnost vřeténka v oocytu nelze chromozomy ve vedlejší zygote vůbec pozorovat (vizte Obr. 9 část C), zatímco když je na stejném snímku zaměření na chromozomy zygoty (zrovna procházející anafází, vizte Obr. 9 část D) jsou pixely vřeténka s chromozomy ve vedlejším oocytu saturované.

Tato odlišnost není pouze zajímavostí při analýze nasnímaných dat, ale znamená, že není možné nastavovat síly laserů pro časověné snímání podle oocytů, jelikož toto nastavení vede k situaci viditelné na Obr. 9 (část D), kde je vidět vřeténko oocytu, ale v zygote (i přes probíhající anafázi chromozomů) vřeténko vůbec viditelné není. Pro získání analyzovatelných dat bylo také nakonec nutné přejít od snímání celého zorného pole ke snímání jednotlivých buněk (metoda použitá pro všechny 3 nezávislé experimenty prezentované níže).

I přes optimalizaci snímání byla u obou skupin ve všech experimentech patrná variabilita míry šumu v cytoplazmě, zejména u proby SPY505-DNA. Na Obr. 10 je ukázán nasnímaný průběh první mitózy u "ideální" zygoty CD-1 x CD-1. Je zde vidět průběh sestavení fúzního dělicího vřeténka. Nejprve dochází k rozpadu prvojader, okolo kterých se později tvoří mikrotubulární masa. Jelikož nejsou značeny póly vřetének, tak pokud nejsou vřeténka zcela oddělená, není snadné je od sebe odlišit. Postupně se sestavuje fúzní bipolární vřeténko, na němž dochází ke kongresi chromozomů a nakonec anafázi. Stejně kvality snímání však rozhodně nebylo možné dosáhnout u všech buněk, srovnajte například s Obr. 16 z oddílu 4.4.1 Rozpad prvojader, který ukazuje průběh mitózy zygoty CD-1 x CD-1 s extrémním zpožděním rozpadu jednoho z prvojader. Z tohoto důvodu nebyl také nakonec do analýzy zařazen parametr zpoždění chromozomů při anafázi (lagging), protože ho nebylo možné u některých zygot jasně určit.



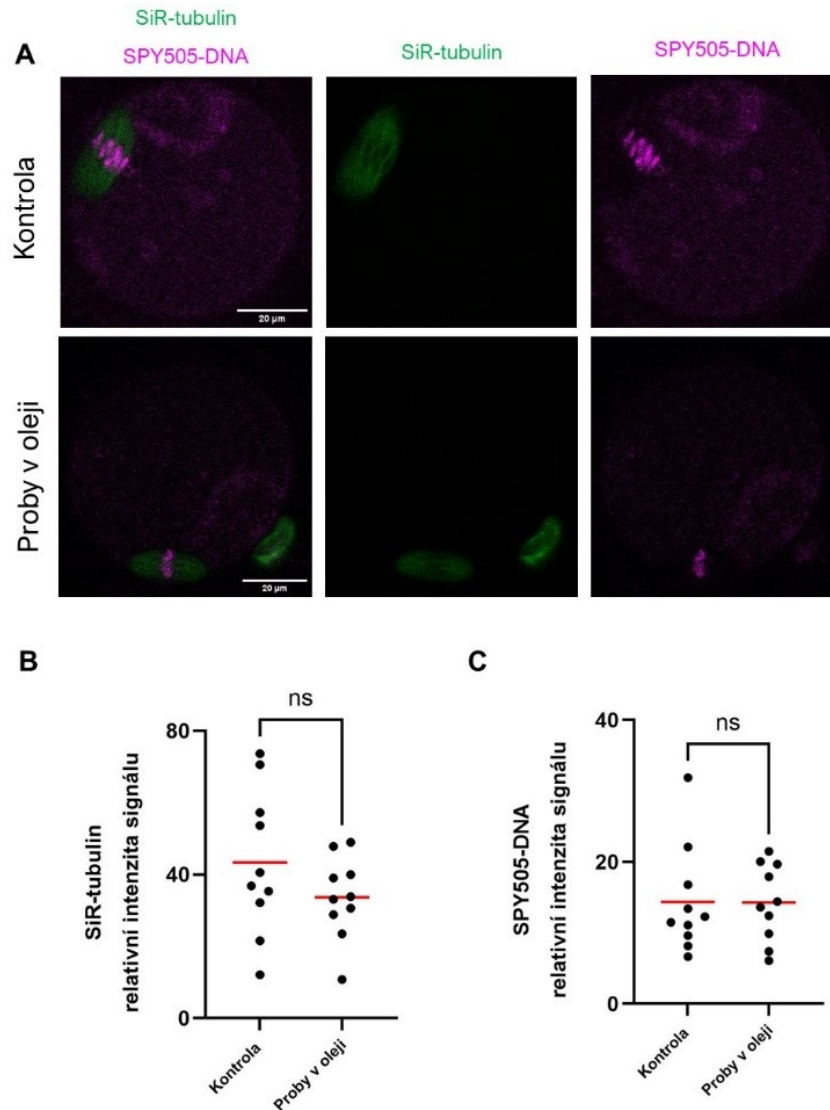
**Obr. 10** Průběh dělení “ideální” zygoty CD-1 x CD-1. U zygoty dochází k rozpadu prvojader, tvorbě mikrotubulární masy, později fúzního vřeténka a nakonec anafázi v podmínkách s minimálním šumem v cytoplazmě. Magentou je zobrazen signál SPY505-DNA (DNA), zeleně SiR-tubulin (tubulin). Čas je vyjádřen ve formátu hh:mm:ss od rozpadu prvojader.

Z důvodu úplnosti uvádím také dva experimenty na CD-1 oocytech zabývající se chováním prob procházejících přes membránu.

V prvním experimentu (vizte Obr. 11) bylo testováno, zda dochází k uvolňování SPY505-DNA a SiR-tubulinu do oleje překrývajícího kapku média ve kterém byly buňky snímány. Jedné skupině CD-1 GV oocytů byla barviva SPY505-DNA a SiR-tubulin přidána

pouze do média (přístup používaný v ostatních experimentech), zatímco druhá je měla jak v médiu, tak i v oleji určeném pro překrytí snímané kapky.

Relativní intenzita signálu SPY505-DNA na chromozomech metafázických destiček, ani SiR-tubulinu na dělicích vřeténkách nebyla mezi skupinami významně rozdílná.

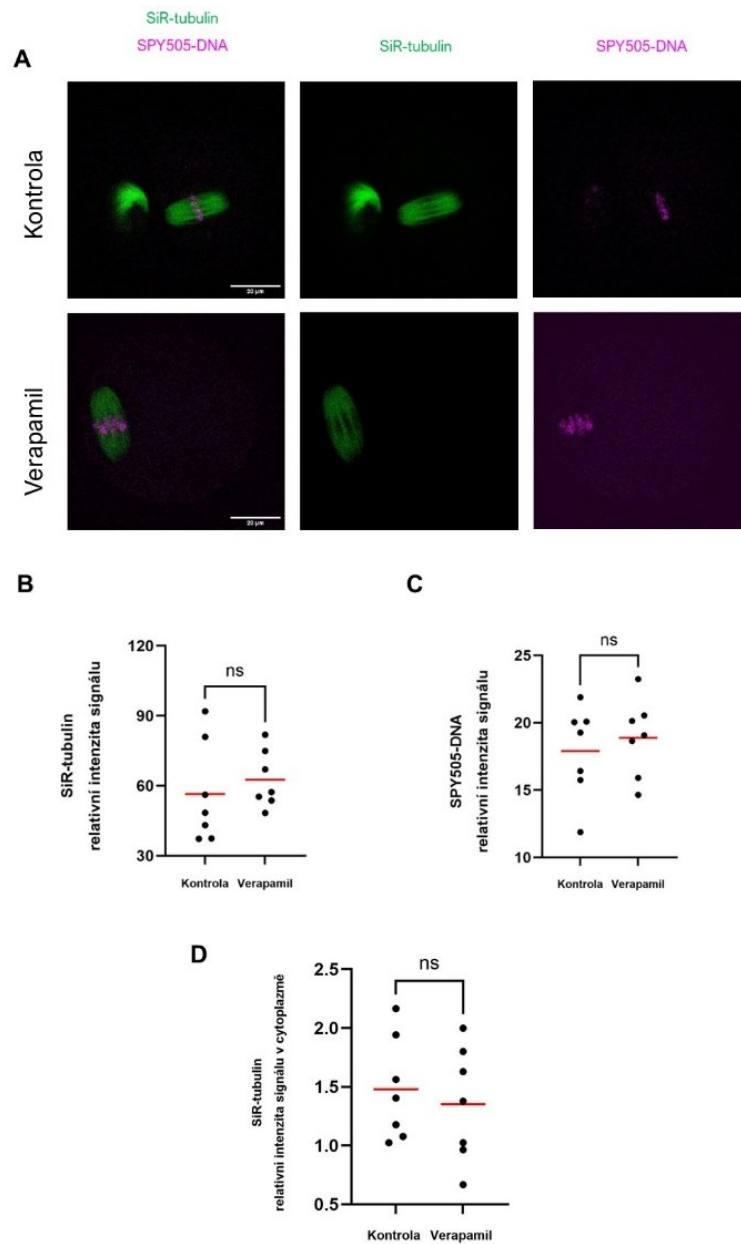


**Obr. 11** SPY505-DNA a SiR-tubulin v oleji CD-1 oocytů. **(A)** Srovnání barvení metafázického dělicího vřeténka a chromozomů v kontrolní skupině oocytů se SPY505-DNA a SiR-tubulin probami v médiu se skupinou oocytů ‘Proby v oleji’, která měla SPY505-DNA a SiR-tubulin přítomný v médiu i v překryvném oleji. Měřítko ukazuje 20  $\mu\text{m}$ . **(B)** Bodový graf ukazující relativní intenzitu signálu SiR-tubulin proby v kontrolní skupině a skupině ‘Proby v oleji’. Data byla získána z jednoho zkušebního experimentu. **(C)** Bodový graf ukazující relativní intenzitu signálu SPY505-DNA proby v kontrolní skupině a skupině ‘Proby v oleji’. Data byla získána z jednoho zkušebního experimentu. Červené úsečky značí průměr dané skupiny.



Druhý experiment zkoumal vliv verapamilu, inhibitoru efluxních pump (Ughachukwu a Unekwe 2012), na relativní intenzitu signálu SPY505-DNA a SiR-tubulin prob u CD-1 oocytů (vizte Obr.12).

Relativní intenzita signálu SiR-tubulin proby v cytoplazmě oocytů (korigovaná na pozadí mimo buňky) nebyla mezi kontrolní skupinou (‘Kontrola‘, bez přidaného verapamilu) a skupinou s přidaným verapamilem do média (‘Verapamil‘) rozdílná. Analogicky nebyl rozdíl ani v případě srovnání relativních intenzit signálu SiR-tubulin proby v oblasti vřetének, ani u SPY505-DNA na chromozomech metafázických destiček.



**Obr. 12** Účinek verapamilu na relativní intenzitu signálu SPY505-DNA a SiR-tubulinu u CD-1 oocytů. (A) Srovnání barvení metafázického dělicího vřeténka a chromozomů probami SPY505-DNA

a SiR-tubulin v kontrolní skupině oocytů bez přidaného verapamilu se skupinou oocytů ‘Verapamil’, která měla inhibitor přidaný do média. Měřítka ukazují 20  $\mu\text{m}$ . **(B)** Bodový graf ukazující relativní intenzitu signálu SiR-tubulin proby v cytoplazmě u kontrolní skupiny a u skupiny ‘Verapamil’. Data byla získána z jednoho zkušebního experimentu. **(C)** Bodový graf ukazující relativní intenzitu signálu SiR-tubulin proby v oblasti vřeténka u kontrolní skupiny a skupiny ‘Verapamil’. Data byla získána z jednoho zkušebního experimentu. **(D)** Bodový graf ukazující relativní intenzitu signálu SPY505-DNA v oblasti chromozomů u kontrolní skupiny a skupiny ‘Verapamil’. Data byla získána z jednoho zkušebního experimentu. Červené úsečky značí průměr dané skupiny.

### 4.3 Subfertilita samců kmene C57BL/6JOlaHsd

Původním plánem pro tuto práci bylo zařadit také samce z inbredního kmene C57BL/6JOlaHsd, se kterými byly provedeny čtyři přípuštění se samicemi kmene CD-1 (vizte Tabulku 1). V rámci prvního přípuštění však vůbec nedošlo k tvorbě vaginálních zátek a další dvě přípuštění se samicemi CD-1 sice vedly k tvorbě vaginálních zátek, ale při izolaci byly nalezeny pouze neoplozené oocyty. Po čtvrtém přípuštění se zygoty vyskytovaly pouze u jedné ze dvou samic (konkrétně u ní bylo nalezeno 33 zygot z celkových 62 buněk, u druhé samice pak 48 oocytů). Z důvodu této výrazné subfertility už s těmito páry nebylo dále pokračováno.

Experiment	Počet použitých samců (počet samic odpovídá)	Vaginální zátka	Počet samic u nichž byly nalezeny zygoty
1	3	ne	0
2	3	ano	0
3	2	ano	0
4	2	ano	1

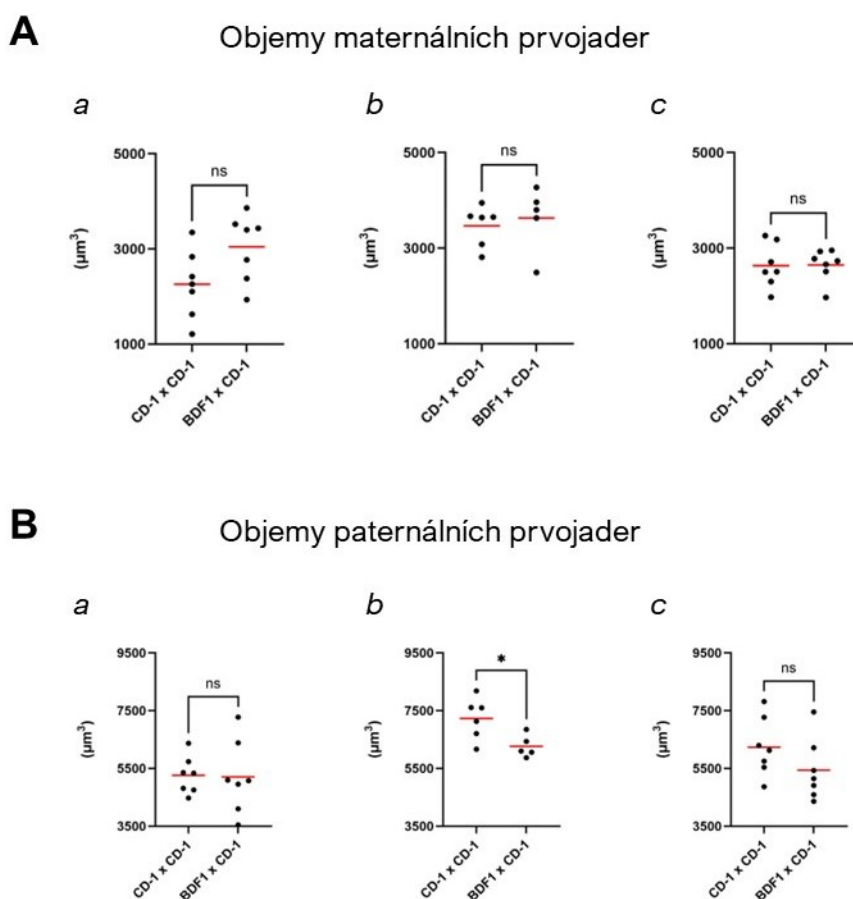
**Tabulka 1** Přípuštění samců kmene C57BL/6JOlaHsd.

## 4.4 Časoběrné snímání

### 4.4.1 Prvojádra zygot

První srovnání zygot skupiny CD-1 x CD-1 a BDF1 x CD-1 se zabývalo jejich prvojádry. V každé zygotě byla prvojádra na posledním snímku před prasknutím rozdělena na maternální (menší objem) a paternální (větší objem).

Objemy maternálního a paternálního prvojádra byly v posledním časovém bodě, kde byla prvojádra v chromozomálním kanálu ještě intaktní. Ve všech 3 experimentech se ukázalo, že mezi objemy maternálního prvojádra skupiny CD-1 x CD-1 a BDF1 x CD-1 není statisticky významný rozdíl (vizte Obr. 13). V případě srovnání objemů paternálního prvojádra měla v jednom experimentu paternální prvojádra kmene BDF1 x CD-1 významně nižší objem než paternální prvojádra kmene CD-1 x CD-1 (Obr. 13 část B graf b), ale tento rozdíl se v dalších dvou nezávislých experimentech nepotvrdil.

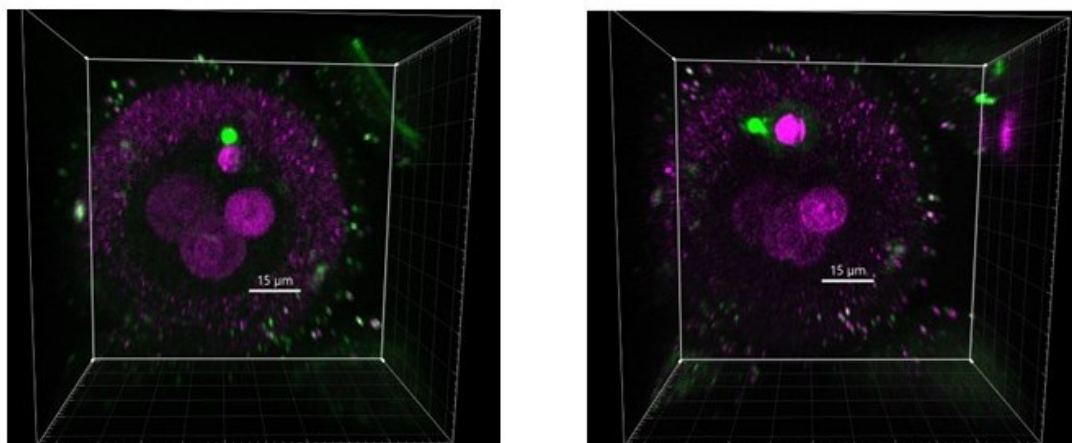


**Obr. 13** Objemy prvojader. **(A)** Bodové grafy znázorňující objemy maternálních prvojader. **(B)** Bodové grafy znázorňující objemy paternálních prvojader. \*:  $p < 0,05$ . Červené úsečky značí průměr dané skupiny.

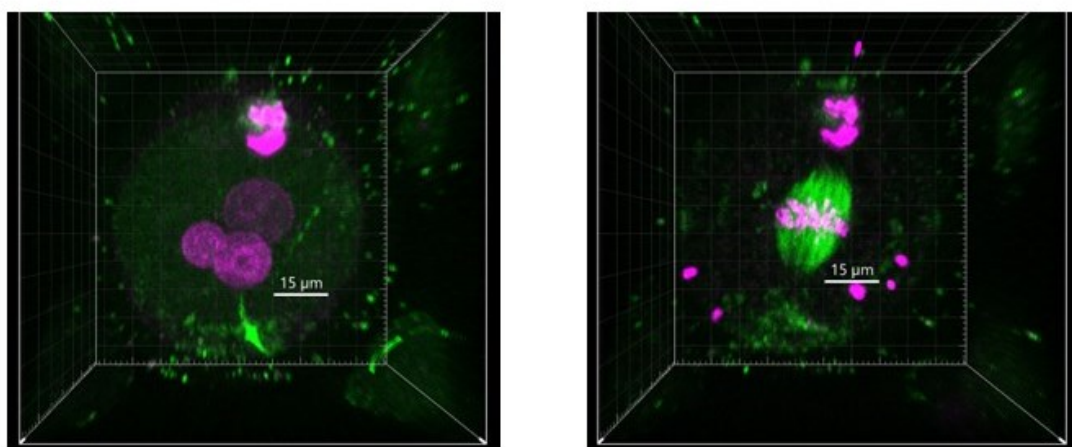
V obou skupinách se vyskytovaly zygoty se 3 prvojádry. Ve skupině CD-1 x CD-1 to byly 2 buňky z celkových 23 sledovaných (9 %) a ve skupině BDF1 x CD-1 se jednalo o 1 buňku z také celkově 23 sledovaných (4 %).

V případě skupiny CD-1 x CD-1 ani jedna z těchto buněk nebyla schopna dojít v době snímání do anafáze (vizte Obr. 14). V prvním případě nedošlo k rozpadu ani jednoho ze 3 prvojader. V druhém případě se všechna 3 prvojádra rozpadla a vytvořila bipolární vřeténko, ale k rozpadu došlo až v době 825 minut od začátku snímání (pro srovnání průměrná doba rozpadu prvního prvojádra dvojjaderných zygot ve skupině v daném experimentu činila  $509 \pm 110$  minut od začátku snímání) a ve zbylých 100 minutách snímání nestačila zygota do anafáze dojít.

