

Autoreferat

1. Imię i Nazwisko: **Anna Ajduk**

2. Posiadane dyplomy, stopnie naukowe/ artystyczne:

18.06.2007 – doktor nauk biologicznych w zakresie biologii – Wydział Biologii, Uniwersytet Warszawski; tytuł rozprawy: “Dojrzewanie cytoplazmatyczne oocytów myszy: rozwój mechanizmu odpowiedzialnego za aktywację komórki jajowej podczas zapłodnienia; promotor: prof. dr hab. Marek Maleszewski

4.06.2003 – magister, kierunek biologia w zakresie biologii molekularnej – Wydział Biologii, Uniwersytet Warszawski; tytuł rozprawy: “Aktywność czynnika plemnikowego w oocytach inseminowanych w czasie dojrzewania *in vitro* lub po aktywacji partenogenetycznej”; opiekun: prof. dr hab. Marek Maleszewski

3. Informacje o dotychczasowym zatrudnieniu w jednostkach naukowych/ artystycznych.

od 2017 – starszy wykładowca w Zakładzie Embriologii, Wydział Biologii, Uniwersytet Warszawski

2009-2011 – research associate (post-doc) w Wellcome Trust / Cancer Research UK Gurdon Institute, University of Cambridge

2007-2017 – adiunkt w Zakładzie Embriologii, Wydział Biologii, Uniwersytet Warszawski; (na urlopie naukowym w l. 2009-2011)

2003-2007 – studia doktoranckie na Wydziale Biologii Uniwersytetu Warszawskiego

Krótkoterminowe staże zagraniczne:

2008 – visiting scientist (2-miesięczny staż naukowy finansowany przez FEBS Short-term Fellowship) w Wellcome Trust / Cancer Research UK Gurdon Institute, University of Cambridge

2005-2006 – research assistant (dwa 3-miesięczne staże naukowe) w Institute for Biogenesis Research, John A. Burns School of Medicine, University of Hawaii

2005 – visiting student (3-miesięczny staż naukowy finansowany przez Schering Foundation Short-term Fellowship) w Department of Obstetrics and Gynaecology, Wales College of Medicine, Cardiff University.

4. Wskazanie osiągnięcia* wynikającego z art. 16 ust. 2 ustawy z dnia 14 marca 2003 r. o stopniach naukowych i tytule naukowym oraz o stopniach i tytule w zakresie sztuki (Dz. U. 2016 r. poz. 882 ze zm. w Dz. U. z 2016 r. poz. 1311.):

a) tytuł osiągnięcia naukowego/artystycznego:

Wybrane aspekty czasowej i przestrzennej dynamiki rozwoju przedimplantacyjnego zarodków myszy

