Univerzita Karlova

Přírodovědecká fakulta

Studijní program: Speciální chemicko-biologické obory

Studijní obor: Molekulární biologie a biochemie organismů

Irem Mertová

Role importinů v reprodukci

Role of importins in reproduction

Bakalářská práce

Vedoucí práce: RNDr. Michaela Frolíková, Ph.D.

Praha 2020

Prohlášení

Prohlašuji, že jsem závěrečnou práci zpracovala samostatně a že jsem uvedla všechny použité informační zdroje a literaturu. Tato práce ani její podstatná část nebyla předložena k získání jiného nebo stejného akademického titulu.

V Praze dne 13. 5. 2020 …..……

Irem Mertová

Poděkování

Chtěla bych poděkovat své školitelce RNDr. Michaele Frolíkové, Ph.D za její pomoc, ochotu a čas, které mi poskytla při psaní této bakalářské práce.

Abstrakt

Importiny jsou proteiny ze skupiny karyoferinů, které zajišťují transport proteinů z cytoplazmy do jádra, a to jak v somatických buňkách, tak v gametách. V gametách hraje transport specifických transkripčních faktorů a jiných proteinů do jádra významnou roli a během reprodukce savců ovlivňuje klíčové děje. U savců je reprodukce zprostředkována procesem pohlavního rozmnožování. V rámci tohoto děje dochází u každého z rodičů ke vzniku haploidní gamety, ty později během finální fáze oplození splývají a dávají vzniknout diploidní zygotě. Genová exprese v gametách se od genové exprese somatických buněk významně liší. V gametách dochází k pozastavení translace a specifické proteiny jsou exprimovány jen v určitých stádiích vývoje buňky. Proteiny určené k transportu do jádra obsahují odlišné jaderné lokalizační signály, ty jsou rozeznávány různými druhy importinů. Na základě studia rozdílů v expresi jednotlivých druhů importinů v různých fázích vývoje gamet, tak lze vyvozovat jejich role v těchto procesech. Role importinů byla prokázána jak v gametogenezi, tak v diferenciaci kmenových buněk a maturaci zárodečných buněk. Navíc se ukazuje, že importiny mají úlohu i v obraně samčích pohlavních buněk proti oxidativnímu stresu.

Klíčová slova:

importiny, karyoferiny, gameta, pohlavní buňky, jaderný transport, jaderný pór

Abstract

Importins are proteins from a group of karyopherins, which provide transport of proteins into the nucleus both in somatic cells and gametes. Transport of specific transcription factors plays an important role in gametes and affects key events of reproduction. In mammals, reproduction is mediated by the process of sexual reproduction. In this event, a haploid gamete is formed in each parent, which in later stages of fertilization combine and make a diploid zygote. Gene expression in gametes differs dramatically from somatic cells. In gametes, translation is suspended and specific proteins are expressed only at certain stages of cell development. Proteins determined for transport into the nucleus contain various nuclear localization signals, which are detected by different types of importins. Based on studying differences in expression of individual types of importins in various phases of gametogenesis, we can deduce their roles in these processes. Role of importins was proven in gametogenesis, differentiation of stem cells and maturation of germ cells. On top of that, importins appear to play a role in defense of male germ cells against oxidative stress.

Seznam zkratek

ARM	armadilová repetice
CAS	cellular apoptosis susceptibility protein
Cdc2	cyklin dependentní kináza 2 (cyclin-dependent kinase 2)
Hsp70-2	heat shock protein 70-2
IBB	importin β binding domain
IPO5	importin 5
IPO7	importin 7
IPO13	importin 13
KPNA1	karyopherin subunit α 1
KPNA2	karyopherin subunit α 2
KPNA4	karyopherin subunit α 4
KPNA5	karyopherin subunit α 5
KPNA6	karyopherin subunit α 6
KPNA7	karyopherin subunit α 7
LIF	leukemia inhibitory factor
L-Ipo13	long form Ipo13
RanBP6	Ran binding protein 6
RanBP9	Ran binding protein 9
RanBP10	Ran binding protein 10
RanBP17	Ran binding protein 17
RanGAP	Ran GTPase activating protein
RanGEF	Ran GTPase exchange factor
NES	jaderný exportní signál (nuclear export signal)

NF-κB	nuclear factor κ-light-chain-enhancer of activated B cells
NLS	jaderný lokalizační signál (nuclear localization signal)
Oct4	octamer-binding transcription factor 4
Oct6	octamer-binding transcription factor 6
PGC	primordiální kmenové buňky (primordial germ cells)
RCC1	regulator of chromosome condensation 1
ROS	reaktivní oxidový radikál (reactive oxygen species)
Sox2	SRY-box transcription factor 2
SRY	sex-determing region Y
TGFβ	transforming growth factor β
TP2	transition protein 2
TS-Ipo13	testis specific short form Ipo13
UBC9	ubiquitin-conjugating enzyme 9
XPO4	exportin 4

Obsah

Úvod 1
Cíle práce 2
1. Jaderný transport 3
2. Importiny 4
2.1. Stavba a funkce 4
2.2. Druhy importinů u lidí (*Homo sapiens*) a myší (*Mus musculus*) 6
2.3. Specifita importinů k přenášeným proteinům 7
3. Gametogeneze 7
3.1. Role importinů v oogenezi 8
3.1.1. Oogeneze 8
3.1.2. Exprese importinů během oogeneze 9
3.2. Role importinů ve spermatogenezi 12
3.2.1. Spermatogeneze, spermiogeneze 12
3.2.2. Exprese importinů v průběhu spermatogeneze 13
4. Role importinů v časném embryonálním vývoji 15
4.1. Podíl importinů na diferenciaci kmenových embryonálních buněk 16
4.2. Souvislost mezi distribucí importinů v buňce a maturací zárodečných buněk 18
5. Importin jako obrana proti oxidativnímu stresu v souvislosti se samčí neplodností 19
6. Závěr 21
7. Seznam obrazových příloh 23
8. Seznam použité literatury 24

Úvod

Reprodukce je proces, který zahrnuje produkci samčích a samičích gamet, jejich úspěšné oplození a následný vývoj. Při oplození dochází ke splynutí dvou haploidních gamet a vzniku diploidní zygoty (Gilbert 2000c). Zralé gamety jsou velmi specializované, a tedy i modifikované buňky, které musejí projít mnoha strukturními změnami, než se dostanou do své finální podoby. Jádro zralého vajíčka se v době oplození nachází v metafázi meiózy II, z toho důvodu postrádá jadernou membránu a chromatin je kondenzován do chromosomů (Cooper 2000). Naopak jádro zralé spermie je velmi kompaktní struktura, kde během jaderné kondenzace dochází k nahrazení histonů za pro spermii specifické proteiny protaminy a dále k relokaci laminů a jaderných pórů v jaderné membráně (Sudhakar and Rao 1990, Meistrich et al. 2003, Ho 2010). Aby k těmto finálním podobám došlo, musí být jejich vývoj značně regulován. Těmito regulátory jsou proteiny, které jsou specificky transportovány do jádra. Molekuly, které jsou větší než 40 kDa procházejí do jádra skrze jaderné póry pomocí aktivního transportu za účasti dalších proteinů. Tyto proteiny se díky své funkci nazývají importiny (Tzfira & Citovsky 2005). Pro to, aby vznikla specifická vazba importinu na přenášený protein, je nutné, aby tento protein obsahoval jaderný lokalizační signál. Přenášený protein pak tvoří společně s importinem α a importinem β komplex, který umožní transport daného proteinu přes jaderné póry (Imamoto et al. 1995). Importiny jsou proto nezbytnými regulátory mnoha buněčných dějů jak u somatických buněk, tak v gametách. Proteiny určené k transportu do jádra obsahují odlišné jaderné lokalizační signály, které jsou dále rozeznávány různými druhy importinů. Z tohoto důvodu můžeme v odlišných fázích vývoje a maturace gamet sledovat přítomnost různých druhů importinů. Role importinů v reprodukci je tak zkoumána především na základě detekce přítomnosti odlišných druhů importinů v různých jejích fázích.

V rámci této práce jsou předkládány a diskutovány dosavadní poznatky o složení importinů, jejich specifitě k přenášeným proteinům a jejich funkci v ovlivňování různých fází reprodukce u savců. Práce se zaměřuje zejména na roli importinů při diferenciaci zárodečných buněk a v gametogenezi, v diferenciaci embryonálních kmenových buněk a při zvládání oxidativního stresu spermiemi.

Cíle práce

Cílem této bakalářské práce je shrnutí a diskuze dosavadních poznatků o roli importinů v reprodukci savců. Tato práce se se zaměřuje na:

1) funkci importinů v jaderném transportu, jejich stavbu a specifitu k přenášeným proteinům
2) roli importinů v diferenciaci zárodečných buněk a v gametogenezi
3) roli importinů v diferenciaci embryonálních kmenových buněk
4) roli importinů ve spermiích při zvládání oxidativního stresu a jejich souvislost se sterilitou

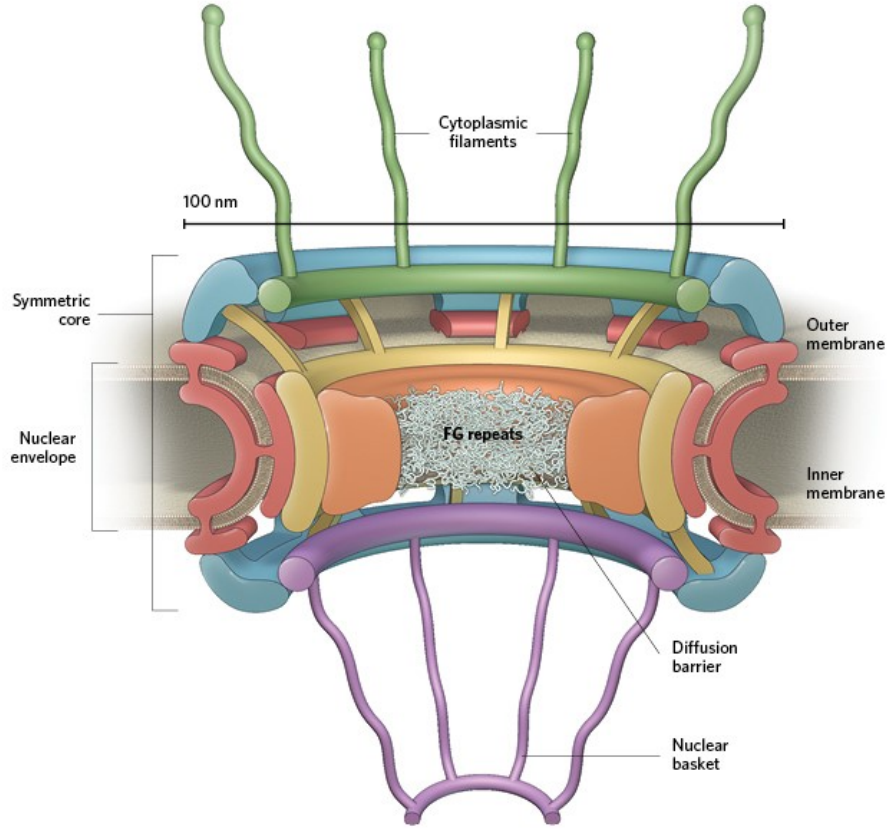
1. Jaderný transport

Jaderný transport je důležitým procesem v buňce, který je nezbytný pro správnou genovou expresi a signální transdukci (Kim et al. 2017). Zárodečné buňky obsahují transkripty, které jsou translatovány v pozdějších stádiích jejich vývoje. Exprese jednotlivých transkriptů závisí na jejich sestřihu, jaderném transportu a jejich skladování v buňce (Steger 2001). Savčí oocyty obsahují maternálně skladovanou mRNA, která se exprimuje v počátečních fázích vývoje oocytů a řídí jejich růst. Ve chvíli, kdy oocyt dosáhne svojí plné velikosti, dochází k pozastavení transkripce a ta je obnovena až ve fázi aktivace embryonálního genomu. Tato doba se u různých druhů savců časově liší (Davidson 1968, Braude et al. 1979).

Buněčné jádro je obaleno jadernou membránou, která je tvořena dvěma fosfolipidovými vrstvami. Ty se dělí na vnitřní a vnější membránu (Callan & Tomlin 1950) a jsou od sebe odděleny periplazmatickým prostorem. Skoro veškerý jaderný transport je zprostředkován pomocí jaderných pórů. Jaderný pór je komplex asi 30 různých druhů proteinů (nukleoporinů) (Rout et al. 2000, Cronshaw et al. 2002), u člověka o velikosti 110 MDa (Ori et al. 2013). Má rozměry o průměru kruhu póru 100-150 nm a šířce napříč membránou 50-70 nm (Beck et al. 2004). Rozměry jaderného póru se u různých druhů liší, stejně tak i jejich množství v jaderné membráně. U kvasinek se v jaderné membráně nachází cca 100-200 komplexů nukleárních pórů, u savčích buněk je to několik tisíc a u jader oocytů obojživelníků (*Amphibia*) jich najdeme až 38 milionů (Allen et al. 2000, Jamieson 2003, Ellenberg 2013).

Centrum jaderného póru má osmičetnou radiální symetrii a na vnější straně (směrem do cytoplazmy) z něj vybíhají filamenta o délce 30-35 nm. Na vnitřní straně (směrem do jádra) jsou filamenta o délce 40-60 nm, které jsou laterálně propojeny a vytváří útvar podobný košíku (Hinshaw at al. 1992, Jarnik & Aebi 1991) (viz obrázek č.1).

Specifický transport jadernými póry je zprostředkován pomocí přenašečových proteinů. Tyto přenašečové proteiny jsou selektivní k různým přenášeným proteinům, které obsahují jaderné lokalizační signály (NLS – nuclear localization signal) nebo jaderné exportní signály (NES – nuclear export signal). NLS a NES jsou rozeznávány karyoferiny (importiny/exportiny/transportiny) (Kim et al. 2017), které specificky váží přenášený protein a transportují ho dovnitř (importiny) nebo ven (exportiny) z jádra.



Obrázek č. 1: Stavba jaderného póru (Daniel H. Lin & André Hoelz, 2016)

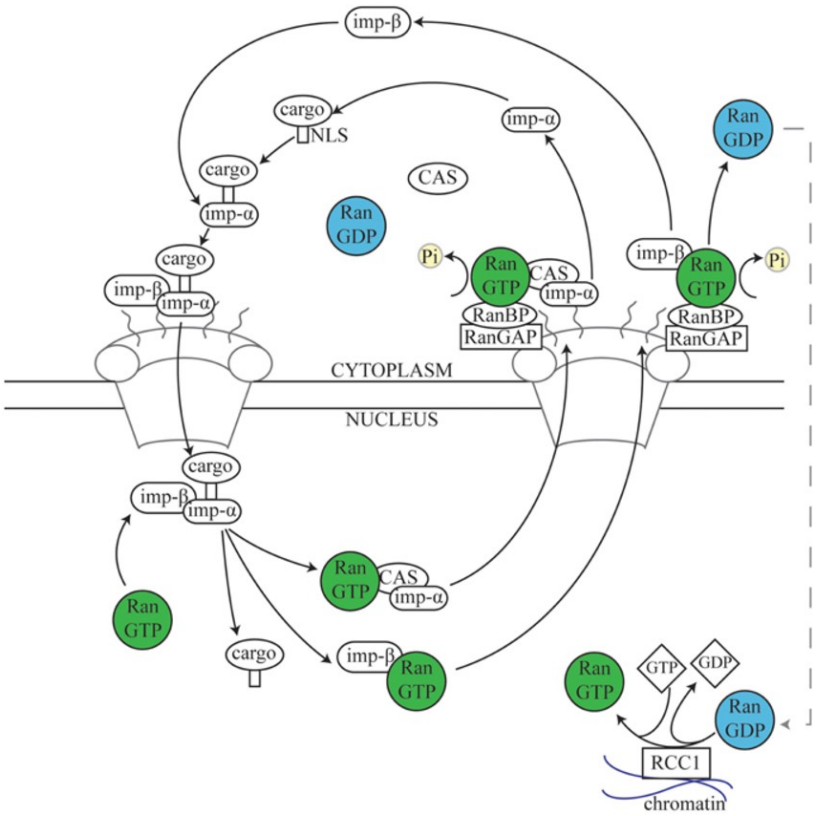
2. Importiny

2.1. Stavba a funkce

Importiny jsou proteiny, které přecházejí z cytoplazmy do jádra a zpět. Tento jejich přesun zajišťuje aktivní transport dalších proteinů, jelikož v cytoplazmě dochází ke specifickému navázání přenášených proteinů na importiny a v jádře k jejich uvolnění (Mattaj & Englmeier 1998).

