

ROLA CZYNNIKA CYTOSTATYCZNEGO W REGULACJI MEJOZY OOCYTÓW SSAKÓW

THE ROLE OF CYTOSTATIC ACTIVITY IN MEIOTIC MATURATION OF MAMMALIAN OOCYTES

Karolina ARCHACKA¹, Maria A. CIEMERYCH²

¹Zakład Cytologii i ²Zakład Embriologii,
Instytut Zoologii, Wydział Biologii, Uniwersytet Warszawski

Streszczenie: Dojrzewanie oocytów kręgowców zostaje zablokowane w stadium metafazy drugiego podziału mejotycznego. Oocyty, które osiągnęły to stadium, są owulowane, a następnie mogą być aktywowane przez wnikający plemnik lub przez działanie bodźca partenogenetycznego. Za utrzymanie bloku w stadium metafazy drugiego podziału mejotycznego odpowiedzialna jest aktywność cytostaticzna (CSF), która nie dopuszcza do inaktywacji głównego regulatora fazy M, jakim jest kinaza CDK1 – cykliny B. Zanik aktywności CSF wydaje się niezbędny do ukończenia przez oocyt drugiego podziału mejotycznego i rozpoczęcia rozwoju zarodkowego. Doświadczenia przeprowadzone na oocytach płazów doprowadziły do odkrycia czynników zaangażowanych w powstawanie aktywności cytostaticznej. Dotychczas najlepiej scharakteryzowana została rola białek szlaku kinazy MAP (ERK1/ERK2), choć ciągle nieznany jest dokładny mechanizm działania tych kinaz jako składnika CSF. Prowadzone są również badania nad rolą innych czynników, takich jak: białka zaangażowane w regulację punktu kontrolnego wrzeciona podziałowego oraz białka z rodziny Emi. Niniejszy artykuł ma na celu przedstawienie aktualnej wiedzy na temat natury tej aktywności, jej roli w regulacji mejozy oocytów ssaków, na przykładzie myszy jako organizmu modelowego, jak również perspektyw dalszych badań.

Słowa kluczowe: ssaki, mysz, oocyt, mejoza, czynnik cytostaticzny.

Summary: Maturing vertebrate oocytes become arrested in metaphase of the second meiotic division. These oocytes are ovulated, and then can be activated by sperm or parthenogenetic stimulus. Metaphase arrest is mediated by the cytostatic activity – CSF, that prevents the inactivation of the major M-phase regulator i.e. CDK1-cyclin B kinase. CSF inactivation seems to be necessary for the completion of the second meiotic division and the initiation of the embryonic development. Analysis of amphibian oocyte maturation led to the discovery of factors crucial for the CSF activation. Among them are proteins involved in MAP kinase (ERK1/ERK2) pathway. Moreover, several studies focus on the factors regulating the function of the spindle assembly checkpoint and also members of the Emi protein family. Current review focus on mouse as a model organism. We discuss current understanding of the nature of cytostatic activity, its role in the meiotic maturation of mammalian oocytes and also present perspectives of further investigations.

Key words: mouse, oocyte, meiotic division, CSF.

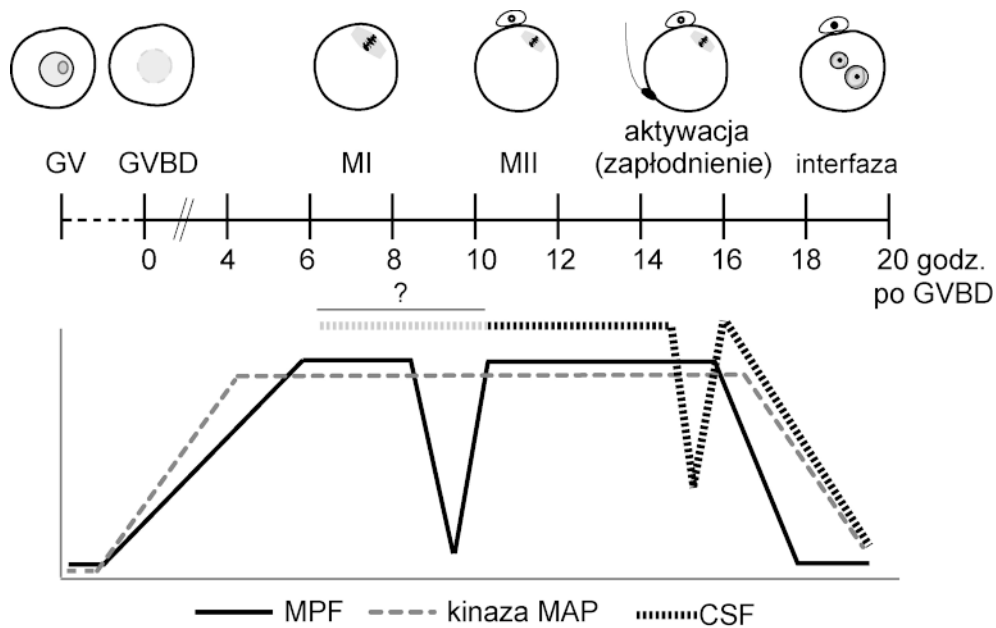
WPROWADZENIE

Oocyty znajdujące się w jajniku samicy myszy zablokowane są w stadium profazy pierwszego podziału meiotycznego. Oocyty te przechodzą fazę wzrostu, podczas której w ich cytoplazmie gromadzone są mRNA i białka niezbędne dla prawidłowego przebiegu dalszych etapów dojrzewania, a następnie początkowych etapów rozwoju zarodkowego. Wtedy też oocyty nabierają zdolności do wznowienia mejozy w odpowiedzi na indukcję hormonalną lub izolację z pęcherzyków jajnikowych i hodowlę *in vitro* [8]. Stadium profazy określane jest także jako stadium pęcherzyka zarodkowego, a nazwa ta pochodzi od angielskiego określenia jądra oocytu – *Germinal Vesicle* (GV). Wznowienie mejozy przebiega w oocytach pod kontrolą czynnika odkrytego w 1971 roku przez Masui'ego i Markerta oraz Smitha i Eckera podczas badań nad oocytami *Rana pipiens* i określonego mianem MPF (z ang. *Maturation Promoting Factor* lub *M-phase Promoting Factor*) [25]. Późniejsze badania wykazały, że jest to uniwersalny czynnik regulujący nie tylko podziały meiotyczne oocytów kręgowców, ale także podziały mitotyczne komórek zarodkowych i somatycznych tak różnych organizmów jak rośliny i zwierzęta, a także komórek grzybów [25]. Obecnie wiadomo, że MPF jest heterodimerem składającym się z podjednostki regulacyjnej – cykliny B oraz podjednostki katalitycznej CDK1 (z ang. *Cyclin Dependent Kinase 1*), która jest kinazą serynowo-treoninową o masie 34 kD [9]. Podstawową rolą MPF w komórce jest fosforylacja określonych białek, takich jak: lamininy jądrowe czy histon H1. Procesy te są niezbędne do rozpoczęcia fazy M cyklu komórkowego.