**A**



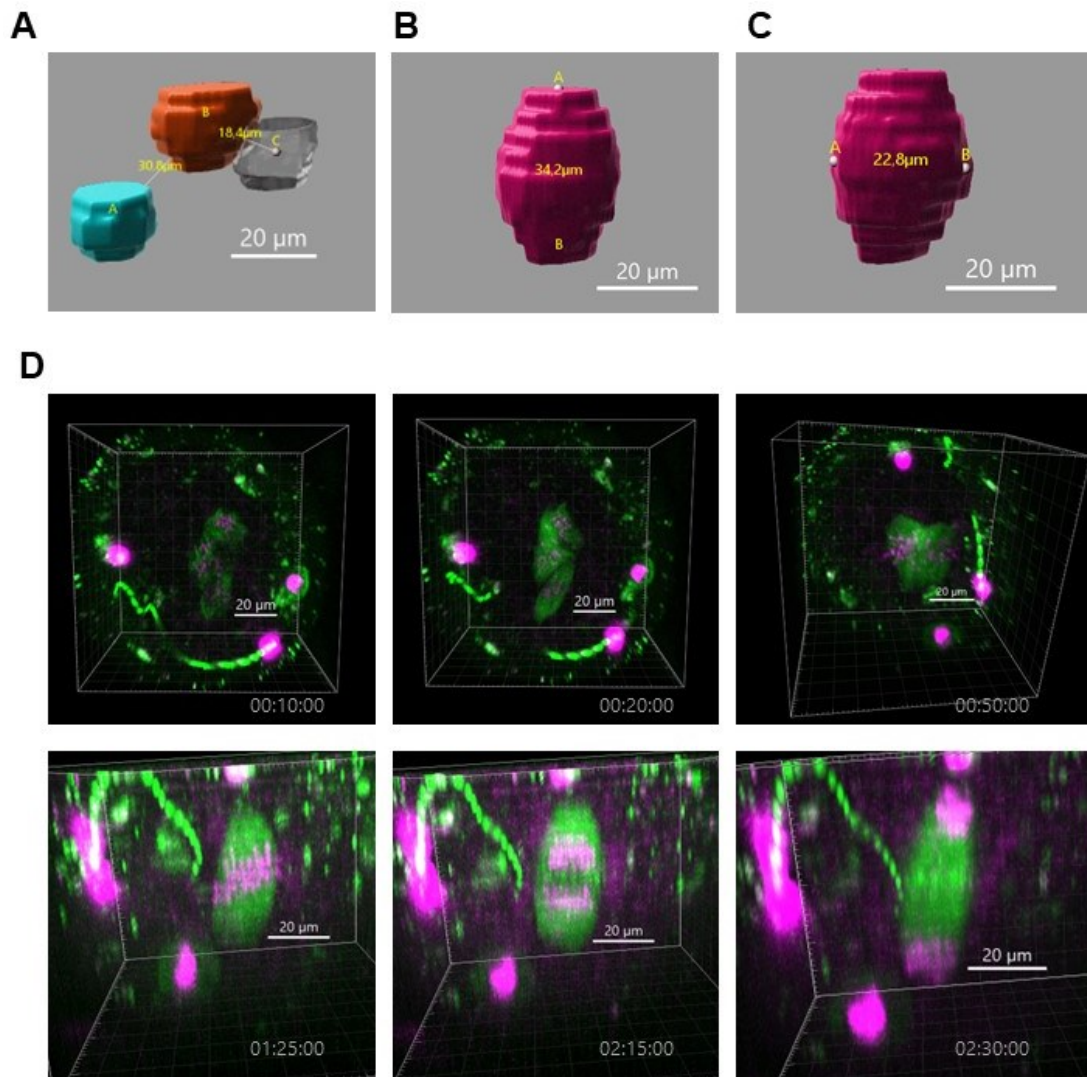
**B**



**Obr. 14** První a poslední snímek zygot CD-1 x CD-1 se 3 prvojádry. **(A)** Zygota, jejíž 3 prvojádra se nerozpadnou po celou dobu snímání. **(B)** Zygota, jejíž 3 prvojádra se rozpadnou, ale fúzní vřeténko

nestihne dojít do anafáze. Magentou je zobrazen signál SPY505-DNA (DNA), zeleně SiR-tubulin (tubulin).

Ve skupině BDF1 x CD-1 trojjaderná zygota byla schopna anafázi provést (vizte Obr. 15). Na místě prvojádra, jehož střed byl v posledním časovém bodě před rozpadem ve vzdálenosti 30,8  $\mu\text{m}$  od prvojádra s nejvyšším objemem, se vytvořilo vlastní bipolární vřetenko, které poté se zbytkem vytvořilo vřetenko fúzní. Při srovnání s fúzními vřetenky dvojjaderných zygot bylo toto vřetenko jedno z nejkratších a absolutně nejširší z analyzovaných fúzních vřetének. Jeho délka činila 34,2  $\mu\text{m}$  (nejkratší vřetenko dvojjaderné BDF1 x CD-1 zygoty měřilo 33,7  $\mu\text{m}$ ) a šířka 22,8  $\mu\text{m}$  (nejširší BDF1 x CD-1 vřetenko měřilo 22,6  $\mu\text{m}$ ). Doba od rozpadu prvojader do rozchodu chromozomů u této buňky činila 140 minut (pro srovnání průměr dvojjaderné skupiny v daném experimentu činil  $150 \pm 22$  minut od rozpadu paternálního prvojádra a  $162 \pm 21$  minut od rozpadu maternálního prvojádra).



**Obr. 15** Zygota BDF1 x CD-1 se 3 prvojádry. (A) Modely prvojader ukazují vzdálenosti v posledním

časovém bodě před jejich prasknutím. **(B)** Délka modelu fúzního vřeténka. **(C)** Šířka modelu fúzního vřeténka. **(D)** Průběh mitózy po rozpadu prvojader. Okolo každého rozpadlého prvojádra vzniká mikrotubulární masa, která se poté organizuje do více vřetének, která fúzují. Fúzní vřeténko prochází anafází. Magentou je zobrazen signál SPY505-DNA (DNA), zeleně SiR-tubulin (tubulin).

Dále byl při dělení zygot sledován rozpad prvojader. Do analýzy byly zařazeny dvojjaderné zygoty, které došly při snímání až do anafáze (20 CD-1 x CD-1 zygot a 19 BDF1 x CD-1 zygot z celkového počtu 23 snímaných zygot pro každou skupinu).

Ve většině případů bylo možné pozorovat rozpad obou prvojader ve stejném časovém bodě, ale ve skupině CD-1 x CD-1 i BDF1 x CD-1 byly nalezeny buňky, u kterých se čas rozpadu lišil. Množství těchto zygot bylo u obou skupin stejné, konkrétně vždy 4 zygoty (tedy 20 % z analyzovaných CD-1 x CD-1 a 21 % z analyzovaných BDF1 x CD-1).

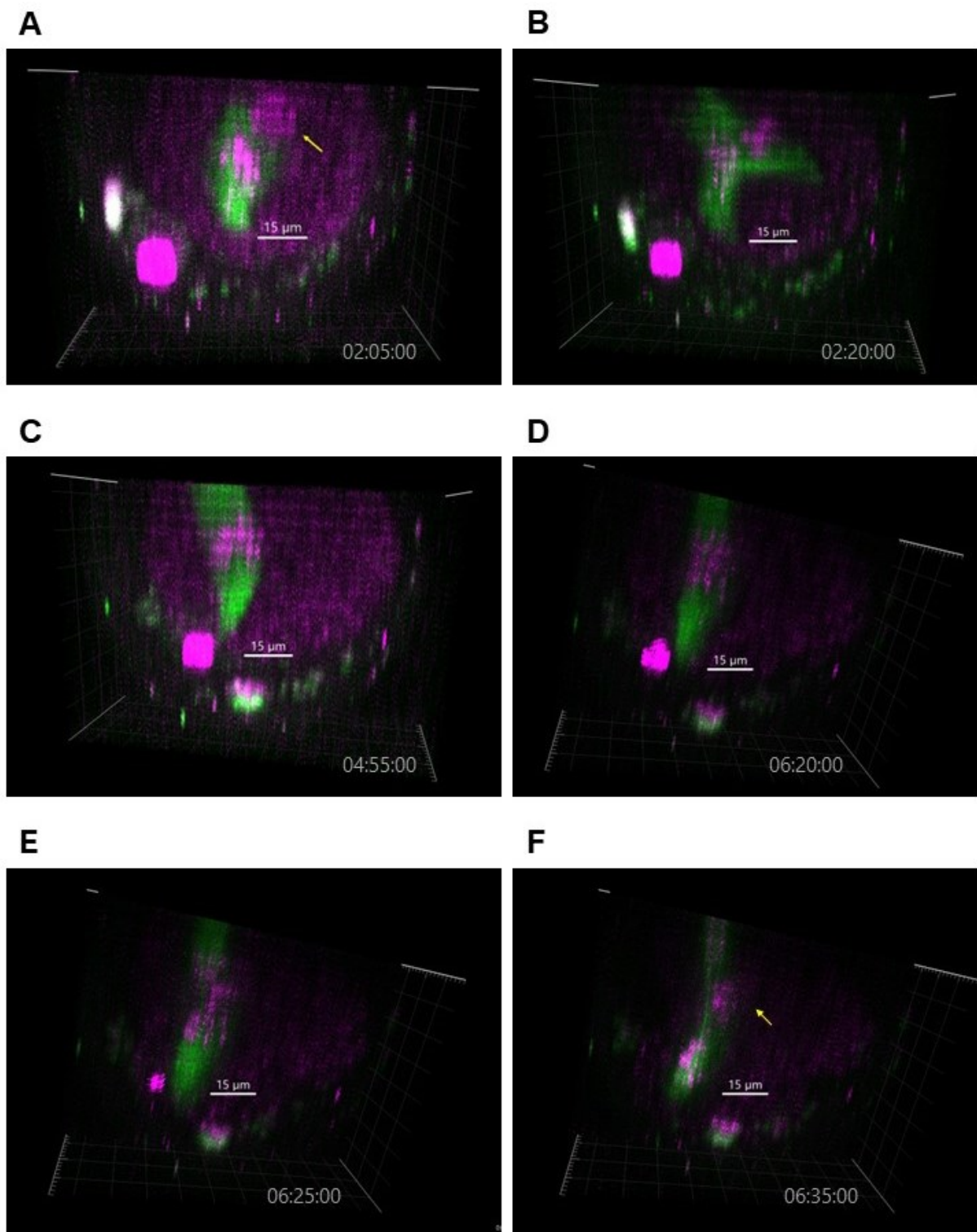
Zpoždění rozpadu se vyskytovalo ve skupině CD-1 x CD-1 jak u prvojádra paternálního, tak i u maternálního. Zpoždění rozpadu paternálního prvojádra nastalo u 1 ze 4 zygot a konkrétně se jednalo o rozdíl 15 minut. Tato zygot vytvořila dvě zcela oddělená vřeténka, která nefúzovala a délka mitózy u ní činila 190 minut od rozpadu maternálního prvojádra (ve srovnání s průměrem CD-1 x CD-1 skupiny  $139 \pm 31$  minut v daném experimentu). Z hlediska zpoždění rozpadu maternálního prvojádra činil rozdíl ve dvou případech 5 minut a zřejmě neměl významný vliv na dobu mitózy (vizte Tabulku 2).

Zpožděné prvojádro	Délka zpoždění (min)	Délka mitózy od rozpadu prvního prvojádra (min)	Průměrná délka mitózy v experimentu (min)
paternální	15	190	$139 \pm 31$
maternální	5	125	$139 \pm 28$
maternální	5	125	$139 \pm 28$
maternální	125	385	$176 \pm 50$

**Tabulka 2** Zpožděný rozpad prvojader ve skupině zygot CD-1 x CD-1. Průměrná délka mitózy v experimentu je uvedena vzhledem k prvnímu rozpadlému prvojádru (ne zpožděnému). Průměrná délka mitózy v experimentu je uvedena ve formátu průměr  $\pm$  směrodatná odchylka.

Třetí případ zpoždění rozpadu maternálního prvojádra ve skupině CD-1 x CD-1 byl příkladem extrému (vizte Obr. 16). Maternální prvojádru zde zůstalo nerozpadlé ještě v době kdy už se okolo paternálních chromozomů vytvořilo samostatné bipolární dělicí vřeténko. I přesto nakonec k rozpadu došlo (125 minut po rozpadu paternálního prvojádra) a bylo vytvořeno fúzní dělicí vřeténko. Doba mitózy činila 385 minut od rozpadu paternálního

prvojádra (pro srovnání průměrná doba mitózy od rozpadu paternálního prvojádra byla v daném experimentu  $176 \pm 50$  minut). Při anafázi se však části chromozomů zřejmě nedařilo rozejít.



**Obr. 16** Zygota CD-1 x CD-1 s extrémním zpožděním rozpadu maternálního prvojádra. (A) Nerozpadlé maternální prvojádro (ukazáno žlutou šipkou) a vytvořené bipolární vřetenko. (B) Dvě bipolární vřetenka skládající se dohromady. (C), (D) Vytvořené fúzní vřetenko. (E) Anafáze. (F) Lagging na

vřeténku (ukázán žlutou šipkou) dokončujícím anafázi. Čas je vyjádřen ve formátu hh:mm:ss od rozpadu prvního prvojádra. Magentou je zobrazen signál SPY505-DNA (DNA), zeleně SiR-tubulin (tubulin).

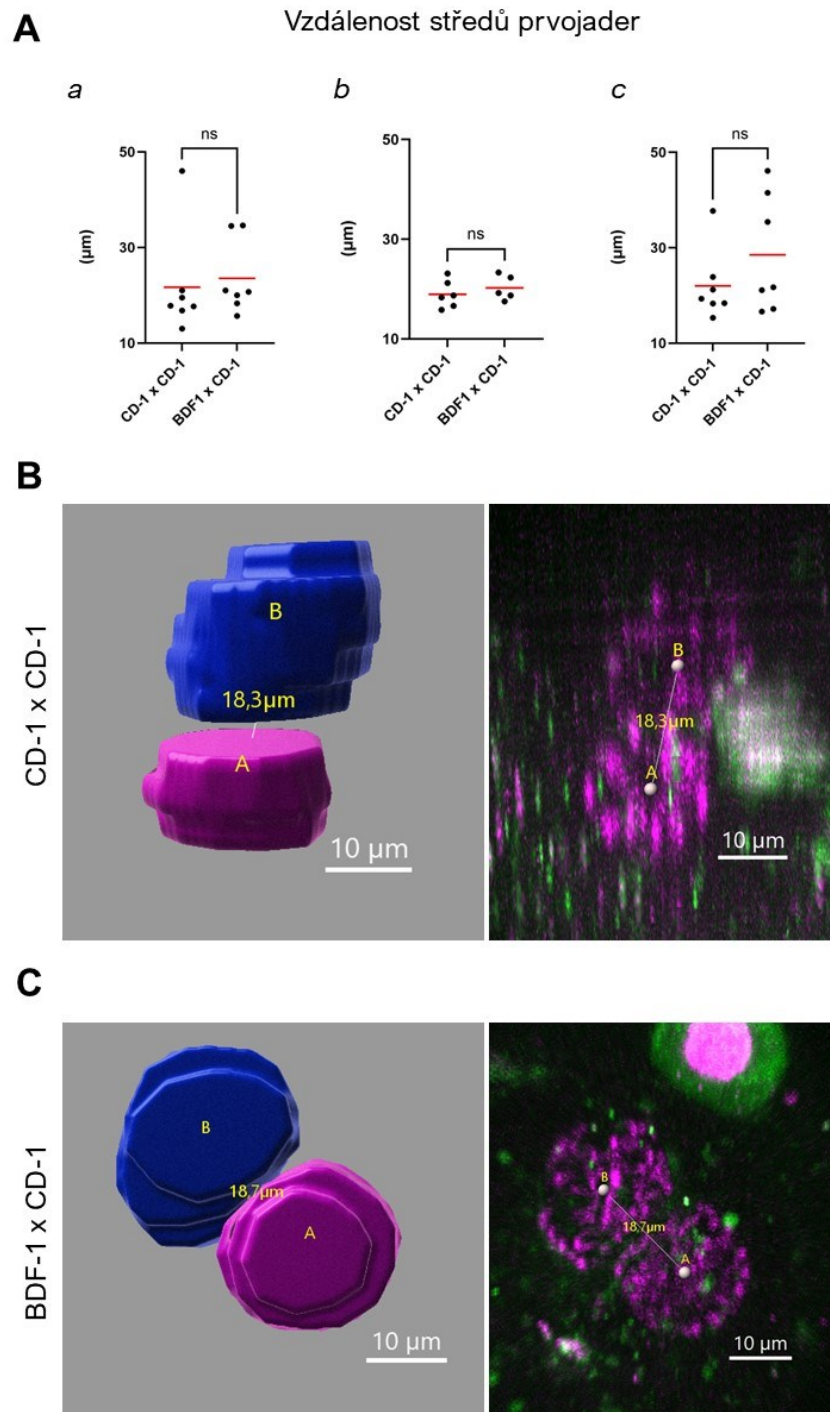
Ve skupině BDF1 x CD-1 zygot také došlo ke zpoždění rozpadu jak paternálního, tak i maternálního prvojádra. Na rozdíl od skupiny CD-1 x CD-1 se tu však nevyskytovalo extrémní zpoždění, maximální doba mezi rozpady prvojader činila 15 minut a zpoždění se také neukazovalo ve výrazném odchylení od průměrné délky mitózy v experimentu (vizte Tabulku 3).

Zpožděné prvojádro	Délka zpoždění (min)	Délka mitózy od rozpadu prvního prvojádra (min)	Průměrná délka mitózy v experimentu (min)
paternální	5	105	114 ± 12
paternální	5	130	131 ± 18
maternální	15	160	150 ± 22
maternální	10	145	132 ± 19

**Tabulka 3** Zpožděný rozpad prvojader ve skupině zygot BDF1 x CD-1. Průměrná délka mitózy v experimentu je uvedena vzhledem k prvnímu rozpadlému prvojádro (ne zpožděnému). Průměrná délka mitózy v experimentu je uvedena ve formátu průměr ± směrodatná odchylka.

Následně byla sledována vzdálenost středů prvojader (vizte Obr. 17), znovu v posledním časovém bodě, kdy byla prvojádra v chromozomální kanálu ještě viditelně intaktní. V případě, že jedno prvojádro mělo zpožděný rozpad vzhledem k druhému, bylo měření provedeno před rozpadem prvního prvojádra. Vzdálenost středů prvojader se v žádném ze tří nezávislých experimentů mezi zygotami CD-1 x CD-1 a BDF1 x CD-1 významně nelišila.