Importiny jsou tvořeny dvěma podjednotkami, podjednotku α a β. β podjednotka je schopná vázat přenášený protein nesoucí NLS přímo, bez adaptéru, i nepřímo, přes adaptéry v podobě podjednotky α (Lott & Cingolani 2011). Podjednotka β obsahuje vazebnou doménu pro přenášený protein, vazebnou doménu pro jaderný pór (Cingolani et al. 1999, Isgro & Schulten 2005, Zachariae & Grubmüller 2008) a další pro vazbu Ran GTPázového proteinu. (Chook & Blobel 1999, Vetter et al. 1999). Rozpoznání NLS importinem α a jeho heterodimerizace s importinem β způsobí jejich transport do jádra (Imamoto et al. 1995, Görlich et al. 1996). Průchod jaderným pórem se uskutečňuje na základě interakcí komplexu importinů s hydrofobními fenylalanin-glycinovými repeticemi nukleoporinů (Damelin & Silver 2000, Allen et al. 2001, Suntharalingam & Wente 2003).

V energeticky poháněném transportu proteinů z cytoplazmy do jádra a zpět hrají roli Ran GTPázové proteiny z rodiny Ras (Moore & Blobel 1993, Macara 2001, Görlich et al. 2003). Ran protein existuje ve dvou stavech - RanGDP a RanGTP (Bourne et al. 1991, Sorokin et al. 2007). Jejich vlastní GTPázová aktivita je malá a je proto urychlena GAP proteiny (Bischoff et al. 1994, Vetter & Wittinghofer 2001). Koncentrace GTP je vyšší v jádře, v cytoplazmě je naopak vysoká koncentrace GDP (Weis 2002). V jádře se vyskytuje protein RanGEF (Ran GTP exchange factor), v lidských buňkách také nazýván RCC1 (regulator of chromosome condensation 1). RanGEF způsobuje disociaci GDP od GTPázy Ran, což umožňuje navázání GTP a asociaci s komplexem importinu β a jeho opětovnou recyklací ven z jádra (Bourne et al. 1990, Bischoff & Ponstingl 1991, Seki et al. 1996). Importin α je transportován ven z jádra separátně navázáním na jaderný exportní protein CAS (cellular apoptosis susceptibility) (Kutay et al. 1997). GTPázové proteiny jsou inaktivovány cytoplazmatickým Ran – GAP1 (Ran GTPase activating protein), který způsobuje hydrolýzu GTP a odpojení Ran od komplexu (F. Ralf Bischoff et al. 1994, Mahajan et al. 1997) (viz obrázek č.2).



Obrázek č. 2: Cyklus jaderného transportu (Chen et al. 2015)

2.2. Druhy importinů u lidí (*Homo sapiens*) a myší (*Mus musculus*)

Lidské a myší importiny se podle své vazebné specifity dělí do několika skupin. Tyto skupiny se označují též jako rodiny. Mezi příslušnými rodinami importinů u myší a lidí byla na základě jejich sekvenční identity prokázaná evoluční souvislost (Malik et al. 1997). Dále je dokázáno, že se zvyšující se komplexností organismu vzrůstá počet genů pro importiny. Například kvasinky (*Saccharomyces cerevisiae*) mají pouze 1 gen pro importin α (Shulga et al. 1996, Tabb et al. 2000), zatímco v lidském genomu bylo pro importin α doposud identifikováno genů 7 (Kimura & Imamoto 2014, Pumroy & Cingolani 2015) a u myši (*Mus musculus*) genů 5, ty se dělí do tří podrodin α -P, α -Q a α -S (Tsuji et al. 1997). Na základě podobnosti primární struktury proteinů se importiny u lidí dělí do tří podrodin α1, α2 a α3 (Köhler et al. 1997, Goldfarb et al. 2004). Byly zkoumány i homologní vztahy mezi těmito skupinami u myší a lidí (Hogarth et al. 2006). Na základě homologie mezi myšími a lidskými importiny byly importiny zařazeny do homologních skupin. Názvosloví různých druhů importinů však není vždy jednoznačné. Proto jsem pro lepší orientaci v názvech a vzájemných vztazích mezi myšími a lidskými importiny vytvořila přehlednou tabulku (viz tabulka 1).

Podrodina	Importiny u lidí	Importiny u myší (*Mus musculus*)
α -S, α1	• Importin α5 (Imp α5), Karyoferin α1 (KPNA1)	• Importin α1, Importin α-S1
	• Importin α7 (Imp α7), Karyoferin α6 (KPNA6)	• Importin α6, Importin α-S2 • Importin α7
	• Importin α6 (Imp α6), Karyoferin α5 (KPNA5)	• Žádný přímý homolog
α -P, α2	• Importin α1 (Imp α1), Karyoferin α2 (KPNA2)	• Importin α2, Importin α-P1
α -Q, α3	• Importin α3 (Imp α3), Karyoferin α4 (KPNA4)	• Importin α4, Karyoferin α4, Importin α-Q1
	• Importin α4 (Imp α4), Karyoferin α3 (KPNA α3)	• Importin α3, Karyoferin α3, Importin α-Q2

Tabulka 1: Homology importinů α u lidí a myší (*Mus musculus)* (Hogarth et al. 2006, Zienkiewicz et al. 2013)

Doposud bylo u savců (*Mammalia*) popsáno více než 20 importinů rodiny β, které mají jak importní, tak exportní funkci (Mosammaparast & Pemberton 2004, Quan et al. 2008, Kimura & Imamoto 2014). Importin β je schopen transportu přenášeného proteinu jak přes adapterový protein importin α, tak i nezávisle na něm (Miyamoto et al. 2012). Samostatně přenáší například protein parathormon (Lam et al. 1999) nebo DNA vazebný protein SRY (sex determing region), který je klíčový v determinaci pohlaví u savců (Forwood et al. 2001).

2.3. Specifita importinů k přenášeným proteinům

Jaderný transport zprostředkovaný importiny je založen na vazebné specifitě importinů k přenášeným proteinům. Proteiny, které jsou přenášeny určitým druhem importinu sdílí jednotný NLS (Kelley et al. 2010a, Kimura et al. 2013).

NLS jsou tvořeny buď jedním shlukem bazickým aminokyselin či dvěma shluky bazických aminokyselin oddělenými krátkými, asi 10 bp dlouhými mezerami (Robbins et al. 1991). První rozpoznaná NLS byla NLS velkého T antigenu Simian viru 40 (McLane & Corbett 2009). NLS se na přenášeném proteinu většinou vyskytují na N nebo C konci, mezi doménami nebo ve flexibilních smyčkách proteinu (Marfori et al. 2011). Specifita přenášených proteinů k transportním receptorům je stále málo prostudovaná, hlavně díky proměnlivosti jejich vzájemných interakcí (Mackmull et al. 2017).

Pro specifický transport přenášených proteinů do jádra vazbou na importiny se na importinech nachází několik vazebných domén. Specifické vazebné domény pro NLS přenášených proteinů jsou umístěny na C terminálních doménách importinů α, kde jsou přítomny tzv. armadilové repetice (ARM) (Yano et al. 1992, Yano et al. 1994, Rexach & Blobel 1995, Weis et al. 1996, Görlich et al. 1996). ARM jsou přibližně 40 bp dlouhé a nesou svůj název podle Armadilo proteinu u *Drosophila melanogaster*, který je homologem savčího β-kateninu (Peifer 1993, Orsulic & Peifer 1996). Na C terminálních doménách importinů α se nacházejí také specifické vazebné sekvence pro proteiny CAS, které slouží při exportu importinů α z jádra (Kutay et al. 1997, Lott & Cingolani 2011).

N terminální domény importinů α obsahují importin β vazebné domény (IBB – importin β binding domain). Tyto domény jsou zodpovědné za vazbu importinů α na importiny β (Kobe 1999, Lott & Cingolani 2011). Importin β má mnohočetné funkce, za které jsou především zodpovědné takzvané HEAT repetice, které mohou prodělávat strukturní změny a měnit tím specifitu vazebných míst pro přenášené proteiny, komplexy jaderných pórů a pro Ran proteiny (Kappel et al. 2010, Forwood et al. 2010).

3. Gametogeneze

Gametogeneze je nezbytný proces pro reprodukci, při kterém se se z diploidních buněk vytvářejí buňky haploidní. Vznik samičích pohlavních buněk se nazývá oogeneze, vznik samčích pohlavích buněk spermatogeneze. Ačkoliv jsou výsledkem obou dějů haploidní pohlavní buňky, oba procesy se od sebe v mnohém liší. Při meiotickém dělení v oogenezi vzniká jedno haploidní vajíčko a 3 pólové buňky, které se obvykle procesu oplození dále neúčastní, zatímco ve spermatogenezi vznikají 4 haploidní rovnocenné buňky - spermie. U samčích gamet je cílem jejich diferenciace hlavně jejich dobrá

pohyblivost, zatímco u samičích je kladen důraz na to, aby obsahovaly všechen potřebný materiál pro metabolismus a vývoj nově vznikajícího embrya (Gilbert 2000a).

3.1. Role importinů v oogenezi

3.1.1. Oogeneze

Během oogeneze dochází jak k vytvoření haploidní buňky z buňky diploidní, tak k vytváření zásob mRNA, enzymů, metabolických substrátů a organel. U různých druhů živočichů je oogeneze velmi rozdílná.

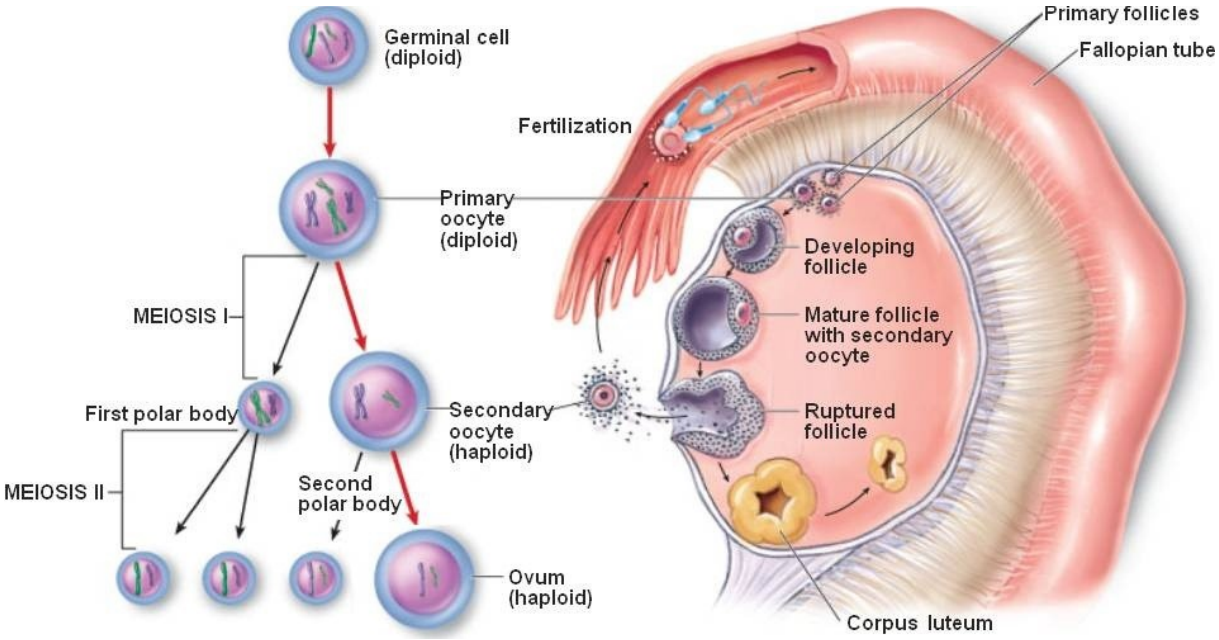
Prekurzory samičích savčích pohlavních buněk jsou oogonie, které se v zárodku dělí pomocí mitózy. U člověka a ostatních savců (*Mammalia*) je vyprodukován pouze omezený počet vajíček, zatímco například u ježovek (*Echinozoa*) a dalších druhů je počet vyprodukovaných vajíček mnohonásobně větší. Na rozdíl od oogonií savců, fungují oogonie ježovek (*Echinozoa*) jako samoobnovující se kmenové buňky po celý život organismu (Gilbert 2000a).

Konečné množství vytvořených zárodečných buněk dosahuje několika milionů, u člověka až 7 milionů (Baker 1963). Tyto zárodečné buňky se po narození nadále mitoticky nedělí a jejich počet naopak klesá. U savců je odhadováno, že až 50-70% oogonií podlehne apoptóze či programované buněčné smrti (Anon 1962, Burgoyne & Baker 1985, McClellan et al. 2003). Z oogonií dále vznikají primární oocyty.

Primární oocyty jsou uloženy v kubickém epitelu, tvořeném tzv. granulózními buňkami. Tyto buňky sekretují glykoproteiny, což kolem primárního oocytu vytváří ochranou vrstvu zvanou *zona pellucida* (Frandson et al. 2009, Kierszenbaum & Tres 2020) . Primární oocyty vstupují do 1. meiotického dělení a jsou zastaveny ve fázi profáze, do dosažení pohlavní dospělosti samic (Jaffe & Egbert 2017). U myší (*Mus musculus*) se jedná o měsíce, u lidí o roky. Některé primární oocyty mohou u lidí být v této fázi zastaveny až do posledního menstruačního cyklu ženy po dobu až 50 let (Gilbert 2000a). Savčí oocyty zastavené ve fázi profáze I obsahují velké jádro, zvané též jako zárodečný váček. Při obnovení meiotického dělení po hormonálním působení dochází k rozpadu zárodečného váčku a kondenzaci chromosomů (Sun et al. 2001, Gao et al. 2002, Miyano et al. 2003).

Výsledkem prvního meiotického dělení je vznik sekundárního oocytu a oddělení prvního pólového tělíska (Alberts et al. 2002). Pólové tělísko se může dále mitoticky dělit a sekundární oocyt je zastaven v metafázi druhého meiotického dělení. Dokončení druhého meiotického dělení nastává po oplození oocytu spermií. Výsledkem druhého meiotického dělení je vznik vajíčka a druhého pólového tělíska. Pólová tělíska jsou v obou meiotických děleních oddělena nerovnoměrným buněčným dělením, z důvodu zachování co největšího objemu cytoplazmy a organel v sekundárním oocytu a vajíčku. Lidská

pólová tělíska po 17-24 hodinách prodělají apoptózu a jejich fragmenty zůstávají v *zona pellucida* (Longo 1997) (viz obrázek č. 3).