W oocytach, które wznowiły mejozę, dochodzi do aktywacji MPF, co prowadzi do fosforylacji lamin, ich depolimeryzacji i w efekcie do zaniku otoczki jądrowej. Zjawisko to określane jest jako rozpad pęcherzyka zarodkowego (z ang. *Germinal Vesicle BreakDown*, GVBD). Równocześnie rozpoczyna się kondensacja chromatyny oraz tworzenie wrzeciona metafazy pierwszego podziału meiotycznego (metafazy I, MI) [1]. W oocytach myszy aktywność MPF rośnie stopniowo od momentu wznowienia mejozy i osiąga maksimum po około 4 godz., kiedy znajdujące się w oocycie chromosomy ułożone są w płytce równikowej, a związane z nimi mikrotubule formują wrzeciono podziałowe [1]. Stadium to zwyczajowo określa się mianem metafazy I. Wydaje się jednak, że bardziej prawidłowe byłoby stwierdzenie, że oocyty znajdują się w stadium prometafazy. Badania ostatnich lat wykazały bowiem, że w takich oocytach proces formowania prawidłowych połączeń między kinetochorami chromosomów a mikrotubulami wrzeciona podziałowego nie został jeszcze ukończony, a zatem aktywny jest punkt kontrolny wrzeciona podziałowego [1]. Obecnie przyjmuje się, że dopiero wytworzenie stabilnych połączeń między kinetochorami a mikrotubulami wrzeciona, prowadzące do inaktywacji punktu kontrolnego, wyznacza moment rozpoczęcia metafazy [26]. W dojrzewających oocytach myszy następowałoby to dopiero w 8–9 godz. od momentu wznowienia mejozy. Wtedy aparat podziałowy staje się w pełni funkcjonalny i dochodzi do ukończenia pierwszego podziału meiotycznego. Podziałowi temu towarzyszy przejściowy spadek aktywności MPF spowodowany proteolityczną degradacją cykliny

B (ryc. 1) [1, 18]. Bezpośrednio po ukończeniu podziału tworzone jest wrzeciono oraz płytka metafazy drugiego podziału meiotycznego (metafazy II, MII). Równocześnie, dzięki ciągłej syntezie cykliny B i łączeniu się jej z CDK1, aktywność MPF ponownie wzrasta (ryc. 1) [1, 18]. Oocyty pozostają zablokowane w metafazie II aż do momentu aktywacji przez plemnik lub bodziec partenogenetyczny. Blok w stadium metafazy II może być utrzymywany przez wiele godzin dzięki czynnikowi cytostatycznemu (*CytoStatic Factor*, CSF), określanemu też mianem aktywności cytostatycznej, która utrudnia inaktywację MPF w oocytach, a co za tym idzie ukończenie drugiego podziału meiotycznego.

Czynnik cytostatyczny został po raz pierwszy opisany w 1971 przez Masui'ego i Markerta jako składnik cytoplazmy oocytów *Rana pipiens* zablokowanych w stadium metafazy II [25]. Wprowadzenie cytoplazmy pobranej z takich oocytów do jednego z blastomerów dwukomórkowego zarodka doprowadziło do zablokowania podziału mitotycznego tego blastomeru. Wynik tego doświadczenia sugerował, że czynnik, który spowodował zablokowanie mitozy w dzielącym się blastomerze, odpowiadał także za naturalny blok oocytów *Rana pipiens* w stadium metafazy II [25]. Aktywność CSF w owulowanych oocytach myszy została potwierdzona po raz pierwszy dopiero w 1993 roku przez Kubiaka i współpracowników, którzy wykazali, że cytoplazma owulowanych



RYCINA 1. Aktywność MPF, kinazy MAP oraz CSF podczas dojrzewania meiotycznego oocytów myszy. Podziały meiotyczne oocyty zostają wznowione w momencie GVBD oznaczonym na wykresie jako 0 godz. Aktywność MPF (mierzona jako aktywność kinazy histonu H1, czyli kinazy CDK1 – cykliny B) rośnie prawie równocześnie z aktywnością kinazy MAP. Aktywny CSF wykrywany jest w stadium metafazy II podziału meiotycznego. Jaśniejsza przerywana linia oraz znak zapytania nad wykresem aktywności CSF obrazują hipotezę, że do aktywacji CSF może dochodzić już w stadium metafazy I podziału meiotycznego

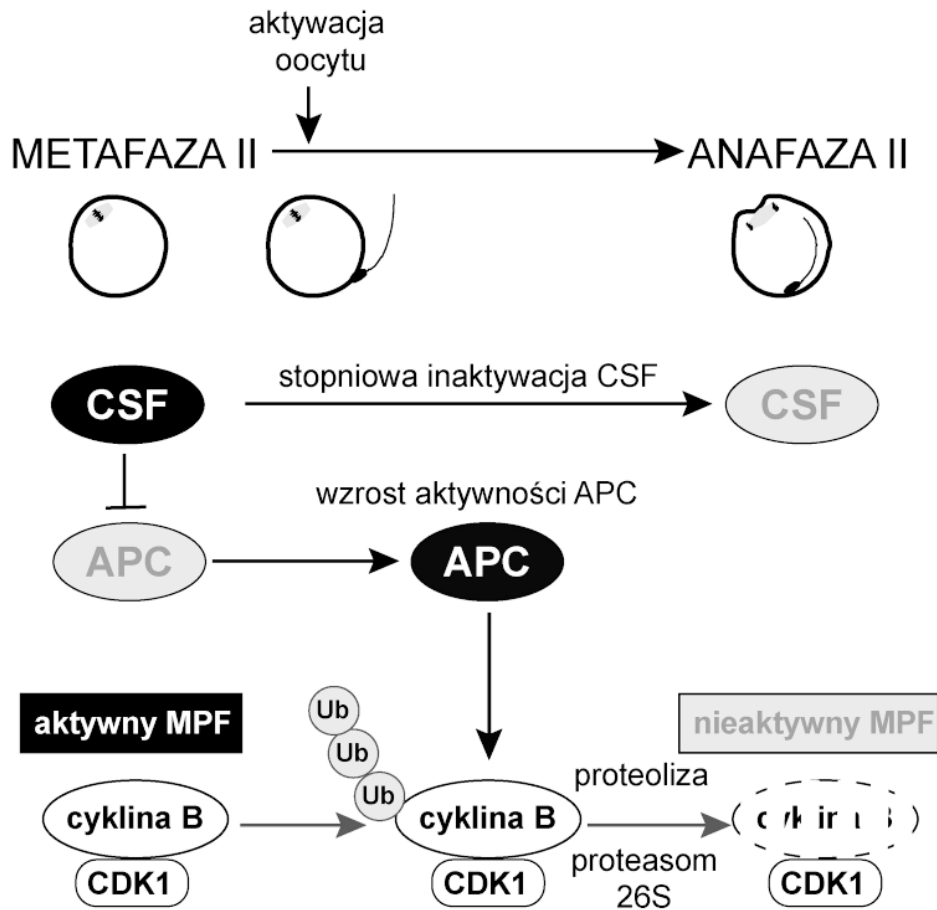
oocytów myszy zablokowanych w metafazie II jest w stanie zablokować mitozę w dzielącym się zarodku myszy [1].

Od wielu lat prowadzone są badania mające na celu określenie, jakie czynniki odpowiedzialne są za pojawienie się aktywności cytostatycznej w oocytach, które osiągnęły stadium metafazy II. Pionierskie doświadczenia dotyczyły oocytów płaza *Rana pipiens*. Obecnie głównym obiektem badań jest afrykańska żaba szponiasta *Xenopus laevis*. Wyniki wielu tych badań znalazły potwierdzenie w doświadczeniach prowadzonych z wykorzystaniem oocytów ssaków (głównie myszy). Dostępne są jednak dane sugerujące istnienie międzygatunkowych różnic w funkcjonowaniu CSF.