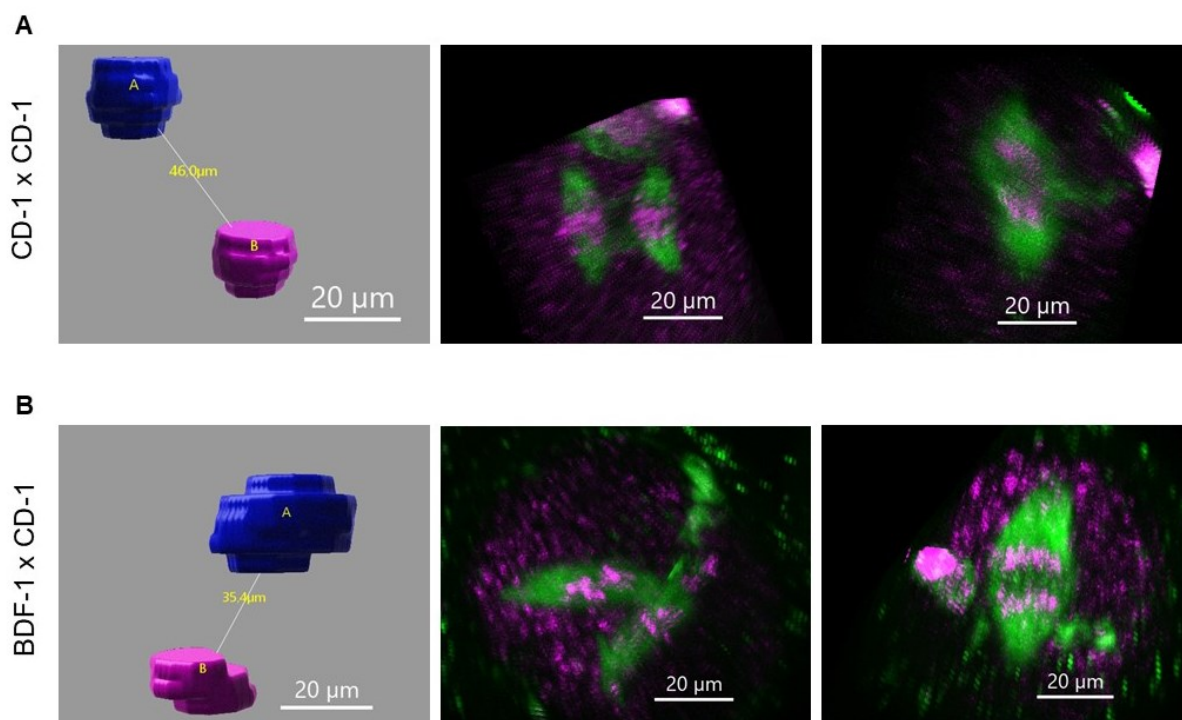




**Obr. 17** Vzálenost středů prvojader. **(A)** Bodové grafy znázorňující měření vzdálenosti středů prvojader zygot CD-1 x CD-1 a BDF1 x CD-1. Červené úsečky ukazují průměr dané skupiny. **(B)** Vlevo příklad modelů prvojader zygoty CD-1 x CD-1 použitých pro měření. Vpravo naměřená vzdálenost proložená samotnými nasnímanými prvojádry. **(C)** Vlevo příklad modelů prvojader zygoty BDF1 x CD-1 použitých pro měření. Vpravo naměřená vzdálenost proložená samotnými nasnímanými prvojádry. Magentou je zobrazen signál SPY505-DNA (DNA), zeleně SiR-tubulin (tubulin).

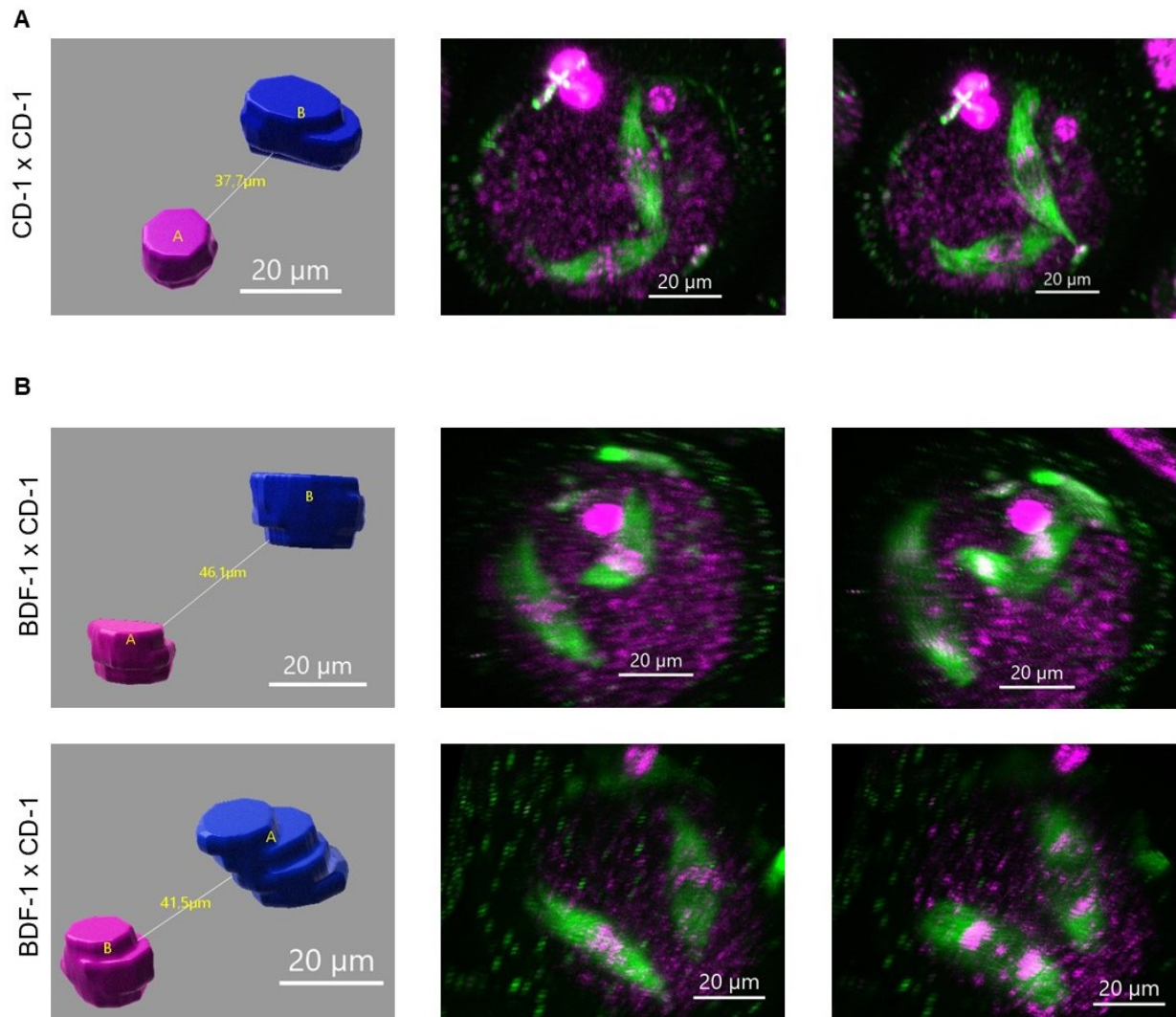
Všechny zygoty, které měly vzdálenost mezi prvojádry před rozpadem větší jak 35  $\mu\text{m}$  vytvořily dvě zcela oddělená vřeténka (vizte Obr. 18 a Obr. 19). U skupiny CD-1 x CD-1 byly zaznamenány 2 případy z 20 zygot (10 %) a u skupiny BDF1 x CD-1 to byly 3 zygoty, z celkem 19 zkoumaných buněk (16 %).

V obou skupinách se vyskytla jedna zygoty, které se i přes počáteční velkou vzdálenost mezi prvojádry a tvorbou samostatných vřetének nakonec podařilo vytvořit vřeténko fúzní. V případě CD-1 x CD-1 zygoty (vizte Obr. 18 část A) doba od rozpadu prvojader po rozchod chromozomů činila 225 minut, zatímco průměrná doba skupiny v daném experimentu byla  $162 \pm 37$  minut. V případě BDF1 x CD-1 zygoty ale tato doba prodloužena nebyla, činila 130 minut (pro srovnání ve skupině v daném experimentu byl průměr  $132 \pm 19$  minut od rozpadu paternálního prvojádra a  $131 \pm 18$  minut od rozpadu maternálního prvojádra).



**Obr. 18** Zygoty tvořící fúzní vřeténko z původně dvou oddělených vřetének. V obou částech je zobrazena vzdálenost prvojader před prasknutím, dvě oddělená vřeténka a fúzní vřeténko procházející anafází. **(A)** Zygoty CD-1 x CD-1 tvoří fúzní vřeténko procházející anafází ze 2 původně oddělených vřetének. **(B)** Zygoty BDF1 x CD-1 tvoří fúzní vřeténko procházející anafází ze 2 původně oddělených vřetének. Magentou je zobrazen signál SPY505-DNA (DNA), zeleně SiR-tubulin (tubulin).

Zbytek zygoty se dvěma zcela oddělenými vřeténky nevytvořil fúzní vřeténka (vizte Obr. 19), ale všechny případy došly až do anafáze (provedené na oddělených vřeténkách).

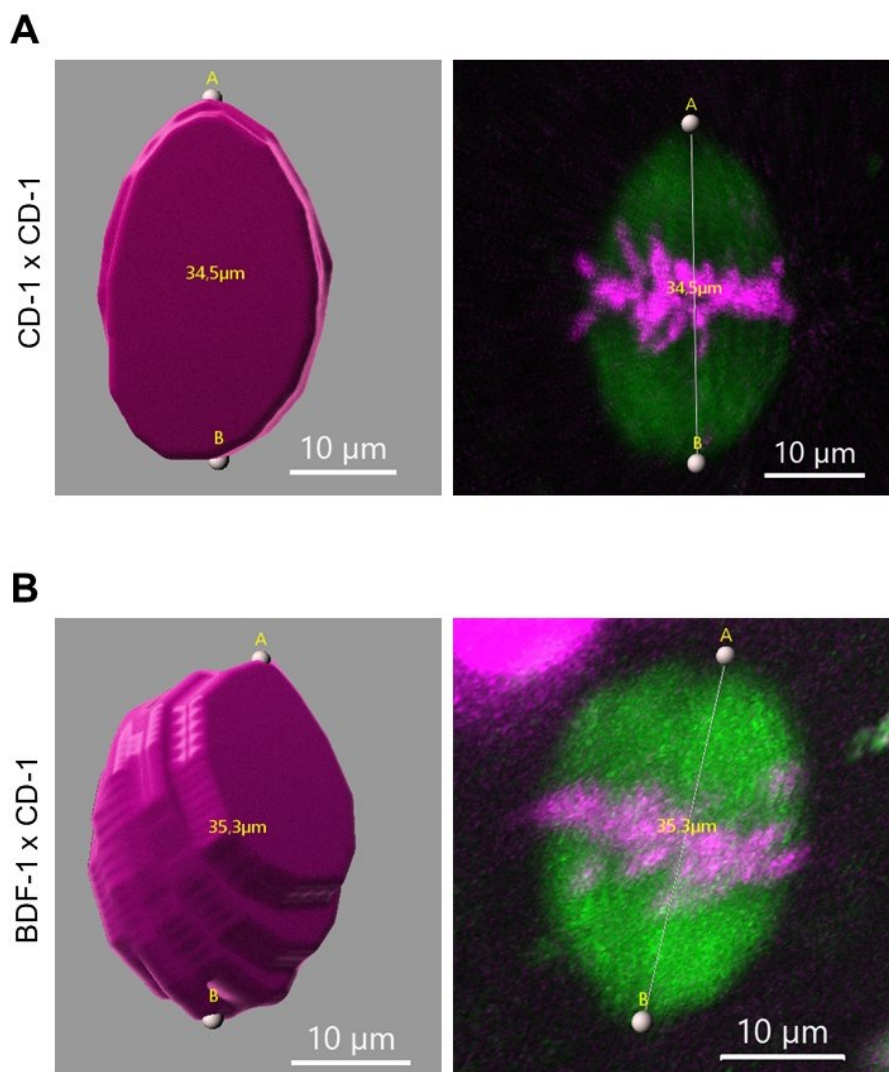


**Obr. 19** Zygoty jejichž vřeténka zůstávají i při anafázi oddělená. V obou částech je zobrazena vzdálenost prvojader před prasknutím, dvě oddělená vřeténka a vřeténka procházející anafází. **(A)** Zygota CD-1 x CD-1, která vytváří dvě oddělená vřeténka, a ta i při anafázi zůstávají samostatná. **(B)** Zygoty BDF1 x CD-1 tvoří samostatná vřeténka, která nefúzují a anafázi provádí odděleně. Magentou je zobrazen signál SPY505-DNA (DNA), zeleně SiR-tubulin (tubulin).

#### 4.4.2 Fúzní vřeténka

Obě srovnávané skupiny zygot byly ve většině případů schopny vytvořit fúzní vřeténka. U skupiny CD-1 x CD-1 to konkrétně bylo 19 zygot z 20 (95 %), u skupiny BDF1 x CD-1 se jednalo o 17 zygot z 19 buněk (90 %).

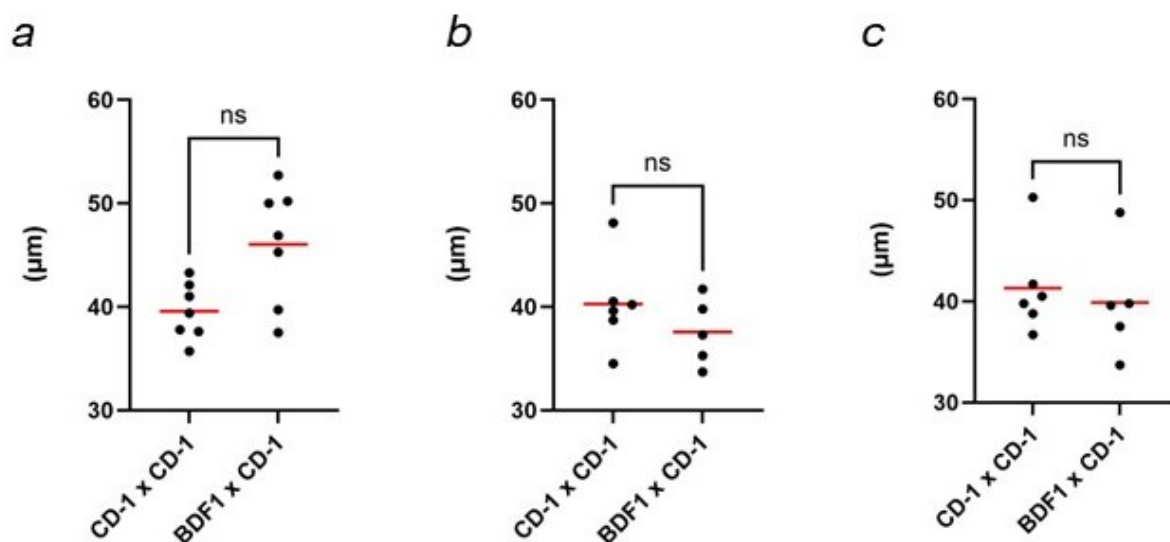
U vytvořeného fúzního vřeténka byla měřena nejprve jeho délka (vizte Obr. 20). Pro každou zygotu bylo měřeno fúzní vřeténko ve stejném časovém bodě, konkrétně 10 minut před anafází, což odpovídá dvěma snímkům před snímkem anafáze. V žádném ze 3 nezávislých experimentů nebyl mezi délkou fúzních vřetének skupiny BDF1 x CD-1 a CD-1 x CD-1 významný rozdíl (vizte Obr. 21).



**Obr. 20** Délka fúzních vřetének. **(A)** Vlevo příklad modelu fúzního vřeténka zygoty CD-1 x CD-1 použitého pro měření. Vpravo naměřená vzdálenost proložená samotným fúzním vřeténkem. **(B)** Vlevo příklad modelu fúzního vřeténka zygoty BDF1 x CD-1 použitého pro měření. Vpravo naměřená

vzdálenost proložená samotným fúzním vřeténkem. Magentou je zobrazen signál SPY505-DNA (DNA), zeleně SiR-tubulin (tubulin).

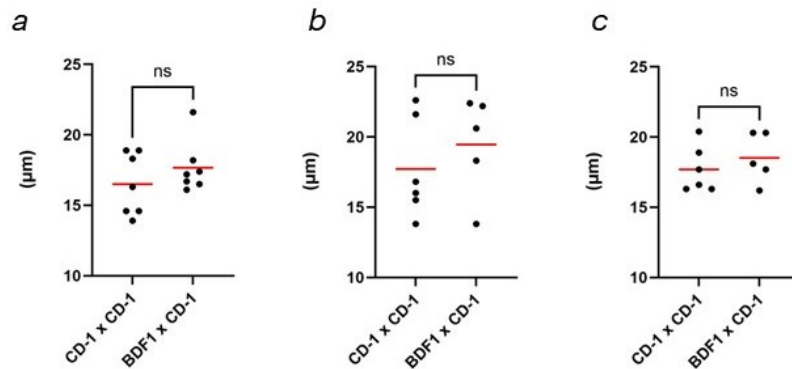
## Délka fúzního vřeténka



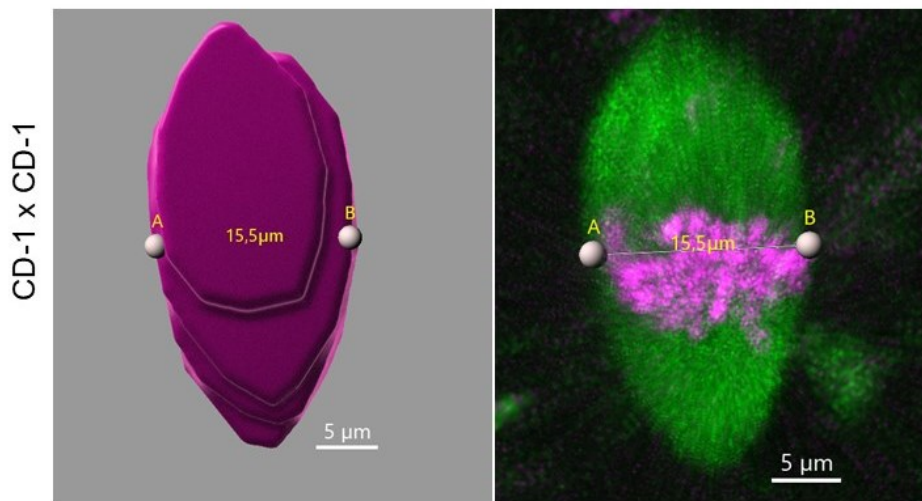
**Obr. 21** Bodové grafy znázorňující délky fúzních vřetének. Červené úsečky značí průměr dané skupiny.

Druhým měřeným parametrem týkajícím se fúzních vřetének byla šířka fúzního vřeténka (vizte Obr. 22 část B, pro ilustraci byla vybrána vřeténka jiných zygot než ta ukazující měření délky výše). Pro každou zygotu bylo použito odpovídající vřeténko na kterém byla předtím měřena délka, a šířka byla určena v oblasti metafázní destičky. Šířka fúzního vřeténka nebyla významně odlišná mezi skupinami CD-1 x CD-1 a BDF1 x CD-1 v žádném ze 3 nezávislých experimentů (vizte Obr. 22 část A).

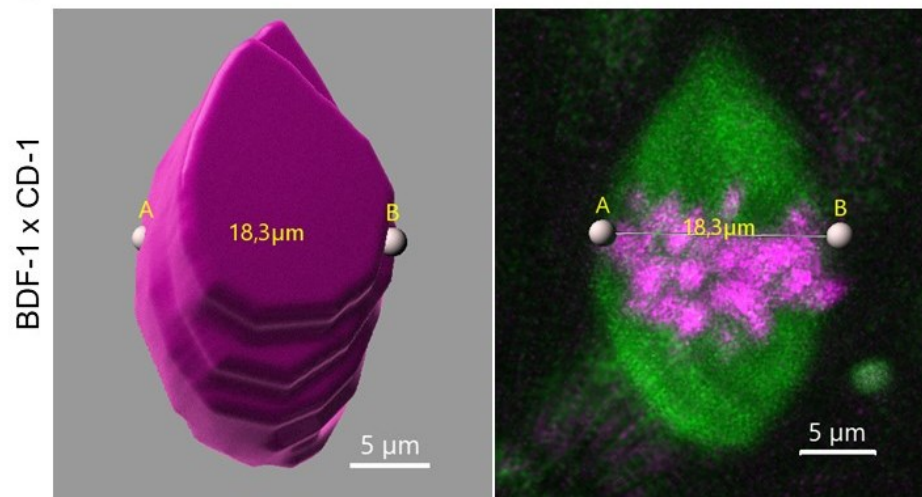
## A Šířka fúzního vřeténka



## B



## C

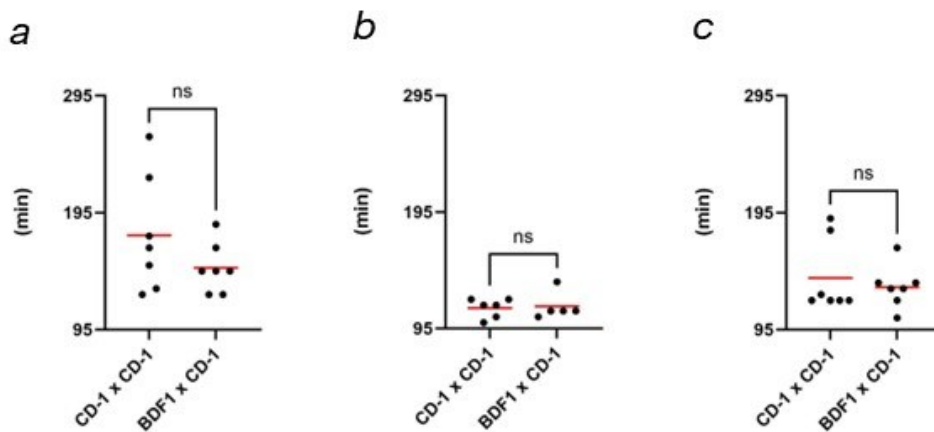


**Obr. 22** Šířka fúzních vřetének. **(A)** Bodové grafy znázorňující šířky fúzních vřetének zygot CD-1 x CD-1 a BDF1 x CD-1. Červené úsečky ukazují průměr dané skupiny. **(B)** Vlevo příklad modelu fúzního vřeténka zygoty CD-1 x CD-1 použitého pro měření. Vpravo naměřená vzdálenost proložená samotným vřeténkem. **(C)** Vlevo příklad modelu fúzního vřeténka zygoty BDF1 x CD-1 použitého pro měření. Vpravo naměřená vzdálenost proložená samotným fúzním vřeténkem. Magentou je zobrazen signál SPY505-DNA (DNA), zeleně SiR-tubulin (tubulin).