Obrázek č. 3: Oogeneze ("Human reproduction" 2010-2019)

Vývoj oocytů je provázen důležitými změnami v cytoplazmě. Dochází například k reorganizaci mitochondrií a endoplazmatického retikula, zvýšení hladin cAMP, růstových faktorů a dalších molekul (Van Blerkom & Runner 1984, FitzHarris et al. 2007, Yamada & Isaji 2011).

Důležitým procesem ve správném vývoji gamet je jejich genová exprese, která se od somatických buněk v mnohém liší. Při prvním meiotickém dělení je oocyt transkripčně neaktivní až do fáze aktivace genomu v zygotě. Z tohoto důvodu zde probíhá exprese genů pouze na translační úrovni a oocyt je zcela závislý na maternálních zásobách mRNA (Bouniol-Baly et al. 1999, Martins & Conti 2018, Esencan & Seli 2019). V oocytech také dochází v různých fázích vývoje k přesunu a specifické segregaci mRNA na místo jejich potřebné exprese (Femino et al. 1998, Susor et al. 2015, Jansova et al. 2018).

3.1.2. Exprese importinů během oogeneze

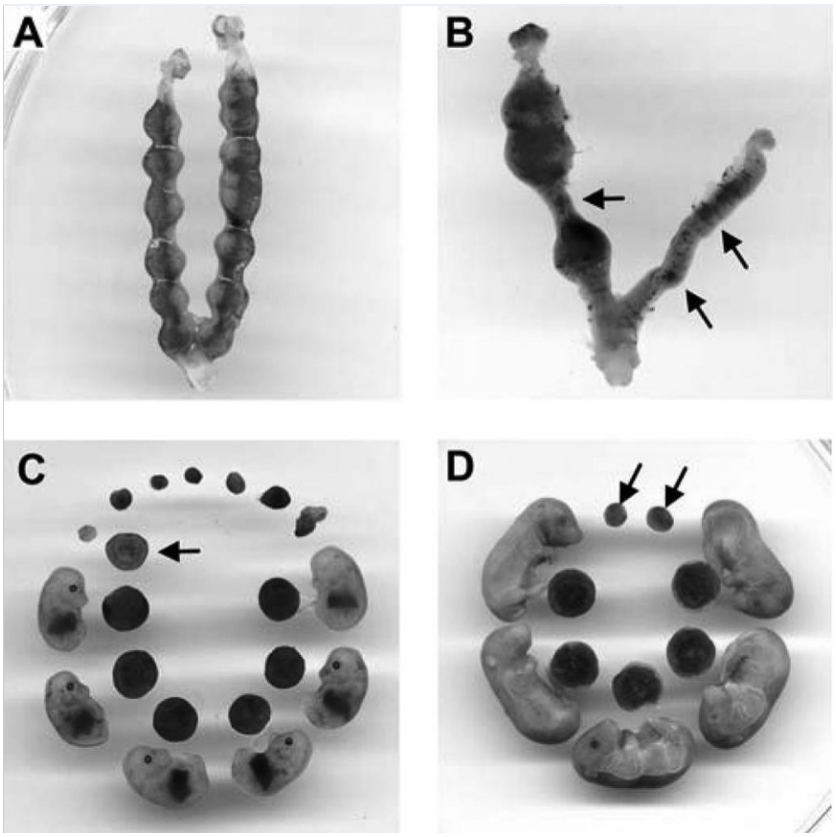
Proces oogeneze je ovlivňován různorodou expresí genů, která závisí především na jaderném transportu transkripčních a chromatin remodelujících faktorů. Tento transport je zprostředkováván karyoferiny. Zkoumání těchto jevů a jejich následná analýza spočívá především v pozorování změn míry transkripce a počtu proteinů, které se exprimují v různých fázích gametogeneze. Pozorované změny exprese naznačují různé funkce karyoferinů ve vývoji oocytu, jak již ve vstupu do meiózy, aktivaci

primordiálního folikulu, tak v dokončení meiotických dělení (Mihalas et al. 2015). Karyoferiny vykazují různé změny exprese ve vývoji zárodečných buněk.

Při pozorování míry transkripce karyoferinů u *Mus musculus* se přišlo na to, že při přechodu samičích zárodečných buněk do meiotického dělení zůstaly jejich hladiny překvapivě poměrně stálé, ale množství konečných proteinů pro karyoferin KPNA2 při vstupu do meiózy bylo zvýšené. Možným vysvětlením je, že při vstupu do meiotického dělení je zvýšená jeho míra translace. Role KPNA2 v tomto ději by mohla spočívat ve specifickém přenášení regulátorů buněčného cyklu do jádra. Hypotézu, že KPNA2 hraje roli v řízení zahájení vstupu samičích zárodečných buněk do meiózy podporuje i skutečnost, že během studia KPNA2 proteinu byla jeho lokalizace před zahájením meiotického dělení převážně cytoplazmatická a po zahájením meiotického dělení byl KPNA2 lokalizován v perinukleárním prostoru (Mihalas et al. 2015).

Karyoferin KPNA7, přítomný u *Homo sapiens*, *Mus musculus* a *Bos taurus* je blízce příbuzný karyoferinu KPNA2 (Kelley et al. 2010b). Při zvýšené expresi proteinu karyoferinu KPNA2 u HeLa buněk se snížila exprese genů histonů, které jsou spojené s replikací (Yasuda et al. 2012). To naznačuje, že při vývoji oocytu mohou sloužit členové rodiny KPNA7 karyoferinů k regulaci jeho genů a účastnit se tak regulace replikace buněk. Karyoferin KPNA7 byl ve fázích primárního oocytu, zygotě a ve fázi dvoubuněčného embrya lokalizován v jádře buněk. U oocytu v metafázi II je KPNA7 dokonce asociován s dělícím vřeténkem (Hu et al. 2010). To, že jsou karyoferiny v této fázi zřejmě velmi důležité podporuje i fakt, že dochází k jejich stálé translační expresi, a to i přes to, že v této fázi v oocytu dochází k výrazné degradaci transkriptomu (Su et al. 2007).

Při vytvoření knock-out myši pro protein karyoferinu KPNA7 byla zvýšena frekvence úmrtnosti plodů (Hu et al. 2010) (viz obrázek č. 4). Tato skutečnost indikuje roli KPNA7 v zachování fertility u *Mus musculus*. Jedním z možných vysvětlení je zapojení KPNA7 v regulaci genové exprese či v epigenetických modifikacích chromatinu embrya.



Obrázek č. 4: Zvýšená úmrtnost plodů *Mus musculus* spojená s knock-outem karyoferinu KPNA7 (Hu et al. 2010)

A: vaječník transgenní Mus musclus po 7,5 dnech vývoje, kdy byla všechna embrya naživu

B: vaječník po 12,5 dnech vývoje s 3 embryi naživu a ostatními uhynulými či absorbovanými

C: typický vrh transgenní Mus musculus po 13,5 dnech vývoje, se 6 plody ze 13 naživu

D: typický vrh transgenní Mus musculus po 16,5 dnech vývoje s 5 plody naživu a 2 mrtvými

Šipky ukazují na absorbovaná embrya

Při přechodu primordiálního folikulu na folikul primární je zvýšená míra exprese karyoferinů KPNA1, KPNA2, KPNA4 a KPNA6, a naopak snížená exprese karyoferinů KPNB1 a KPNA7. U oocytů se těsně před ovulací mění lokalizace karyoferinů KPNA2 a KPNB1 z cytoplasmy k jadernému okraji (Hu et al. 2010). Tyto údaje poukazují na funkci těchto karyoferinů v regulaci vývoje oocytu díky specifickému přenosu proteinů, které hrají roli v regulaci buněčného vývoje (Mihalas et al. 2015). Oproti tomu karyoferin KPNA6 pravděpodobně přispívá ke správnému průběhu ranného embryonálního vývoje. Bylo prokázáno, že při odstranění KPNA6 karyoferinu z oplodněných vajíček dochází ke snížené schopnosti zygoty projít prvním rýhováním a následně ve fázi dvoubuněčného embrya dochází k úplnému zastavení rýhování (Rother et al. 2011). Jedním z možných vysvětlení je, že karyoferin KPNA6 je důležitým faktorem v zygotické aktivaci genomu.

Karyoferiny hrají v reprodukci roli také zřejmě při správném vývoji reprodukčních orgánů. Hypotéza je podpořena studií, kde byl použit myší knock-out pro gen karyoferinu KPNA1 a bylo zjištěno, že u těchto myší dochází ke snížení počtu rostoucích folikulů a zvýšení frekvence hypoplazie. Knock-outované myši měly také až o polovinu snížené hladiny maturovaných folikulů, progesteronu a velmi nízké hladiny transkriptů pro receptor progesteronu (Moriyama et al. 2011). Tyto skutečnosti jasně ukazují, že karyoferin KPNA1 hraje důležitou roli v reprodukci u *Mus musculus*.

3.2. Role importinů ve spermatogenezi

3.2.1. Spermatogeneze, spermiogeneze

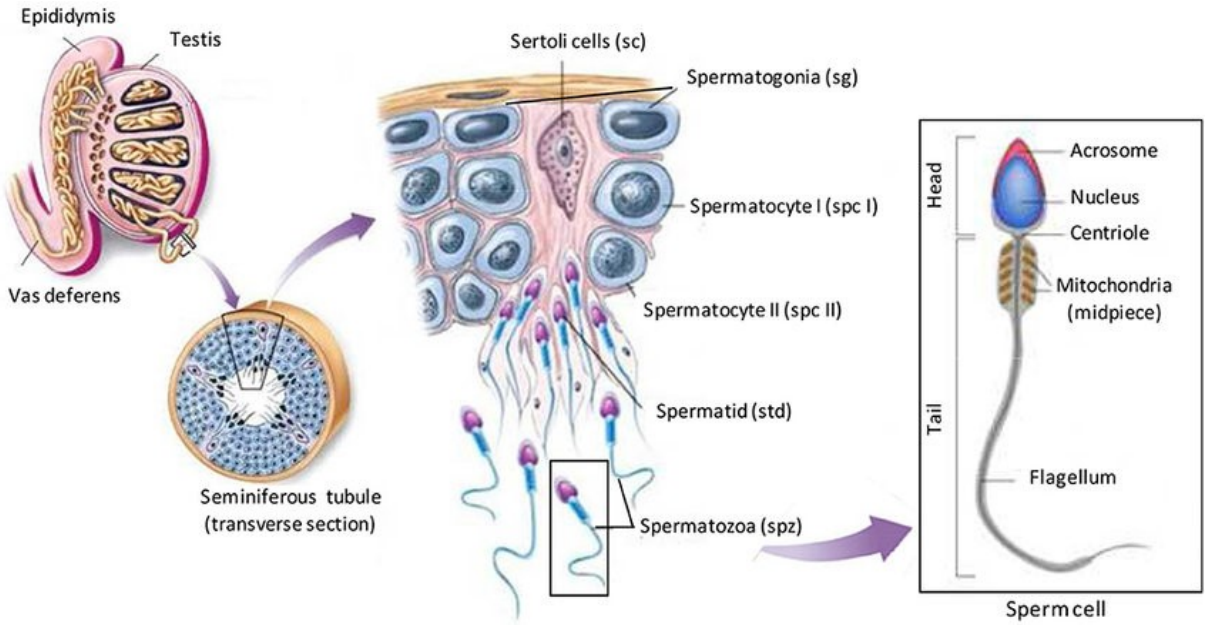
Haploidní samčí gamety vznikají procesem zvaným spermatogeneze, který začíná v pohlavní dospělosti samců a pokračuje po celou dobu dospělosti (Feng et al. 2014). Celý proces spermatogeneze probíhá v zárodečném epitelu semenotvorných kanálků, který je složen ze zárodečných buněk v různých stádiích vývoje, a to spermatogonií, primárních spermatocytů, sekundárních spermatocytů a spermatid. Všechny tyto buňky jsou obklopeny Sertoliho buňkami (Holstein et al. 2003). Sertoliho buňky jsou nezbytné pro správnou přeměnu zárodečných buněk. Zajišťují správné prostředí semenotvorných kanálků a přímý kontakt s diferencujícími buňkami (Griswold 1998). Proces spermatogeneze začíná na bázi semenotvorných kanálků, kde probíhá mitotické dělení spermatogonií. Při další diferenciaci buňky postupují více do středu kanálků až do konečného stádia vývoje, kdy jsou vypuštěny do lumen (de Kretser et al. 2015) (viz obrázek č. 5).

Prekurzory samčích pohlavních buněk jsou takzvané primordiální zárodečné buňky PGC (primordial germ cells). Vznikají již v prenatálním vývoji savců. Strukturně jsou větší než spermatogonie a mají oválné jádro (Jiang 1998). PGC dávají vznik A_1 spermatogoniím, které jsou řazeny mezi kmenové buňky a u samců může tedy spermatogeneze probíhat po celý život. Spermatogonie A_1 se mohou přeměnit na jiný typ spermatogonií, A_2, které jsou navzájem propojeny cytoplazmatickými můstky. Jejich buněčným dělením vznikají A_3 spermatogonie a z nich A_4 spermatogonie. A_4 spermatogonie poté prodělávají buněčnou smrt, nebo se opět replikují a dávají vznik dalším A_4 spermatogoniím, nebo se diferenciují v intermediátní spermatogonie. Z intermediátních spermatogonií vznikají mitotickým dělením tzv. B spermatogonie (Gilbert 2000b) . Spermatogonie B se dále dělí mitotickým dělením a vznikají z nich primární spermatocyty. Z každého primárního spermatocytu, který prochází prvním meiotickým dělením, vznikají dva sekundární spermatocyty. Ty pokračují nadále v dalším, druhém meiotickém dělení. Výsledkem jsou 4 haploidní buňky, spermatidy (Holstein et al. 2003).

Spermatidy jsou stále navzájem propojené cytoplazmatickými můstky, které zajišťují synchronizovaný vývoj a sdílení haploidních produktů genomů mezi sebou (Ventelä et al. 2003). Z důvodu přechodů genových produktů mezi buňkami jsou spermatidy označovány jako buňky funkčně diploidní i přesto, že mají haploidní genom (Braun et al. 1989). Spermatidy spojení cytoplazmatickými můstky ztrácejí

v konečné fázi, kdy se nacházejí na hranici lumen a diferencují se ve spermie procesem zvaným spermiogeneze (Weber & Russell 1987).

Spermiogeneze je nutný proces pro to, aby ze spermatidy, kulaté haploidní buňky, vznikla pohyblivá buňka, schopná najít a oplodnit vajíčko. Dochází v ní k tvorbě akrozomálního vezikulu z Golgiho aparátu, posunu jádra pod akrozomální vezikul, jeho zploštění a kondenzaci. Na druhé straně buňky se tvoří bičík, kolem jehož báze se shromažďují mitochondrie pro tvorbu energie (Gilbert 2000b).