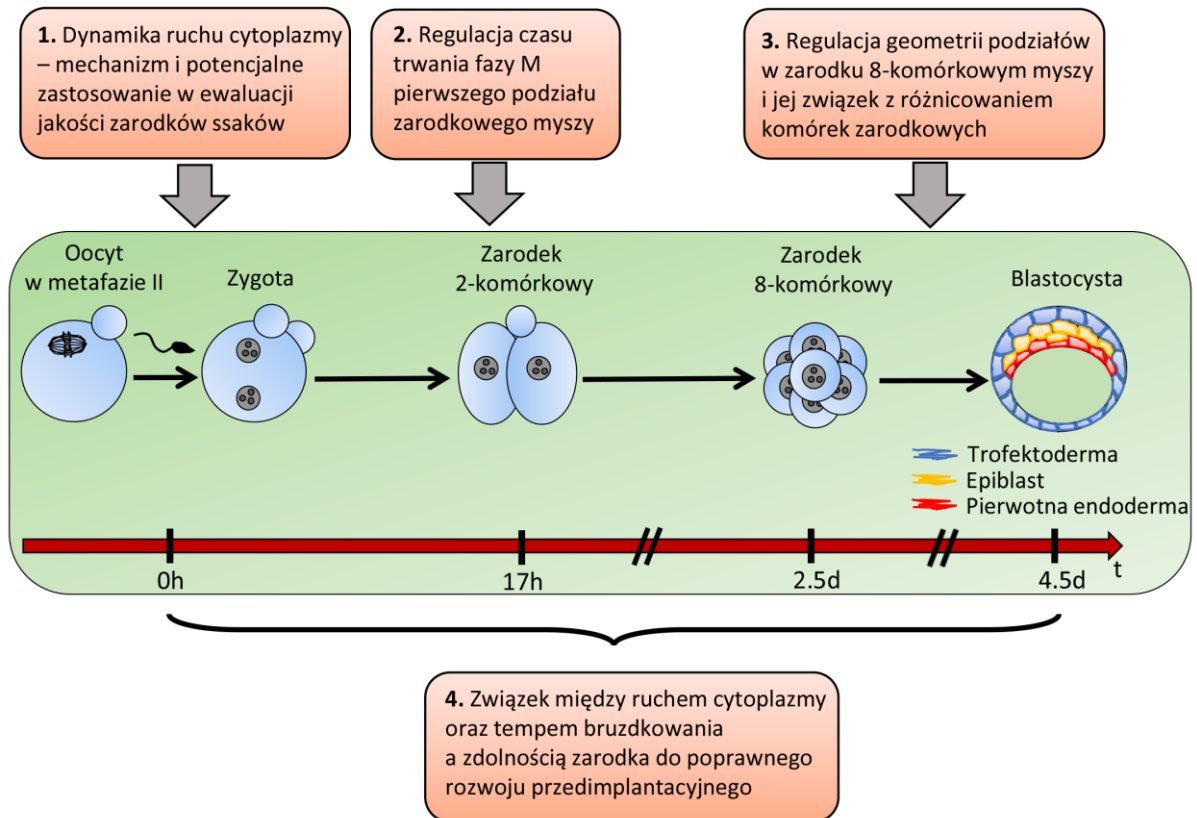
b) Spis publikacji wchodzących w skład osiągnięcia habilitacyjnego:

1. **Ajduk A**, Ilozue T, Windsor S, Yu Y, Seres KB, Bompfrey RJ, Tom BD, Swann K, Thomas A, Graham C, Zernicka-Goetz M. (2011) Rhythmic actomyosin-driven contractions induced by sperm entry predict mammalian embryo viability. *Nature Communications* 2: 417. (IF 2011: 7.396, pkt. MNiSW 2011: -, l. cytowań: 44)
2. **Ajduk A**, Zernicka-Goetz M. (2013) Quality control of embryo development. *Molecular Aspects of Medicine* 34: 903-918. (Praca przeglądowa) (IF 2013: 10.302, pkt. MNiSW 2013: 45, l. cytowań: 18)
3. **Ajduk A**, Biswas Shivhare S, Zernicka-Goetz M. (2014) The basal position of nuclei is one prerequisite for asymmetric cell divisions in the early mouse embryo. *Developmental Biology* 392: 133-140. (IF 2014: 3.547, pkt. MNiSW 2014: 35, l. cytowań: 8)
4. **Ajduk A**, Zernicka-Goetz M. (2016) Polarity and cell division orientation in the cleavage embryo: from worm to human. *Molecular Human Reproduction* 22: 691-703. (Praca przeglądowa) (IF 2016: 3.585, pkt. MNiSW 2016: 40, l. cytowań: 4)
5. **Ajduk A**, Strauss B, Pines J, Zernicka-Goetz M. (2017) Delayed APC/C activation extends the first mitosis of mouse embryos. *Scientific Reports* 7: 9682. (IF 2016 (brak jeszcze IF za 2017): 4.259, pkt. MNiSW 2016: 40, l. cytowań: 0)
6. Milewski R, Szpila M, **Ajduk A**. (2018) Dynamics of cytoplasm and cleavage divisions correlates with preimplantation embryo development. *Reproduction* 155: 1-14 (IF 2016 (brak jeszcze IF za 2018): 3.100, pkt. MNiSW 2016: 35, l. cytowań: 0)

c) omówienie celu naukowego/artystycznego ww. pracy/prac i osiągniętych wyników wraz z omówieniem ich ewentualnego wykorzystania.