2. NATURA CZYNNIKA CYTOSTATYCZNEGO

Masui i Markert wykazali, że w cytoplazmie zablokowanych w metafazie II oocytów płazów wykrywana jest aktywność CSF [25]. W 1998 roku Ciemerych i Kubiak, analizując oocyty myszy szczepu LT/Sv, które wykazują szereg zaburzeń dojrzewania mejotycznego, postawili hipotezę, że do aktywacji CSF może dochodzić już w stadium metafazy I. Dotychczas jednak nie udowodniono, aby zjawisko takie rzeczywiście zachodziło także podczas dojrzewania oocytów innych szczepów myszy [20]. Zapłodnienie lub aktywacja partenogenetyczna dojrzewających bez zakłóceń oocytów większości szczepów myszy prowadzi do inaktywacji czynnika cytostatycznego, co w konsekwencji umożliwia oocytowi ukończenie II podziału mejotycznego, a następnie powstanie jednokomórkowego zarodka. Badania zmian aktywności CSF w oocytach myszy wykazały jednak, że inaktywacja MPF zachodzi przed definitywnym wyeliminowaniem aktywności CSF (ryc. 1) [20]. Wydaje się, że CSF jest jedynie czynnikiem sprzyjającym stabilizacji MPF w warunkach panujących w cytoplazmie oocytu w MII. Gdy warunki te zmieniają się np. pod wpływem zadziałania bodźca aktywującego, hamujący efekt CSF jest przełamany i dochodzi do przyspieszonej degradacji cykliny B i inaktywacji MPF. Późniejsza inaktywacja czynnika cytostatycznego jest konieczna między innymi po to, by zapobiec zablokowaniu zygoty podczas pierwszego podziału bruzdkowania [20].

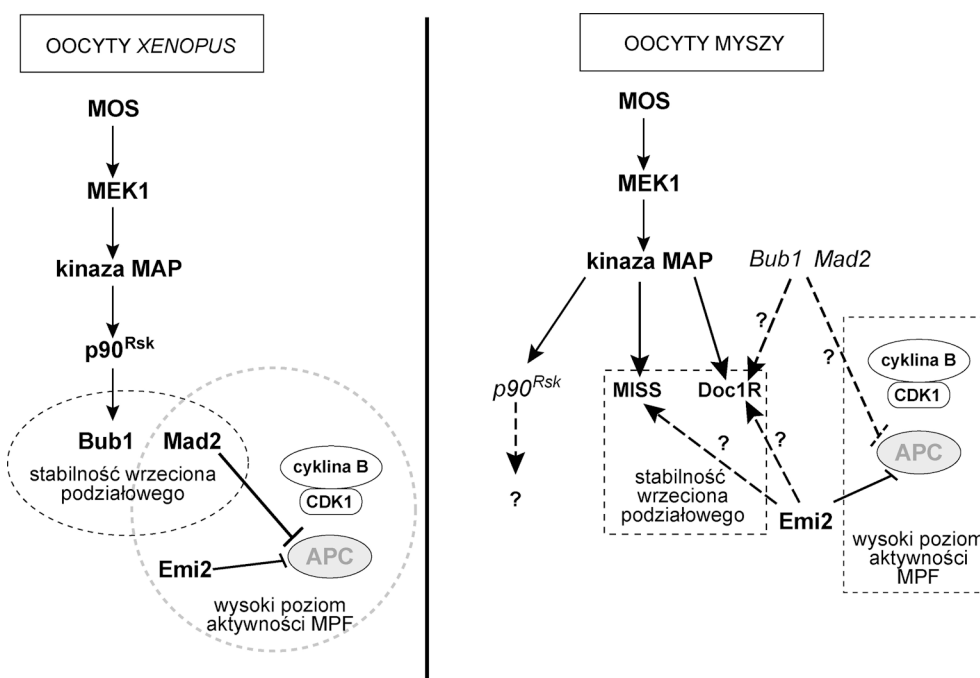
Rozpoczęcie drugiego podziału mejotycznego oocytu wiąże się ze wzrostem aktywności kompleksu inicjującego anafazę (z ang. *Anaphase Promoting Complex*, APC) (ryc. 2) [3, 49]. APC (ligaza ubikwityny E3) odpowiada za ubikwitylizację cykliny B i skierowanie tego białka do degradacji w proteasomie 26S (ryc. 2) [6]. Spadek poziomu cykliny B prowadzi do obniżenia aktywności MPF i rozpoczęcia anafazy (ryc. 2) [28]. W pobudzonych oocytach myszy aktywność APC rośnie, natomiast aktywność proteasomu 26S nie zmienia się. Sugeruje to, że podczas bloku w stadium metafazy II czynnik cytostatyczny hamuje degradację cykliny B właśnie poprzez inhibicję aktywacji APC (ryc. 2). Celem prowadzonych w chwili obecnej badań jest więc jednoznaczne określenie roli białek zaangażowanych w ten proces.



RYCINA 2. Regulacja aktywności CSF w zablokowanych w stadium metafazy II oraz w aktywowanych oocytach myszy. W oocytach zablokowanych w stadium metafazy II aktywność MPF stabilizowana jest dzięki czynnikowi CSF blokującemu kompleks inicjujący anafazę (APC). Aktywacja oocytu prowadzi do inaktywacji CSF, wzrostu aktywności APC i degradacji cykliny B, a tym samym inaktywacji MPF; Ub – ubikwityna

2.1. Białka szlaku kinazy MAP (ERK1/ERK2) oraz białka punktu kontrolnego wrzeczona podziałowego

Najlepiej scharakteryzowanymi „składnikami” CSF są białka ścieżki kinazy MAP (ERK1/ERK2). Czynniki te zaangażowane są w wytworzenie aktywności cytostaticznej zarówno w oocytach płazów, jak i ssaków (ryc. 3) [1, 47]. Aktywacja kinazy MAP zachodzi w wyniku szeregu procesów fosforylacji zapoczątkowanych przez produkt protoonkogenu c-mos, kinazę białkową MOS o masie 39 kDa. Kinaza MOS fosforyluje kinazę MEK1, która z kolei fosforyluje i aktywuje kinazę MAP (ryc. 3). W 1989 roku Sagata i współpracownicy wykazali, że aktywność kinazy MOS jest niezbędna



RYCINA 3. Oddziaływania między „składnikami” CSF w oocytach płazów i ssaków. Według najnowszych badań białka, których nazwy napisano kursywą, nie są istotne dla funkcjonowania czynnika cytostaticznego. Oddziaływania między białkami zaznaczone przerywaną linią oraz znakami zapytania wymagają jeszcze potwierdzenia w dalszych badaniach

do wytworzenia aktywności cytostaticznej w oocytach płazów [47]. Mikroiniekcja mRNA kodującego c-mos do jednego z blastomerów 2-komórkowego zarodka *Xenopus* prowadziła do zablokowania mitozy w nastrzykniętym blastomerze, podczas gdy drugi z blastomerów zarodka kontynuował podział. W 1994 roku na łamach czasopisma *Nature* zostały opublikowane wyniki badań Colledge’a i współpracowników oraz Hashimoto i współpracowników, którzy wykazali, że również u myszy białko MOS jest niezbędne do zablokowania oocytów w stadium metafazy II [1]. W przeciwieństwie do normalnie dojrzewających oocytów, oocyty myszy pozbawionych funkcjonalnego genu kodującego kinazę MOS po osiągnięciu stadium metafazy II natychmiast rozpoczynały anafazę i kończyły drugi podział mejotyczny. Ulegały one spontanicznej aktywacji lub wchodziły w kolejną fazę M (tzw. metafazę III) [1]. Ponieważ oocyty te nie były w stanie wytworzyć bloku w stadium metafazy II, stwierdzono, że aktywność kinazy MOS odgrywa kluczową rolę w wytwarzaniu aktywności cytostaticznej w oocytach myszy. Kolejne badania wykazały, że istotną rolę w powstawaniu CSF odgrywa efektor MOS – kinaza MAP (ERK1/ERK2). Aktywność kinazy MAP – podobnie jak kinazy MOS – rośnie podczas dojrzewania mejotycznego oocytu i osiąga maksimum już w oocytach, które osiągnęły stadium metafazy I (ryc. 1) [17]. O roli kinazy MAP w aktywacji CSF świadczy fakt, że oocyty myszy poddane działaniu inhibitorów tej kinazy, podobnie jak oocyty pozbawione kinazy MOS, po osiągnięciu stadium metafazy II