Obrázek č. 5: Spermatogeneze (Allais-Bonnet & Pailhoux 2014)

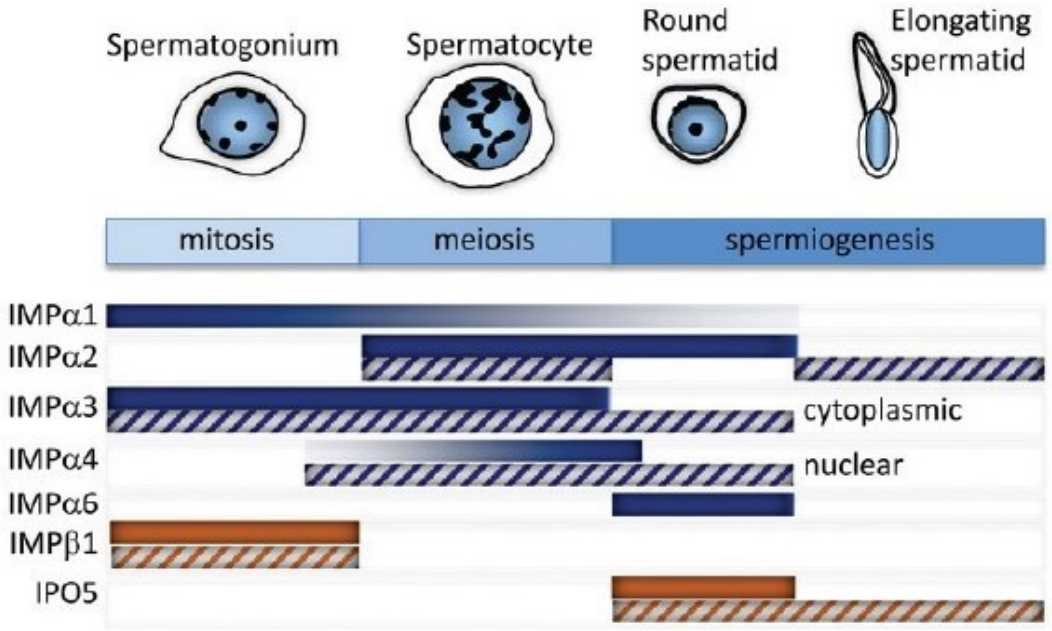
3.2.2. Exprese importinů v průběhu spermatogeneze

Proces spermatogeneze je stejně jako proces oogeneze ovlivňován odlišnými expresemi importinů. Jejich transportní funkce je zde nezbytná pro přenos transkripčních faktorů a jiných proteinů do jádra, což různě ovlivňuje genovou expresi. Studování jaderných změn způsobených přítomností určitých druhů importinů je zajištěno převážně měřením exprese mRNA jistého druhu importinu, či lokalizací samotného proteinu importinu.

Mezi známými proteiny, jejichž transport zajišťují importiny, jsou například transkripční faktory z rodiny TGFβ a transkripční faktor Gli1, který má roli v tzv. Hedgehog dráze (Loveland et al. 2015). Dalším důležitým proteinem ve spermatogenezi je protein Hsp70-2, což je chaperon, který pomáhá správnému uspořádání komplexu cyklinuB1/cdc2 a asociaci se synaptonemálním komplexem (Son et al. 1999).

V poměrně nedávné studii (Loveland et al. 2015) byly studovány míry exprese mRNA všech druhů importinů u *Mus musculus* (viz obrázek č. 6). Bylo zjištěno, že ve varlatech samců od narození po

dospělost nastala největší změna exprese v importinech α1 a α4, kdy největší míra exprese nastala v dospělosti samců.



Obrázek č. 6: Exprese importinů ve spermatogenezi (Loveland et al. 2015)

Plné čáry znázorňují expresi transkriptů importinů, čárkované znázorňují expresi proteinů importinů

Exprese importinu α2 je v počátečních stádiích poměrně stálá (Hogarth et al. 2006). Jeho exprese ale výrazně roste při vstupu zárodečných buněk do meiózy, a hraje tedy pravděpodobně roli při vzniku primárních spermatocytů.

Ve spermatocytech je importin α2 přítomen jak v cytoplazmě, tak v jádře buněk. Ve fázi prodlužujících se spermatid se vyskytuje převážně v cytoplazmě, zatímco ve fázi oválných spermatid je ho v cytoplazmě přítomno mnohem méně, což poukazuje na roli importinu α2 v přechodu mezi těmito fázemi spermatid (Miyamoto et al. 2013). Bylo také vypozorováno, že v zárodečných buňkách hlodavců jsou importin α3 a importin α4 přítomny výhradně v cytoplazmě, zatímco ve stádiu spermatocytů a spermatid jsou lokalizovány v jádře (Hogarth et al. 2007, Whiley et al. 2012, Miyamoto et al. 2013). Z tohoto neobvyklého umístění je vyvozena pravděpodobná role importinu α4 ve zvládání stresorů, ať již oxidativních či jiných, v semenotvorných kanálcích (Loveland et al. 2015). Tuto hypotézu podporuje i skutečnost, že exprese mRNA importinu α4 v raných stádiích spermatogeneze je velmi nízká a výrazně narůstá v pozdních fázích meiozy zárodečných buněk a v haploidních spermatidách (Hogarth et al. 2006).

Importin α3 je nepatrně exprimován v mitotických fázích spermatogeneze a v raných meiotických děleních zárodečných buněk a ovlivňuje proto zřejmě zatím neznámým způsobem průběh tohoto dělení. Podobně jako u importinu α3 je u spermatogonií a spermatocytů u *Rattus rattus* vysoká exprese

importinu α1. Ve stádiu raných meiotických dělení a spermatid je hojně exprimován importin α6. Importin α1 se na základě těchto informací podílí na diferenciaci spermatogonií a spermatocytů, a importin α6 je důležitý při průběhu meiózy ve varlatech dospělých potkanů *Rattus rattus* (Hogarth et al. 2006).

Proces spermatogeneze je ovlivňován nejen importiny α, ale také importiny β. Například člen rodiny importinů β, importin 13, vykazuje u *Mus musculus* vysokou expresi mRNA ve fázi pachytené, jak u samců, tak u samiček. U samiček je tato vysoká exprese ve vaječnících plodu a u samců v dospělosti. Tato skutečnost naznačuje, že importin 13 je důležitý pro přechod zárodečných buněk do meiózy (Yamaguchi et al. 2006). Dalším důležitý člen rodiny importinů β je imporitn β1, který vykazuje vysokou expresi jak proteinu, tak mRNA ve spermatogoniích a spermatocytech. Na rozdíl od importinu β1 je mRNA importinu IPO5 (importin β3/RanBP5), který byl jedním z prvních zkoumaných importinů β, exprimována až v pozdějších stádiích. Nejvyšší expresi vykazuje IPO5 ve fázi oválných spermatid (Loveland et al. 2015).

Importiny hrají také důležitou roli ve spermiogenezi. V rané fázi spermiogeneze u *Mus musculus* byla zjištěna přítomnost importinu α6 na vnějším povrchu akrozomálního váčku. Časem se ale importin α6 přesunul do prostoru mezi vnitřní akrozomální membránou a jadernou membránou, což naznačuje jeho roli v přepravě váčků mezi Golgiho aparátem a jadernou membránou (Tran et al. 2012). Člen rodiny importinů β, importin 4, je hojně exprimován ve fázi spermatocytů a spermatid. Jeho funkce pravděpodobně spočívá v reorganizaci jádra přesunem tzv. transiton protein 2, který nahrazuje histony ve spermatidách, do jádra (Pradeepa et al. 2008).

Hladiny exprese mRNA importinů α2, α4 a α6 jsou vysoké ve spermatocytech, ne ale v buňkách mitotických. Jelikož u meiotických buněk dochází k rozpadu jaderné membrány, není u nich jaderný transport nutný (Hogarth et al. 2006). Je proto zřejmé, že importiny zde figurují i v jiných procesech. Tuto hypotézu potvrzuje i fakt, že pro klasický jaderný transport, kdy dojde k navázání přenášeného proteinu na importin α a následnému napojení na importin β by byl očekáván poměr importin α:importin β zhruba 1:1. Ve skutečnosti ale tento poměr neplatí. Hladiny importinů α2, α3 a α4 jsou ve spermatocytech až šestkrát vyšší, ve spermatidách zhruba třikrát (Loveland et al. 2015).

4. Role importinů v časném embryonálním vývoji

Kromě procesů oogeneze a spermatogeneze se importiny podílejí také na průběhu časného embryonálního vývoje. Buněčná diferenciace je regulována transportem různých přenášených proteinů do jádra. Transport těchto přenášených proteinů závisí na specifické vazbě k různým druhům

importinů a změnami expresí importinů v různých fázích vývoje se tedy regulují mnohé procesy v buňce.

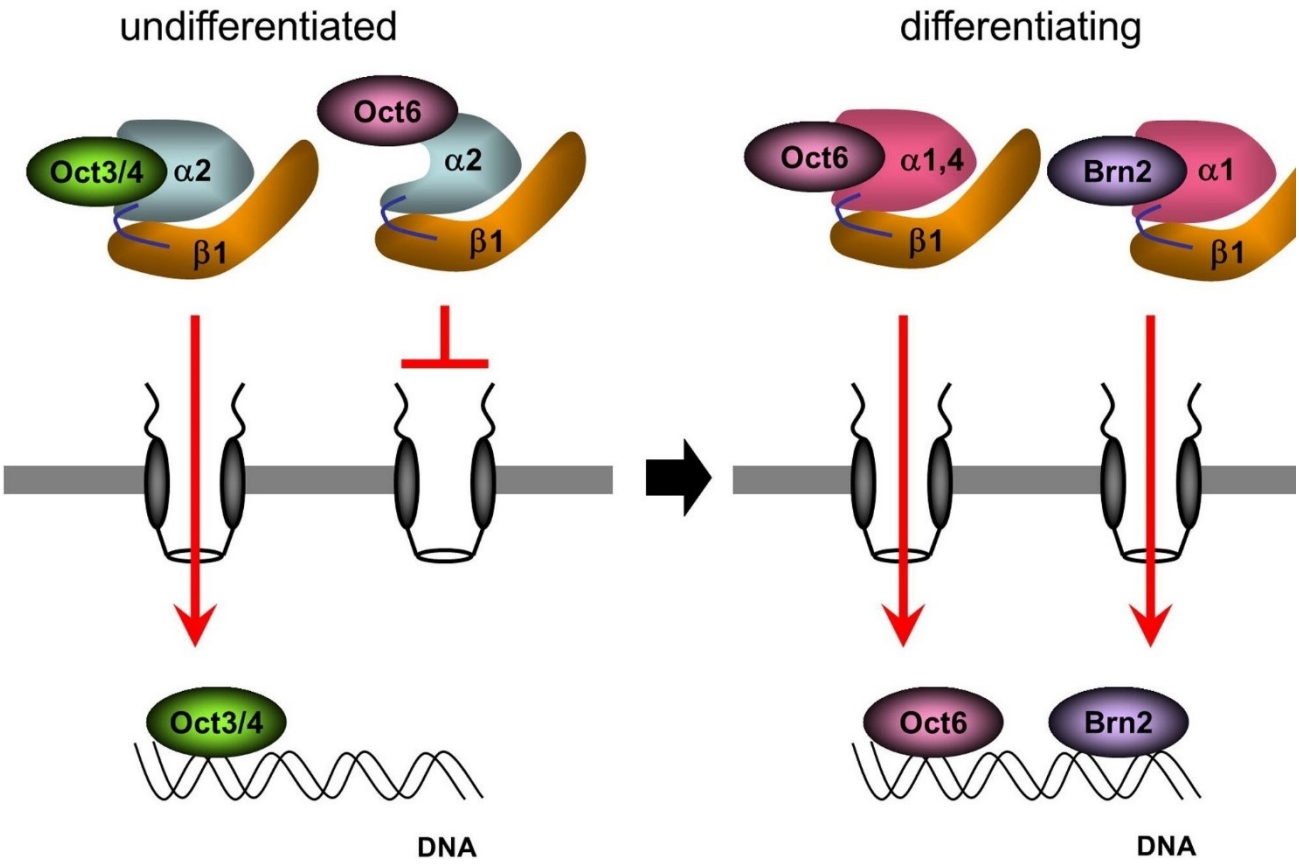
4.1. Podíl importinů na diferenciaci kmenových embryonálních buněk

Kmenové buňky jsou buňky pluripotentní. Jsou tedy schopné diferencovat se v jakýkoliv typ buněk kromě buněk trofoblastu (Martin 1981, Gardner 1985, Reik & Azim Surani 2015). Diferenciace kmenových buněk v buňky jiného typu je podmíněna působením různých transkripčních faktorů, které importiny specificky přenášejí do jádra.

Pluripotence buněk je především regulována transkripčním faktorem Oct4. Úplný knock-out tohoto transkripčního faktoru zapříčiňuje ztrátu pluripotence embryonálních kmenových buněk, ale jeho snížená exprese způsobuje pozitivní regulaci pluripotence (Karwacki-Neisius et al. 2013). Během diferenciace kmenových embryonálních buněk je hojně exprimován importin α1, který při nadměrné expresi transkripční faktor Oct4 pozitivně ovlivňuje, a tím zachovává pluripotenci (Yasuhara et al. 2007).

Dalším důležitým transkripčním faktorem je Sox2 (SRY), který je společně s transkripčním faktorem Oct4 také zodpovědný za udržení pluripotence buněk. Oba tyto transkripční faktory ovlivňují svou expresi negativní zpětnou vazbou, navázáním na své vlastní promotory (Chew et al. 2005). Pro zachování pluripotence buněk je nezbytný také tzv. LIF (leukemia inhibitory factor), který aktivací JAK-STAT kináz zajišťuje sebeobnovu kmenových embryonálních buněk (Hirai et al. 2011). Jedním z nejdůležitějších procesů, na kterém se importiny podílejí, je diferenciace nervové trubice. Mají na něj vliv zejména transkripční faktory z rodiny POU, například transkripční faktor Oct6 (Suzuki et al. 1990).

Důležitým krokem v diferenciaci nervové trubice u *Mus musculus* je změna exprese jednoho typu importinu α2 na expresi importinu α1 u embryonálních kmenových buněk (viz obrázek č. 7) (Yasuhara et al. 2013a). Vytvoření knock-out myši pro importin α2 vedlo ke snížení transportu pluripotenci udržujících transkripčních faktorů, Oct4, Nanog a Sox2, což způsobilo diferenciaci embryonálních kmenových buněk v buňky diferencované. Importin α2 má také funkci v negativní regulaci umístění transkripčního faktoru Oct6, který je sice v embryonálních kmenových buňkách přítomný, ale je lokalizován v cytoplazmě. Když se buňka začne diferencovat, Oct6 se cyklicky přemisťuje z cytoplazmy do jádra a zpět (Yasuhara et al. 2007). Zvýšená exprese Oct6 má také roli ve vývoji mozku (Suzuki et al. 1990, Yasuhara et al. 2007).



Obrázek č. 7: Změna exprese importinu α2 na α1 při diferenciaci neurální trubice (Yasuhara et al. 2013b)

Na udržení pluripotence a diferenciaci embryonálních kmenových buněk se kromě importinů α podílejí také importiny β. U míry exprese různých druhů importinů β v embryonálních kmenových buňkách a v progenitorových zárodečných buňkách u *Mus musculus* jsou zaznamenány velké rozdíly jejich expresi u tkání neurálního ektodermu a mesoendodermu (Sangel et al. 2014). V buňkách neurálního ektodermu je velmi vysoká exprese importinu IPO13, ale také dalších importinů (RanBP6, RanBP9, RanBP10 a dalších). V buňkách mesoendodermu je nejhojnějším importinem RanBP6. Knock-out genů pro importiny RanBP17, XPO4 a IPO7 ovlivňuje produkci transkripčních faktorů Oct4, Sox2 a faktoru Nanog, který je další z faktorů, co se podílí na udržení pluripotence buněk. Knock-out u všech tří typů těchto importinů β vede ke snížení hladiny transkripčního faktoru Nanog a poukazuje tedy na pozitivní ovlivňování těchto importinů v udržení pluripotence embryonálních kmenových buněk. Knock-out XPO4 a RanBP17 způsobuje zvýšení exprese transkripčního faktoru Oct4, a naopak snížení exprese Sox2. Tyto skutečnosti prokazují fakt, že XPO4 a RanBP17 svou expresí ovlivňují diferenciaci endodermu v časném embryonálním vývoji.