Rozwój przedimplantacyjny zarodków ssaków obejmuje okres od zapłodnienia, poprzez szereg podziałów mitotycznych (tzw. bruzdkowanie), aż do osiągnięcia przez zarodek stadium blastocysty, kiedy to możliwa jest implantacja w macicy (Rycina 1). Wniknięcie plemnika inicjuje w oocycie oscylacje cytoplazmatycznego stężenia wolnych jonów Ca^{2+} ($[Ca^{2+}]_i$): jony Ca^{2+} w cykliczny sposób uwalniane są z cystern retikulum endoplazmatycznego do cytoplazmy i wpompowywane z powrotem z cytoplazmy do światła retikulum. Częstość oscylacji $[Ca^{2+}]_i$ zależy od gatunku, u myszy wyrzuty Ca^{2+} powtarzają się co 10-20 min (przegląd w Sanders i Swann, 2016). Oscylacje $[Ca^{2+}]_i$ umożliwiają m.in. ukończenie przez oocyt drugiego podziału mejotycznego oraz inicjują przejście zapłodnionego oocytu do interfazy pierwszego podziału zarodkowego. Oprócz tego regulują szereg innych procesów komórkowych: powstanie bloku przeciwko polispermii, aktywność mitochondriów, translację matczynego mRNA czy dynamikę cytoplazmy (więcej szczegółów w **pkt 1. osiągnięcia habilitacyjnego**). Dane literaturowe sugerują, że mogą też wpływać na ekspresję genów na późniejszych etapach rozwoju zarodkowego (Dumollard i wsp., 2004; Ozil i wsp., 2005, 2006; Campbell i Swann, 2006; Toth i wsp., 2006; przegląd w Ducibella i wsp., 2006 oraz Sanders i Swann, 2016).

Pierwszy cykl mitotyczny zarodka myszy jest pod wieloma względami szczególny. W zygotie znajdują się dwa osobne jądra interfazowe, zawierające chromosomy matczyne i ojcowskie, czyli tzw. przedjądra żeńskie i męskie. Dopiero w czasie fazy M pierwszego podziału bruzdkowania chromosomy pochodzące od oocytu i plemnika „spotkają się”, tworząc wspólną płytkę metafazową (przegląd w Destouni i Vermeesch, 2017). W czasie pierwszego cyklu zarodkowego w zasadzie nieaktywna jest transkrypcja *de novo*: zarodek korzysta z mRNA zgromadzonego przez oocyt i dopiero w fazie G2 dochodzi do wstępnej i bardzo ograniczonej aktywacji genomu zarodkowego (przegląd w Li i wsp., 2013 i Biechele i wsp., 2015). Co więcej, pierwsza faza M zarodka trwa znacznie dłużej niż ma to miejsce w komórkach somatycznych, a nawet w późniejszych podziałach bruzdkowania (Sikora-Polaczek i wsp., 2006; Maciejewska i wsp., 2009). Badania nad mechanizmami regulującymi przebieg pierwszej zarodkowej fazy M opisane zostały w **pkt. 2 osiągnięcia habilitacyjnego**.



Rycina 1. Rozwój przedimplantacyjny zarodka myszy z zaznaczeniem zagadnień poruszanych w osiągnięciu habilitacyjnym.

Szczegóły w tekście.

Kolejne podziały brzdękowania prowadzą do powstania zarodka 4-, a następnie 8-komórkowego. Na stadium 8-komórkowym mają miejsce kompaktacja i polaryzacja blastomerów zarodka. Kompaktacja polega na powstaniu płytek przylegania (ang. *adherens junctions*) pomiędzy blastomerami, co prowadzi do zmiany morfologii zarodka: z grupy wyraźnie wyróżnionych komórek zmienia się on w „grudkę”, w której granice między poszczególnymi komórkami są niemal niewidoczne (Collins i Fleming, 1995). Polaryzacja, zachodząca w przybliżeniu w tym samym czasie co kompaktacja, prowadzi natomiast do redystrybucji organelli i molekuł wewnątrz blastomerów wzdłuż osi apikalno-bazalnej i powstania tzw. domeny polarnej w części apikalnej (Reeve i Ziomek, 1981; Reeve i Kelly, 1983; Plusa i wsp., 2005; Vinot i wsp., 2005; Skamagki i wsp., 2013; przegląd w Nance, 2014). Kompaktacja i polaryzacja umożliwiają powstanie w czasie kolejnego podziału brzdękowania dwóch typów komórek o różnych właściwościach i losie rozwojowym: komórek zewnętrznych (dziedziczących domenę polarną) i wewnętrznych (apolarnych) (Tarkowski i Wróblewska, 1967; Johnson i Ziomek, 1981a, b; przegląd w Nance, 2014; więcej szczegółów w **pkt. 3 opisu osiągnięcia habilitacyjnego**). Wyróżnicowanie się tych dwóch rodzajów komórek jest kluczowe dla osiągnięcia przez zarodek stadium blastocysty. Komórki zewnętrzne utworzą bowiem trofektodermę, zewnętrzną warstwę komórek otaczającą jamę blastocysty, która po implantacji przekształci się w zarodkową część łożyska; natomiast komórki wewnętrzne dadzą początek węzłowi zarodkowemu, czyli grupie komórek leżących wewnątrz jamy blastocysty, które uformują ciało płodu oraz większość błon płodowych (przegląd w Zernicka-Goetz i wsp., 2009; Cockburn i Rossant, 2010).