ulegają spontanicznej aktywacji [31]. Długotrwałe zablokowanie oocytów w stadium metafazy II wymaga istnienia sprawnych mechanizmów odpowiedzialnych za utrzymanie prawidłowej struktury wrzeciona podziałowego [1]. Kinaza MAP wydaje się odgrywać ważną rolę w tym procesie, ponieważ katalizuje ona fosforylację co najmniej dwóch białek zlokalizowanych na wrzecionie podziałowym oocytów w stadium metafazy II – białka MISS (z ang. *MAP kinase-Interacting and Spindle-Stabilizing*) i białka DOC1R (z ang. *Deleted Oral Cancer 1 Related*) (ryc. 3) [21, 43]. Wyciszenie ekspresji tych białek przy użyciu technik RNAi (z ang. *RNA interference*) powodowało poważne zaburzenia w budowie wrzeciona podziałowego MII. W oocytach, w których obniżono poziom ekspresji MISS lub DOC1R, często w ogóle nie dochodziło do uformowania wrzeciona podziałowego lub też powstające wrzeciono wytwarzało tylko jeden biegun [21, 43]. Oprócz kinazy MAP za aktywację MISS i DOC1R prawdopodobnie odpowiada także MPF, co sugeruje, iż utrzymywanie prawidłowej struktury wrzeciona podziałowego metafazy II zależy od współdziałania MPF, czyli kinazy CDK1/cyklina B oraz kinazy MAP (ERK1/ERK2) [1].

Wydaje się jednak, że to nie stabilizacja wrzeciona podziałowego, ale przeciwdziałanie degradacji cykliny B poprzez hamowanie aktywności APC jest nadrzędną funkcją CSF. Do chwili obecnej nie stwierdzono, w jaki sposób białka szlaku kinazy MAP wpływają na aktywność APC w oocytach myszy. Badania przeprowadzone w 1999 roku przez Bhatta i Ferrela oraz Grossa i współpracowników wykazały, że w oocytach płazów substratem aktywowanej kinazy MAP jest białko p90^{Rsk} (z ang. *90 kD Ribosomal protein S6 kinase*) [47]. W oocytach *Xenopus* zablokowanych w stadium metafazy II wykrywano dwa białka z nadrodziny p90^{Rsk} – Rsk1 i Rsk2. Jednakże, wyniki tych badań sugerują, że tylko aktywność p90^{Rsk2} jest niezbędna do wytworzenia bloku w stadium metafazy II (ryc. 3) [47]. W oocytach myszy występują trzy białka p90^{Rsk} – Rsk1, Rsk2 i Rsk3. W 2004 roku Paronetto i współpracownicy stwierdzili, że mikroiniekcja białka p90^{Rsk2} do dzielących się blastomerów zarodka myszy prowadzi do zablokowania mitozy. Uzyskane wyniki sugerowały, że podobnie jak w oocytach płazów, także w oocytach ssaków białko p90^{Rsk2} bierze udział w wytworzeniu aktywności cytostatycznej [30]. Jednak wyniki te zostały później zakwestionowane przez badania Dumonta i współpracowników [10]. Badacze ci wykazali, że w oocytach myszy, które pozbawione były genów kodujących Rsk1, Rsk2 oraz Rsk3, dochodziło do wytworzenia funkcjonalnego bloku w stadium metafazy II [10]. Tym samym udowodniono, że żadne z badanych białek Rsk nie jest zaangażowane w powstanie aktywności CSF w oocytach myszy [10]. Zdaniem Dumonta i współpracowników, różnica w funkcjonowaniu ścieżki MOS/MEK1/MAPK/p90^{Rsk} w oocytach płazów i ssaków wynika z różnej wielkości ich oocytów. Oocyt *Xenopus* jest około tysiąckrotnie większy od oocytu myszy. Istnieje więc możliwość, że w oocytach płazów efektywne przekazanie sygnału generowanego przez białka szlaku kinazy MAP wymaga aktywacji „pośrednika” – białka, którego zawartość w oocycie jest wysoka. W oocytach *Xenopus* taką rolę mogłoby pełnić p90^{Rsk}. W znacznie mniejszych oocytach myszy sygnał ten może być skutecznie przekazywany bez dodatkowego wzmocnienia.

Podczas mitozy białka punktu kontrolnego wrzeciona podziałowego uniemożliwiają rozpoczęcie anafazy aż do momentu utworzenia stabilnych połączeń między kineto-chorami chromosomów tworzących płytkę metafazową a mikrotubulami wrzeciona podziałowego. Liczne badania prowadzone na ekstraktach cytoplazmatycznych z oocytów *Xenopus laevis* sugerują, że białka te biorą udział w powstawaniu aktywności cytostatycznej w oocytach płazów (ryc. 3) [46, 48]. W oocytach tych działanie p90^{Rsk2} polega na aktywacji Bub1 – jednego ze składników punktu kontrolnego wrzeciona podziałowego, który z kolei odpowiada za rekrutację kolejnych białek punktu kontrolnego – Mad1 i Mad2 (ryc. 3) [38, 47]. W oocytach płazów oba te białka wydają się niezbędne do wytworzenia aktywności cytostatycznej, jednak tylko obecność Mad1 jest konieczna do utrzymania długotrwałego bloku w MII [46]. Podstawową funkcją Mad2 jest natomiast hamowanie aktywności APC poprzez wiązanie jego głównego aktywatora – białka Cdc20, co w oocycie zablokowanym w stadium metafazy II powoduje zahamowanie degradacji cykliny B i utrzymywanie wysokiego poziomu aktywności MPF (ryc. 3) [5].

Rola białek punktu kontrolnego wrzeciona podziałowego w regulacji mejozy oocytów ssaków jest jednak dyskusyjna. Wykazano, że białka te biorą udział w opóźnieniu pierwszego podziału mejotycznego [15, 44]. Dlatego sądzono, że mogą być one także zaangażowane w powstawanie aktywności cytostatycznej w oocytach myszy. Przekonanie to oparte było również na wynikach doświadczeń, które wykazały, że w oocytach myszy zablokowanych w stadium metafazy II wykrywane są aktywne białka punktu kontrolnego – Bub1 i Mad2 – zlokalizowane na kinetochorach chromosomów [2, 19]. Jednakże wyniki ostatnich badań sugerują, że Mad2 może odgrywać pewną rolę jedynie w początkowych etapach wytwarzania bloku w stadium metafazy II [40]. Ponadto, w oocytach, w których inaktywowano Bub1 lub Mad2, nie obserwuje się zaburzeń w utrzymywaniu bloku w stadium metafazy II [44].

Podsumowując, powstawanie i utrzymanie aktywności cytostatycznej w oocytach myszy pozbawionych funkcjonalnych białek Rsk1, Rsk2 i Rsk3 lub białek punktu kontrolnego, takich jak: Mad2 czy Bub1, świadczy o tym, że czynniki te nie są istotne dla funkcjonowania CSF w oocytach myszy.