4.2. Souvislost mezi distribucí importinů v buňce a maturací zárodečných buněk

Změny v lokalizaci importinů v zárodečných buňkách ovlivňují procesy diferenciace v savčích pohlavních orgánech. Importiny zde zajišťují transport důležitých transkripčních faktorů, které svou aktivitou řídí vývoj buněk. Z proximálních epiblastových buněk se v raných fázích vývoje tvoří primordiální zárodečné buňky (Gardner 1978). Primordiální zárodečné buňky poté putují do genitálních lišt (Clark & Eddy 1975) a během tohoto přesunu proliferují. V genitálních lištách se dále dělí a diferencují do samčích či samičích gonád (Tam & Snow 1981).

Importin β1 transportuje DNA vazebné proteiny Sry a Sox9, u proteinu Sry bez nutnosti navázání na importin α (Forwood et al. 2001, Preiss et al. 2001). Protein Sry je nezbytný pro vývoj samčích pohlavních orgánů (Koopman et al. 1991) a aktivuje transkripci Sox9, který je exprimován především v Sertoliho buňkách varlat, kde řídí jejich proliferaci (Silva et al. 1996).

Na maturaci zárodečných buněk má podíl také importin 13, který patří do rodiny importinů β (Weis 2003) a u lidí slouží jak k importu do jádra, tak k exportu z jádra. Transkripty importinu 13 mají dva různé produkty, dlouhý, tzv. long form Ipo13 (L-Ipo13) a krátký, testis-specific short form Ipo13 (TS-Ipo13) (Yamaguchi et al. 2006). U primordiálních zárodečných buněk *Mus musculus* vykazuje L-Ipo13 expresi v migrujících primordiálních zárodečných buňkách u obou pohlaví (Yamaguchi et al. 2006). U samiček je ve vaječnících plodu jeho exprese výrazně zvýšená při vstupu buněk do meiózy, nejvíce ve fázi pachytené. Při jeho snížené expresi dochází ke zpomalení průchodu buňky profází I meiózy a snížení množství proteinu UBC9 (ubiquitin-conjugating enzyme) v jádře, který je potřebný pro kondenzaci a segregaci chromosomů (Yamaguchi et al. 2006, Nacerddine et al. 2005). U samců je L-Ipo13 nejvíce exprimován při vstupu spermatocytů do fáze pachytené a po této fázi je jeho exprese výrazně nižší. Tyto změny expresí v různých fázích meiózy dokazují, že importin 13 transportuje důležité regulátory, které ovlivňují postup meiózy (Yamaguchi et al. 2006).

Významnými importiny, které svým působením ovlivňují maturaci zárodečných buněk jsou také importiny α1, α3, α4 a RanBP5 (importin β3). Umístění importinu α3 u postnatálních varlat *Mus musculus* je výhradně cytoplazmatické u většiny typů buněk, s mírnou jadernou lokalizací u Sertoliho buněk. Oproti tomu importin α4 vykazuje v první fázi spermatogeneze a dospělých varlatech *Mus Musculus* v zárodečných a Sertoliho buňkách jaderné umístění. Spermatogonie mladých jedinců nevykazují žádný signál importinu α4 (Hogarth et al. 2007). Importiny α3 a α4 jsou známy pro transport transkripčního faktoru NF-κB do jádra, který má roli v diferenciaci buněk, apoptóze a buněčné imunitě (Baeuerle & Baltimore 1996, Ghosh et al. 1998). NF-κB je přítomen od spermatocytů ve fázi pachytené až do dospělosti (Lilienbaum et al. 2000).

Rozdílné umístění importinů v jádře ukazuje na jejich funkci v důležitých fázích vývoje. Jelikož importin α4 se v postnatálních varlatech nachází v jádře, ale importin α3 ne, je pravděpodobné, že každý hraje ve vývoji odlišnou roli, která nemusí záviset pouze na transportu proteinů do jádra (Hogarth et al. 2007). Umístění importinu RanBP5 v zárodečných buňkách plodu samců i samic se cyklicky přesouvá do jádra a zpět do cytoplazmy. U samic se ve fázi gonocytů vyskytuje v jádře a ve fázi oogonií se přesouvá do cytoplazmy. Tento přechod nastává po ukončení mitotických dělení a vstupu do meiózy a RanBP5 má v těchto přechodech pravděpodobně svou funkci. U samců se naopak přesouvají z cytoplazmy do jádra ve fázi zastavení mitózy gonocytů. RanBP5 tedy svou expresí a umístěním ovlivňuje změny v buněčném cyklu buňky (Hogarth et al. 2007).

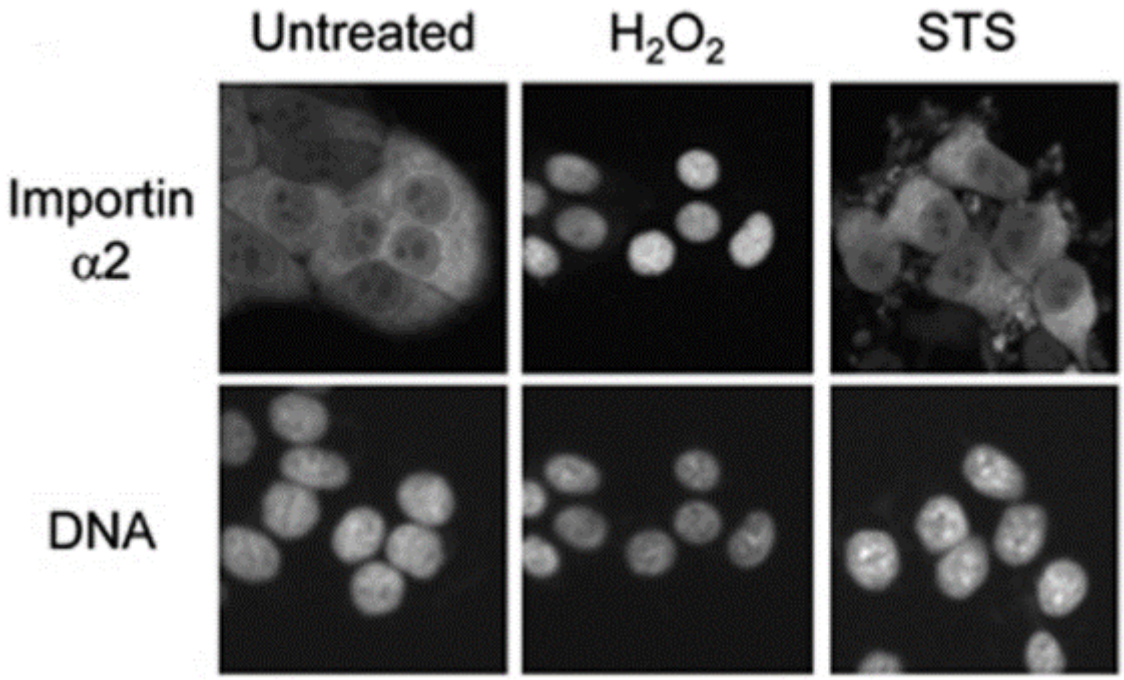
5. Importin jako obrana proti oxidativnímu stresu v souvislosti se samčí neplodností

V roli samčí neplodnosti, ale i v mnoha jiných procesech v těle, hrají roli tzv. reaktivní oxidové radikály (ROS). ROS mohou sloužit jako sekundární poslové v buněčné signalizaci (Finkel 1998), ale ve zvýšeném množství působí na buňku velmi negativně a způsobují tzv. oxidativní stres. ROS vznikají během mnoha metabolických procesů v buňce, a to zejména během oxidativní fosforylace, která probíhá v mitochondriích (Muller 2000). Škodlivý účinek ROS je dán především přítomností nespárovaných elektronů, které následně oxidují například lipidové membrány, proteiny a nukleové kyseliny a poškozují tím jejich fyziologickou funkci (Ochsendorf 1999). Vystavení buněk oxidativnímu stresu, například H_2O_2, UV záření či tepelnému šoku, způsobuje snížení buněčné koncentrace hladin ATP, což vede k narušení RanGTP-GDP gradientu, který je nezbytný pro správnou funkci importinů (Miyamoto et al. 2004, Loveland et al. 2015). V samčích reprodukčních orgánech jsou hlavními producenty ROS spermie a leukocyty, které využívají ROS k destrukci patogenů (Aitken et al. 1994, Garrido et al. 2004, Said et al. 2005). ROS jsou ve spermiích vytvářeny převážně enzymem nikotinamid-adenin dinukleotid fosfát oxidázou (Gavella & Lipovac 1992), která je umístěna v cytoplazmě spermií a nikotinamid adenin dinukleotid oxidázo-dependentní oxidoreduktázou, která má svou funkci v respiračním řetězci a je umístěna poblíž krčku spermie (Said et al. 2005).

Spermie byly vůbec první buňky, u kterých byla objevena produkce ROS a bylo zjištěno, že jejich zvýšené koncentrace výrazně snižují pohyblivost spermií (MacLeod 1943). Pro zabránění negativních účinků ROS je ve spermiích obsaženo hojné množství antioxidantů, které ROS inaktivují. Mezi nejhojnější antioxidanty patří například vitamíny, enzymy superoxid dismutáza, glutathion peroxidáza a kataláza (Fujii et al. 2003). Spermie se sníženými koncentracemi antioxidantů (retinolu a α-tokoferolu) vykazují zvýšené oxidační poškození a sníženou pohyblivost (Kao et al. 2008). U ROS je prokázána schopnost narušování membrán spermií, jelikož oxidují jejich nenasycené mastné kyseliny

a tím snižují jejich ohebnost (Colagar et al. 2013). Existuje mnoho příčin zvýšení produkce ROS. Mezi nejvýznamnější patří kouření, které zapříčiňuje nárůst počtu seminálních leukocytů (Saleh et al. 2002). Ke zvýšení hladin ROS přispívá také ethanol, obsažen v alkoholických nápojích. Jeho odbourávání v játrech zvyšuje aktivitu cytochromu P450, jehož činností vznikají ROS. Alkohol je také spojen se snížením hladin antioxidantů v těle (Wu & Cederbaum 2003). K významným producentům ROS patří ale také například extrémní fyzická aktivita, díky tvorbě ROS v aerobním metabolismu (Peake et al. 2007). Nedostatek pohybu, obezita a vystavení varlat nadměrnému teplu způsobují zvýšení teploty v samčích pohlavních orgánech. To má za následek narušení DNA, apoptózu zárodečných buněk, autofágii a zvýšení hladin ROS (Durairajanayagam et al. 2015). Ke snížení antioxidantů a zvýšení hladin ROS vede také psychologický stres (Clarke 1999). K oxidativnímu stresu napomáhají také patogeny urogenitálního traktu, které způsobují buněčnou odpověď zvýšením hladiny leukocytů, které svou činností produkují vysoké hladiny ROS (Ochsendorf 1999).

Importiny hrají roli ve zvládání buněčných stresorů a regulaci buněčných procesů. Působením stresorů a následným narušením Ran gradientu dochází u HeLa buněk k akumulaci importinu α2 a α4 v jádře. Lokalizace importinu α2 v jádře vede ke zvýšení transkripce mRNA pro serin/threonin kinázu 34. Neustálá exprese této kinázy v podmínkách oxidativního stresu však způsobuje buněčnou smrt (Yasuda et al. 2012). Importiny proto svou expresí příslušnou kinázu zatím neznámým způsobem regulují a mohou tímto způsobem ovlivňovat buněčné procesy i u savčích gamet (viz obrázek č. 8).



Obrázek č. 8: Oxidativním stresem způsobená akumulace importinu α2 v jádře (Yasuda et al. 2012)

Funkce importinů ve zvládání oxidativního stresu byla prokázána také u importinu α4 ve spermatidách (Young et al. 2013). Zvýšená exprese importinu α4 u haploidních zárodečných buněk *Mus musculus* nemá za normálních podmínek vliv na průběh spermatogeneze ani na tvar spermií. Při vystavení buněk se zvýšenou expresí importinu α4 H_2O_2 nevykazují transgenní myši se zvýšenou expresí importinu sníženou fertilitu a jejich zárodečné buňky zvládají oxidativní stres až o 30 % lépe, než při knock-outu tohoto importinu. Na základě dosažených poznatků je vyvozeno, že importiny svou funkcí nejspíše ovlivňují expresi proteinů, které jsou důležité pro zvládání oxidativního stresu v samčích zárodečných buňkách.

6. Závěr

Importiny jsou proteiny, které se jako přenašeče jiných proteinů podílí na jejich aktivním transportu z cytoplazmy do jádra přes jaderné póry. Mezi proteiny, které importiny do jádra transportují mimo jiné patří transkripční faktory a další proteiny účastnící se genové exprese. Importiny se tak mohou podílet na řízení tohoto děje a díky této schopnosti jsou důležitými faktory, které ovlivňují reprodukci savců. Během reprodukčního procesu savců je pro jeho správný průběh nutná regulace genové exprese během vývoje zárodečných buněk, maturace gamet a také během formování diploidní zygoty a následně embrya a ukazuje se, že na všech těchto dějích se importiny podílejí.

Specifita jednotlivých importinů k přenášeným proteinům je klíčovým faktorem v jejich roli při ovlivňování genové exprese. Homology importinů se rozdělují do několika skupin podle jejich sekvenční identity a jednotlivé homology importinů rozeznávají různé NLS přenášených proteinů.

Role importinů v gametogenezi je studována zejména za pomocí detekce změn v hladinách exprese odlišných druhů importinů v průběhu vývoje gamet. Na základě těchto změn jsou pak vyvozovány vztahy importinů ke klíčovým buněčným procesům. Jakou roli přesně importiny v těchto procesech hrají se zatím většinou přesně neví. Nicméně je známo, že importiny se v průběhu oogeneze podílí například na přechodu zárodečných buněk do meiotického dělení transportem proteinů, které regulují buněčný cyklus. Importiny mají na základě vypozorovaných změn díky tvorbě knock-out myší velmi pravděpodobně funkci v regulaci dělení buněk. Svým působením zatím neznámým způsobem ovlivňují expresi genů histonů, které v replikaci působí. To, že importiny expresi těchto histonů ovlivňují potvrzuje i fakt, že příbuzný importin ze stejné rodiny je v průběhu meiózy asociován s dělícím vřeténkem. Důležitou skutečností je také to, že importiny prokazatelně ovlivňují průběh vývoje plodů u samic *Mus musculus* a při absenci příslušných druhů importinů dochází k infertilitě a úhynu plodů. Následné zkoumání příčin této infertility u myší by mohlo být přínosné pro další výzkumy neplodnosti u savců.