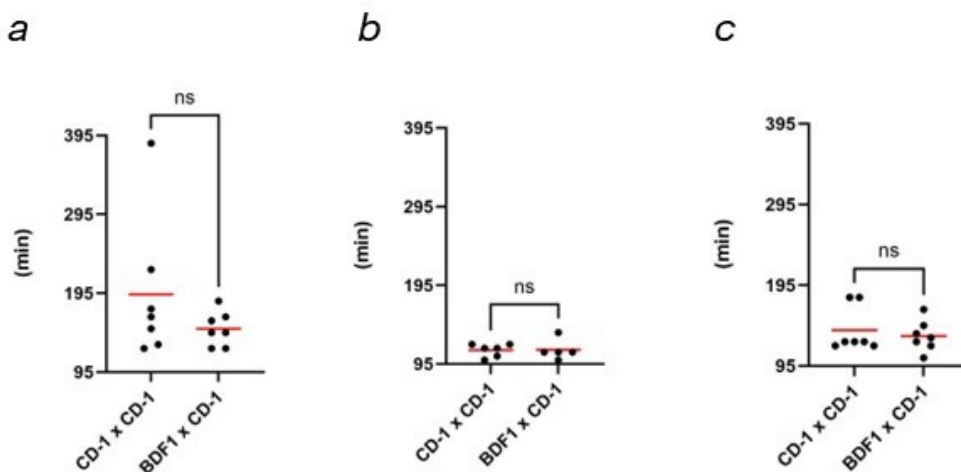
#### 4.4.3 Délka mitózy

Délka mitózy u zygot byla určena jako doba od rozpadu prvojádra (poslední časový bod, kde bylo prvojádro v chromozomálním kanálu ještě intaktní) do anafáze (první časový bod, kde byly vidět rozcházející se chromozomy na vřeténku). Tato doba se mezi zygotami CD-1 x CD-1 a BDF1 x CD-1 významně nelišila (vizte Obr. 23).

### A Délka mitózy od rozpadu maternálního prvojádra



### B Délka mitózy od rozpadu paternálního prvojádra



**Obr. 23** Délka mitózy. **(A)** Bodové grafy znázorňující délku mitózy od rozpadu maternálního prvojádra. **(B)** Bodové grafy znázorňující délku mitózy od rozpadu paternálního prvojádra. Červené úsečky značí průměr dané skupiny.

## 5 Diskuze

Myší kmeny používané ve výzkumu se nechovají vždy identicky. Mohou se lišit například odpovědí na gonadotropiny, schopností fertilizace *in vitro* i *in vivo*, či úspěšností preimplantačního vývoje (Suzuki et al. 1996). V preimplantačním vývoji je jedním z klíčových momentů první mitóza, protože špatnou segregaci chromozomů v tomto stádiu není později možné kompenzovat. U myši bylo ukázáno, že zygota pro segregaci chromozomů používá fúzní dělicí vřeténko vzniklé sestavením vřeténka maternálních chromozomů a vřeténka paternálních chromozomů (Reichmann et al. 2018). Toto poskytuje prostor pro možné problémy s tvorbou fúzního vřeténka a tato práce se proto zaměřila na srovnání tvorby fúzního dělicího vřeténka u zygot vzniklých křížením samce z kmene BDF1 se samicí z kmene CD-1 (BDF1 x CD-1 zygoty) a zygot s oběma rodiči z kmene CD-1 (CD-1 x CD-1 zygoty).

Se správnou segregací chromozomů souvisí také kontrolní bod sestavení dělicího vřeténka, a proto, jak už bylo uvedeno výše, bylo původním plánem věnovat se relativní intenzitě fluorescenčně značených SAC proteinů na metafázických chromozomech u obou skupin. Kvůli pochybnostem o fungování SAC v první mitóze myších zygot byla imunodetekce použita pro srovnání lokalizace a relativní intenzity signálu Mad2 proteinu u CD-1 x CD-1 a BDF1 x CD-1 zygot v interfázi.

V interfázických HeLa buňkách Mad1 kolokalizuje s Mad2 na jaderných pórech. Na středním snímku buňky je proto Mad1 viditelný zejména na periférii (Campbell et al. 2001). U myších zygot (oba rodiče CBA/H x C57BL/10 F1 hybridy) se zdá, že se Mad2 protein před rozpadem prvojader nachází v oblasti celého maternálního i paternálního prvojádra s výjimkou jadérek (Sikora-Polaczek et al. 2006). Stejná lokalizace Mad2 byla nalezena i u zygot CD-1 x CD-1 a byla velmi podobná lokalizaci dalších SAC proteinů, konkrétně Bub3 a BubR1 (Wei et al. 2011). U zygot použitých v této práci byl signál Mad2 v interfázi detekován také v oblasti celých prvojader kromě jadérek, a to jak v případě CD-1 x CD-1, tak i BDF1 x CD-1 zygot. Další výzkum by se mohl zaměřit na zodpovězení otázky zda u zygot dochází v interfázi ke kolokalizaci Mad1 a Mad2 v oblasti jaderných pórů a efektivní tvorbě Mad1-Mad2 komplexů, protože tyto komplexy jsou důležité pro tvorbu Mad2-Cdc20 komplexů a fungování SAC v mitóze (Lara-Gonzalez et al. 2021).

Rozdílná intenzita relativního signálu Mad2 maternálních prvojader se mezi zygotami CD-1 x CD-1 a BDF1 x CD-1 objevila v jednom ze tří nezávislých experimentů. Díky dvěma



experimentům ze tří ukazujícím na nesignifikantní rozdíl to však vypadá, že se relativní intenzita signálu u maternálních prvojadere CD-1 x CD-1 a BDF1 x CD-1 celkově významně neliší.

Z hlediska signálu Mad2 v paternálních prvojadrech se významná odlišnost relativní intenzity signálu Mad2 ukázala znovu pouze v jednom ze 3 experimentů. V posledním experimentu navíc po použití nové primární protilátky došlo k nárůstu relativního signálu pozadí (způsobujícího záporné hodnoty po jeho odečtení od signálu jak v maternálním, tak i v paternálním prvojadře). Celkově se tedy zdá, že mezi CD-1 x CD-1 a BDF1 x CD-1 zygotami není významný rozdíl v relativní intenzitě signálu Mad2 v maternálních ani paternálních prvojadrech.

K vizualizaci DNA, tubulinu a sestavení fúzního dělicího vřeténka byly v této práci použity proby SPY505-DNA a SiR-tubulin, které procházejí přes membránu buňky. Tato metoda byla zvolena z důvodu možnosti zavedení alternativy k metodám vyžadujícím mikroinjekci, protože ty mohou znamenat velkou ztrátovost buněk a v rámci odlišných laboratoří mohou mít pracovníci odlišnou úspěšnost mikroinjekce, což potenciálně komplikuje reprodukcibilitu výsledků získaných těmito metodami.

Proby SPY505-DNA a SiR-tubulin se podařilo využít při časosběrném snímání první mitózy k detekci DNA i tubulinu u obou srovnávaných skupin zygot, ale tato metoda s sebou nesla určitá úskalí.

Jedním z nich byla odlišná efektivita barvení struktur v zygotách, oocytech a spermích. V případě, že u zygoty zůstala v perivitellinním prostoru spermie, byla její detekce SPY505-DNA probou vyšší jak DNA v zygotě, což může komplikovat analýzu. Stejný efekt lze vidět také ve studii, kde v zygotách byla použita proba Nucleoseeing (Okabe et al. 2023), pravděpodobně ještě umocněný použitím *in vitro* fertilizace pro tvorbu zygot, která mohla způsobit větší množství spermíí v okolí oplozovaných oocytů. Eliminovat přítomnost velkého počtu spermíí v perivitellinním prostoru by bylo možné použitím intracytoplazmatické injekce jedné spermie do oocytu, ale tím se znovu zavádí nutnost mikroinjekce a navíc dochází k oddálení od fyziologického oplození.

Důvodem nabízejícím se pro odlišnou detekci probami by mohla být odlišnost samotných struktur, které detekují. SiR-tubulin je založený na modifikované mikrotubulární droze docetaxel (Lukinavičius et al. 2014). V případě taxolu se ukázalo, že k němu mají odlišné izotypy  $\beta$  tubulinu zřejmě jinou afinitu (Chew a Cross 2023), což vybízí k otázce, jestli se modifikovaný docetaxel chová stejně a jestli je rozdíl v zastoupení různých izotypů tubulinu u

vřeténka oocyty a embrya. Odlišná afinita by mohla být zajímavá i z hlediska studia lidských embryí, protože u nich byl použit SPY650-tubulin (Ono et al. 2024), založený na derivátu taxolu, a v lidských oocytech a embryích je exprimován izotyp TUBB8, který je specifický pouze pro primáty (Feng et al. 2016).

U SPY505-DNA se zdá, že její silnou stránkou je značení DNA v kompaktním stavu u buněk s bezproblémovým průběhem dělení, ale i přes optimalizaci podmínek měla tendenci u některých zygot vytvářet výrazný šum v cytoplazmě, který by mohl vést ke ztížení až znemožnění určitých aspektů analýzy, konkrétně v této práci se vyskytl problém s nemožností jasně určit zda dochází při anafázi ke zpoždění rozchodu některých chromozomů.

Možným dalším vysvětlením problematického barvení probami procházejícími přes membránu by mohlo být také jejich potenciální uvolňování do oleje překrývajícího kapky média, ve kterých jsou buňky snímány. Na tuto možnost bylo upozorněno v souvislosti s používáním inhibitorů při studiu oocytů a zygot, například nokodazolu či monastrolu (Rémillard-Labrosse et al. 2024). Ve zkušebním experimentu s oocyty CD-1 však nebyl mezi oocyty, které měly proby i v oleji a oocyty kontrolními (proby pouze v médiu) statisticky významný rozdíl, takže tento směr už nebyl dále zkoumán. Pokud by však mělo být uvolňování prob do oleje zcela vyloučeno, bylo by třeba experiment provést i se zygotami a v několika opakováních.

Potenciální modifikací protokolu používajícího SiR-tubulin je přidání verapamilu, který funguje jako inhibitor efluxních pump buňky (Ughachukwu a Unekwe 2012). Ve zkušebním experimentu s CD-1 oocyty ale nemělo jeho přidání z hlediska relativní intenzity signálu významný vliv. Stejně jako v případě zkoumání vlivu oleje je však nutno dodat že šlo o jeden experiment, který byl navíc proveden na oocytech místo zygot. Blokáce transportérů buňky může mít navíc potenciálně negativní vliv, protože například inhibice transportéru P-glykoproteinu pomocí verapamilu totiž u myších embryí umocňuje působení cytotoxických látek (Elbling et al. 1993), zřejmě proto, že se jich nemohou zbavit.

Tato práce se původně měla zaměřit také na zygoty vzniklé křížením samců kmene C57BL/6JOlaHsd se samicemi kmene CD-1, ale od toho bylo upuštěno, protože u samců byla pozorována významná subfertilita/sterilita. Nabízí se více možných vysvětlení. První možností je náhodný zdravotní defekt u všech (až tří) samců, který ve většině případů zabránil oplození. Tuto hypotézu by bylo možné testovat opakovaným připuštěním samců k samicím stejného kmene (a pozorováním jestli vzniknou zygoty), případně vyšetřením jejich spermií. Další

možností je, že i přes to, že kmen má být inbrední, u něj došlo k vývoji prezygotické bariéry, která brání při křížení s jiným kmenem efektivnímu oplození. Tato bariéra by pravděpodobně byla postkopulační, z důvodu pozorování vzniklých vaginálních zátek (jejichž přítomnost je považována ve studiích křížící různé kmeny myši za jeden ze znaků úspěšného oplození, např. (Dorsch et al. 2020)). Ke zjištění zda jsou spermie schopné efektivně pronikat do oocytů by bylo možné použít *in vitro* fertilizaci, ale tento přístup zanedbává důležitost role vnitřního prostředí samičího reprodukčního traktu a nemusel by dobře reprezentovat situaci *in vivo* (Dean a Nachman 2009).

Při časosběrném snímání zygot CD-1 x CD-1 a BDF1 x CD-1 byly první srovnávané parametry zaměřeny na prvojádra. V této práci bylo použito rozdělení na maternální a paternální prvojádra podle objemu. Pro rozlišení rodičovských prvojader je možné využít Transcription activator-like effectors (TALEs) fúzované s fluorescentními proteiny. Tato metoda je však založená na jednonukleotidových polymorfismech a rozdílech v abundanci pericentromerických a centromerických repetitivních sekvencí mezi *Mus musculus* a *Mus spretus* (Miyayama et al. 2013), proto zygoty, u kterých byla využita vznikly křížením těchto druhů (Reichmann et al. 2018).

Objem maternálních prvojader obou skupin zygot nebyl významně rozdílný v žádném ze tří nezávislých experimentů, což bylo předpokládáno, protože samice kmene CD-1 byly použity pro obě skupiny. Objem paternálních prvojader se lišil pouze v jednom ze tří nezávislých experimentů, takže v tomto parametru zřejmě není mezi zygotami významný rozdíl.

U obou skupin zygot bylo možné zachytit buňky se 3 prvojádry. V případě, že došlo k rozpadu prvojader, tak tyto buňky byly schopny tvořit fúzní vřeténka. Jedna zygota skupiny CD-1 x CD-1 však provedla rozpad prvojader ve srovnání s ostatními buňkami v experimentu pozdě, takže nedošlo k zachycení jejího případného průběhu anafáze. V případě BDF1 x CD-1 zygoty se zdá, že tato buňka byla schopna anafázi dokončit, takže problémy s nadpočetnými chromozomy se zřejmě neprojevily při sestavení fúzního vřeténka v první mitóze, ale pravděpodobně by se projeví až později. Vytvořené fúzní vřeténko navíc nebylo absolutně nejkratší a jeho naměřená šířka byla pouze o 0,2  $\mu\text{m}$  větší než nejširší fúzní vřeténko dvoujáderné zygoty, což ukazuje na pravděpodobnou schopnost vyrovnat se při tomto procesu i s nadpočetnými chromozomy. Bylo by zajímavé pokusit se osvětlit, jak zde mechanismus sestavení vřetének funguje, ale pokud by součástí experimentu bylo i časosběrné snímání samotného průběhu sestavení, tak by bylo pravděpodobně vhodné vyzkoušet také označení pólů

vřetének, protože pokud nejsou vřeténka před fúzí zcela oddělená či nesvírají výrazný úhel během sestavení, tak je není snad pouze při značení tubulinu a DNA odlišit. V embryích vzniklých z dvojjaderných zygot lze také pozorovat, že maternální a paternální chromatin zůstává i v nově vytvořených jádrech oddělený (Mayer et al. 2000) a je otázkou, jestli by nově vzniklá jádra u embryí pocházejících z trojjaderných buněk tvořila tři oddělená teritoria, či ne.

Samostatnost paternálního a maternálního genomu v zygotě také ilustrovalo zjištění, že jak u zygot CD-1 x CD-1, tak i u zygot BDF1 x CD-1 může docházet k rozdílné době rozpadu prvojader. Ke zpoždění může zřejmě dojít jak u paternálního, tak i maternálního prvojádra. V případě zpoždění rozpadu jednoho prvojádra o 5-10 minut zřejmě nedochází k negativnímu ovlivnění, při zpoždění o 15 minut se už u zygoty CD-1 x CD-1 délka její mitózy dostala nad průměr skupiny plus směrodatnou odchylku. Extrémní zpoždění rozpadu zřejmě vede k problémům v anafázi, ale podobně jako v případě trojjaderných buněk se i zde bylo fúzní vřeténko schopno sestavit, takže rozpad prvojader ve stejném časovém bodě zřejmě pro jeho úspěšnou tvorbu není kriticky nutný.

U zygot BDF1 x CD-1 nebyl v žádném ze 3 nezávislých experimentů zaznamenán významný rozdíl ve vzdálenosti středů prvojader před prasknutím od zygot CD-1 x CD-1, což znamená že paternální prvojádru od samce kmene BDF1 je zřejmě schopno migrovat srovnatelně jako paternální prvojádru kmene totožného s kmenem samice (tedy kmene CD-1).

Při zvětšení vzdálenosti mezi prvojádry díky použití nokodazolu může docházet k problémům se sestavením fúzního vřeténka (Reichmann et al. 2018). Pro obě sledované skupiny zygot platilo, že pokud byla vzdálenost středů prvojader před prasknutím větší jak 35  $\mu\text{m}$ , docházelo k tvorbě samostatných vřetének, která v některých případech nefúzovala. Při fúzi samostatných vřetének ale zřejmě vzdálenost prvojader nebyla jediným rozhodujícím faktorem, protože ze skupiny CD-1 x CD-1 zygot tvořící samostatná vřeténka to byla zygota s kratší vzdáleností mezi prvojádry před rozpadem (činící 37,7  $\mu\text{m}$  oproti 46  $\mu\text{m}$  u druhé zygoty), které se nepodařilo vytvořit fúzní vřeténko a anafázi provedla na dvou stále oddělených vřeténkách.

Délka ani šířka se u fúzních vřetének mezi zygotami CD-1 x CD-1 a BDF1 x CD-1 nelišila v žádném ze tří nezávislých experimentů, takže se zdá, že křížení samic CD-1 a samců BDF-1 morfologii fúzních vřetének významně nemění ve srovnání s fúzními vřeténky zygot s oběma rodiči ze stejného kmene.

V případě zygot CD-1 x CD-1 a BDF1 x CD-1 délka první mitózy také není významně odlišná (od rozpadu maternálního ani paternálního prvojádra).

## Závěr

Tato diplomová práce se zabývala srovnáním myších zygot vzniklých křížením kmenů B6D2F1/JRccHsd a CD-1 (BDF1 x CD-1) se zygotami, kde oba rodiče pocházeli z kmene CD-1 (CD-1 x CD-1).

Pomocí imunodetekce bylo zjištěno, že lokalizace Mad2 proteinu se mezi zygotami CD-1 x CD-1 a BDF1 x CD-1 před rozpadem prvojader neliší a relativní intenzita jeho signálu v maternálním ani paternálním prvojádře také není významně odlišná.

Proby procházející přes membránu SiR-tubulin a SPY505-DNA se podařilo u myších zygot v první mitóze použít k vizualizaci lokalizace a dynamiky chromozomů i tubulinu a také ke sledování sestavení dělicího vřeténka. Z hlediska kvality signálu se však zdají být lepší volbou pro práci s oocyty. Pro zobrazování průběhu dělení zygot nemusí být nutně vhodné, protože vysoká hladina šumu v cytoplazmě v některých zygotách může bránit analýze, například v této práci byl problém s určením zda dochází ke zpoždění rozchodu chromozomů při anafázi. Kvalita signálu se v oocytech nezdá být ovlivněna unikáním prob do oleje a doporučené využití verapamilu pro zlepšení signálu SiR-tubulinu nemělo ve zkušebním experimentu významný vliv.

V případě možného budoucího použití křížení samců C57BL/6JOlaHsd se samicemi CD-1 by bylo vhodné nejdříve otestovat jejich fertilitu se samicemi jiného kmene (ideálně stejného jako samci), protože při zpracování této práce byli použiti samci, u kterých byla pozorována významná subfertilita/sterilita.

Použitím časosběrné konfokální mikroskopie bylo zjištěno, že zygoty skupiny BDF1 x CD-1 a CD-1 x CD-1 se ve srovnávaných parametrech (objem maternálních a paternálních prvojader, vzdálenost prvojader před rozpadem, délka a šířka fúzních vřetének a délka mitózy) významně neliší. U obou skupiny byly také zaznamenány zygoty se 3 prvojádry, zygoty se zpožděním rozpadu jednoho z prvojader a zygoty se zcela oddělenými dělicími vřeténky pro maternální a paternální chromozomy i v době anafáze.