2.2. Białka z rodziny Emi

Białka szlaku kinazy MAP bez wątpienia odgrywają kluczową rolę w powstawaniu i utrzymywaniu aktywności cytostatycznej zarówno w oocytach płazów, jak i ssaków. Jednak kinazy te są aktywne w oocytach już podczas pierwszego podziału mejotycznego, a mimo to brak jest definitywnych dowodów na to, że w tym okresie dochodzi do aktywacji CSF. Sugeruje to, że pojawienie się aktywności cytostatycznej może wymagać aktywacji dodatkowego czynnika/czynników. W 1996 roku Choi i wsp. [4] oraz Verlhac i współpracownicy wykazali, że w oocytach pozbawionych funkcjonalnego genu kodującego kinazę MOS, które pozostały zablokowane w stadium metafazy II, aktywność MPF utrzymywana była na wysokim poziomie pomimo braku aktywnej kinazy MAP [4]. Obserwacja ta sugerowała istnienie dodatkowego czynnika, który zaangażowany byłby w utrzymywanie bloku metafazowego. Jak już wspomniano, działanie czynnika cytostatycznego polega przede wszystkim na hamowaniu aktywności APC w

oocytach zablokowanych w stadium metafazy II. Wydaje się, że między oocytami w stadium metafazy I oraz metafazy II istnieją pewne różnice w sposobie regulacji aktywności APC [16, 23]. Świadczyć o tym może obserwacja, że podczas pierwszego podziału mejotycznego oocyty myszy nie dochodzi w cytoplazmie do gwałtownych zmian poziomu Ca^{2+} , które są charakterystyczne dla zapłodnienia. Pomimo to, w oocytach kończących zarówno pierwszy, jak i drugi podział mejotyczny, dochodzi do degradacji cykliny B [16, 23]. Wydaje się zatem, że w oocytach myszy, w okresie między stadium metafazy I a stadium metafazy II, pojawia się dodatkowy, wrażliwy na zmiany stężenia jonów Ca^{2+} czynnik niezbędny do aktywacji CSF. W świetle ostatnich badań najbardziej atrakcyjnymi kandydatami do roli takiego czynnika wydają się być białka z rodziny Emi.

Zainteresowanie białkami z rodziny Emi jako potencjalnymi składnikami CSF wiąże się z wynikami opublikowanej w 2001 roku pracy Reimann i współpracowników, w której białko Emi1 (z ang. *Early Mitotic Inhibitor 1*) zostało opisane jako czynnik odpowiedzialny za hamowanie aktywności APC w dzielących się mitotycznie komórkach *Xenopus* [33, 34]. Kolejne badania wykazały, że Emi1 jest także czynnikiem niezbędnym i wystarczającym do wytworzenia aktywności cytostatycznej w oocytach płazów [35]. Działanie Emi1 polega na hamowaniu aktywności APC poprzez wiązanie głównego aktywatora kompleksu, białka Cdc20 [33]. Badania przeprowadzone przez Paronetto i współpracowników wykazały, iż wytworzenie stabilnego połączenia między Emi1 i Cdc20 w oocytach myszy zablokowanych w stadium metafazy II zależy od aktywności białka p90^{Rsk} [30]. Jednakże, jak już wspomniano wcześniej, oocyty myszy pozbawione białek Rsk1, Rsk2 i Rsk3 pozostają zablokowane w stadium metafazy II, a więc nie dochodzi w nich do inaktywacji CSF [10]. Ponadto, Oshumi i współpracownicy zakwestionowali rolę Emi1 jako składnika CSF w oocytach płazów udowadniając, że białko to nie jest wykrywane w oocytach, które osiągnęły stadium metafazy II [29]. Tym samym udział białka Emi1 w powstawaniu aktywności cytostatycznej w oocytach płazów i ssaków został poddany w wątpliwość. Badania nad rolą tego białka w bloku metafazowym oocytów *Xenopus* ciągle dostarczają sprzecznych danych, co nie pozwala jednoznacznie odpowiedzieć na pytanie, w jakim stopniu białko to zaangażowane jest w proces aktywacji CSF.

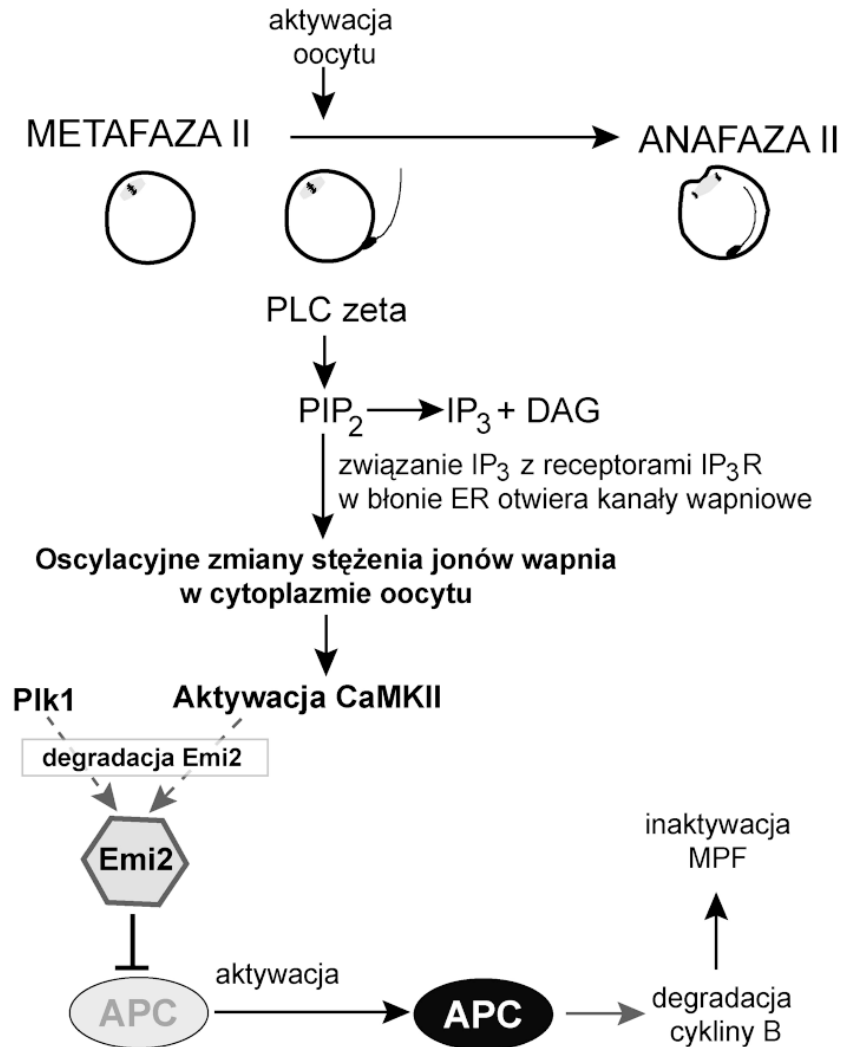
W oocytach *Xenopus* zablokowanych w stadium metafazy II odkryte zostało inne białko podobne do Emi1 – Emi2/Erp1 [45]. Tung i współpracownicy wykazali, że białko Emi2/Erp1 jest stabilne w cytoplazmie oocytów *Xenopus*, które osiągnęły stadium metafazy II, oraz że ulega ono degradacji w obecności jonów wapnia uwolnionych do cytoplazmy oocyty po jego aktywacji. Również w oocytach myszy wykryte zostało białko, które jest ortologiem Emi2/Erp1 u *Xenopus* [39]. Białko to wykrywane jest w dojrzewających oocytach myszy od stadium pęcherzyka zarodkowego do stadium metafazy II, natomiast po aktywacji oocyty ulega degradacji [39]. Przez analogię do pozostałych białek z rodziny Emi białko wykryte u myszy nazwane zostało Emi2. Ze względu na rolę w regulacji dojrzewania mejotycznego oocytów, Shoji i współpracownicy zaproponowali inne rozwinięcie skrótu – **Endogenous Meiotic Inhibitor 2**. Oocyty myszy, do których wstrzyknięto siRNA (z ang. *small interfering RNA*) inaktywujący mRNA kodujące Emi2 uległy spontanicznej aktywacji. Co istotne, w oocytach tych zaobserwowano bardzo niski poziom aktywności zarówno MPF, jak i kinazy MAP

(ERK1/ERK2). Uzyskane wyniki świadczą zatem, że Emi2 jest niezbędne do wykształcenia i utrzymania aktywności cytotatycznej w oocytach myszy. Emi2 hamuje aktywność APC, wiążąc się z jego aktywatorem – białkiem Cdc20, co wykazano przez koimmunoprecypitację obu białek (ryc. 3) [39]. Ponadto, obniżenie ekspresji Cdc20 w oocytach myszy, w których uprzednio zahamowano ekspresję Emi2, prowadzi do odtworzenia bloku w stadium metafazy II [39].