Importiny hrají roli při vstupu do meiotického dělení také v procesu spermatogeneze. Nesmí být opomíjeno, že regulaci buněčných dělení ovlivňují nejen importiny α, ale také importiny β. Další funkce importinů ve spermatogenezi byly odvozeny ze změn lokalizace importinů během jejích odlišných fázích. Je také známo, že importiny hrají roli v přeměně kulatých spermatid na spermatidy prodlužující. Importiny se účastní také v procesu spermiogeneze, a to v reorganizaci jádra a přepravě váčků mezi Golgiho aparátem a jadernou membránou. Určité druhy importinů se vyskytují ve spermatocytech, které již neprocházejí mitotickým, ale pouze meiotickým dělením a z důvodu nepřítomnosti jaderné membrány u nich jaderný transport již není nutný. Z tohoto vyplývá, že importiny musejí prozatím záhadným způsobem ovlivňovat i tato dělení.

Esenciálním procesem ve vývoji savců je správný průběh jejich časného embryonálního vývoje. Tomuto ději dávají úplný základ tzv. embryonální kmenové buňky, které jsou pluripotentní. Na udržení jejich pluripotence se účastní právě importiny. Importiny napomáhají k udržení tohoto stavu zejména transportem pluripotenci udržujících transkripčních faktorů. Jejich významnou funkcí v časném embryonálním vývoji je ale v pozdějších stádiích transport odlišných transkripčních faktorů, které ovlivňují diferenciaci pluripotentních buněk v buňky již terminálně diferencované. Významným příkladem je transice embryonálních kmenových buněk v buňky nervové trubice, kde dochází ke změně exprese jednoho typu importinu (α2) na jiný typ (α1), který přenáší potřebné transkripční faktory.

Importiny se dále podílí na maturaci zárodečných buněk. Nejvýznamnějším příkladem tohoto děje je funkce importinu β1 při transportu DNA vazebného proteinu Sry, který ovlivňuje vývoj samčích pohlavních orgánů.

Velmi zajímavá je i role importinů při zvládání oxidativního stresu spermiemi. Se zvyšující se infertilitou v populaci narůstá zájem o výzkumy, které řeší tento globální problém a následný další výzkum zaměřený na importiny by mohl být pro řešení tohoto problému velmi přínosný.

V této práci je shrnuto a diskutováno mnoho faktů, které nezvratně ukazují, že importiny mají na správný průběh reprodukce podstatný vliv a uplatňují se v mnoha jejích fázích. Doufám, že se v budoucnu objasní mnohé další skutečnosti, které pomohou k lepšímu pochopení tohoto tématu a napomohou k jejich dalším praktickým užitím.

7. Seznam obrazových příloh

Obrázek č. 1: Stavba jaderného póru 4
Obrázek č. 2: Cyklus jaderného transportu 5
Obrázek č. 3: Oogeneze 9
Obrázek č. 4: Zvýšená úmrtnost plodů *Mus musculus* spojená s knock-outem karyoferinu KPNA7 11
Obrázek č. 5: Spermatogeneze 13
Obrázek č. 6: Exprese importinů ve spermatogenezi 14
Obrázek č. 7: Změna exprese importinu α2 na α1 při diferenciaci neurální trubice 17
Obrázek č. 8: Oxidativním stresem způsobená akumulace importinu α2 v jádře 20

8. Seznam použité literatury

Aitken, R. J., K. West, and D. Buckingham. 1994. "Leukocytic Infiltration into the Human Ejaculate and Its Association with Semen Quality, Oxidative Stress, and Sperm Function." *Journal of Andrology* 15(4):343–52.

*Alberts, Bruce, Alexander Johnson, Julian Lewis, Martin Raff, Keith Roberts, and Peter Walter. 2002. "Eggs."

Allais-Bonnet, AurÃ©lie and Eric Pailhoux. 2014. "Role of the Prion Protein Family in the Gonads." *Frontiers in Cell and Developmental Biology* 2.

Allen, Nadia P. C., Lan Huang, Al Burlingame, and Michael Rexach. 2001. "Proteomic Analysis of Nucleoporin Interacting Proteins." *Journal of Biological Chemistry* 276(31):29268–74.

Allen, T. D., J. M. Cronshaw, S. Bagley, E. Kiseleva, and M. W. Goldberg. 2000. "The Nuclear Pore Complex: Mediator of Translocation between Nucleus and Cytoplasm." *Journal of Cell Science* 113(10).

*Anon. n.d. "Human Reproduction | EMedicalPrep." cit. 26. 5. 2020 (https://www.emedicalprep.com/study-material/biology/reproduction/human-reproduction/).

Baeuerle, Patrick A. and David Baltimore. 1996. "Nf-KB: Ten Years After." Pp. 13–20 in *Cell*. Vol. 87. Cell Press.

Baker, T. G. 1963. "A Quantitative And Cytological Study Of Germ Cells In Human Ovaries." *Proceedings of the Royal Society of London. Series B, Containing Papers of a Biological Character. Royal Society (Great Britain)* 158:417–33.

Beaumont, Mandl 1962. "A Quantitative and Cytological Study of Oogonia and Oocytes in the Foetal and Neonatal Rat." *Proceedings of the Royal Society of London. Series B. Biological Sciences* 155(961):557–79.

Beck, Martin, Friedrich Förster, Mary Ecke, Jürgen M. Plitzko, Frauke Melchior, Günther Gerisch, Wolfgang Baumeister, and Ohad Medalia. 2004. "Nuclear Pore Complex Structure and Dynamics Revealed by Cryoelectron Tomography." *Science* 306(5700):1387–90.

Bischoff, F. Ralf, Christian Klebe, Jürgen Kretschmer, Alfred Wittinghofer, and Herwig Ponstingl. 1994. "RanGAP1 Induces GTPase Activity of Nuclear Ras-Related Ran." *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 91(7):2587–91.

Bischoff, F Ralf, Christian Klebet, Jurgen Kretschmer, Alfred Witringhofert, Herwig Ponstingl, *

Abteilung, and Strukturelle Biologie. 1994. *RanGAP1 Induces GTPase Activity of Nuclear Ras-Related Ran (GTPase-Activating Protein/RCCl/TC4/G2 Checkpoint)*. Vol. 91.

Bischoff, F. Ralf and Herwig Ponstingl. 1991. "Catalysis of Guanine Nucleotide Exchange on Ran by the Mitotic Regulator RCC1." *Nature* 354(6348):80–82.

Van Blerkom, Jonathan and Meredith N. Runner. 1984. "Mitochondrial Reorganization during Resumption of Arrested Meiosis in the Mouse Oocyte." *American Journal of Anatomy* 171(3):335–55.

Bouniol-Baly, Christine, Lahcen Hamraoui, Juliette Guibert, Nathalie Beaujean, Maria S. Szöllösi, and Pascale Debey. 1999. "Differential Transcriptional Activity Associated with Chromatin Configuration in Fully Grown Mouse Germinal Vesicle Oocytes1." *Biology of Reproduction* 60(3):580–87.

Bourne, Henry R., David A. Sanders, and Frank McCormick. 1990. "The GTPase Superfamily: A Conserved Switch for Diverse Cell Functions." *Nature* 348(6297):125–32.

Bourne, Henry R., David A. Sanders, and Frank McCormick. 1991. "The GTPase Superfamily: Conserved Structure and Molecular Mechanism." *Nature* 349(6305):117–27.

Braude, Peter, Hugh Pelham, Gin Flach, and Rita Lobatto. 1979. "Post-Transcriptional Control in the Early Mouse Embryo [30]." *Nature* 282(5734):102–5.

Braun, Robert E., Richard R. Behringer, Jacques J. Peschon, Ralph L. Brinster, and Richard D. Palmiter. 1989. "Genetically Haploid Spermatids Are Phenotypically Diploid." *Nature* 337(6205):373–76.

Burgoyne, P. S. and T. G. Baker. 1985. "Perinatal Oocyte Loss in XO Mice and Its Implications for the Aetiology of Gonadal Dysgenesis in XO Women." *Journal of Reproduction and Fertility* 75(2):633–45.

Callan, H. G. and S. G. Tomlin. 1950. "Experimental Studies on Amphibian Oocyte Nuclei. I. Investigation of the Structure of the Nuclear Membrane by Means of the Electron Microscope." *Proceedings of the Royal Society of London. Series B, Containing Papers of a Biological Character. Royal Society (Great Britain)* 137(888):367–78.

Chew, J. L., Y. H. Loh, W. Zhang, X. Chen, W. L. Tam, L. S. Yeap, P. Li, Y. S. Ang, B. Lim, P. Robson, and H. H. Ng. 2005. "Reciprocal Transcriptional Regulation of Pou5f1 and Sox2 via the Oct4/Sox2 Complex in Embryonic Stem Cells." *Molecular and Cellular Biology* 25(14):6031–46.

Chook, Yuh Min and Günter Blobel. 1999. "Structure of the Nuclear Transport Complex Karyopherin-

B2-Ran·GppNHp." *Nature* 399(6733):230–37.

Cingolani, Gino, Carlo Petosa, Karsten Weis, and Christoph W. Müller. 1999. "Structure of Importin-β Bound to the IBB Domain of Importin-α." *Nature* 399(6733):221–29.

Clark, J. M. and E. M. Eddy. 1975. "Fine Structural Observations on the Origin and Associations of Primordial Germ Cells of the Mouse." *Developmental Biology* 47(1):136–55.

Clarke, R. N. 1999. "Relationship between Psychological Stress and Semen Quality among In-Vitro Fertilization Patients." *Human Reproduction* 14(3):753–58.

Colagar, Abasalt Hosseinzadeh, Fatemeh Karimi, and Seyed Gholam Ali Jorsaraei. 2013. "Correlation of Sperm Parameters with Semen Lipid Peroxidation and Total Antioxidants Levels in Astheno- and Oligoasheno- Teratospermic Men." *Iranian Red Crescent Medical Journal* 15(9):780–85.

*Cooper, Geoffrey M. 2000. "Meiosis and Fertilization."

Cronshaw, Janet M., Andrew N. Krutchinsky, Wenzhu Zhang, Brian T. Chait, and Michae L. J. Matunis. 2002. "Proteomic Analysis of the Mammalian Nuclear Pore Complex." *Journal of Cell Biology* 158(5):915–27.

Damelin, Marc and Pamela A. Silver. 2000. "Mapping Interactions between Nuclear Transport Factors in Living Cells Reveals Pathways through the Nuclear Pore Complex." *Molecular Cell* 5(1):133–40.

Davidson, Eric H. 1968. *Gene Activity in Early Development*. Academic Press.

Durairajanayagam, Damayanthi, Ashok Agarwal, and Chloe Ong. 2015. "Causes, Effects and Molecular Mechanisms of Testicular Heat Stress." *Reproductive BioMedicine Online* 30(1):14–27.

Ellenberg, Jan. 2013. "Dynamics of Nuclear Envelope Proteins During the Cell Cycle in Mammalian Cells."

Esencan, Ecem and Emre Seli. 2019. "Translational Regulation of Gene Expression During Oogenesis and Preimplantation Embryo Development." Pp. 221–39 in *Human Reproductive and Prenatal Genetics*. Elsevier.

Femino, Andrea M., Fredric S. Fay, Kevin Fogarty, and Robert H. Singer. 1998. "Visualization of Single RNA Transcripts in Situ." *Science* 280(5363):585–90.

*Feng, Chun Wei, Josephine Bowles, and Peter Koopman. 2014. "Control of Mammalian Germ Cell

Entry into Meiosis." *Molecular and Cellular Endocrinology* 382(1):488–97.

Finkel, Toren. 1998. "Oxygen Radicals and Signaling." *Current Opinion in Cell Biology* 10(2):248–53.

FitzHarris, Greg, Petros Marangos, and John Carroll. 2007. "Changes in Endoplasmic Reticulum Structure during Mouse Oocyte Maturation Are Controlled by the Cytoskeleton and Cytoplasmic Dynein." *Developmental Biology* 305(1):133–44.

Forwood, Jade K., Vincent Harley, and David A. Jans. 2001. "The C-Terminal Nuclear Localization Signal of the Sex-Determining Region Y (SRY) High Mobility Group Domain Mediates Nuclear Import through Importin B1." *Journal of Biological Chemistry* 276(49):46575–82.

Forwood, Jade K., Allison Lange, Ulrich Zachariae, Mary Marfori, Callie Preast, Helmut Grubmüller, Murray Stewart, Anita H. Corbett, and Bostjan Kobe. 2010. "Quantitative Structural Analysis of Importin-β Flexibility: Paradigm for Solenoid Protein Structures." *Structure* 18(9):1171–83.

Frandson, Wilke, Fails "Anatomy and Physiology of Farm Animals" cit. 26.5. 2020 (https://books.google.cz/books?id=I9ZZkwnFLN0C&pg=PA431&lpg=PA431&dq=granulosa+cells+secrete+glycoproteins&source=bl&ots=hHAnHWxNOG&sig=ACfU3U1zpANBzowMxyc3imxeut5wFrQCqg&hl=cs&sa=X&ved=2ahUKEwiPmO3lm9HpAhXYPsAKHbLSCFAQ6AEwDHoECAwQAQ#v=onepage&q=granulosa cells secrete glycoproteins&f=false).

*Fujii, Junichi, Yoshihito Iuchi, Shingo Matsuki, and Tatsuya Ishii. 2003. "Cooperative Function of Antioxidant and Redox Systems against Oxidative Stress in Male Reproductive Tissues." *Asian Journal of Andrology* 5(3):231–42.

Gao, Shaorong, Bianca Gasparrini, Michelle McGarry, Tricia Ferrier, Judy Fletcher, Linda Harkness, Paul De Sousa, and Ian Wilmut. 2002. "Germinal Vesicle Material Is Essential for Nucleus Remodeling after Nuclear Transfer1." *Biology of Reproduction* 67(3):928–34.

Gardner, R. L. 1978. "The Relationship between Cell Lineage and Differentiation in the Early Mouse Embryo." *Results and Problems in Cell Differentiation* 9:205–41.

Gardner, R. L. 1985. "Clonal Analysis of Early Mammalian Development." *Philosophical Transactions of the Royal Society of London. Series B, Biological Sciences* 312(1153):163–78.

Garrido, Nicolás, Marcos Meseguer, Carlos Simon, Antonio Pellicer, and José Remohi. 2004. "Pro-Oxidative and Anti-Oxidative Imbalance in Human Semen and Its Relation with Male Fertility." *Asian Journal of Andrology* 6(1):59–65.

Gavella, M. and V. Lipovac. 1992. "Nadh-Dependent Oxidoreductase (Diaphorase) Activity and

Isozyme Pattern of Sperm in Infertile Men." *Systems Biology in Reproductive Medicine* 28(2):135–41.

Ghosh, Sankar, Michael J. May, and Elizabeth B. Kopp. 1998. "NF-KB AND REL PROTEINS: Evolutionarily Conserved Mediators of Immune Responses." *Annual Review of Immunology* 16(1):225–60.

*Gilbert, Scott F. 2000a. "Oogenesis."

*Gilbert, Scott F. 2000b. "Spermatogenesis."

*Gilbert, Scott F. 2000c. "Structure of the Gametes."

Goldfarb, David S., Anita H. Corbett, D. Adam Mason, Michelle T. Harreman, and Stephen A. Adam. 2004. "Importin α: A Multipurpose Nuclear-Transport Receptor." *Trends in Cell Biology* 14(9):505–14.

Görlich, D., P. Henklein, R. A. Laskey, and E. Hartmann. 1996. "A 41 Amino Acid Motif in Importin-Alpha Confers Binding to Importin-Beta and Hence Transit into the Nucleus." *The EMBO Journal* 15(8):1810–17.