Celkově lze tedy shrnout, že křížením kmenů BDF1 a CD-1 ve vzniklé zygotě nedochází k významně odlišné tvorbě fúzního dělicího vřeténka a že samotné jeho sestavení je sice důležité pro správnou segregaci chromozomů v první mitóze, ale zřejmě není nutně kriticky narušeno předcházejícími problémy jako je například přítomnost tří prvojader, zpoždění rozpadu jednoho z prvojader či velké vzdálenosti prvojader, a je tedy jedním z řady faktorů

nutných pro úspěšný start života nové myši, ať už její otec pochází z kmene CD-1 či BDF1.

## Seznam literatury

Sekundární zdroje jsou označeny hvězdičkou.

ADENOT, Pierre G., Maria S. SZOLLOSI, Marc GEZE, Jean-paul RENARD a Pascale DEBEY, 1991. Dynamics of Paternal Chromatin Changes in Live One-Cell Mouse Embryo After Natural Fertilization. *Molecular Reproduction And Development* [online]. **28**(1), 23–34 [vid. 2023-02-03]. Dostupné z: <https://doi.org/10.1002/mrd.1080280105>

ADHAM, I. M., K. NAYERNIA a W. ENGEL, 1997. Spermatozoa Lacking Acrosin Protein Show Delayed Fertilization. *Molecular Reproduction and Development* [online]. **46**(3), 370–376 [vid. 2023-01-25]. Dostupné z: [https://doi.org/10.1002/\(SICI\)1098-2795\(199703\)46:3%3C370::AID-MRD16%3E3.0.CO;2-2](https://doi.org/10.1002/(SICI)1098-2795(199703)46:3%3C370::AID-MRD16%3E3.0.CO;2-2)

ADHIKARI, Deepak, Wenjing ZHENG, Yan SHEN, Nagaraju GORRE, Yao NING, Guillaume HALET, Philipp KALDIS a Kui LIU, 2012. Cdk1, but not Cdk2, is the sole Cdk that is essential and sufficient to drive resumption of meiosis in mouse oocytes. *Human Molecular Genetics* [online]. **21**(11), 2476–2484 [vid. 2022-11-17]. ISSN 0964-6906. Dostupné z: [doi:10.1093/HMG/DDS061](https://doi.org/10.1093/HMG/DDS061)

AMARGANT, Farners, Aïda PUJOL, Anna FERRER-VAQUER, Mercè DURBAN, Meritxell MARTÍNEZ, Rita VASSENA a Isabelle VERNOS, 2021. The human sperm basal body is a complex centrosome important for embryo preimplantation development. *Molecular Human Reproduction* [online]. **27**(11), 1–15 [vid. 2023-01-24]. Dostupné z: [doi:10.1093/molehr/gaab062](https://doi.org/10.1093/molehr/gaab062)

BALBOULA, Ahmed Z., Alexandra L. NGUYEN, Amanda S. GENTILELLO, Suzanne M. QUARTUCCIO, David DRUTOVIC, Petr SOLC a Karen SCHINDLER, 2016. Haspin kinase regulates microtubule-organizing center clustering and stability through Aurora kinase C in mouse oocytes. *Journal of Cell Science* [online]. **129**(19), 3648–3660 [vid. 2022-10-24]. ISSN 14779137. Dostupné z: [doi: 10.1242/jcs.189340](https://doi.org/10.1242/jcs.189340)

BALBOULA, Ahmed Z. a Karen SCHINDLER, 2014. Selective Disruption of Aurora C Kinase Reveals Distinct Functions from Aurora B Kinase during Meiosis in Mouse Oocytes. *PLOS Genetics* [online]. **10**(2), 1–17 [vid. 2022-10-15]. ISSN 1553-7404. Dostupné z: [doi:10.1371/JOURNAL.PGEN.1004194](https://doi.org/10.1371/JOURNAL.PGEN.1004194)

BARAN, Vladimir, Adela BRZAKOVA, Pavol REHAK, Veronika KOVARIKOVA a Petr SOLC, 2016. PLK1 regulates spindle formation kinetics and APC/C activation in mouse zygote. *Zygote* [online]. **24**(3), 338–345 [vid. 2023-02-05]. ISSN 0967-1994. Dostupné z: [doi:10.1017/S0967199415000246](https://doi.org/10.1017/S0967199415000246)

BAUMANN, Claudia, Xiaotian WANG, Luhan YANG a Maria M. VIVEIROS, 2017. Error-prone meiotic division and subfertility in mice with oocyte-conditional knockdown of pericentrin. *Journal of Cell Science* [online]. **130**(7), 1251–1262 [vid. 2022-10-11]. ISSN 14779137. Dostupné z: <https://doi.org/10.1242/jcs.196188>



BLEIL, Jeffrey D. a Paul M. WASSARMAN, 1980. Structure and function of the zona pellucida: Identification and characterization of the proteins of the mouse oocyte's zona pellucida. *Developmental Biology* [online]. **76**(1), 185–202 [vid. 2023-01-23]. ISSN 00121606. Dostupné z: doi:10.1016/0012-1606(80)90371-1

BLENGINI, Cecilia S., Patricia IBRAHIMIAN, Michaela VASKOVICOVA, David DRUTOVIC, Petr SOLC a Karen SCHINDLER, 2021. Aurora kinase A is essential for meiosis in mouse oocytes. *PLoS Genetics* [online]. **17**(4), 1–27 [vid. 2022-10-23]. ISSN 1553-7404. Dostupné z: doi:10.1371/JOURNAL.PGEN.1009327

BORNSLAEGER, Elayne A., Peter MATTEI a Richard M. SCHULTZ, 1986. Involvement of CAMP-Dependent Protein Kinase and Protein Phosphorylation in Regulation of Mouse Oocyte Maturation. *Developmental Biology* [online]. **114**, 453–462 [vid. 2023-01-22]. Dostupné z: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/0012160686902095>

BORUM, Kirstine, 1961. Oogenesis in the mouse. A study of the meiotic prophase. *Experimental Cell Research* [online]. **24**, 495–507 [vid. 2023-01-22]. Dostupné z: [https://doi.org/10.1016/0014-4827\(61\)90449-9](https://doi.org/10.1016/0014-4827(61)90449-9)

BOUFTAS, Nora, Lena SCHNEIDER, Marc HALDER, Rebecca DEMMIG, Martina BAACK, Damien CLADIÈRE, Melanie WALTER, Hiba AL ABDALLAH, Camilla KLEINHEMPEL, Janina MÜLLER, Francesca PASSARELLI, Patrick WEHRLE, Andreas HEIM, Katja WASSMANN a Thomas U. MAYER, 2022. Cyclin B3 implements timely vertebrate oocyte arrest for fertilization. *Developmental Cell* [online]. **57**(19), 2305–2320 [vid. 2023-01-30]. Dostupné z: doi:10.1101/2022.06.04.494806

BREUER, Manuel, Agnieszka KOLANO, Mijung KWON, Chao Chin LI, Ting Fen TSAI, David PELLMAN, Stéphane BRUNET a Marie Hélène VERLHAC, 2010. HURP permits MTOC sorting for robust meiotic spindle bipolarity, similar to extra centrosome clustering in cancer cells. *Journal of Cell Biology* [online]. **191**(7), 1251–1260 [vid. 2022-10-23]. ISSN 00219525. Dostupné z: <https://doi.org/10.1083/jcb.201005065>

BULLEJOS, Monica a Peter KOOPMAN, 2004. Germ cells enter meiosis in a rostro-caudal wave during development of the mouse ovary. *Molecular Reproduction and Development* [online]. **68**(4), 422–428 [vid. 2023-01-22]. ISSN 1040452X. Dostupné z: doi:10.1002/mrd.20105

BURY, Leah, Paula A. COELHO, Angela SIMEONE, Samantha FERRIES, Claire E. EYERS, Patrick A. EYERS, Magdalena ZERNICKA-GOETZ a David M. GLOVER, 2017. Plk4 and Aurora A cooperate in the initiation of acentriolar spindle assembly in mammalian oocytes. *Journal of Cell Biology* [online]. **216**(11), 3571–3590 [vid. 2022-10-23]. ISSN 15408140. Dostupné z: <https://doi.org/10.1083/jcb.201606077>

CAMPBELL, Michael S., Gordon K.T. CHAN a Tim J. YEN, 2001. Mitotic checkpoint proteins HsMAD1 and HsMAD2 are associated with nuclear pore complexes in interphase. *Journal of Cell Science* [online]. **114**(5), 953–963 [vid. 2024-08-02]. ISSN 0021-9533. Dostupné z: doi:10.1242/JCS.114.5.953

CAVAZZA, Tommaso, Yuko TAKEDA, Antonio Z. POLITI, Magomet AUSHEV, Patrick ALDAG, Clara BAKER, Meenakshi CHOUDHARY, Jonas BUCEVIČIUS, Gražvydas LUKINAVIČIUS, Kay ELDER, Martyn BLAYNEY, Andrea LUCAS-HAHN, Heiner NIEMANN, Mary HERBERT a Melina SCHUH, 2021. Parental genome unification is highly error-prone in mammalian embryos. *Cell* [online]. **184**(11), 2860-2877.e22 [vid. 2023-02-01]. ISSN 10974172. Dostupné z: doi:10.1016/J.CELL.2021.04.013

CLIFT, Dean a Melina SCHUH, 2015. A three-step MTOC fragmentation mechanism facilitates bipolar spindle assembly in mouse oocytes. *Nature Communications* [online]. **6**(1), 1–12 [vid. 2022-10-12]. ISSN 2041-1723. Dostupné z: doi:10.1038/ncomms8217

COELHO, Paula A., Leah BURY, Bedra SHARIF, Maria G. RIPARBELLI, Jingyan FU, Giuliano CALLAINI, David M. GLOVER a Magdalena ZERNICKA-GOETZ, 2013. Spindle formation in the mouse embryo requires Plk4 in the absence of centrioles. *Developmental Cell* [online]. **27**(5), 586–597 [vid. 2023-02-01]. ISSN 15345807. Dostupné z: doi:10.1016/J.DEVCEL.2013.09.029

COURTOIS, Aurélien, Melina SCHUH, Jan ELLENBERG a Takashi HIIRAGI, 2012. The transition from meiotic to mitotic spindle assembly is gradual during early mammalian development. *Journal of Cell Biology* [online]. **198**(3), 357–370 [vid. 2023-01-31]. ISSN 00219525. Dostupné z: doi:10.1083/jcb.201202135

CURRIE, Cerys E., Emma FORD, Lucy BENHAM WHYTE, Deborah M. TAYLOR, Bettina P. MIHALAS, Muriel ERENT, Adele L. MARSTON, Geraldine M. HARTSHORNE a Andrew D. MCAINSH, 2022. The first mitotic division of human embryos is highly error prone. *Nature Communications* [online]. **13**(1), 1–13 [vid. 2023-02-03]. ISSN 2041-1723. Dostupné z: doi:10.1038/s41467-022-34294-6

DALDELLO, Enrico Maria, Xuan G. LUONG, Cai Rong YANG, Jonathan KUHN a Marco CONTI, 2019. Cyclin B2 is required for progression through meiosis in mouse oocytes. *Development* [online]. **146**(8), 1–12 [vid. 2023-02-03]. ISSN 14779129. Dostupné z: doi:10.1242/dev.172734

DAVYDENKO, Olga, Richard M. SCHULTZ a Michael A. LAMPSON, 2013. Increased CDK1 activity determines the timing of kinetochore-microtubule attachments in meiosis I. *Journal of Cell Biology* [online]. **202**(2), 221–229 [vid. 2022-10-12]. ISSN 00219525. Dostupné z: doi:10.1083/jcb.201303019

DEAN, Matthew D. a Michael W. NACHMAN, 2009. Faster fertilization rate in conspecific versus heterospecific matings in house mice. *Evolution* [online]. **63**(1), 20–28 [vid. 2024-07-04]. ISSN 0014-3820. Dostupné z: doi:10.1111/J.1558-5646.2008.00499.X

DEL LLANO, Edgar, Rajan IYYAPPAN, Daria ALESHKINA, Tomas MASEK, Michal DVORAN, Zongliang JIANG, Martin POSPISEK, Michal KUBELKA a Andrej SUSOR, 2022. SGK1 is essential for meiotic resumption in mammalian oocytes. *European Journal of Cell Biology* [online]. **101**(2), 1–9 [vid. 2022-12-20]. ISSN 0171-9335. Dostupné z: doi:10.1016/J.EJCB.2022.151210

DONAHUE, Roger P., 1968. Maturation of the mouse oocyte in vitro. I. Sequence and timing of nuclear progression. *Journal of Experimental Zoology* [online]. **169**(2), 237–249 [vid. 2023-01-22]. ISSN 1097-010X. Dostupné z: doi:10.1002/JEZ.1401690210

DORSCH, Martina, Isabell WITTUR a Wiebke GARRELS, 2020. Efficiency of timed pregnancies in C57BL/6 and BALB/c mice by mating one male with up to four females. *Laboratory Animals* [online]. **54**(5), 461–468 [vid. 2024-07-04]. ISSN 17581117. Dostupné z: doi:10.1177/0023677219897687

DRUTOVIC, David, Xing DUAN, Rong LI, Petr KALAB a Petr SOLC, 2020. RanGTP and importin  $\beta$  regulate meiosis I spindle assembly and function in mouse oocytes. *The EMBO Journal* [online]. **39**(1), 1–19 [vid. 2022-10-15]. ISSN 1460-2075. Dostupné z: doi:10.15252/EMBJ.2019101689

DUMONT, Julien, Sebastian PETRI, Franz PELLEGRIN, Marie Emilie TERRET, Markus T. BOHNSACK, Pascale RASSINIER, Virginie GEORGET, Petr KALAB, Oliver J. GRUSS a Marie Hélène VERLHAC, 2007. A centriole- and RanGTP-independent spindle assembly pathway in meiosis I of vertebrate oocytes. *The Journal of Cell Biology* [online]. **176**(3), 295–305 [vid. 2022-11-01]. ISSN 00219525. Dostupné z: doi:10.1083/JCB.200605199

EL YAKOUBI, Warif, Eulalie BUFFIN, Damien CLADIÈRE, Yulia GRYAZNOVA, Inés BERENGUER, Sandra A. TOUATI, Rocío GÓMEZ, José A. SUJA, Jan M. VAN DEURSEN a Katja WASSMANN, 2017. Mps1 kinase-dependent Sgo2 centromere localisation mediates cohesin protection in mouse oocyte meiosis I. *Nature Communications* [online]. **8**(1), 1–14 [vid. 2022-11-20]. ISSN 2041-1723. Dostupné z: doi:10.1038/s41467-017-00774-3

ELBLING, L., W. BERGER, A. REHBERGER, T. WALDHÖR a M. MICKSCHE, 1993. P-Glycoprotein regulates chemosensitivity in early developmental stages of the mouse. *The FASEB Journal* [online]. **7**(15), 1499–1506 [vid. 2024-07-11]. ISSN 1530-6860. Dostupné z: doi:10.1096/FASEBJ.7.15.7903262

EPPIG, John J., Rolf R. FRETER, Patricia F. WARD-BAILEY a Richard M. SCHULTZ, 1983. Inhibition of oocyte maturation in the mouse: Participation of cAMP, steroid hormones, and a putative maturation-inhibitory factor. *Developmental Biology* [online]. **100**(1), 39–49 [vid. 2023-01-22]. ISSN 0012-1606. Dostupné z: doi:10.1016/0012-1606(83)90198-7

FENG, Ruizhi, Qing SANG, Yanping KUANG, Xiaoxi SUN, Zheng YAN, Shaozhen ZHANG, Juanzi SHI, Guoling TIAN, Anna LUCHNIAK, Yusuke FUKUDA, Bin LI, Min YU, Junling CHEN, Yao XU, Luo GUO, Ronggui QU, Xueqian WANG, Zhaogui SUN, Miao LIU, Huijuan SHI, Hongyan WANG, Yi FENG, Ruijin SHAO, Renjie CHAI, Qiaoli LI, Qinghe XING, Rui ZHANG, Eva NOGALES, Li JIN, Lin HE, Mohan L. GUPTA, Nicholas J. COWAN a Lei WANG, 2016. Mutations in TUBB8 and Human Oocyte Meiotic Arrest. *New England Journal of Medicine* [online]. **374**(3), 223–232 [vid. 2024-07-29]. ISSN 0028-4793. Dostupné z: doi: 10.1056/NEJMoa1510791

FERENCOVA, Ivana, Michaela VASKOVICOVA, David DRUTOVIC, Lucie KNOBLOCHOVA, Libor MACUREK, Richard M. SCHULTZ a Petr SOLC, 2022. CDC25B is required for the metaphase

I-metaphase II transition in mouse oocytes. *Journal of Cell Science* [online]. **135**(6), 1–11 [vid. 2022-11-20]. ISSN 14779137. Dostupné z: <https://doi.org/10.1242/jcs.252924>

FERRER-BUITRAGO, M., L. DHAENENS, Y. LU, D. BONTE, F. VANDEN MEERSCHAUT, P. DE SUTTER, L. LEYBAERT a B. HEINDRYCKX, 2018. Human oocyte calcium analysis predicts the response to assisted oocyte activation in patients experiencing fertilization failure after ICSI. *Human Reproduction* [online]. **33**(3), 416–425 [vid. 2023-01-25]. Dostupné z: [doi:10.1093/humrep/dex376](https://doi.org/10.1093/humrep/dex376)

FISHMAN, Emily L., Kyoung JO, Quynh P.H. NGUYEN, Dong KONG, Rachel ROYFMAN, Anthony R. CEKIC, Sushil KHANAL, Ann L. MILLER, Calvin SIMERLY, Gerald SCHATTEN, Jadranka LONCAREK, Vito MENNELLA a Tomer AVIDOR-REISS, 2018. A novel atypical sperm centriole is functional during human fertilization. *Nature Communications* [online]. **9**(1), 1–12 [vid. 2023-01-24]. ISSN 20411723. Dostupné z: [doi:10.1038/s41467-018-04678-8](https://doi.org/10.1038/s41467-018-04678-8)

FREUDZON, Leon, Rachael P. NORRIS, Arthur R. HAND, Shigeru TANAKA, Yoshinaga SAEKI, Teresa L. Z. JONES, Mark M. RASENICK, Catherine H. BERLOT, Lisa M. MEHLMANN a Laurinda A. JAFFE, 2005. Regulation of meiotic prophase arrest in mouse oocytes by GPR3, a constitutive activator of the Gs G protein. *Journal of Cell Biology* [online]. **171**(2), 255–265 [vid. 2023-01-22]. ISSN 00219525. Dostupné z: [doi:10.1083/jcb.200506194](https://doi.org/10.1083/jcb.200506194)

GOUDET, Ghylène, Sylvie MUGNIER, Isabelle CALLEBAUT a Philippe MONGET, 2008. Phylogenetic Analysis and Identification of Pseudogenes Reveal a Progressive Loss of Zona Pellucida Genes During Evolution of Vertebrates. *Biology of Reproduction* [online]. **78**(5), 796–806 [vid. 2022-12-21]. ISSN 0006-3363. Dostupné z: [doi:10.1095/BIOLREPROD.107.064568](https://doi.org/10.1095/BIOLREPROD.107.064568)

GRYAZNOVA, Yulia, Leonor KEATING, Sandra A. TOUATI, Damien CLADIÈRE, Warif EL YAKOUBI, Eulalie BUFFIN a Katja WASSMANN, 2021. Kinetochore individualization in meiosis I is required for centromeric cohesin removal in meiosis II. *The EMBO Journal* [online]. **40**(7), 1–19 [vid. 2022-11-19]. ISSN 1460-2075. Dostupné z: [doi:10.15252/EMBJ.2020106797](https://doi.org/10.15252/EMBJ.2020106797)

HACHED, Khaled, Stephanie Z. XIE, Eulalie BUFFIN, Damien CLADIÈRE, Christophe RACHEZ, Marina SACRAS, Peter K. SORGER a Katja WASSMANN, 2011. Mps1 at kinetochores is essential for female mouse meiosis I. *Development* [online]. **138**(11), 2261–2271 [vid. 2022-11-10]. ISSN 0950-1991. Dostupné z: [doi:10.1242/DEV.061317](https://doi.org/10.1242/DEV.061317)

HAN, Jin Seung, Ruby CHEN, Maria Paola PARONETTO a Marco CONTI, 2005. Wee1B is an oocyte-specific kinase involved in the control of meiotic arrest in the mouse. *Current Biology* [online]. **15**(18), 1670–1676 [vid. 2022-12-19]. ISSN 09609822. Dostupné z: [doi:10.1016/j.cub.2005.07.056](https://doi.org/10.1016/j.cub.2005.07.056)