Obserwacje Shoji i współpracowników sugerują, że białko Emi2, oprócz udziału w powstawaniu aktywności cytotatycznej, odgrywa także istotną rolę w regulacji cytokinezy kończącej drugi podział mejotyczny. Mniej niż połowa oocytów, które na skutek mikroiniekcji siRNA przeciwko Emi2 zostały uwolnione z bloku w stadium metafazy II, prawidłowo ukończyła drugi podział mejotyczny. Zatem, zdaniem autorów, Emi2 wraz z innymi białkami – MISS i/lub DOC1R może wpływać na dynamikę cytoszkieletu w komórce, a tym samym odpowiadać za kontrolę podziału komórkowego (ryc. 3). Oprócz wykazania roli Emi2 jako składnika CSF w oocytach myszy, praca Shoji i współpracowników dostarcza danych potwierdzających hipotezę Oshumi i współpracowników mówiącą, że białko Emi1 nie bierze udziału w wytwarzaniu aktywności cytotatycznej [29]. Oocyty myszy, w których wyciszono ekspresję Emi1, były zdolne do wytworzenia aktywności cytotatycznej i ulegały zablokowaniu w stadium metafazy II [39].

3. INAKTYWACJA CSF PO ZAPŁODNIENIU LUB AKTYWACJI PARTENOGENETYCZNEJ OOCYTÓW SSAKÓW

Pierwszym objawem aktywacji oocytów wywołanej działaniem bodźca partenogenetycznego lub wniknięciem plemnika, a zarazem czynnikiem niezbędnym i wystarczającym do pobudzenia oocytu jest wzrost stężenia wolnych jonów wapnia w cytoplazmie (ryc. 4) [17]. Badania przeprowadzone w latach 80, w laboratorium Masui'ego, wykazały, że zwiększenie poziomu jonów wapnia w ekstraktach uzyskanych z oocytów *Rana pipiens*, zablokowanych w stadium metafazy II powoduje utratę aktywności CSF. Tak więc wzrost stężenia wolnych jonów wapnia okazał się „sygnałem” inicjującym inaktywację CSF i MPF (ryc. 4) [25]. Mechanizm odpowiedzialny za podwyższenie poziomu jonów wapnia w oocycie zależy od aktywności fosfolipazy C zeta, która wnoszona jest do oocytu podczas zapłodnienia przez plemnik [7, 36, 41]. Enzym ten katalizuje hydrolizę bisfosforanu fosfatydyloinozytolu (PIP_2 ; ryc. 4). W wyniku tej reakcji powstają dwie cząsteczki informacyjne: trójfosforan inozytolu (IP_3) oraz diacyloglicerol (DAG) [12]. Związanie IP_3 z odpowiednimi receptorami (IP_3R) zlokalizowanymi na błonie siateczki śródplazmatycznej powoduje otwarcie kanałów wapniowych i uwolnienie jonów wapnia zmagazynowanych w tym organellum (ryc. 4). Oscylacyjne zmiany stężenia wolnych jonów wapnia w cytoplazmie oocytu aktywują kinazę zależną od kalmoduliny II (z ang. *Calmodulin-dependent kinase II*, CaMKII; ryc. 4) [24]. Aktywacja CaMKII powoduje inaktywację CSF i wzrost aktywności



RYCINA 4. Ścieżka sygnałowa uruchamiana w oocycie po wnikięciu plemnika. Wnikający do oocytu plemnik wnosi fosfolipazę C zeta (PLCzeta), która indukuje oscylacyjne zmiany stężenia wapnia w cytoplazmie, prowadzące do aktywacji kinazy zależnej od kalmoduliny (CaMKII). Rola CaMKII oraz kinazy Polo 1 (Plk1) w inaktywacji Emi2 w oocytach myszy nie została jeszcze w pełni przebadana. Degradacja Emi2 umożliwia aktywację kompleksu inicjującego anafazę (APC), degradację cykliny B i inaktywację MPF: PIP₂ – bisfosforan fosfatidyloinozytolu, IP₃ – trójfosforan inozytolu

APC w oocytach myszy zablokowanych w stadium metafazy II. To z kolei prowadzi do degradacji cykliny B, a w konsekwencji do spadku aktywności MPF i rozpoczęcia przez oocyt anafazy II (ryc. 4) [16, 23, 42]. Nie wiadomo, jakie białko jest substratem dla kinazy CaMKII w oocytach myszy. Najnowsze badania przeprowadzone na oocytach *Xenopus* udowodniły, że kinaza CaMKII fosforyluje białko Emi2/Erp1, które jest inhibitorem APC (ryc. 4) [14, 32]. Pośrednio, za degradację białek z rodziny Emi odpo-

wiada fosforylacja katalizowana przez kinazę Plk1 (z ang. *Polo-like kinase 1*) (ryc. 4) [13, 27, 37]. Plk1 fosforyluje jednak tylko takie białka, które zostały wcześniej ufosforylowane przez inną kinazę [11]. Zarówno białko Emi1, jak i Emi2/Erp1 mają sekwencje aminokwasów potencjalnie fosforylowane przez kinazy CaMKII w obrębie sekwencji rozpoznawanej również przez kinazę Plk1 [35, 37]. Zatem aktywacja CaMKII w oocytach płazów może prowadzić do „wstępnej” fosforylacji białka Emi2/Erp1, które następnie byłoby fosforylowane przez Plk1 i ulegałoby degradacji [14, 22, 32]. W ten sposób białko Cdc20 zostaje uwolnione i może aktywować APC, co prowadzi do degradacji cykliny B, a następnie spadku aktywności MPF i ukończenia przez oocyt II podziału mejotycznego (ryc. 4).

Kluczowa rola białka Emi2 w wytwarzaniu aktywności cytostatycznej w oocytach zarówno płazów, jak i ssaków sugeruje, że w obu przypadkach inaktywacja CSF może przebiegać z wykorzystaniem podobnej ścieżki sygnałowej (ryc. 4). Badania opublikowane w 1991 roku przez Weber i współpracowników wykazały, że w aktywowanych oocytach myszy degradacja białka MOS i inaktywacja kinazy MAP, czyli składników CSF, następuje znacznie później niż inaktywacja MPF [20]. Jednakże w 1999 roku Ciemerych i Kubiak wykazali, że inaktywacja CSF przebiega dwuetapowo – tuż po pobudzeniu oocytu następuje gwałtowny zanik aktywności cytostatycznej towarzyszący spadkowi aktywności MPF, zaś ostateczna inaktywacja CSF zachodzi już po inaktywacji MPF i związana jest ze spadkiem aktywności kinazy MAP [20]. Aktywacja oocytu może zatem prowadzić do degradacji/inaktywacji innego białka (być może właśnie Emi2), którego obecność/aktywność ma decydujący wpływ na funkcjonowanie bloku w stadium metafazy II. Inaktywacja/degradacja tego czynnika odpowiada za spadek aktywności cytostatycznej obserwowany w oocytach wkrótce po ich aktywacji i poprzedza inaktywację MPF. W świetle ostatnich badań tym głównym czynnikiem limitującym aktywność CSF w oocytach myszy wydaje się być Emi2. W obecnej chwili najważniejszym celem badań wydaje się sprawdzenie, czy w aktywowanych oocytach ssaków uruchamiana jest ścieżka z udziałem CaMKII i Plk1, prowadząca do degradacji Emi2, analogiczna do tej funkcjonującej w pobudzonych oocytach płazów. Ponadto, należy określić, czy degradacja/inaktywacja Emi2 wywołana aktywacją oocytu jest bezpośrednią przyczyną inaktywacji CSF prowadzącą do przełamania bloku metafazowego w oocytach ssaków i jaki jest rzeczywisty udział ścieżki sygnalizacyjnej kinazy MAP w tym procesie.