Wraz z kolejnymi podziałami zarodkowymi dochodzi do wyróżnicowania się w obrębie węzła zarodkowego dwóch osobnych linii komórkowych: epiblastu, który utworzy właściwe ciało płodu wraz

z mezoderma pozazarodkową, wchodzącą w skład błon płodowych, oraz pierwotnej endodermy, która zbuduje endodermalną warstwę pęcherzyka żółtkowego. We w pełni wykształconej blastocystie epiblast zajmuje niszę wewnątrz węzła zarodkowego, między otaczającą go od zewnątrz trofektodermą, a oddzielającą go od jamy blastocysty endoderma pierwotną. Dopiero tak zbudowana blastocysta jest gotowa do implantacji i ma szansę na prawidłowy rozwój poimplantacyjny (przegląd w Zernicka-Goetz i wsp., 2009; Cockburn i Rossant, 2010).

Dzięki technikom hodowli *in vitro* rozwój przedimplantacyjny zarodka możemy analizować w warunkach laboratoryjnych, poza organizmem samicy. Badania te nie tylko wzbogacają naszą wiedzę na temat procesów wewnątrzkomórkowych regulujących wczesny rozwój zarodkowy ssaków, ale mogą też mieć wymierne znaczenie praktyczne, pomagając w optymalizacji procedur stosowanych w medycynie reprodukcyjnej czy we wspomaganym rozrodzie zwierząt. Na szczególną uwagę zasługuje wykorzystanie analizy dynamiki procesów komórkowych zachodzących w czasie rozwoju przedimplantacyjnego jako źródła potencjalnych biomarkerów jakości zarodków. Biomarkery takie znajdują zastosowanie w ewaluacji żywotności zarodków przed ich transferem do bioczyń (**patrz pkt. 1 i 4 opisu osiągnięcia habilitacyjnego**). Badania, których wyniki składają się na moje osiągnięcie habilitacyjne, miały na celu zgłębienie dynamiki procesów komórkowych zachodzących w przedimplantacyjnych zarodkach ssaków, począwszy od zapłodnienia, poprzez regulację czasową pierwszego podziału zarodkowego, po tempo bruzdkowania i regulację płaszczyzny jego podziałów. Moim modelem badawczym były zarodki myszy, jednak część z uzyskanych przeze mnie wyników może być interesująca także w kontekście innych gatunków ssaków, w tym człowieka, i posłużyć jako punkt wyjścia do badań nad nowymi wskaźnikami potencjału rozwojowego zarodków uzyskiwanych w procedurach zapłodnienia *in vitro*.