Görlich, Dirk, Michael J. Seewald, and Katharina Ribbeck. 2003. "Characterization of Ran-Driven Cargo Transport and the RanGTPase System by Kinetic Measurements and Computer Simulation." *The EMBO Journal* 22(5):1088–1100.

Griswold, Michael D. 1998. "The Central Role of Sertoli Cells in Spermatogenesis." *Seminars in Cell and Developmental Biology* 9(4):411–16.

Hinshaw, Jenny E., Bridget O. Carragher, and Ronald A. Milligan. 1992. "Architecture and Design of the Nuclear Pore Complex." *Cell* 69(7):1133–41.

Hirai, Hiroyuki, Peter Karian, and Nobuaki Kikyo. 2011. "Regulation of Embryonic Stem Cell Self-Renewal and Pluripotency by Leukaemia Inhibitory Factor." *Biochemical Journal* 438(1):11–23.

Ho, Han Chen. 2010. "Redistribution of Nuclear Pores during Formation of the Redundant Nuclear Envelope in Mouse Spermatids." *Journal of Anatomy* 216(4):525–32.

Hogarth, Cathryn A., Sophina Calanni, David A. Jans, and Kate L. Loveland. 2006. "Importin α MRNAs Have Distinct Expression Profiles during Spermatogenesis." *Developmental Dynamics* 235(1):253–62.

Hogarth, Cathryn A., David A. Jans, and Kate L. Loveland. 2007. "Subcellular Distribution of Importins

Correlates with Germ Cell Maturation." *Developmental Dynamics* 236(8):2311–20.

*Holstein, Adolf Friedrich, Wolfgang Schulze, and Michail Davidoff. 2003. "Understanding Spermatogenesis Is a Prerequisite for Treatment." *Reproductive Biology and Endocrinology* 1:107.

Hu, Jianjun, Fengchao Wang, Ye Yuan, Xiaoquan Zhu, Yixuan Wang, Yu Zhang, Zhaohui Kou, Shufang Wang, and Shaorong Gao. 2010. "Novel Importin-α Family Member Kpna7 Is Required for Normal Fertility and Fecundity in the Mouse." *Journal of Biological Chemistry* 285(43):33113–22.

Imamoto, N., T. Shimamoto, T. Takao, T. Tachibana, S. Kose, M. Matsubae, T. Sekimoto, Y. Shimonishi, and Y. Yoneda. 1995. "In Vivo Evidence for Involvement of a 58 KDa Component of Nuclear Pore-Targeting Complex in Nuclear Protein Import." *The EMBO Journal* 14(15):3617–26.

Isgro, Timothy A. and Klaus Schulten. 2005. "Binding Dynamics of Isolated Nucleoporin Repeat Regions to Importin-β." *Structure* 13(12):1869–79.

*Jaffe, Laurinda A. and Jeremy R. Egbert. 2017. "Regulation of Mammalian Oocyte Meiosis by Intercellular Communication Within the Ovarian Follicle." *Annual Review of Physiology* 79(1):237–60.

Jamieson, Barrie G. M. (Barrie Gillean Molyneux). 2003. *Reproductive Biology and Phylogeny of Anura*. Science Publishers.

Jansova, Denisa, Anna Tetkova, Marketa Koncicka, Michal Kubelka, and Andrej Susor. 2018. "Localization of RNA and Translation in the Mammalian Oocyte and Embryo" edited by A. F. Palazzo. *PLOS ONE* 13(3):e0192544.

Jarnik, M. and U. Aebi. 1991. "Toward a More Complete 3-D Structure of the Nuclear Pore Complex." *Journal of Structural Biology* 107(3):291–308.

Jiang, F. X. 1998. "Purification and Characterization of Primordial Germ Cells in Male Rat Fetuses." *Italian Journal of Anatomy and Embryology = Archivio Italiano Di Anatomia Ed Embriologia* 103(4 Suppl 1):31–39.

Kao, Shu Huei, Hsiang Tai Chao, Haw Wen Chen, Thomas I. S. Hwang, Tien Ling Liao, and Yau Huei Wei. 2008. "Increase of Oxidative Stress in Human Sperm with Lower Motility." *Fertility and Sterility* 89(5):1183–90.

Kappel, Christian, Ulrich Zachariae, Nicole Dölker, and Helmut Grubmüller. 2010. "An Unusual

Hydrophobic Core Confers Extreme Flexibility to HEAT Repeat Proteins." *Biophysical Journal* 99(5):1596–1603.

Karwacki-Neisius, Violetta, Jonathan Göke, Rodrigo Osorno, Florian Halbritter, Jia Hui Ng, Andrea Y. Weiße, Frederick C. K. Wong, Alessia Gagliardi, Nicholas P. Mullin, Nicola Festuccia, Douglas Colby, Simon R. Tomlinson, Huck Hui Ng, and Ian Chambers. 2013. "Reduced Oct4 Expression Directs a Robust Pluripotent State with Distinct Signaling Activity and Increased Enhancer Occupancy by Oct4 and Nanog." *Cell Stem Cell* 12(5):531–45.

Kelley, Joshua B., Ashley M. Talley, Adam Spencer, Daniel Gioeli, and Bryce M. Paschal. 2010a. "Karyopherin A7 (KPNA7), a Divergent Member of the Importin α Family of Nuclear Import Receptors." *BMC Cell Biology* 11(1):63.

Kelley, Joshua B., Ashley M. Talley, Adam Spencer, Daniel Gioeli, and Bryce M. Paschal. 2010b. "Karyopherin A7 (KPNA7), a Divergent Member of the Importin α Family of Nuclear Import Receptors." *BMC Cell Biology* 11:63.

Kierszenbaum, Tres "Histology and Cell Biology: An Introduction to Pathology E-Book - ." cit. 26. 5. 2020(https://books.google.cz/books?id=AOWdDwAAQBAJ&pg=PA729&lpg=PA729&dq=primary+oocytes+granulosa+cells+i&source=bl&ots=TRRCxPUOpf&sig=ACfU3U2VJr9hUct-PQzwbqIk0j2S1D4GBA&hl=cs&sa=X&ved=2ahUKEwi10cOFmdHpAhUMXsAKHetRAVs4ChDoATABegQIChAB#v=onepage&q=primary oocytes granulosa cells i&f=false).

*Kim, Yun Hak, Myoung Eun Han, and Sae Ock Oh. 2017. "The Molecular Mechanism for Nuclear Transport and Its Application." *Anatomy and Cell Biology* 50(2):77–85.

Kimura, Makoto and Naoko Imamoto. 2014a. "Biological Significance of the Importin-β Family-Dependent Nucleocytoplasmic Transport Pathways." *Traffic* 15(7):727–48.

Kimura, Makoto and Naoko Imamoto. 2014b. "Biological Significance of the Importin-β Family-Dependent Nucleocytoplasmic Transport Pathways." *Traffic* 15(7):727–48.

Kimura, Makoto, Nobuaki Okumura, Shingo Kose, Toshifumi Takao, and Naoko Imamoto. 2013. "Identification of Cargo Proteins Specific for Importin-β with Importin-α Applying a Stable Isotope Labeling by Amino Acids in Cell Culture (SILAC)-Based in Vitro Transport System." *Journal of Biological Chemistry* 288(34):24540–49.

Kobe, Bostjan. 1999. "Autoinhibition by an Internal Nuclear Localization Signal Revealed by the Crystal Structure of Mammalian Importin α." *Nature Structural Biology* 6(4):388–97.

Köhler, M., S. Ansieau, S. Prehn, A. Leutz, H. Haller, and E. Hartmann. 1997. "Cloning of Two Novel

Human Importin-Alpha Subunits and Analysis of the Expression Pattern of the Importin-Alpha Protein Family." *FEBS Letters* 417(1):104–8.

Koopman, Peter, John Gubbay, Nigel Vivian, Peter Goodfellow, and Robin Lovell-Badge. 1991. "Male Development of Chromosomally Female Mice Transgenic for Sry." *Nature* 351(6322):117–21.

*de Kretser, David M., Kate Loveland, and Moira O'Bryan. 2015. "Spermatogenesis." Pp. 2325-2353.e9 in *Endocrinology: Adult and Pediatric*. Vols. 2–2. Elsevier Inc.

Kutay, Ulrike, F. Ralf Bischoff, Susanne Kostka, Regine Kraft, and Dirk Görlich. 1997. "Export of Importin α from the Nucleus Is Mediated by a Specific Nuclear Transport Factor." *Cell* 90(6):1061–71.

Lam, Mark H. C., Lyndall J. Briggs, Wei Hu, T. John Martin, Matthew T. Gillespie, and David A. Jans. 1999. "Importin β Recognizes Parathyroid Hormone-Related Protein with High Affinity and Mediates Its Nuclear Import in the Absence of Importin α." *Journal of Biological Chemistry* 274(11):7391–98.

Lilienbaum, Alain, Julien Sage, Sylvie Mémet, Minoo Rassoulzadegan, François Cuzin, and Alain Israël. 2000. "NF-κB Is Developmentally Regulated during Spermatogenesis in Mice." *Developmental Dynamics* 219(3):333–40.

Longo, Frank J. 1997. *Fertilization*. 2. ed. London: Chapman and Hall.

Lott, Kaylen and Gino Cingolani. 2011a. "The Importin β Binding Domain as a Master Regulator of Nucleocytoplasmic Transport." *Biochimica et Biophysica Acta - Molecular Cell Research* 1813(9):1578–92.

Lott, Kaylen and Gino Cingolani. 2011b. "The Importin β Binding Domain as a Master Regulator of Nucleocytoplasmic Transport." *Biochimica et Biophysica Acta - Molecular Cell Research* 1813(9):1578–92.

Loveland, Kate L., Andrew T. Major, Romaly Butler, Julia C. Young, David A. Jans, and Yoichi Miyamoto. 2015. "Putting Things in Place for Fertilization: Discovering Roles for Importin Proteins in Cell Fate and Spermatogenesis." *Asian Journal of Andrology* 17(4):537–44.

Macara, I. G. 2001. "Transport into and out of the Nucleus." *Microbiology and Molecular Biology Reviews* 65(4):570–94.

Mackmull, Marie-Therese, Bernd Klaus, Ivonne Heinze, Manopriya Chokkalingam, Andreas Beyer, Robert B. Russell, Alessandro Ori, and Martin Beck. 2017. "Landscape of Nuclear Transport

Receptor Cargo Specificity." *Molecular Systems Biology* 13(12):962.

MacLeod, John. 1943. "The Role Of Oxygen In The Metabolism And Motility Of Human Spermatozoa." *American Journal of Physiology-Legacy Content* 138(3):512–18.

Mahajan, Rohit, Christian Delphin, Tinglu Guan, Larry Gerace, and Frauke Melchior. 1997. "A Small Ubiquitin-Related Polypeptide Involved in Targeting RanGAP1 to Nuclear Pore Complex Protein RanBP2." *Cell* 88(1):97–107.

Malik, Harmit S., Thomas H. Eickbush, and David S. Goldfarb. 1997. "Evolutionary Specialization of the Nuclear Targeting Apparatus." *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 94(25):13738–42.

Marfori, Mary, Andrew Mynott, Jonathan J. Ellis, Ahmed M. Mehdi, Neil F. W. Saunders, Paul M. Curmi, Jade K. Forwood, Mikael Bodén, and Bostjan Kobe. 2011. "Molecular Basis for Specificity of Nuclear Import and Prediction of Nuclear Localization." *Biochimica et Biophysica Acta - Molecular Cell Research* 1813(9):1562–77.

Martin, G. R. 1981. "Isolation of a Pluripotent Cell Line from Early Mouse Embryos Cultured in Medium Conditioned by Teratocarcinoma Stem Cells." *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 78(12 II):7634–38.

Martins, Joao P. Sous. and Marco Conti. 2018. "Profiling Maternal MRNA Translation During Oocyte Development." Pp. 43–50 in *Methods in Molecular Biology*. Vol. 1818. Humana Press Inc.

Mattaj, Iain W. and Ludwig Englmeier. 1998. "Nucleocytoplasmic Transport: The Soluble Phase." *Annual Review of Biochemistry* 67(1):265–306.

McClellan, Kelly A., Roger Gosden, and Teruko Taketo. 2003. "Continuous Loss of Oocytes throughout Meiotic Prophase in the Normal Mouse Ovary." *Developmental Biology* 258(2):334–48.

*McLane, Laura M. and Anita H. Corbett. 2009. "Nuclear Localization Signals and Human Disease." *IUBMB Life* 61(7):697–706.

Meistrich, Marvin L., Bhagyalaxmi Mohapatra, Cynthia R. Shirley, and Ming Zhao. 2003. "Roles of Transition Nuclear Proteins in Spermiogenesis." *Chromosoma* 111(8):483–88.

Mihalas, Bettina P., Patrick S. Western, Kate L. Loveland, Eileen A. McLaughlin, and Janet E. Holt. 2015. "Changing Expression and Subcellular Distribution of Karyopherins during Murine Oogenesis." *Reproduction* 150(6):485–96.

Miyamoto, Yoichi, Mark A. Baker, Penny A. Whiley, Arash Arjomand, Justin Ludeman, Chin Wong,

David A. Jans, and Kate L. Loveland. 2013. “Towards Delineation of a Developmental α-Importome in the Mammalian Male Germline.” *Biochimica et Biophysica Acta - Molecular Cell Research* 1833(3):731–42.

Miyamoto, Yoichi, Peter R. Boag, Gary R. Hime, and Kate L. Loveland. 2012. “Regulated Nucleocytoplasmic Transport during Gametogenesis.” *Biochimica et Biophysica Acta - Gene Regulatory Mechanisms* 1819(6):616–30.

Miyamoto, Yoichi, Takuya Saiwaki, Junichi Yamashita, Yoshinari Yasuda, Ippei Kotera, Satoshi Shibata, Masaki Shigeta, Yasushi Hiraoka, Tokuko Haraguchi, and Yoshihiro Yoneda. 2004. “Cellular Stresses Induce the Nuclear Accumulation of Importin α and Cause a Conventional Nuclear Import Block.” *Journal of Cell Biology* 165(5):617–23.

Miyano, Takashi, Jibak Lee, and Josef Fulka. 2003. “G2/M Transition of Pig Oocytes: How Do Oocytes Initiate Maturation?” *Reproductive Medicine and Biology* 2(3):91–99.

Moore, Mary Shannon and Günter Blobel. 1993. “The GTP-Binding Protein Ran/TC4 Is Required for Protein Import into the Nucleus.” *Nature* 365(6447):661–63.

Moriyama, Tetsuji, Masahiro Nagai, Masahiro Oka, Masahito Ikawa, Masaru Okabe, and Yoshihiro Yoneda. 2011. “Targeted Disruption of One of the Importin α Family Members Leads to Female Functional Incompetence in Delivery.” *FEBS Journal* 278(9):1561–72.

Mosammaparast, Nima and Lucy F. Pemberton. 2004. “Karyopherins: From Nuclear-Transport Mediators to Nuclear-Function Regulators.” *Trends in Cell Biology* 14(10):547–56.

Muller, F. 2000. “The Nature and Mechanism of Superoxide Production by the Electron Transport Chain: Its Relevance to Aging.” *Journal of the American Aging Association* 23(4):227–53.

Nacerddine, Karim, François Lehembre, Mantu Bhaumik, Jérôme Artus, Michel Cohen-Tannoudji, Charles Babinet, Pier Paolo Pandolfi, and Anne Dejean. 2005. “The SUMO Pathway Is Essential for Nuclear Integrity and Chromosome Segregation in Mice.” *Developmental Cell* 9(6):769–79.