4. PODSUMOWANIE

Poznanie mechanizmów regulujących dojrzewanie mejotyczne oocytu, w tym również odpowiedzialnych za powstanie bloku w stadium metafazy II, jest niezwykle istotne, gdyż przedwczesne zablokowanie oocytów w stadium metafazy I, jak również samoistna aktywacja oocytów są uważane za przyczyny niepłodności. Mimo iż dwa najważniejsze czynniki odpowiedzialne za regulację dojrzewania mejotycznego oocytów, MPF i CSF, zostały odkryte 35 lat temu, do chwili obecnej wiele pytań dotyczących współdziałania obu czynników, a szczególnie udziału poszczególnych składników CSF w kontroli aktywności MPF, pozostaje bez odpowiedzi. Identyfikacja nowych białek zaangażo-

wanych w powstawanie aktywności cytostatycznej w oocytach płazów i ssaków, jak również weryfikacja roli białek, uważanych dotąd za potencjalne składniki CSF, w wytwarzaniu tej aktywności uzupełnia i zmienia nasze wyobrażenie o funkcjonowaniu aktywności cytostatycznej w oocytach obu grup zwierząt. Czynniki cytostatyczne, którego aktywność opisali Masui i Markert, wydaje się nie być jednym tylko białkiem lub specyficznym kompleksem białkowym, lecz wydaje się zależeć od całej sieci oddziaływań molekularnych.

Podziękowania

Dziękujemy Ewie Borsuk i Jackowi Kubiakowi za przeczytanie manuskryptu i cenne uwagi, a Darkowi Maluchnikowi za rysunki oocytów. Maria A. Ciemerych jest stypendystką Fundacji L'Oreal Polska przy wsparciu Polskiego Komitetu do Spraw UNESCO.

LITERATURA

- [1] BRUNET S, MARO B. Cytoskeleton and cell cycle control during meiotic maturation of the mouse oocyte: integrating time and space. *Reproduction* 2005; **130**: 801–811.
- [2] BRUNET S, PAHLAVAN G, TAYLOR S, MARO B. Functionality of the spindle checkpoint during the first meiotic division of mammalian oocytes. *Reproduction* 2003; **126**: 443–450.
- [3] CASTRO A, BERNIE C, VIGNERON S, LABBE JC, LORCA T. The anaphase-promoting complex: a key factor in the regulation of cell cycle. *Oncogene* 2005; **24**: 314–325.
- [4] CHOI T, FUKASAWA K, ZHOU R, TESSAROLLO L, BORROR K, RESAU J, VANDE WOUDE G F. The Mos/mitogen-activated protein kinase (MAPK) pathway regulates the size and degradation of the first polar body in maturing mouse oocytes. *Proc Natl Acad Sci USA* 1996; **93**: 7032–7035.
- [5] CHUNG E, CHEN RH. Spindle checkpoint requires Mad1-bound and Mad1-free Mad2. *Mol Biol Cell* 2002; **13**: 1501–1511.
- [6] CIECHANOVER A. Proteolysis: from the lysosome to ubiquitin and the proteasome. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2005; **6**: 79–87.
- [7] COX IJ, LARMAN MG, SAUNDERS CM, HASHIMOTO K, SWANN K, LAI FA. Sperm phospholipase C ζ from humans and cynomolgus monkeys triggers Ca²⁺ oscillations, activation and development of mouse oocytes. *Reproduction* 2002; **124**: 611–623.
- [8] DE LA FUENTE R. Chromatin modifications in the germinal vesicle (GV) of mammalian oocytes. *Dev Biol* 2006; **292**: 1–12.
- [9] DOREE M, HUNT T. From Cdc2 to Cdk1: when did the cell cycle kinase join its cyclin partner? *J Cell Sci* 2002; **115**: 2461–2464.
- [10] DUMONT J, UMBHAUER M, RASSINIER P, HANAUER A, VERLHAC M H. p90Rsk is not involved in cytostatic factor arrest in mouse oocytes. *J Cell Biol* 2005; **169**: 227–231.
- [11] ELIA AE, RELLOS P, HAIRE LF, CHAO JW, IVINS FJ, HOEPKER K, MOHAMMAD D, CANTLEY LC, SMERDON SJ, YAFFE MB. The molecular basis for phosphodependent substrate targeting and regulation of Plks by the Polo-box domain. *Cell* 2003; **115**: 83–95.
- [12] HALET G. PKC signaling at fertilization in mammalian eggs. *Biochim Biophys Acta* 2004; **1742**: 185–189.
- [13] HANSEN DV, LOKTEV AV, BAN KH, JACKSON PK. Plk1 Regulates Activation of the Anaphase Promoting Complex by Phosphorylating and Triggering SCF β -TrCP-dependent Destruction of the APC Inhibitor Emi1. *Mol Biol Cell* 2004; **15**: 5623–5634.
- [14] HANSEN DV, TUNG JJ, JACKSON PK. CaMKII and Polo-like kinase 1 sequentially phosphorylate the cytostatic factor Emi2/XErp1 to trigger its destruction and meiotic exit. *Proc Natl Acad Sci USA* 2006; **103**: 608–613.