1. Dynamika ruchu cytoplazmy – mechanizm i potencjalne zastosowanie w ewaluacji jakości zarodków ssaków

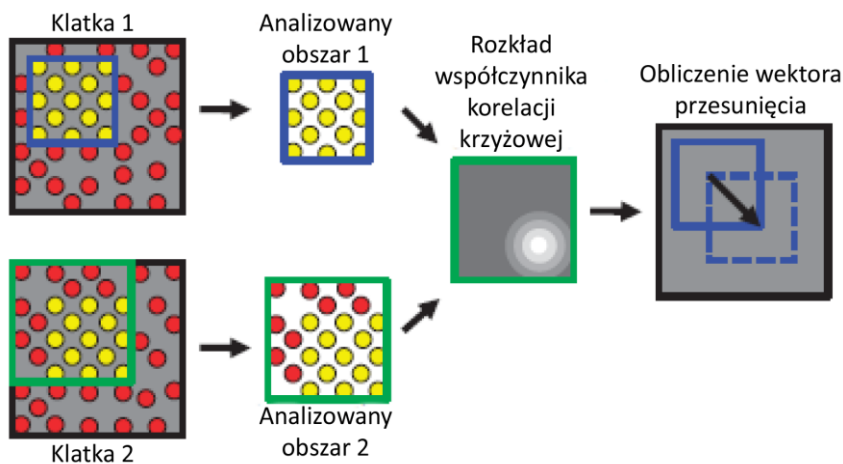
Praca oryginalna: Ajduk A, Ilozue T, Windsor S, Yu Y, Seres KB, Bomphrey RJ, Tom BD, Swann K, Thomas A, Graham C, Zernicka-Goetz M. (2011) Rhythmic actomyosin-driven contractions induced by sperm entry predict mammalian embryo viability. *Nature Communications* 2: 417.

Praca przeglądowa: Ajduk A, Zernicka-Goetz M. (2013) Quality control of embryo development. *Molecular Aspects of Medicine* 34: 903-918

Wstęp. Ukierunkowany ruch cytoplazmy oocyty wywołany zapłodnieniem jest zjawiskiem znanym u wielu gatunków zwierząt. U *C. elegans*, jeźowców, żachw i pazów jest on regulowany przez mechanizm zależny od Ca^{2+} i/lub cytoszkieletu oraz wiąże się z ustanowieniem polarnośći zarodków (Speksnijder i wsp., 1990; Roegiers i wsp., 1995; Munro i wsp., 2004; Stack i wsp., 2006; przegląd w Weaver i Kimelman, 2004; Sardet i wsp., 2007; Nance i Zallen, 2011; **Ajduk i Żernicka-Goetz, 2016**). Ruch taki był także zaobserwowany w oocytach ssaków (Deguchi i wsp., 2000), lecz jego mechanizm i znaczenie były nieznanne. Przed opublikowaniem naszych badań (**Ajduk i wsp., 2011**) wiadomo było jedynie, że zapłodnienie prowadzi w oocytach do reorganizacji rozmieszczenia niektórych organelli: ziaren korowych, czyli granul wypełnionych enzymami proteo- i glikolitycznymi umiejscowionymi w kortykalnej części oocyty, retikulum endoplazmatycznego, mitochondriów (Abbott i Ducibella, 2001; Sun i wsp., 2001; FitzHarris i wsp., 2003) oraz cytoszkieletu. Reorganizacja cytoszkieletu przejawia się m.in. akumulacją filamentów aktynowych i towarzyszących im białek nad chromatyną plemnika, skutkującą powstaniem charakterystycznego wybrzuszenia, tzw. wżgórka zapłodnienia (Maro i wsp., 1984, 1986; Deng i wsp., 2007). Dodatkowo, zapłodnienie wywołuje w oocycie oscylacyjne zmiany $[Ca^{2+}]_i$ (przegląd w: Sanders i Swann, 2016). Oscylacje $[Ca^{2+}]_i$ trwają od momentu zapłodnienia do

utworzenia przedjądrzy zygoty (Marangos i wsp., 2003) i indukują szereg procesów związanych z zapłodnieniem i rozwojem zarodkowym (patrz powyżej).