HAN, Seung Jin, João Pedro Sousa MARTINS, Ye YANG, Min Kook KANG, Enrico Maria DALDELLO a Marco CONTI, 2017. The Translation of Cyclin B1 and B2 is Differentially Regulated during Mouse Oocyte Reentry into the Meiotic Cell Cycle. *Scientific Reports* [online]. **7**(1), 1–12 [vid. 2023-01-30]. ISSN 20452322. Dostupné z: [doi:10.1038/s41598-017-13688-3](https://doi.org/10.1038/s41598-017-13688-3)

HEINDRYCKX, B., J. VAN DER ELST, P. DE SUTTER a M. DHONT, 2005. Treatment option for sperm-or oocyte-related fertilization failure: assisted oocyte activation following diagnostic heterologous ICSI. *Human Reproduction* [online]. **20**(8), 2237–2241 [vid. 2023-01-25]. Dostupné z: doi:10.1093/humrep/dei029

HERBERT, Mary, Mark LEVASSEUR, Hayden HOMER, Katie YALLOP, Alison MURDOCH a Alex MCDOUGALL, 2003. Homologue disjunction in mouse oocytes requires proteolysis of securin and cyclin B1. *Nature Cell Biology* [online]. **5**(11), 1023–1025 [vid. 2023-02-08]. ISSN 14657392. Dostupné z: doi:10.1038/ncb1062

HINO, Toshiaki, Yuko MURO, Miwa TAMURA-NAKANO, Masaru OKABE, Hiroyuki TATENO a Ryuzo YANAGIMACHI, 2016. The behavior and acrosomal status of mouse spermatozoa in vitro, and within the oviduct during fertilization after natural mating. *Biology of Reproduction* [online]. **95**(3), 1–11 [vid. 2023-01-25]. ISSN 15297268. Dostupné z: doi:10.1095/biolreprod.116.140400

HORAKOVA, Adela, Marketa KONECNA, Lenka RADONOVA a Martin ANGER, 2024. Early onset of APC/C activity renders SAC inefficient in mouse embryos. *Frontiers in Cell and Developmental Biology* [online]. **12**, 1–13 [vid. 2024-07-26]. ISSN 2296634X. Dostupné z: doi:10.3389/FCELL.2024.1355979/BIBTEX

HORNER, Kathleen, Gabriel LIVERA, Mary HINCKLEY, Kien TRINH, Daniel STORM a Marco CONTI, 2003. Rodent oocytes express an active adenylyl cyclase required for meiotic arrest. *Developmental Biology* [online]. **258**(2), 385–396 [vid. 2023-01-22]. ISSN 00121606. Dostupné z: doi:10.1016/S0012-1606(03)00134-9

HOSHI, K., T. SUGANO, C. ENDO, N. YOSHIMATSU, K. YANAGIDA a A. SATO, 1993. Induction of the acrosome reaction in human spermatozoa by human zona pellucida and effect of cervical mucus on zona-induced acrosome reaction. *Fertility and Sterility* [online]. **60**(1), 149–153 [vid. 2023-01-23]. ISSN 00150282. Dostupné z: doi:10.1016/S0015-0282(16)56053-1

HU, Meng Wen, Zhen Bo WANG, Zong Zhe JIANG, Shu Tao QI, Lin HUANG, Qiu Xia LIANG, Heide SCHATTEN a Qing Yuan SUN, 2014. Scaffold subunit alpha of PP2A is essential for female meiosis and fertility in mice. *Biology of Reproduction* [online]. **91**(1), 1–10 [vid. 2022-10-28]. ISSN 15297268. Dostupné z: <https://doi.org/10.1095/biolreprod.114.120220>

HU, Meng Wen, Zhen Bo WANG, Yan TENG, Zong Zhe JIANG, Xue Shan MA, Ning HOU, Xuan CHENG, Heide SCHATTEN, Xingzhi XU, Xiao YANG a Qing Yuan SUN, 2015. Loss of protein phosphatase 6 in oocytes causes failure of meiosis II exit and impaired female fertility. *Journal of Cell Science* [online]. **128**(20), 3769–3780 [vid. 2022-10-28]. ISSN 14779137. Dostupné z: <https://doi.org/10.1242/jcs.173179>

CHAIGNE, Agathe, Clément CAMPILLO, Raphaël VOITURIEZ, Nir S. GOV, Cécile SYKES, Marie-Hélène VERLHAC a Marie-Emilie TERRET, 2016. F-actin mechanics control spindle centring in the

mouse zygote. *Nature Communications* [online]. 7(10253), 1–14 [vid. 2023-02-02]. Dostupné z: doi:10.1038/ncomms10253

CHAKRAVARTY, Sanchita, K. SURAJ a Satish Kumar GUPTA, 2005. Baculovirus-expressed recombinant human zona pellucida glycoprotein-B induces acrosomal exocytosis in capacitated spermatozoa in addition to zona pellucida glycoprotein-C. *Molecular Human Reproduction* [online]. 11(5), 365–372 [vid. 2023-01-23]. ISSN 13609947. Dostupné z: doi:10.1093/molehr/gah165

CHEW, Yean Ming a Robert A. CROSS, 2023. Taxol acts differently on different tubulin isoforms. *Communications Biology* [online]. 6(1), 1–15 [vid. 2024-07-29]. ISSN 2399-3642. Dostupné z: doi:10.1038/s42003-023-05306-y

CHOI, Taesaeng, Fugaku AOKI, Makoto MORI, Masakane YAMASHITA, Yoshitaka NAGAHAMA a Kaoru KOHMOTO, 1991. Activation of p34 cdc2 protein kinase activity in meiotic and mitotic cell cycles in mouse oocytes and embryos. *Development* [online]. 113(3), 789–795 [vid. 2023-01-22]. Dostupné z: <https://journals.biologists.com/dev/article/113/3/789/37175/Activation-of-p34cdc2-protein-kinase-activity-in>

INOUE, Azusa, Sugako OGUSHI, Mitinori SAITOU, Masataka G. SUZUKI a Fugaku AOKI, 2011. Involvement of Mouse Nucleoplasmin 2 in the Decondensation of Sperm Chromatin after Fertilization. *Biology of Reproduction* [online]. 85(1), 70–77 [vid. 2023-02-03]. ISSN 0006-3363. Dostupné z: doi:10.1095/BIOLREPROD.110.089342

IZQUIERDO-RICO, M<sup>a</sup> José, Carla MOROS-NICOLÁS, Míriam PÉREZ-CRESPO, Ricardo LAGUNA-BARRAZA, Alfonso GUTIÉRREZ-ADÁN, Frédéric VEYRUNES, José BALLESTA, Vincent LAUDET, Pascale CHEVRET a Manuel AVILÉS, 2021. ZP4 Is Present in Murine Zona Pellucida and Is Not Responsible for the Specific Gamete Interaction. *Frontiers in Cell and Developmental Biology* [online]. 8, 1–18 [vid. 2023-01-23]. ISSN 2296634X. Dostupné z: doi:10.3389/fcell.2020.626679

JIN, Fang, Masakazu HAMADA, Liviu MALUREANU, Karthik B. JEGANATHAN, Wei ZHOU, Dean E. MORBECK a Jan M. VAN DEURSEN, 2010. Cdc20 Is Critical for Meiosis I and Fertility of Female Mice. *PLOS Genetics* [online]. 6(9), 1–16 [vid. 2023-02-08]. ISSN 15537390. Dostupné z: doi:10.1371/journal.pgen.1001147

JIN, Mayuko, Eiji FUJIWARA, Yasutaka KAKIUCHI, Masaru OKABE, Yuhkoh SATOUH, Shoji A. BABA, Kazuyoshi CHIBA a Noritaka HIROHASHI, 2011. Most fertilizing mouse spermatozoa begin their acrosome reaction before contact with the zona pellucida during in vitro fertilization. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* [online]. 108(12), 4892–4896 [vid. 2023-01-23]. ISSN 00278424. Dostupné z: doi:10.1073/pnas.1018202108

JU, Jia Qian, Hao Lin ZHANG, Yue WANG, Lin Lin HU a Shao Chen SUN, 2024. Kinesin KIFC3 is essential for microtubule stability and cytokinesis in oocyte meiosis. *Cell Communication and Signaling* [online]. 22(1), 1–11 [vid. 2024-06-03]. ISSN 1478811X. Dostupné z: <https://doi.org/10.1186/s12964-024-01589-8>

KAI, Yoshiteru, Hiroomi KAWANO a Naoki YAMASHITA, 2021. First mitotic spindle formation is led by sperm centrosome-dependent MTOCs in humans. *Reproduction* [online]. **161**(5), V19–V22 [vid. 2023-02-03]. ISSN 17417899. Dostupné z: <https://doi.org/10.1530/rep-21-0061>

KANG, Hyoeun, Seok Cheol HWANG, Yong Seok PARK a Jeong Su OH, 2013. Cdc25B phosphatase participates in maintaining metaphase II arrest in mouse oocytes. *Molecules and cells* [online]. **35**(6), 514–518 [vid. 2022-10-28]. ISSN 02191032. Dostupné z: [doi:10.1007/s10059-013-0029-6](https://doi.org/10.1007/s10059-013-0029-6)

\*KARABINOVA, Pavla, Michal KUBELKA a Andrej SUSOR, 2011. Proteasomal degradation of ubiquitinated proteins in oocyte meiosis and fertilization in mammals. *Cell and Tissue Research* [online]. **346**(1), 1–9 [vid. 2024-06-05]. ISSN 0302766X. Dostupné z: <https://doi.org/10.1007/s00441-011-1235-1>

KIM, Jihye, Kei Ichiro ISHIGURO, Aya NAMBU, Bungo AKIYOSHI, Shihori YOKOBAYASHI, Ayano KAGAMI, Tadashi ISHIGURO, Alberto M. PENDAS, Naoki TAKEDA, Yogo SAKAKIBARA, Tomoya S. KITAJIMA, Yuji TANNO, Takeshi SAKUNO a Yoshinori WATANABE, 2015. Meikin is a conserved regulator of meiosis-I-specific kinetochore function. *Nature* [online]. **517**(7535), 466–471 [vid. 2022-10-28]. ISSN 14764687. Dostupné z: [doi:10.1038/nature14097](https://doi.org/10.1038/nature14097)

KITAJIMA, Tomoya S., Miho OHSUGI a Jan ELLENBERG, 2011. Complete kinetochore tracking reveals error-prone homologous chromosome biorientation in mammalian oocytes. *Cell* [online]. **146**(4), 568–581 [vid. 2022-10-12]. ISSN 10974172. Dostupné z: [doi:10.1016/j.cell.2011.07.031](https://doi.org/10.1016/j.cell.2011.07.031)

KOEHLER, Kara E., Stefanie E. SCHRUMP, Jonathan P. CHERRY, Terry J. HASSOLD a Patricia A. HUNT, 2006. Near-human aneuploidy levels in female mice with homeologous chromosomes. *Current Biology* [online]. **16**(15), R579–R580 [vid. 2023-02-13]. ISSN 09609822. Dostupné z: [doi:10.1016/j.cub.2006.07.018](https://doi.org/10.1016/j.cub.2006.07.018)

KOLANO, Agnieszka, Stéphane BRUNET, Alain D. SILK, Don W. CLEVELAND a Marie Hélène VERLHAC, 2012. Error-prone mammalian female meiosis from silencing the spindle assembly checkpoint without normal interkinetochore tension. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* [online]. **109**(27), E1858–E1867 [vid. 2024-08-04]. ISSN 00278424. Dostupné z: <https://doi.org/10.1073/pnas.1204686109>

KONG, Qingran, Laura A. BANASZYNSKI, Fuqiang GENG, Xiaolei ZHANG, Jiaming ZHANG, Heng ZHANG, Claire L. O'NEILL, Peidong YAN, Zhonghua LIU, Koji SHIDO, Gianpiero D. PALERMO, C. DAVID ALLIS, Shahin RAFII, Zev ROSENWAKS a Duancheng WEN, 2018. Histone variant H3.3-mediated chromatin remodeling is essential for paternal genome activation in mouse preimplantation embryos. *Journal of Biological Chemistry* [online]. **293**(10), 3829–3838 [vid. 2023-02-03]. ISSN 1083351X. Dostupné z: [doi:10.1074/JBC.RA117.001150](https://doi.org/10.1074/JBC.RA117.001150)

KOVARIKOVA, Veronika, Jan BURKUS, Pavol REHAK, Adela BRZAKOVA, Petr SOLC a Vladimir BARAN, 2016. Aurora kinase A is essential for correct chromosome segregation in mouse zygote. *Zygote* [online]. **24**(3), 326–337 [vid. 2023-02-05]. ISSN 14698730. Dostupné z: [doi:10.1017/S0967199415000222](https://doi.org/10.1017/S0967199415000222)

KUBIAK, J. Z., M. WEBER, G. GERAUD a B. MARO, 1992. Cell cycle modification during the transitions between meiotic M-phases in mouse oocytes. *Journal of Cell Science* [online]. **102**, 457–467 [vid. 2023-01-22]. Dostupné z: <https://journals.biologists.com/jcs/article/102/3/457/23368/Cell-cycle-modification-during-the-transitions>

KUDO, Nobuaki R., Katja WASSMANN, Martin ANGER, Melina SCHUH, Karin G. WIRTH, Huiling XU, Wolfgang HELMHART, Hiromi KUDO, Michael MCKAY, Bernard MARO, Jan ELLENBERG, Peter DE BOER a Kim NASMYTH, 2006. Resolution of Chiasmata in Oocytes Requires Separase-Mediated Proteolysis. *Cell* [online]. **126**(1), 135–146 [vid. 2023-01-30]. ISSN 00928674. Dostupné z: doi:10.1016/j.cell.2006.05.033

KUSKE, Michael, Julia FLOEHR, Irene YIALLOUROS, Thomas MICHNA, Willi JAHNEN-DECHENT, Stefan TENZER, Walter STÖCKER a Hagen KÖRSCHGEN, 2021. Limited proteolysis by acrosin affects sperm-binding and mechanical resilience of the mouse zona pellucida. *Molecular Human Reproduction* [online]. **27**(4), 1–10 [vid. 2023-01-25]. Dostupné z: doi:10.1093/molehr/gaab022

KUSUHARA, Atsuko, Elnur BABAYEV, Luhan T. ZHOU, Vijay P. SINGH, Jennifer L. GERTON a Francesca E. DUNCAN, 2021. Immature Follicular Origins and Disrupted Oocyte Growth Pathways Contribute to Decreased Gamete Quality During Reproductive Juvenescence in Mice. *Frontiers in Cell and Developmental Biology* [online]. **9**, 1–15 [vid. 2024-08-04]. ISSN 2296634X. Dostupné z: doi:10.3389/FCELL.2021.693742/FULL

LA SPINA, Florenza A., Lis C. PUGA MOLINA, Ana ROMAROWSKI, Alejandra M. VITALE, Tomas L. FALZONE, Dario KRAPF, Noritaka HIROHASHI a Mariano G. BUFFONE, 2016. Mouse sperm begin to undergo acrosomal exocytosis in the upper isthmus of the oviduct. *Developmental Biology* [online]. **411**(2), 172–182 [vid. 2023-01-23]. ISSN 1095564X. Dostupné z: doi:10.1016/j.ydbio.2016.02.006

LAMAS-TORANZO, Ismael, Noelia FONSECA BALVÍS, Ana QUEREJETA-FERNÁNDEZ, María José IZQUIERDO-RICO, Leopoldo GONZÁLEZ-BRUSI, Pedro L. LORENZO, Pilar GARCÍA-REBOLLAR, Manuel AVILÉ a Pablo BERMEJO-ÁLVAREZ, 2019. ZP4 confers structural properties to the zona pellucida essential for embryo development. *eLife* [online]. **8**(e48904), 1–18 [vid. 2023-01-23]. Dostupné z: doi:10.7554/eLife.48904.001

LANE, Simon I. R. a Keith T. JONES, 2014. Non-canonical function of spindle assembly checkpoint proteins after APC activation reduces aneuploidy in mouse oocytes. *Nature Communications* [online]. **5**(1), 1–9 [vid. 2022-11-08]. ISSN 2041-1723. Dostupné z: doi:10.1038/ncomms4444

LANE, Simon I. R., Stephanie L. MORGAN, Tianyu WU, Josie K. COLLINS, Julie A. MERRIMAN, Elias ELINATI, James M. TURNER a Keith T. JONES, 2017. DNA damage induces a kinetochore-based ATM/ATR-independent SAC arrest unique to the first meiotic division in mouse oocytes. *Development* [online]. **144**(19), 3475–3486 [vid. 2022-11-13]. ISSN 14779129. Dostupné z: <https://doi.org/10.1242/dev.153965>



\*LARA-GONZALEZ, Pablo, Jonathon PINES a Arshad DESAI, 2021. Spindle assembly checkpoint activation and silencing at kinetochores. *Semin Cell Dev Biol.* [online]. **117**, 86–98 [vid. 2024-08-04]. ISSN 10963634. Dostupné z: doi:10.1016/j.semcdb.2021.06.009

LEE, In Won, Yu Jin JO, Seung Min JUNG, Hai Yang WANG, Nam Hyung KIM a Suk NAMGOONG, 2018. Distinct roles of Cep192 and Cep152 in acentriolar MTOCs and spindle formation during mouse oocyte maturation. *FASEB Journal* [online]. **32**(2), 625–638 [vid. 2022-10-11]. ISSN 15306860. Dostupné z: <https://doi.org/10.1096/fj.201700559rr>

LEFIÈVRE, L., S. J. CONNER, A. SALPEKAR, O. OLUFOWOBI, P. ASHTON, B. PAVLOVIC, W. LENTON, M. AFNAN, I. A. BREWIS, M. MONK, D. C. HUGHES a C. L.R. BARRATT, 2004. Four zona pellucida glycoproteins are expressed in the human\*. *Human Reproduction* [online]. **19**(7), 1580–1586 [vid. 2023-01-23]. ISSN 0268-1161. Dostupné z: doi:10.1093/HUMREP/DEH301

LI, Jian, Hao Ya CHANG, Zi Yun YI, Chun Hui ZHANG, Qing Yuan SUN a Wei Ping QIAN, 2022. Transient inhibition of CDK2 activity prevents oocyte meiosis I completion and egg activation in mouse. *Journal of Cellular Physiology* [online]. **237**(11), 4317–4325 [vid. 2022-11-13]. ISSN 10974652. Dostupné z: doi:10.1002/JCP.30885

LI, Jian, Ji Xin TANG, Jin Mei CHENG, Bian HU, Yu Qian WANG, Batool AALIA, Xiao Yu LI, Cheng JIN, Xiu Xia WANG, Shou Long DENG, Yan ZHANG, Su Ren CHEN, Wei Ping QIAN, Qing Yuan SUN, Xing Xu HUANG a Yi Xun LIU, 2018. Cyclin B2 can compensate for Cyclin B1 in oocyte meiosis I. *Journal of Cell Biology* [online]. **217**(11), 3901–3911 [vid. 2022-11-12]. ISSN 15408140. Dostupné z: doi:10.1083/jcb.201802077

LI, Jian, Hong Yong ZHANG, Feng WANG, Qing Yuan SUN a Wei Ping QIAN, 2021. The Cyclin B2/CDK1 Complex Conservatively Inhibits Separase Activity in Oocyte Meiosis II. *Frontiers in Cell and Developmental Biology* [online]. **9**, 1–8 [vid. 2022-11-12]. ISSN 2296634X. Dostupné z: doi:10.3389/fcell.2021.648053

LI, Mo, Sen LI, Ju YUAN, Zhen Bo WANG, Shao Chen SUN, Heide SCHATTEN a Qing Yuan SUN, 2009. Bub3 Is a Spindle Assembly Checkpoint Protein Regulating Chromosome Segregation during Mouse Oocyte Meiosis. *PLOS ONE* [online]. **4**(11), e7701 [vid. 2022-11-12]. ISSN 1932-6203. Dostupné z: doi:10.1371/JOURNAL.PONE.0007701

LIN, Chih Jen, Fong Ming KOH, Priscilla WONG, Marco CONTI a Miguel RAMALHO-SANTOS, 2014. Hira-mediated H3.3 incorporation is required for DNA replication and ribosomal RNA transcription in the mouse zygote. *Developmental Cell* [online]. **30**(3), 268–279 [vid. 2023-02-02]. ISSN 18781551. Dostupné z: doi:10.1016/j.devcel.2014.06.022

LINCOLN, A. Jeannine, Dineli WICKRAMASINGHE, Paula STEIN, Richard M. SCHULTZ, Mary Ellen PALKO, Maria P. DE MIGUEL, Lino TESSAROLLO a Peter J. DONOVAN, 2002. Cdc25b phosphatase is required for resumption of meiosis during oocyte maturation. *Nature Genetics* [online]. **30**(4), 446–449 [vid. 2022-11-12]. ISSN 10614036. Dostupné z: doi:10.1038/ng856