- [15] HOMER HA, MCDOUGALL A, LEVASSEUR M, YALLOP K, MURDOCH AP, HERBERT M. Mad2 prevents aneuploidy and premature proteolysis of cyclin B and securin during meiosis I in mouse oocytes. *Genes Dev* 2005; **19**: 202–207.
- [16] HYSLOP LA, NIXON VL, LEVASSEUR M, CHAPMAN F, CHIBA K, MCDOUGALL A, VENABLES JP, ELLIOTT DJ, JONES KT. Ca^{2+} -promoted cyclin B1 degradation in mouse oocytes requires the establishment of a metaphase arrest. *Dev Biol* 2004; **269**: 206–219.
- [17] JONES KT. Mammalian egg activation: from Ca^{2+} spiking to cell cycle progression. *Reproduction* 2005; **130**: 813–823.
- [18] JONES KT. Turning it on and off: M-phase promoting factor during meiotic maturation and fertilization. *Mol Hum Reprod* 2004; **10**: 1–5.
- [19] KALLIO M, ERIKSSON JE, GORBSKY GJ. Differences in spindle association of the mitotic checkpoint protein Mad2 in mammalian spermatogenesis and oogenesis. *Dev Biol* 2000; **225**: 112–123.
- [20] KUBIAK JZ, CIEMERYCH MA. Cell cycle regulation in early mouse embryos. Novartis Found Symp 2001; **237**: 79–89.
- [21] LEFEBVRE C, TERRET, DZIANE A, RASSINIER P, MARO B, VERLHAC MH. Meiotic spindle stability depends on MAPK-interacting and spindle-stabilizing protein (MISS), a new MAPK substrate. *J Cell Biol* 2002; **157**: 603–613.
- [22] LIU J, MALLER JL. Calcium elevation at fertilization coordinates phosphorylation of XErp1/Emi2 by Plx1 and CaMK II to release metaphase arrest by cytostatic factor. *Curr Biol* 2005; **15**: 1458–1468.
- [23] MARANGOS P, CARROLL J. Fertilization and InsP3-induced Ca^{2+} release stimulate a persistent increase in the rate of degradation of cyclin B1 specifically in mature mouse oocytes. *Dev Biol* 2004; **272**: 26–38.
- [24] MARKOULAKI S, MATSON S, ABBOTT AL, DUCIBELLA T. Oscillatory CaMKII activity in mouse egg activation. *Dev Biol* 2003; **258**: 464–474.
- [25] MASUI Y. From oocyte maturation to the *in vitro* cell cycle: the history of discoveries of Maturation-Promoting Factor (MPF) and Cytostatic Factor (CSF). *Differentiation* 2001; **69**: 1–17.
- [26] MERDALI P, DRAVIAM VM, SORGER PK. Timing and checkpoints in the regulation of mitotic progression. *Dev Cell* 2004; **7**: 45–60.
- [27] MOSHE Y, BOULAIRE J, PAGANO M, HERSHKO A. Role of Polo-like kinase in the degradation of early mitotic inhibitor 1, a regulator of the anaphase promoting complex/cyclosome. *Proc Natl Acad Sci USA* 2004; **101**: 7937–7942.
- [28] NIXON VL, LEVASSEUR M, MCDOUGALL A, JONES KT. Ca^{2+} oscillations promote APC/C-dependent cyclin B1 degradation during metaphase arrest and completion of meiosis in fertilizing mouse eggs. *Curr Biol* 2002; **12**: 746–750.
- [29] OHSUMI K, KOYANAGI A, YAMAMOTO TM, GOTOH T, KISHIMOTO T. Emi1-mediated M-phase arrest in *Xenopus* eggs is distinct from cytostatic factor arrest. *Proc Natl Acad Sci USA* 2004; **101**: 12531–12536.
- [30] PARONETTO MP, GIORDA E, CARSETTI R, ROSSI P, GEREMIA R, SETTE C. Functional interaction between p90(Rsk2) and Emi1 contributes to the metaphase arrest of mouse oocytes. *Embo J* 2004; **23**: 4649–4659.
- [31] PHILLIPS KP, PETRUNEWICH MA, COLLINS JL, BOOTH RA, LIU XJ, BALTZ JM. Inhibition of MEK or cdc2 kinase parthenogenetically activates mouse eggs and yields the same phenotypes as Mos(-/-) parthenogenotes. *Dev Biol* 2002; **247**: 210–223.
- [32] RAUH NR, SCHMIDT A, BORMANN J, NIGG EA, MAYER TU. Calcium triggers exit from meiosis II by targeting the APC/C inhibitor XErp1 for degradation. *Nature* 2005; **437**: 1048–1052.
- [33] REIMANN JD, FREED E, HSU JY, KRAMER ER, PETERS JM, JACKSON PK. Emi1 is a mitotic regulator that interacts with Cdc20 and inhibits the anaphase promoting complex. *Cell* 2001; **105**: 645–655.
- [34] REIMANN JD, GARDNER JB, MARGOTTIN-GOGUET F, JACKSON PK. Emi1 regulates the anaphase-promoting complex by a different mechanism than Mad2 proteins. *Genes Dev* 2001; **15**: 3278–3285.
- [35] REIMANN JD, JACKSON PK. Emi1 is required for cytostatic factor arrest in vertebrate eggs. *Nature* 2002; **416**: 850–854.
- [36] SAUNDERS CM, LARMAN MG, PARRINGTON J, COX LJ, ROYSE J, BLAYNEY LM, SWANN K, LAI FA. PLC zeta: a sperm-specific trigger of Ca^{2+} oscillations in eggs and embryo development. *Development* 2002; **129**: 3533–3544.
- [37] SCHMIDT A, DUNCAN PI, RAUH NR, SAUER G, FRY AM, NIGG EA, MAYER TU. *Xenopus* polo-like kinase Plx1 regulates XErp1, a novel inhibitor of APC/C activity. *Genes Dev* 2005; **19**: 502–513.

- [38] SCHWAB MS, ROBERTS BT, GROSS SD, TUNQUIST BJ, TAIEB FE, LEWELLYN AL, MALLER JL. Bub1 is activated by the protein kinase p90(Rsk) during *Xenopus* oocyte maturation. *Curr Biol* 2001; **11**: 141–150.
- [39] SHOJI S, YOSHIDA N, AMANAI M, OHGISHI M, FUKUI T, FUJIMOTO S, NAKANO Y, KAJIKAWA E, PERRY AC. Mammalian Emi2 mediates cytostatic arrest and transduces the signal for meiotic exit via Cdc20. *Embo J* 2006; **25**: 834–845.
- [40] SIKORA-POLACZEK M, HUPALOWSKA A, POLANSKI Z, KUBIAK JZ, CIEMERYCH MA. The first mitosis of the mouse embryo is prolonged by transitional metaphase arrest. *Biol Reprod* 2006; **74**: 734–743.
- [41] SWANN K, LARMAN MG, SAUNDERS CM, LAI FA. The cytosolic sperm factor that triggers Ca^{2+} oscillations and egg activation in mammals is a novel phospholipase C: PLCzeta. *Reproduction* 2004; **127**: 431–439.
- [42] TATONE C, DELLE MONACHE S, IORIO R, CASERTA D, DI COLA M, COLONNA R. Possible role for $\text{Ca}^{(2+)}$ calmodulin-dependent protein kinase II as an effector of the fertilization $\text{Ca}^{(2+)}$ signal in mouse oocyte activation. *Mol Hum Reprod* 2002; **8**: 750–757.
- [43] TERRET ME, LEFEBVRE C, DJIANE A, RASSINIER P, MOREAU J, MARO B, VERLHAC MH. DOC1R: a MAP kinase substrate that control microtubule organization of metaphase II mouse oocytes. *Development* 2003; **130**: 5169–5177.
- [44] TSURUMI C, HOFFMANN S, GELEY S, GRAESER R, POLANSKI Z. The spindle assembly checkpoint is not essential for CSF arrest of mouse oocytes. *J Cell Biol* 2004; **167**: 1037–1050.
- [45] TUNG JJ, HANSEN DV, BAN KH, LOKTEV AV, SUMMERS MK, ADLER JR, 3rd, JACKSON PK. A role for the anaphase-promoting complex inhibitor Emi2/XErp1, a homolog of early mitotic inhibitor 1, in cytostatic factor arrest of *Xenopus* eggs. *Proc Natl Acad Sci USA* 2005; **102**: 4318–4323.
- [46] TUNQUIST BJ, EYERS PA, CHEN LG, LEWELLYN AL, MALLER JL. Spindle checkpoint proteins Mad1 and Mad2 are required for cytostatic factor-mediated metaphase arrest. *J Cell Biol* 2003; **163**: 1231–1242.
- [47] TUNQUIST BJ, MALLER JL. Under arrest: cytostatic factor (CSF)-mediated metaphase arrest in vertebrate eggs. *Genes Dev* 2003; **17**: 683–710.
- [48] TUNQUIST BJ, SCHWAB MS, CHEN LG, MALLER JL. The spindle checkpoint kinase bub1 and cyclin e/cdk2 both contribute to the establishment of meiotic metaphase arrest by cytostatic factor. *Curr Biol* 2002; **12**: 1027–1033.
- [49] ZACHARIAE W, NASMYTH K. Whose end is destruction: cell division and the anaphase-promoting complex. *Genes Dev* 1999; **13**: 2039–2058.

Redaktor prowadzący – Bożena Kamińska-Kaczmarek

Otrzymano: 21.04. 2006 r. .

Przyjęto: 30. 06. 2006 r.

ul. Miecznikowa 1, 02-096 Warszawa

e-mail: ciemerych@biol.uw.edu.pl