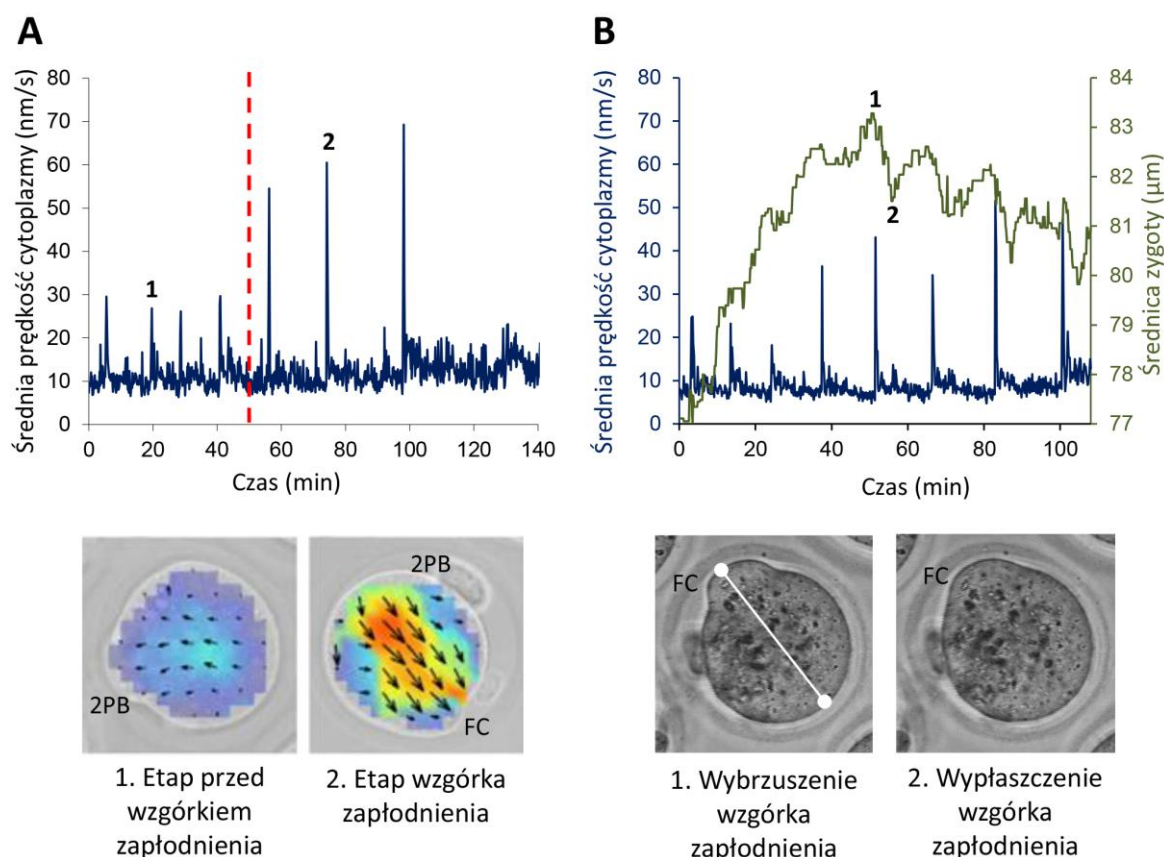
W ramach projektu, w którym uczestniczyłam w czasie mojego stażu podoktorskiego, podjęliśmy próbę scharakteryzowania ruchu cytoplazmy w zapłodnionym oocyty myszy, określenia zależności między nim a oscylacjami $[Ca^{2+}]_i$ i cytoszkieletem, oraz jego związku z potencjałem rozwojowym zarodka (Ajduk i wsp., 2011). W tym celu wykorzystaliśmy obrazowanie poklatkowe zapłodnionych oocytów myszy połączone z analizą obrazu opartą o technikę *Particle Image Velocimetry* (PIV), powszechnie stosowaną w badaniach nad dynamiką płynów (Willert i Gharib, 1991; Keane i Adrian, 1992; Westerweel, 1997; Raffel i wsp., 1998). W skrócie, algorytm PIV, porównując pomiędzy kolejnymi klatkami filmu wzory jasnych i ciemnych pikseli w zadanych obszarach analizowanego obiektu, kalkuluje wektor przesunięcia danego obszaru w czasie pomiędzy porównywanymi klatkami (Rycina 2). Pozwala to na śledzenie ruchu obiektów amorficznych, w przypadku komórki - ruchu cytoplazmy.



Rycina 2. Schemat analizy ruchu cytoplazmy metodą *Particle Image Velocimetry*.

Każda klatka nagrania zostaje podzielona na obszary, w obrębie których analizowany jest wzór pikseli. Algorytm oblicza rozkład współczynnika korelacji krzyżowej dla porównywanych ze sobą obszarów w następujących po sobie klatkach. Szczytowa wartość rozkładu wskazuje na najbardziej prawdopodobne miejsce przesunięcia analizowanego obszaru i pozwala na wyliczenie wektora przesunięcia.