Ochsendorf, F. R. 1999. *Infections in the Male Genital Tract and Reactive Oxygen Species*. Vol. 5.

Ori, Alessandro, Niccolò Banterle, Murat Iskar, Amparo Andrés-Pons, Claudia Escher, Huy Khanh Bui, Lenore Sparks, Victor Solis-Mezarino, Oliver Rinner, Peer Bork, Edward A. Lemke, and Martin Beck. 2013. “Cell Type-Specific Nuclear Pores: A Case in Point for Context-Dependent Stoichiometry of Molecular Machines.” *Molecular Systems Biology* 9(1):648.

Orsulic, Sandra and Mark Peifer. n.d. *An In Vivo Structure-Function Study of Armadillo, the [3-Catenin*

Homologue, Reveals Both Separate and Overlapping Regions of the Protein Required for Cell Adhesion and for Wingless Signaling.

Peake, Jonathan M., Katsuhiko Suzuki, and Jeff S. Coombes. 2007. "The Influence of Antioxidant Supplementation on Markers of Inflammation and the Relationship to Oxidative Stress after Exercise." *Journal of Nutritional Biochemistry* 18(6):357–71.

Peifer, M. 1993. "The Product of the Drosophila Segment Polarity Gene Armadillo Is Part of a Multi-Protein Complex Resembling the Vertebrate Adherens Junction." *Journal of Cell Science* 105(4):993–1000.

Pradeepa, M. M., S. Manjunatha, V. Sathish, S. Agrawal, and M. R. S. Rao. 2008. "Involvement of Importin-4 in the Transport of Transition Protein 2 into the Spermatid Nucleus." *Molecular and Cellular Biology* 28(13):4331–41.

Preiss, Scott, Anthony Argentaro, Andrew Clayton, Anna John, David A. Jans, Tsutomu Ogata, Toshiro Nagai, Inês Barroso, Alan J. Schafer, and Vincent R. Harley. 2001. "Compound Effects of Point Mutations Causing Campomelic Dysplasia/Autosomal Sex Reversal upon SOX9 Structure, Nuclear Transport, DNA Binding, and Transcriptional Activation." *Journal of Biological Chemistry* 276(30):27864–72.

Pumroy, Ruth A. and Gino Cingolani. 2015. "Diversification of Importin-α Isoforms in Cellular Trafficking And." *Biochemical Journal* 466(1):13–28.

Quan, Yu, Zhi Liang Ji, Xiao Wang, Alan M. Tartakoff, and Tao Tao. 2008. "Evolutionary and Transcriptional Analysis of Karyopherin β Superfamily Proteins." *Molecular and Cellular Proteomics* 7(7):1254–69.

Reik, Wolf and M. Azim Surani. 2015. "Germline and Pluripotent Stem Cells." *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology* 7(11).

Rexach, Michael and Günter Blobel. 1995. "Protein Import into Nuclei: Association and Dissociation Reactions Involving Transport Substrate, Transport Factors, and Nucleoporins." *Cell* 83(5):683–92.

Robbins, Jacqueline, Stephen M. Dilworth, Ronald A. Laskey, and Colin Dingwall. 1991. "Two Interdependent Basic Domains in Nucleoplasmin Nuclear Targeting Sequence: Identification of a Class of Bipartite Nuclear Targeting Sequence." *Cell* 64(3):615–23.

Rother, Franziska, Tatiana Shmidt, Elena Popova, Alexander Krivokharchenko, Stefanie Hügel, Larissa Vilianovich, Michael Ridders, Katja Tenner, Natalia Alenina, Matthias Köhler, Enno Hartmann,

and Michael Bader. 2011. “Importin A7 Is Essential for Zygotic Genome Activation and Early Mouse Development” edited by J. Baltz. *PLoS ONE* 6(3):e18310.

Rout, Michael P., John D. Aitchison, Adisetyantari Suprapto, Kelly Hjertaas, Yingming Zhao, and Brian T. Chait. 2000. “The Yeast Nuclear Pore Complex: Composition, Architecture, Transport Mechanism.” *Journal of Cell Biology* 148(4):635–51.

Said, Tamer M., Ashok Agarwal, Rakesh K. Sharma, Anthony J. Thomas, and Suresh C. Sikka. 2005. “Impact of Sperm Morphology on DNA Damage Caused by Oxidative Stress Induced by β-Nicotinamide Adenine Dinucleotide Phosphate.” *Fertility and Sterility* 83(1):95–103.

Saleh, Ramadan A., Ashok Agarwal, Rakesh K. Sharma, David R. Nelson, and Anthony J. Thomas. 2002. “Effect of Cigarette Smoking on Levels of Seminal Oxidative Stress in Infertile Men: A Prospective Study.” *Fertility and Sterility* 78(3):491–99.

Sangel, Percival, Masahiro Oka, and Yoshihiro Yoneda. 2014. “The Role of Importin-Bs in the Maintenance and Lineage Commitment of Mouse Embryonic Stem Cells.” *FEBS Open Bio* 4:112–20.

Seki, Takashi, Naoyuki Hayashi, and Takeharu Nishimoto. 1996. *RCCl in the Ran Pathway*. Vol. 120.

Shulga, Nataliya, Paul Roberts, Zhenyu Gu, Lynn Spitz, Michelle M. Tabb, Masayasu Nomura, and David S. Goldfarb. 1996. “In Vivo Nuclear Transport Kinetics in Saccharomyces Cerevisiae: A Role for Heat Shock Protein 70 during Targeting and Translocation.” *Journal of Cell Biology* 135(2):329–39.

Silva, Sara Morais Da, Adam Hacker, Vince Harley, Peter Goodfellow, Amanda Swain, and Robin Lovell-Badge. 1996. “Sox9 Expression during Gonadal Development Implies a Conserved Role for the Gene in Testis Differentiation in Mammals and Birds.” *Nature Genetics* 14(1):62–68.

Son, Weon-Young, Suh-Ha Hwang, Ching-Tack Han, Jae-Ho Lee, Seokjoong Kim, and Young Chan Kim. 1999. “Specific Expression of Heat Shock Protein HspA2 in Human Male Germ Cells.” *Molecular Human Reproduction* 5(12):1122–26.

Sorokin, A. V., E. R. Kim, and L. P. Ovchinnikov. 2007. “Nucleocytoplasmic Transport of Proteins.” *Biochemistry (Moscow)* 72(13):1439–57.

Steger, Klaus. 2001. “Haploid Spermatids Exhibit Translationally Repressed MRNAs.” *Anatomy and Embryology* 203(5):323–34.

Su, You Qiang, Koji Sugiura, Yong Woo, Karen Wigglesworth, Sonya Kamdar, Jason Affourtit, and John

J. Eppig. 2007. “Selective Degradation of Transcripts during Meiotic Maturation of Mouse Oocytes.” *Developmental Biology* 302(1):104–17.

Sudhakar, L. and M. R. Rao. 1990. “Stage-Dependent Changes in Localization of a Germ Cell-Specific Lamin during Mammalian Spermatogenesis.” *The Journal of Biological Chemistry* 265(36):22526–32.

Sun, Qing-Yuan, Liangxue Lai, Aaron Bonk, Randall S. Prather, and Heide Schatten. 2001. “Cytoplasmic Changes in Relation to Nuclear Maturation and Early Embryo Developmental Potential of Porcine Oocytes: Effects of Gonadotropins, Cumulus Cells, Follicular Size, and Protein Synthesis Inhibition.” *Molecular Reproduction and Development* 59(2):192–98.

Suntharalingam, Mythili and Susan R. Wente. 2003. “Peering through the Pore: Nuclear Pore Complex Structure, Assembly, and Function.” *Developmental Cell* 4(6):775–89.

Susor, Andrej, Denisa Jansova, Renata Cerna, Anna Danylevska, Martin Anger, Tereza Toralova, Radek Malik, Jaroslava Supolikova, Matthew S. Cook, Jeong Su Oh, and Michal Kubelka. 2015. “Temporal and Spatial Regulation of Translation in the Mammalian Oocyte via the MTOR-EIF4F Pathway.” *Nature Communications* 6:6078.

Suzuki, N., H. Rohdewohld, T. Neuman, P. Gruss, and H. R. Schöler. 1990. “Oct-6: A POU Transcription Factor Expressed in Embryonal Stem Cells and in the Developing Brain.” *The EMBO Journal* 9(11):3723–32.

Tabb, M. M., P. Tongaonkar, L. Vu, and M. Nomura. 2000. “Evidence for Separable Functions of Srp1p, the Yeast Homolog of Importin Alpha (Karyopherin Alpha): Role for Srp1p and Sts1p in Protein Degradation.” *Molecular and Cellular Biology* 20(16):6062–73.

Tam, P. P. L. and M. H. L. Snow. 1981. “Proliferation and Migration of Primordial Germ Cells during Compensatory Growth in Mouse Embryos.” *Development* 64(1).

Tran, Mong Hoa, Ritu B. Aul, Wei Xu, Frans A. van der Hoorn, and Richard Oko. 2012. “Involvement of Classical Bipartite/Karyopherin Nuclear Import Pathway Components in Acrosomal Trafficking and Assembly During Bovine and Murid Spermiogenesis1.” *Biology of Reproduction* 86(3):84.

Tsuji, L., T. Takumi, N. Imamoto, and Y. Yoneda. 1997. “Identification of Novel Homologues of Mouse Importin Alpha, the Alpha Subunit of the Nuclear Pore-Targeting Complex, and Their Tissue-Specific Expression.” *FEBS Letters* 416(1):30–34.

*Tzfira, Tzvi and Vitaly Citovsky. 2005. *Nuclear Import and Export in Plants and Animals*. Springer US.

Ventelä, Sami, Jorma Toppari, and Martti Parvinen. 2003. “Intercellular Organelle Traffic through Cytoplasmic Bridges in Early Spermatids of the Rat: Mechanisms of Haploid Gene Product Sharing.” *Molecular Biology of the Cell* 14(7):2768–80.

Vetter, I. R. and A. Wittinghofer. 2001. “The Guanine Nucleotide-Binding Switch in Three Dimensions.” *Science* 294(5545):1299–1304.

Vetter, Ingrid R., Andreas Arndt, Ulrike Kutay, Dirk Görlich, and Alfred Wittinghofer. 1999. “Structural View of the Ran-Importin β Interaction at 2.3 Å Resolution.” *Cell* 97(5):635–46.

Weber, James E. and Lonnie D. Russell. 1987. “A Study of Intercellular Bridges during Spermatogenesis in the Rat.” *American Journal of Anatomy* 180(1):1–24.

Weis, K., U. Ryder, and A. I. Lamond. 1996. “The Conserved Amino-Terminal Domain of HSRP1 Alpha Is Essential for Nuclear Protein Import.” *The EMBO Journal* 15(8):1818–25.

Weis, Karsten. 2002. “Nucleocytoplasmic Transport: Cargo Trafficking across the Border.” *Current Opinion in Cell Biology* 14(3):328–35.

Weis, Karsten. 2003. “Regulating Access to the Genome: Nucleocytoplasmic Transport throughout the Cell Cycle.” *Cell* 112(4):441–51.

Whiley, P. A. F., Y. Miyamoto, R. I. Mclachlan, D. A. Jans, and K. L. Loveland. 2012. “Changing Subcellular Localization of Nuclear Transport Factors during Human Spermatogenesis.” *International Journal of Andrology* 35(2):158–69.

Wu, Defeng and Arthur I. Cederbaum. 2003. “Alcohol, Oxidative Stress, and Free Radical Damage.” *Alcohol Research & Health : The Journal of the National Institute on Alcohol Abuse and Alcoholism* 27(4):277–84.

Yamada, Masayasu and Yuuki Isaji. 2011. “Structural and Functional Changes Linked to, and Factors Promoting, Cytoplasmic Maturation in Mammalian Oocytes.” *Reproductive Medicine and Biology* 10(2):69–79.

Yamaguchi, Yasuka L., Satomi S. Tanaka, Kunio Yasuda, Yasuhisa Matsui, and Patrick P. L. Tam. 2006. “Stage-Specific Importin13 Activity Influences Meiosis of Germ Cells in the Mouse.” *Developmental Biology* 297(2):350–60.

Yano, R., M. Oakes, M. Yamaghishi, J. A. Dodd, and M. Nomura. 1992. “Cloning and Characterization of SRP1, a Suppressor of Temperature-Sensitive RNA Polymerase I Mutations, in Saccharomyces Cerevisiae.” *Molecular and Cellular Biology* 12(12):5640–51.

Yano, Ryoji, Melanie L. Oakes, Michelle M. Tabb, and Masayasu Nomura. 1994. "Yeast Srp1p Has Homology to Armadillo/Plakoglobin/β-Catenin and Participates in Apparently Multiple Nuclear Functions Including the Maintenance of the Nucleolar Structure." *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 91(15):6880–84.

Yasuda, Yoshinari, Yoichi Miyamoto, Tomoko Yamashiro, Munehiro Asally, Ayumi Masui, Chin Wong, Kate L. Loveland, and Yoshihiro Yoneda. 2012. "Nuclear Retention of Importin α Coordinates Cell Fate through Changes in Gene Expression." *EMBO Journal* 31(1):83–94.

Yasuhara, Noriko, Noriko Shibazaki, Shinya Tanaka, Masahiro Nagai, Yasunao Kamikawa, Souichi Oe, Munehiro Asally, Yusuke Kamachi, Hisato Kondoh, and Yoshihiro Yoneda. 2007. "Triggering Neural Differentiation of ES Cells by Subtype Switching of Importin-α." *Nature Cell Biology* 9(1):72–79.

Yasuhara, Noriko, Ryosuke Yamagishi, Yoshiyuki Arai, Rashid Mehmood, Chihiro Kimoto, Toshiharu Fujita, Kenichi Touma, Azumi Kaneko, Yasunao Kamikawa, Tetsuji Moriyama, Toshio Yanagida, Hiroki Kaneko, and Yoshihiro Yoneda. 2013a. "Importin Alpha Subtypes Determine Differential Transcription Factor Localization in Embryonic Stem Cells Maintenance." *Developmental Cell* 26(2):123–35.

Yasuhara, Noriko, Ryosuke Yamagishi, Yoshiyuki Arai, Rashid Mehmood, Chihiro Kimoto, Toshiharu Fujita, Kenichi Touma, Azumi Kaneko, Yasunao Kamikawa, Tetsuji Moriyama, Toshio Yanagida, Hiroki Kaneko, and Yoshihiro Yoneda. 2013b. "Importin Alpha Subtypes Determine Differential Transcription Factor Localization in Embryonic Stem Cells Maintenance." *Developmental Cell* 26(2):123–35.

Young, Julia C., Jennifer D. Ly-Huynh, Helen Lescesen, Yoichi Miyamoto, Cate Browne, Yoshihiro Yoneda, Peter Koopman, Kate L. Loveland, and David A. Jans. 2013. "The Nuclear Import Factor Importin A4 Can Protect against Oxidative Stress." *Biochimica et Biophysica Acta - Molecular Cell Research* 1833(10):2348–56.

Zachariae, Ulrich and Helmut Grubmüller. 2008. "Importin-β: Structural and Dynamic Determinants of a Molecular Spring." *Structure* 16(6):906–15.

Zienkiewicz, Jozef, Amy Armitage, and Jacek Hawiger. 2013. "Targeting Nuclear Import Shuttles, Importins/Karyopherins Alpha by a Peptide Mimicking the NFκB1/P50 Nuclear Localization Sequence." *Journal of the American Heart Association* 2(5).

(* označuje sekundární zdroje)