LITTLE, Tara M. a Philip W. JORDAN, 2020. PLK1 is required for chromosome compaction and microtubule organization in mouse oocytes. *Molecular Biology of the Cell* [online]. **31**(12), 1206–1217 [vid. 2022-10-21]. ISSN 19394586. Dostupné z: <https://doi.org/10.1091/mbc.e19-12-0701>

LIU, De Yi a H. W.G. BAKER, 1993. Inhibition of Acrosin Activity with a Trypsin Inhibitor Blocks Human Sperm Penetration of the Zona Pellucida. *Biology of Reproduction* [online]. **48**(2), 340–348 [vid. 2023-01-25]. ISSN 0006-3363. Dostupné z: [doi:10.1095/BIOLREPROD48.2.340](https://doi.org/10.1095/BIOLREPROD48.2.340)

LONGO, Frank J. a Da Yuan CHEN, 1985. Development of cortical polarity in mouse eggs: Involvement of the meiotic apparatus. *Developmental Biology* [online]. **107**(2), 382–394 [vid. 2023-01-23]. ISSN 00121606. Dostupné z: [doi:10.1016/0012-1606\(85\)90320-3](https://doi.org/10.1016/0012-1606(85)90320-3)

LUKINAVIČIUS, Gražvydas, Luc REYMOND, Elisa D'ESTE, Anastasiya MASHARINA, Fabian GÖTTFERT, Haisen TA, Angelika GÜTHER, Mathias FOURNIER, Stefano RIZZO, Herbert WALDMANN, Claudia BLAUKOPF, Christoph SOMMER, Daniel W. GERLICH, Hans Dieter ARNDT, Stefan W. HELL a Kai JOHNSSON, 2014. Fluorogenic probes for live-cell imaging of the cytoskeleton. *Nature Methods* [online]. **11**(7), 731–733 [vid. 2024-07-11]. ISSN 1548-7105. Dostupné z: [doi:10.1038/nmeth.2972](https://doi.org/10.1038/nmeth.2972)

MADGWICK, Suzanne, David V. HANSEN, Mark LEVASSEUR, Peter K. JACKSON a Keith T. JONES, 2006. Mouse Emi2 is required to enter meiosis II by reestablishing cyclin B1 during interkinesis. *Journal of Cell Biology* [online]. **174**(6), 791–801 [vid. 2022-11-12]. ISSN 00219525. Dostupné z: [doi:10.1083/jcb.200604140](https://doi.org/10.1083/jcb.200604140)

MADGWICK, Suzanne, Mark LEVASSEUR a Keith T. JONES, 2005. Calmodulin-dependent protein kinase II, and not protein kinase C, is sufficient for triggering cell-cycle resumption in mammalian eggs. *Journal of Cell Science* [online]. **118**(17), 3849–3859 [vid. 2023-01-05]. ISSN 0021-9533. Dostupné z: [doi:10.1242/JCS.02506](https://doi.org/10.1242/JCS.02506)

MAIER, Nolan K., Jun MA, Michael A. LAMPSON a Iain M. CHEESEMAN, 2021. Separase cleaves the kinetochore protein Meikin at the meiosis I/II transition. *Developmental Cell* [online]. **56**(15), 2192–2206.e8 [vid. 2022-11-21]. ISSN 1534-5807. Dostupné z: [doi:10.1016/J.DEVCEL.2021.06.019](https://doi.org/10.1016/J.DEVCEL.2021.06.019)

MANANDHAR, G., C. SIMERLY a G. SCHATTEN, 2000. Highly degenerated distal centrioles in rhesus and human spermatozoa. *Human Reproduction* [online]. **15**(2), 256–263 [vid. 2023-01-24]. ISSN 0268-1161. Dostupné z: [doi:10.1093/HUMREP/15.2.256](https://doi.org/10.1093/HUMREP/15.2.256)

MANANDHAR, G., P. SUTOVSKY, H. C. JOSHI, T. STEARNS a G. SCHATTEN, 1998. Centrosome Reduction during Mouse Spermiogenesis. *Developmental Biology* [online]. **203**(2), 424–434 [vid. 2023-01-24]. Dostupné z: <https://doi.org/10.1006/dbio.1998.8947>

MARANGOS, Petros a John CARROLL, 2004. The dynamics of cyclin B1 distribution during meiosis I in mouse oocytes. *Reproduction* [online]. **128**(2), 153–162 [vid. 2023-01-26]. ISSN 1741-7899. Dostupné z: doi:10.1530/REP.1.00192

MARTIN-MCCAFFREY, Luke, Francis S. WILLARD, Antonio J. OLIVEIRA-DOS-SANTOS, David R.C. NATALE, Bryan E. SNOW, Randall J. KIMPLE, Agnieszka PAJAK, Andrew J. WATSON, Lina DAGNINO, Josef M. PENNINGER, David P. SIDEROVSKI a Sudhir J.A. D'SOUZA, 2004. RGS14 is a mitotic spindle protein essential from the first division of the mammalian zygote. *Developmental Cell* [online]. **7**(5), 763–769 [vid. 2023-02-02]. ISSN 15345807. Dostupné z: doi:10.1016/J.DEVCEL.2004.10.004

MASCIARELLI, Silvia, Kathleen HORNER, Chengyu LIU, Sun Hee PARK, Mary HINCKLEY, Steven HOCKMAN, Taku NEDACHI, Catherine JIN, Marco CONTI a Vincent MANGANIELLO, 2004. Cyclic nucleotide phosphodiesterase 3A-deficient mice as a model of female infertility. *Journal of Clinical Investigation* [online]. **114**(2), 196–205 [vid. 2022-11-12]. ISSN 0021-9738. Dostupné z: doi:10.1172/jci200421804

MAYER, Wolfgang, Avril SMITH, Reinald FUNDELE a Thomas HAAF, 2000. Spatial Separation of Parental Genomes in Preimplantation Mouse Embryos. *The Journal of Cell Biology* [online]. **148**(4), 629–634 [vid. 2023-02-08]. Dostupné z: <https://doi.org/10.1083/jcb.148.4.629>

MCGUINNESS, Barry E., Martin ANGER, Anna KOUZNETSOVA, Ana M. GIL-BERNABÉ, Wolfgang HELMHART, Nobuaki R. KUDO, Annelie WUENSCH, Stephen TAYLOR, Christer HOOG, Bela NOVAK a Kim NASMYTH, 2009. Regulation of APC/C Activity in Oocytes by a Bub1-Dependent Spindle Assembly Checkpoint. *Current Biology* [online]. **19**(5), 369–380 [vid. 2022-11-09]. ISSN 09609822. Dostupné z: doi:10.1016/j.cub.2009.01.064

MEDVEDEV, Sergey, Paula STEIN a Richard M. SCHULTZ, 2014. Specificity of calcium/calmodulin-dependent protein kinases in mouse egg activation. *Cell Cycle* [online]. **13**(9), 1482–1488 [vid. 2023-01-24]. ISSN 15514005. Dostupné z: doi:10.4161/cc.28432

MEHLMANN, Lisa M., Teresa L. Z. JONES a Laurinda A. JAFFE, 2002. Meiotic Arrest in the Mouse Follicle Maintained by a Gs Protein in the Oocyte. *Science* [online]. **297**, 1343–1345 [vid. 2022-11-12]. Dostupné z: <https://doi.org/10.1126/science.1073978>

MENG, Tie Gang, Wen Long LEI, Jian LI, Feng WANG, Zheng Hui ZHAO, Ang LI, Zhen Bo WANG, Qing Yuan SUN a Xiang Hong OU, 2020. Degradation of Ccnb3 is essential for maintenance of MII arrest in oocyte. *Biochemical and Biophysical Research Communications* [online]. **521**(1), 265–269 [vid. 2022-11-09]. ISSN 10902104. Dostupné z: doi:10.1016/j.bbrc.2019.10.124

MENGOLI, Valentina, Katarzyna JONAK, Oleksii LYZAK, Mahdi LAMB, Lisa M LISTER, Chris LODGE, Julie ROJAS, Ievgeniia ZAGORIY, Mary HERBERT a Wolfgang ZACHARIAE, 2021. Deprotection of centromeric cohesin at meiosis II requires APC/C activity but not kinetochore tension. *The EMBO Journal* [online]. **40**(7), e106812 [vid. 2022-11-20]. ISSN 1460-2075. Dostupné z: doi:10.15252/EMBJ.2020106812

MIYANARI, Yusuke, Céline ZIEGLER-BIRLING a Maria Elena TORRES-PADILLA, 2013. Live visualization of chromatin dynamics with fluorescent TALEs. *Nature Structural & Molecular Biology* [online]. **20**(11), 1321–1324 [vid. 2024-07-26]. ISSN 1545-9985. Dostupné z: doi:10.1038/nsmb.2680

MOLYNEAUX, Kathleen A., Jim STALLOCK, Kyle SCHAIBLE a Christopher WYLIE, 2001. Time-lapse analysis of living mouse germ cell migration. *Developmental Biology* [online]. **240**(2), 488–498 [vid. 2023-01-22]. ISSN 00121606. Dostupné z: doi:10.1006/dbio.2001.0436

MORI, Masashi, Tatsuma YAO, Tappei MISHINA, Hiromi ENDOH, Masahito TANAKA, Nao YONEZAWA, Yuta SHIMAMOTO, Shigenobu YONEMURA, Kazuo YAMAGATA, Tomoya S KITAJIMA a Masahito IKAWA, 2021. RanGTP and the actin cytoskeleton keep paternal and maternal chromosomes apart during fertilization. *Journal of Cell Biology* [online]. **10**(220), 1–17 [vid. 2023-02-02]. Dostupné z: doi:10.1083/jcb.202012001

NABTI, Ibtissem, Alexandra REIS, Mark LEVASSEUR, Olaf STEMMANN a Keith T. JONES, 2008. Securin and not CDK1/cyclin B1 regulates sister chromatid disjunction during meiosis II in mouse eggs. *Developmental Biology* [online]. **321**(2), 379–386 [vid. 2023-01-30]. ISSN 00121606. Dostupné z: doi:10.1016/J.YDBIO.2008.06.036

NAGAOKA, So Iha, Craig A. HODGES, David F. ALBERTINI a Patricia Ann HUNT, 2011. Oocyte-specific differences in cell-cycle control create an innate susceptibility to meiotic errors. *Current Biology* [online]. **21**(8), 651–657 [vid. 2024-08-04]. ISSN 09609822. Dostupné z: doi:10.1016/j.cub.2011.03.003

NIKALAYEVICH, Elvira, Safia EL JAILANI, Aude DUPRÉ, Damien CLADIÈRE, Yulia GRYAZNOVA, Célia FOSSE, Eulalie BUFFIN, Sandra A. TOUATI a Katja WASSMANN, 2022. Aurora B/C-dependent phosphorylation promotes Rec8 cleavage in mammalian oocytes. *Current Biology* [online]. **32**(10), 2281–2290 [vid. 2024-06-05]. ISSN 18790445. Dostupné z: doi:10.1016/j.cub.2022.03.041

NOMIKOS, Michail, Maria THEODORIDOU, Khalil ELGMATI, Dimitris PARTHIMOS, Brian L. CALVER, Luke BUNTWAL, George NOUNESIS, Karl SWANN a F. Anthony LAI, 2014. Human PLC $\zeta$  exhibits superior fertilization potency over mouse PLC $\zeta$  in triggering the Ca<sup>2+</sup> oscillations required for mammalian oocyte activation. *Molecular Human Reproduction* [online]. **20**(6), 489–498 [vid. 2023-01-25]. Dostupné z: doi:10.1093/molehr/gau011

NORRIS, Rachael P., Marina FREUDZON, Lisa M. MEHLMANN, Ann E. COWAN, Alexander M. SIMON, David L. PAUL, Paul D. LAMPE a Laurinda A. JAFFE, 2008. Luteinizing hormone causes MAP kinase-dependent phosphorylation and closure of connexin 43 gap junctions in mouse ovarian follicles: One of two paths to meiotic resumption. *Development* [online]. **135**(19), 3229–3238 [vid. 2022-12-19]. ISSN 09501991. Dostupné z: doi:10.1242/dev.025494

NORRIS, Rachael P., William J. RATZAN, Marina FREUDZON, Lisa M. MEHLMANN, Judith KRALL, Matthew A. MOVSESIAN, Huanchen WANG, Hengming KE, Viacheslav O. NIKOLAEV a Laurinda A. JAFFE, 2009. Cyclic GMP from the surrounding somatic cells regulates cyclic AMP

and meiosis in the mouse oocyte. *Development* [online]. **136**(11), 1869–1878 [vid. 2022-12-19]. ISSN 09501991. Dostupné z: doi:10.1242/DEV.035238

NOZAWA, Kaori, Yuhkoh SATOUH, Takao FUJIMOTO, Asami OJI a Masahito IKAWA, 2018. Sperm-borne phospholipase C zeta-1 ensures monospermic fertilization in mice. *Scientific Reports* [online]. **8**(1), 1–10 [vid. 2023-01-05]. ISSN 20452322. Dostupné z: doi:10.1038/s41598-018-19497-6

ODOR, D. Louise a Richard J. BLANDAU, 1969. Ultrastructural Studies on Fetal and Early Postnatal Mouse Ovaries. *Am. J. Anat.* [online]. **124**(2), 163–186 [vid. 2023-02-22]. Dostupné z: <https://doi.org/10.1002/aja.1001240204>

OGUSHI, Sugako, Ahmed RATTANI, Jonathan GODWIN, Jean METSON, Lothar SCHERMELLEH a Kim NASMYTH, 2021. Loss of sister kinetochore co-orientation and peri-centromeric cohesin protection after meiosis I depends on cleavage of centromeric REC8. *Developmental Cell* [online]. **56**(22), 3100-3114.e4 [vid. 2022-11-18]. ISSN 18781551. Dostupné z: doi:10.1016/j.devcel.2021.10.017

OH, Jeong Su, Seung Jin HAN a Marco CONTI, 2010. Wee1B, Myt1, and Cdc25 function in distinct compartments of the mouse oocyte to control meiotic resumption. *Journal of Cell Biology* [online]. **188**(2), 199–207 [vid. 2022-10-26]. ISSN 00219525. Dostupné z: doi:10.1083/jcb.200907161

OH, Jeong Su, Andrej SUSOR a Marco CONTI, 2011. Protein Tyrosine Kinase Wee1B Is Essential for Metaphase II Exit in Mouse Oocytes. *Science* [online]. **332**, 462–464 [vid. 2022-10-26]. Dostupné z: <https://doi.org/10.1126/science.1199211>

OH, Jeong Su, Andrej SUSOR, Karen SCHINDLER, Richard M. SCHULTZ a Marco CONTI, 2013. Cdc25A activity is required for the metaphase II arrest in mouse oocytes. *Journal of Cell Science* [online]. **126**, 1081–1085 [vid. 2023-01-21]. Dostupné z: doi:10.1242/jcs.115592

OKABE, Motonari, Hiromitsu SHIRASAWA, Yuki ONO, Mayumi GOTO, Takuya IWASAWA, Taichi SAKAGUCHI, Akiko FUJISHIMA, Yohei ONODERA, Kenichi MAKINO, Hiroshi MIURA, Yukiyo KUMAZAWA, Kazumasa TAKAHASHI a Yukihiro TERADA, 2023. An approach for live imaging of first cleavage in mouse embryos using fluorescent chemical probes for DNA, microtubules, and microfilaments. *Reproductive Medicine and Biology* [online]. **22**(1), 1–9 [vid. 2024-07-11]. ISSN 14470578. Dostupné z: doi:10.1002/RMB2.12551

ONO, Yuki, Hiromitsu SHIRASAWA, Kazumasa TAKAHASHI, Mayumi GOTO, Takahiro ONO, Taichi SAKAGUCHI, Motonari OKABE, Takeo HIRAKAWA, Takuya IWASAWA, Akiko FUJISHIMA, Tae SUGAWARA, Kenichi MAKINO, Hiroshi MIURA, Noritaka FUKUNAGA, Yoshimasa ASADA, Yukiyo KUMAZAWA a Yukihiro TERADA, 2024. Shape of the first mitotic spindles impacts multinucleation in human embryos. *Nature Communications* [online]. **15**, 1–13 [vid. 2024-07-29]. ISSN 2041-1723. Dostupné z: doi:10.1038/s41467-024-49815-8

PARK, Yuram, Jae Sung KIM a Jeong Su OH, 2019. Zw10 is a spindle assembly checkpoint protein that regulates meiotic maturation in mouse oocytes. *Histochemistry and Cell Biology* [online]. **152**(3), 207–215 [vid. 2022-11-17]. ISSN 1432119X. Dostupné z: <https://doi.org/10.1007/s00418-019-01800-9>

PEPLING, Melissa E. a Allan C. SPRADLING, 1998. Female mouse germ cells form synchronously dividing cysts. *Development* [online]. **125**, 3323–3328 [vid. 2023-01-22]. Dostupné z: <https://doi.org/10.1242/dev.125.17.3323>

PEPLING, Melissa E. a Allan C. SPRADLING, 2001. Mouse ovarian germ cell cysts undergo programmed breakdown to form primordial follicles. *Developmental Biology* [online]. **234**(2), 339–351 [vid. 2023-01-22]. ISSN 00121606. Dostupné z: [doi:10.1006/dbio.2001.0269](https://doi.org/10.1006/dbio.2001.0269)

PIRINO, Giorgia, Melanie P. WESCO a Peter J. DONOVAN, 2009. Protein kinase A regulates resumption of meiosis by phosphorylation of Cdc25B in mammalian oocytes. *Cell Cycle* [online]. **8**(4), 665–670 [vid. 2022-12-19]. ISSN 15514005. Dostupné z: [doi:10.4161/cc.8.4.7846](https://doi.org/10.4161/cc.8.4.7846)

POROKH, Volodymyr, Drahomíra KYJOVSKÁ, Martina MARTONOVÁ, Tereza KLENKOVÁ, Pavel OTEVŘEL, Soňa KLOUDOVÁ a Zuzana HOLUBCOVÁ, 2024. Zygotic spindle orientation defines cleavage pattern and nuclear status of human embryos. *Nature Communications* [online]. **15**, 1–9 [vid. 2024-08-06]. Dostupné z: <https://doi.org/10.1038/s41467-024-50732-z>

QIAO, Jing Yi, Qian ZHOU, Ke XU, Wei YUE, Wen Long LEI, Yuan Yuan LI, Lin Jian GU, Ying Chun OUYANG, Yi HOU, Heide SCHATTEN, Tie Gang MENG, Zhen Bo WANG a Qing Yuan SUN, 2023. Mad2 is dispensable for accurate chromosome segregation but becomes essential when oocytes are subjected to environmental stress. *Development* [online]. **150**(14) [vid. 2024-05-31]. ISSN 14779129. Dostupné z: <https://doi.org/10.1242/dev.201398>

RATTANI, Ahmed, Magda WOLNA, Mickael PLOQUIN, Wolfgang HELMHART, Seamus MORRONE, Bernd MAYER, Jonathan GODWIN, Wenqing XU, Olaf STEMMANN, Alberto PENDAS a Kim NASMYTH, 2013. Sgol2 provides a regulatory platform that coordinates essential cell cycle processes during meiosis I in oocytes. *eLife* [online]. 1–24 [vid. 2022-12-17]. ISSN 2050084X. Dostupné z: [doi:10.7554/ELIFE.01133.001](https://doi.org/10.7554/ELIFE.01133.001)

REICHMANN, Judith, Bianca NIJMEIJER, M. Julius HOSSAIN, Manuel EGUREN, Isabell SCHNEIDER, Antonio Z. POLITI, M. Julia ROBERTI, Lars HUFNAGEL, Takashi HIIRAGI a Jan ELLENBERG, 2018. Dual-spindle formation in zygotes keeps parental genomes apart in early mammalian embryos. *Science* [online]. **361**(6398), 189–193 [vid. 2022-07-16]. ISSN 10959203. Dostupné z: <https://doi.org/10.1126/science.aar7462>

REIS, Alexandra, Heng-Yu CHANG, Mark LEVASSEUR a Keith T. JONES, 2006. APC cdh1 activity in mouse oocytes prevents entry into the first meiotic division. *Nature Cell Biology* [online]. **8**, 539–540 [vid. 2023-01-26]. Dostupné z: [doi:10.1038/ncb1406](https://doi.org/10.1038/ncb1406)