Wyniki. Wykazaliśmy, że wnikięcie plemnika wywołuje oscylacyjne zmiany prędkości i kierunku ruchu cytoplazmy oocyty trwające ok. 4h, czyli aż do momentu utworzenia przedjądrzy. Okresy, w których prędkość cytoplazmy znacząco wzrastała, a jej wektory były skierowane w jedną stronę (tzw. *speed-peaks*), występowały na zmianę z okresami, w których ruch cytoplazmy miał niską prędkość, a charakteryzujące go wektory skierowane były w różne strony, zależnie od analizowanego fragmentu komórki (tzw. okresy *inter-peak*). Przed powstaniem wżórka zapłodnienia, wektory ruchu cytoplazmy w czasie *speed-peaks* skierowane były w stronę tworzącego się drugiego ciała kierunkowego, a po uformowaniu się wżórka – w stronę tego właśnie wybrzuszenia (Rycina 3A). Co więcej, zauważyliśmy, że oscylacjom prędkości ruchu cytoplazmy towarzyszyły zmiany w kształcie wżórka zapłodnienia, który w naprzemienny sposób wybrzuszał się i wypłaszczał. W czasie okresów *speed-peaks* dochodziło do gwałtownego wypłaszczenia wżórka zapłodnienia, a następnie w okresie *inter-peak* ulegał on stopniowo ponownemu wybrzuszeniu (Rycina 3B). Pulsacje wżórka zasugerowały