RÉMILLARD-LABROSSE, Gaudeline, Sydney COHEN, Éliane BOUCHER, Kéryanne GAGNON, Filip VASILEV, Aleksandar I. MIHAJLOVIĆ a Greg FITZHARRIS, 2024. Oocyte and embryo culture under oil profoundly alters effective concentrations of small molecule inhibitors. *Frontiers in Cell and Developmental Biology* [online]. **12**, 1–9 [vid. 2024-07-11]. ISSN 2296634X. Dostupné z: doi:10.3389/FCELL.2024.1337937/BIBTEX

SACRISTAN, Carlos, Kumiko SAMEJIMA, Lorena Andrade RUIZ, Moonmoon DEB, Maaïke L.A. LAMBERS, Adam BUCKLE, Chris A. BRACKLEY, Daniel ROBERTSON, Tetsuya HORI, Shaun WEBB, Robert KIEWISZ, Tristan BEPLER, Eloïse VAN KWAWEGEN, Patrik RISTESKI, Kruno VUKUŠIĆ, Iva M. TOLIĆ, Thomas MÜLLER-REICHERT, Tatsuo FUKAGAWA, Nick GILBERT, Davide MARENDUZZO, William C. EARNSHAW a Geert J. P.L. KOPS, 2024. Vertebrate centromeres in mitosis are functionally bipartite structures stabilized by cohesin. *Cell* [online]. **187**(12), 3023 [vid. 2024-07-29]. ISSN 10974172. Dostupné z: doi:10.1016/j.cell.2024.04.014

SALDÍVAR-HERNÁNDEZ, Analilia, María E. GONZÁLEZ-GONZÁLEZ, Ana SÁNCHEZ-TUSIÉ, Israel MALDONADO-ROSAS, Pablo LÓPEZ, Claudia L. TREVIÑO, Fernando LARREA a Mayel CHIRINOS, 2015. Human sperm degradation of zona pellucida proteins contributes to fertilization. *Reproductive Biology and Endocrinology* [online]. **13**(1), 1–10 [vid. 2023-01-25]. ISSN 14777827. Dostupné z: doi:10.1186/s12958-015-0094-0

SANTELLA, Luigia, Mina ALIKANI, Beth E. TALANSKY, Jacques COHEN a Brian DALE, 1992. Is the human oocyte plasma membrane polarized? *Human Reproduction* [online]. **7**(7), 999–1003 [vid. 2023-01-23]. Dostupné z: <https://doi.org/10.1093/oxfordjournals.humrep.a137788>

SATHANANTHAN, A. H., I. KOLA, J. OSBORNE, A. TROUNSON, S. C. NG, A. BONGSO a S. S. RATNAM, 1991. Centrioles in the beginning of human development. *Proceedings of the National Academy of Sciences* [online]. **88**(11), 4806–4810 [vid. 2023-01-24]. ISSN 00278424. Dostupné z: doi:10.1073/PNAS.88.11.4806

SAUNDERS, Christopher M., Mark G. LARMAN, John PARRINGTON, Llewellyn J. COX, Jilliam ROYSE, Linda M. BLAYNEY, Karl SWANN a Anthony F. LAI, 2002. PLC $\zeta$ : a sperm-specific trigger of Ca<sup>2+</sup> oscillations in eggs and embryo development. *Development* [online]. **129**, 3533–3544 [vid. 2023-01-02]. Dostupné z: <https://doi.org/10.1242/dev.129.15.3533>

SEBESTOVA, Jaroslava, Anna DANYLEVSKA, Lucia NOVAKOVA, Michal KUBELKA a Martin ANGER, 2012. Lack of response to unaligned chromosomes in mammalian female gametes. *Cell cycle* [online]. **11**(16), 3011–3018 [vid. 2022-11-17]. ISSN 15514005. Dostupné z: doi:10.4161/CC.21398

SCHEFFLER, Kathleen, Julia URAJI, Ida JENTOFT, Tommaso CAVAZZA, Eike MÖNNICH, Binyam MOGESSIE a Melina SCHUH, 2021. Two mechanisms drive pronuclear migration in mouse zygotes. *Nature Communications* [online]. **12**(841), 1–18 [vid. 2023-02-01]. Dostupné z: doi:10.1038/s41467-021-21020-x

SCHNEIDER, Isabell, Marta DE RUIJTER-VILLANI, M. JULIUS HOSSAIN, Tom A. E. STOUT a Jan ELLENBERG, 2021. Dual spindles assemble in bovine zygotes despite the presence of paternal

centrosomes. *Journal of Cell Biology* [online]. **220**(11), 1–16 [vid. 2023-02-05]. ISSN 15408140. Dostupné z: doi:10.1083/jcb.202010106

SCHUH, Melina a Jan ELLENBERG, 2007. Self-Organization of MTOCs Replaces Centrosome Function during Acentrosomal Spindle Assembly in Live Mouse Oocytes. *Cell* [online]. **130**(3), 484–498 [vid. 2022-10-10]. ISSN 00928674. Dostupné z: doi:10.1016/j.cell.2007.06.025

SIKORA-POLACZEK, Marta, Anna HUPALOWSKA, Zbigniew POLANSKI, Jacek Z. KUBIAK a Maria A. CIEMERYCH, 2006. The First Mitosis of the Mouse Embryo Is Prolonged by Transitional Metaphase Arrest. *Biology of Reproduction* [online]. **74**(4), 734–743 [vid. 2024-07-29]. ISSN 0006-3363. Dostupné z: doi:10.1095/BIOLREPROD.105.047092

SIMERLY, C., C. CASTRO, C. HARTNETT, C. C. LIN, M. SUKHWANI, K. ORWIG a G. SCHATTEN, 2016. Post-Testicular Sperm Maturation: Centriole Pairs, Found in Upper Epididymis, are Destroyed Prior to Sperm's Release at Ejaculation. *Scientific Reports* [online]. **6**(1), 1–12 [vid. 2023-01-24]. ISSN 2045-2322. Dostupné z: doi:10.1038/srep31816

SIMERLY, Calvin, Marion MANIL-SÉGALEN, Carlos CASTRO, Carrie HARTNETT, Dong KONG, Marie-Hélène VERLHAC, Jadranka LONCAREK a Gerald SCHATTEN, 2018. Separation and Loss of Centrioles From Primordial Germ Cells To Mature Oocytes In The Mouse OPEN. *Scientific Reports* [online]. **8**, 1–17 [vid. 2023-02-02]. Dostupné z: doi:10.1038/s41598-018-31222-x

SO, Chun, K. Bianka SERES, Anna M. STEYER, Eike MÖNNICH, Dean CLIFT, Anastasija PEJKOVSKA, Wiebke MÖBIUS a Melina SCHUH, 2019. A liquid-like spindle domain promotes acentrosomal spindle assembly in mammalian oocytes. *Science* [online]. **364**, 1–12 [vid. 2022-12-18]. ISSN 10959203. Dostupné z: <https://doi.org/10.1126/science.aat9557>

SOLC, Petr, Tomoya S. KITAJIMA, Shuhei YOSHIDA, Adela BRZAKOVA, Masako KAIDO, Vladimir BARAN, Alexandra MAYER, Pavlina SAMALOVA, Jan MOTLIK a Jan ELLENBERG, 2015. Multiple Requirements of PLK1 during Mouse Oocyte Maturation. *PLOS ONE* [online]. **10**(2), e0116783 [vid. 2022-11-17]. ISSN 1932-6203. Dostupné z: doi:10.1371/JOURNAL.PONE.0116783

SOLC, Petr, Adela SASKOVA, Vladimir BARAN, Michal KUBELKA, Richard M. SCHULTZ a Jan MOTLIK, 2008. CDC25A phosphatase controls meiosis I progression in mouse oocytes. *Developmental Biology* [online]. **317**(1), 260–269 [vid. 2022-11-17]. ISSN 00121606. Dostupné z: doi:10.1016/j.ydbio.2008.02.028

SUZUKI, Osamu, Toshihiko ASANO, Yoshie YAMAMOTO, Kaoru TAKANO a Minako KOURA, 1996. Development in vitro of preimplantation embryos from 55 mouse strains. *Reproduction, Fertility and Development* [online]. **8**(6), 975–980 [vid. 2024-07-29]. ISSN 1448-5990. Dostupné z: doi:10.1071/RD9960975



TALANSKY, Beth E., Henry E. MALTER a Jacques COHEN, 1991. A Preferential Site for Sperm-Egg Fusion in Mammals. *Molecular Reproduction and Development* [online]. **28**, 183–188 [vid. 2023-01-23]. Dostupné z: <https://doi.org/10.1002/mrd.1080280212>

TANG, An, Peiliang SHI, Anying SONG, Dayuan ZOU, Yue ZHOU, Pengyu GU, Zan HUANG, Qinghua WANG, Zhaoyu LIN a Xiang GAO, 2016. PP2A regulates kinetochore-microtubule attachment during meiosis I in oocyte. *Cell Cycle* [online]. **15**(11), 1450–1461 [vid. 2022-10-12]. ISSN 15514005. Dostupné z: <https://doi.org/10.1080/15384101.2016.1175256>

TOSH, Justin, Victor TYBULEWICZ a Elizabeth M.C. FISHER, 2022. Mouse models of aneuploidy to understand chromosome disorders [online]. *Mammalian Genome* [online]. **33**, 157–168 [vid. 2023-02-13]. ISSN 14321777. Dostupné z: [doi:10.1007/s00335-021-09930-z](https://doi.org/10.1007/s00335-021-09930-z)

TOUATI, Sandra A., Eulalie BUFFIN, Damien CLADIÈRE, Khaled HACHED, Christophe RACHEZ, Jan M. VAN DEURSEN a Katja WASSMANN, 2015. Mouse oocytes depend on BubR1 for proper chromosome segregation but not for prophase I arrest. *Nature Communications* [online]. **6**(1), 1–13 [vid. 2022-12-18]. ISSN 2041-1723. Dostupné z: [doi:10.1038/ncomms7946](https://doi.org/10.1038/ncomms7946)

\*UGHACHUKWU, PO a PC UNEKWE, 2012. Efflux Pump-Mediated Resistance in Chemotherapy. *Annals of Medical and Health Sciences Research* [online]. **2**(2), 191–198 [vid. 2024-08-02]. ISSN 2141-9248. Dostupné z: [doi:10.4103/2141-9248.105671](https://doi.org/10.4103/2141-9248.105671)

VALLOT, Antoine, Joanna LEONTIOU, Damien CLADIÈRE, Warif EL YAKOUBI, Susanne BOLTE, Eulalie BUFFIN a Katja WASSMANN, 2018. Tension-Induced Error Correction and Not Kinetochore Attachment Status Activates the SAC in an Aurora-B/C-Dependent Manner in Oocytes. *Current Biology* [online]. **28**(1), 130-139.e3 [vid. 2022-11-15]. ISSN 09609822. Dostupné z: [doi:10.1016/j.cub.2017.11.049](https://doi.org/10.1016/j.cub.2017.11.049)

VAN BLERKOM, Jonathan a Kyle CALTRIDER, 2013. Sperm attachment and penetration competence in the human oocyte: A possible aetiology of fertilization failure involving the organization of oolemmal lipid raft microdomains influenced by the  $\Delta\Psi_m$  of subplasmalemmal mitochondria. *Reproductive BioMedicine Online* [online]. **27**(6), 690–701 [vid. 2023-01-23]. ISSN 14726483. Dostupné z: [doi:10.1016/J.RBMO.2013.09.011](https://doi.org/10.1016/J.RBMO.2013.09.011)

VERLHAC, Marie-Hélène, Jacek Z. KUBIAK, Hugh J. CLARKE a Bernard MARO, 1994. Microtubule and chromatin behavior follow MAP kinase activity but not MPF activity during meiosis in mouse oocytes. *Development* [online]. **120**, 1017–1025 [vid. 2023-01-22]. Dostupné z: <https://doi.org/10.1242/dev.120.4.1017>

VONDRAKOVA, Jana, Michaela FROLIKOVA, Lukas DED, Jiri CERNY, Pavla POSTLEROVA, Veronika PALENIKOVA, Ondrej SIMONIK, Zuzana NAHACKA, Krystof BASUS, Eliska VALASKOVA, Radek MACHAN, Allan PACEY, Zuzana HOLUBCOVA, Pavel KOUBEK, Zuzana EZROVA, Soojin PARK, Ruiwu LIU, Raghavendran PARTHA, Nathan CLARK, Jiri NEUZIL, Masahito IKAWA, Kent ERICKSON, Kit S. LAM, Harry MOORE a Katerina KOMRSKOVA, 2022. MAIA, Fc receptor-like 3, supersedes JUNO as IZUMO1 receptor during human fertilization. *Science*

*Advances* [online]. **8**(36), 1–16 [vid. 2023-02-25]. ISSN 23752548. Dostupné z: doi:10.1126/SCIADV.ABN0047

WANG, Xiaotian, Claudia BAUMANN, Rabindranath DE LA FUENTE a Maria M. VIVEIROS, 2021. Loss of acentriolar MTOCs disrupts spindle pole Aurora A and assembly of the liquid-like meiotic spindle domain in oocytes. *Journal of Cell Science* [online]. **134**(14), 1–12 [vid. 2022-10-23]. ISSN 14779137. Dostupné z: <https://doi.org/10.1242/jcs.256297>

WEI, Liang, Xing Wei LIANG, Qing Hua ZHANG, Mo LI, Ju YUAN, Sen LI, Shao Chen SUN, Ying Chun OUYANG, Heide SCHATTEN a Qing Yuan SUN, 2010. BubR1 is a spindle assembly checkpoint protein regulating meiotic cell cycle progression of mouse oocyte. *Cell cycle* [online]. **9**(6), 1112–1121 [vid. 2022-11-12]. ISSN 15514005. Dostupné z: doi:10.4161/CC.9.6.10957

WEI, Yanchang, Saima MULTI, Cai Rong YANG, Junyu MA, Qing Hua ZHANG, Zhen Bo WANG, Mo LI, Liang WEI, Zhao Jia GE, Chun Hui ZHANG, Ying Chun OUYANG, Yi HOU, Heide SCHATTEN a Qing Yuan SUN, 2011. Spindle Assembly Checkpoint Regulates Mitotic Cell Cycle Progression during Preimplantation Embryo Development. *PLOS ONE* [online]. **6**(6), 1–11 [vid. 2024-07-29]. ISSN 1932-6203. Dostupné z: doi:10.1371/JOURNAL.PONE.0021557

WU, Qiju, Yanxiang GUO, Ayumi YAMADA, Jennifer A. PERRY, Michael Z. WANG, Marito ARAKI, Christopher D. FREEL, Jeffrey J. TUNG, Wanli TANG, Seth S. MARGOLIS, Peter K. JACKSON, Hiroyuki YAMANO, Maki ASANO a Sally KORNBLUTH, 2007. A Role for Cdc2- and PP2A-Mediated Regulation of Emi2 in the Maintenance of CSF Arrest. *Current Biology* [online]. **17**(3), 213–224 [vid. 2023-01-06]. ISSN 09609822. Dostupné z: doi:10.1016/J.CUB.2006.12.045

WU, Tianyu, Jie DONG, Jing FU, Yanping KUANG, Biaobang CHEN, Hao GU, Yuxi LUO, Ruihuan GU, Meiling ZHANG, Wen LI, Xi DONG, Xiaoxi SUN, Qing SANG a Lei WANG, 2022. The mechanism of acentrosomal spindle assembly in human oocytes. *Science* [online]. **378**, 1–12 [vid. 2023-01-31]. ISSN 0036-8075. Dostupné z: doi:10.1126/SCIENCE.ABQ7361

XIAO, Cally, Marta GRZONKA, Charlotte MEYER-GERARDS, Miriam MACK, Rebecca FIGGE a Hisham BAZZI, 2021. Gradual centriole maturation associates with the mitotic surveillance pathway in mouse development. *EMBO reports* [online]. **22**(2), 1–12 [vid. 2023-01-24]. ISSN 1469-221X. Dostupné z: doi:10.15252/EMBR.202051127

XU, Xiaoming, Linheng LI, Cuilian ZHANG a Li MENG, 2019. Observation of two separate bipolar spindles in the human zygote. *Journal of Assisted Reproduction and Genetics* [online]. **36**(4), 601–602 [vid. 2023-01-31]. ISSN 15737330. Dostupné z: doi:10.1007/S10815-019-01440-X

XU, Zheng, Bulent CETIN, Martin ANGER, Uhn Soo CHO, Wolfgang HELMHART, Kim NASMYTH a Wenqing XU, 2009. Structure and function of the PP2A-shugoshin interaction. *Molecular Cell* [online]. **35**(4), 426–441 [vid. 2023-01-30]. ISSN 10972765. Dostupné z: doi:10.1016/J.MOLCEL.2009.06.031

YOSHIDA, Shuhei, Masako KAIDO a Tomoya S. KITAJIMA, 2015. Inherent Instability of Correct Kinetochore-Microtubule Attachments during Meiosis I in Oocytes. *Developmental Cell* [online]. **33**(5), 589–602 [vid. 2022-12-18]. ISSN 18781551. Dostupné z: doi:10.1016/j.devcel.2015.04.020

YOSHIDA, Shuhei, Sui NISHIYAMA, Lisa LISTER, Shu HASHIMOTO, Tappei MISHINA, Aurélien COURTOIS, Hirohisa KYOGOKU, Takaya ABE, Aki SHIRAISHI, Meenakshi CHOUDHARY, Yoshiharu NAKAOKA, Mary HERBERT a Tomoya S. KITAJIMA, 2020. Prc1-rich kinetochores are required for error-free acentrosomal spindle bipolarization during meiosis I in mouse oocytes. *Nature Communications* [online]. **11**(1), 1–15 [vid. 2022-10-28]. ISSN 2041-1723. Dostupné z: doi:10.1038/s41467-020-16488-y

ZENG, Juan, Shiwei WANG, Min GAO, Dian LU, Shuang SONG, Diyu CHEN, Weimin FAN, Zhiliang XU, Zhiguo ZHANG a Xiaofang SUN, 2023. PAK2 is essential for chromosome alignment in metaphase I oocytes. *Cell Death & Disease* [online]. **14**(2), 1–10 [vid. 2024-05-31]. ISSN 2041-4889. Dostupné z: doi:10.1038/s41419-023-05585-7

ZHANG, Qing Hua, Wai Shan YUEN, Deepak ADHIKARI, Jennifer A. FLEGG, Greg FITZHARRIS, Marco CONTI, Piotr SICINSKI, Ibtissem NABTI, Petros MARANGOS a John CARROLL, 2017. Cyclin A2 modulates kinetochore-microtubule attachment in meiosis II. *Journal of Cell Biology* [online]. **216**(10), 3133–3143 [vid. 2022-10-26]. ISSN 15408140. Dostupné z: <https://doi.org/10.1083/jcb.201607111>

ZHANG, Yin Li, Xiao Man LIU, Shu Yan JI, Qian Qian SHA, Jue ZHANG a Heng Yu FAN, 2015. ERK1/2 Activities Are Dispensable for Oocyte Growth but Are Required for Meiotic Maturation and Pronuclear Formation in Mouse. *Journal of Genetics and Genomics* [online]. **42**(9), 477–485 [vid. 2022-10-25]. ISSN 1673-8527. Dostupné z: doi:10.1016/J.JGG.2015.07.004

ZHOU, Changyin, Yilong MIAO, Zhaokang CUI, Xiayan SHIYANG, Yu ZHANG a Bo XIONG, 2020. The cohesin release factor Wapl interacts with Bub3 to govern SAC activity in female meiosis I. *Science Advances* [online]. **6**(15), 3969–3977 [vid. 2022-11-12]. ISSN 23752548. Dostupné z: <https://doi.org/10.1126/sciadv.aax3969>

ZHOU, Chenxi, Janelle L HANCOCK, Kum Kum KHANNA a Hayden A. HOMER, 2019. First meiotic anaphase requires Cep55-dependent inhibitory cyclin-dependent kinase 1 phosphorylation. *Journal of Cell Science* [online]. **132**(18), 1–11 [vid. 2023-02-08]. Dostupné z: doi:10.1242/jcs.233379

ZHOU, Chenxi a Hayden A. HOMER, 2022. The oocyte spindle midzone pauses Cdk1 inactivation during fertilization to enable male pronuclear formation and embryo development. *Cell Reports* [online]. **39**(5) 1–13 [vid. 2023-02-01]. ISSN 22111247. Dostupné z: doi:10.1016/J.CELREP.2022.110789

ZHU, Zi Yu, Da Yuan CHEN, Jin Song LI, Li LIAN, Lei LEI, Zhi Ming HAN a Qing Yuan SUN, 2003. Rotation of Meiotic Spindle Is Controlled by Microfilaments in Mouse Oocytes. *Biology of Reproduction* [online]. **68**(3), 943–946 [vid. 2023-02-22]. ISSN 0006-3363. Dostupné z: doi:10.1095/BIOLREPROD.102.009910