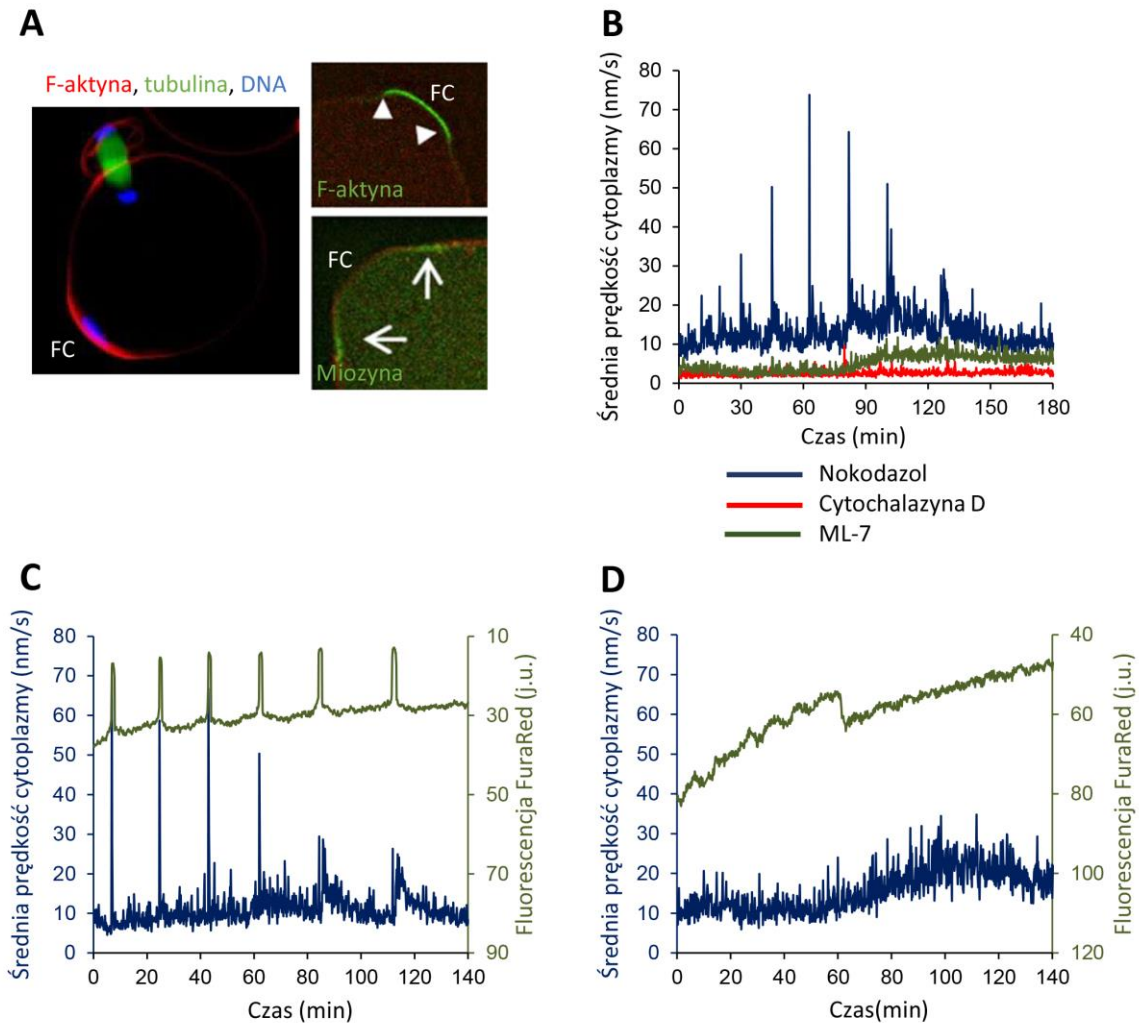


Rycina 3. Cykliczne szybkie ruchy cytoplazmy oocyty wywołane zapłodnieniem i towarzyszące im pulsacje wżgórka zapłodnienia.

(A) Średnia prędkość cytoplazmy w zapłodnionym oocyty myszy z widocznymi okresami szybkich ruchów (*speed-peaks*). 1 – przykładowy *speed-peak* z okresu przed wykształceniem się wżgórka zapłodnienia i odpowiadające mu zdjęcie zygoty z nałożonymi wektorami ruchu cytoplazmy uzyskanymi poprzez analizę PIV; 2 – przykładowy *speed-peak* w okresie po powstaniu wżgórka zapłodnienia wraz z odpowiadającym mu zdjęciem zygoty z nałożonymi wektorami ruchu cytoplazmy. (B) Korelacja czasowa między oscylacjami prędkości cytoplazmy (linia niebieska) a pulsacjami wżgórka zapłodnienia przedstawionymi jako zmiany w długości średnicy zygoty przechodzącej przez wżgórek zapłodnienia (linia zielona). 1 – moment wybrzuszenia wżgórka zapłodnienia wraz z odpowiadającym mu zdjęciem zygoty; biała linia pokazuje miejsce pomiaru średnicy zygoty; 2 – moment wyplaszczenia wżgórka zapłodnienia wraz z odpowiadającym mu zdjęciem zygoty. 2PB – II ciało kierunkowe (z ang. 2nd polar body), FC – wżgórek zapłodnienia (z ang. fertilization cone).

nam, że może on służyć jako rodzaj „pompy” napędzającej ruch cytoplazmy w okresach *speed-peaks* (w okresie przed powstaniem wżgórka zapłodnienia rolę takiej pompy mogłaby pełnić wypukłość w rejonie chromosomów żeńskich i tworzącego się drugiego ciała kierunkowego). Rzeczywiście, zaobserwowaliśmy, że im silniejsze pulsacje wżgórka zapłodnienia, tym szybszy ruch cytoplazmy w czasie *speed-peaks*. Co więcej, pokazaliśmy, że w zapłodnionych oocytach, w których wżgórek nie powstał (oocyty zapłodnione poprzez docytoplazmatyczne wstrzyknięcie plemnika (z ang. ICSI, *intracytoplasmic sperm injection*) w rejon centralny komórki – zbyt duża odległość chromatyny plemnika od korteksu oocyty uniemożliwia uformowanie wżgórka zapłodnienia (Deng i wsp., 2007)), szybkie ruchy cytoplazmy (*speed-peaks*) są znacznie ograniczone.

Kolejnym krokiem w naszych badaniach było pokazanie mechanizmu prowadzącego do gwałtownych ruchów cytoplazmy (*speed-peaks*) oraz do pulsacji wżgórka zapłodnienia. Mikrofilamenty



Rycina 4. Mechanizm powstawania szybkich ruchów cytoplazmy w zapłodnionym oocyte myszy.

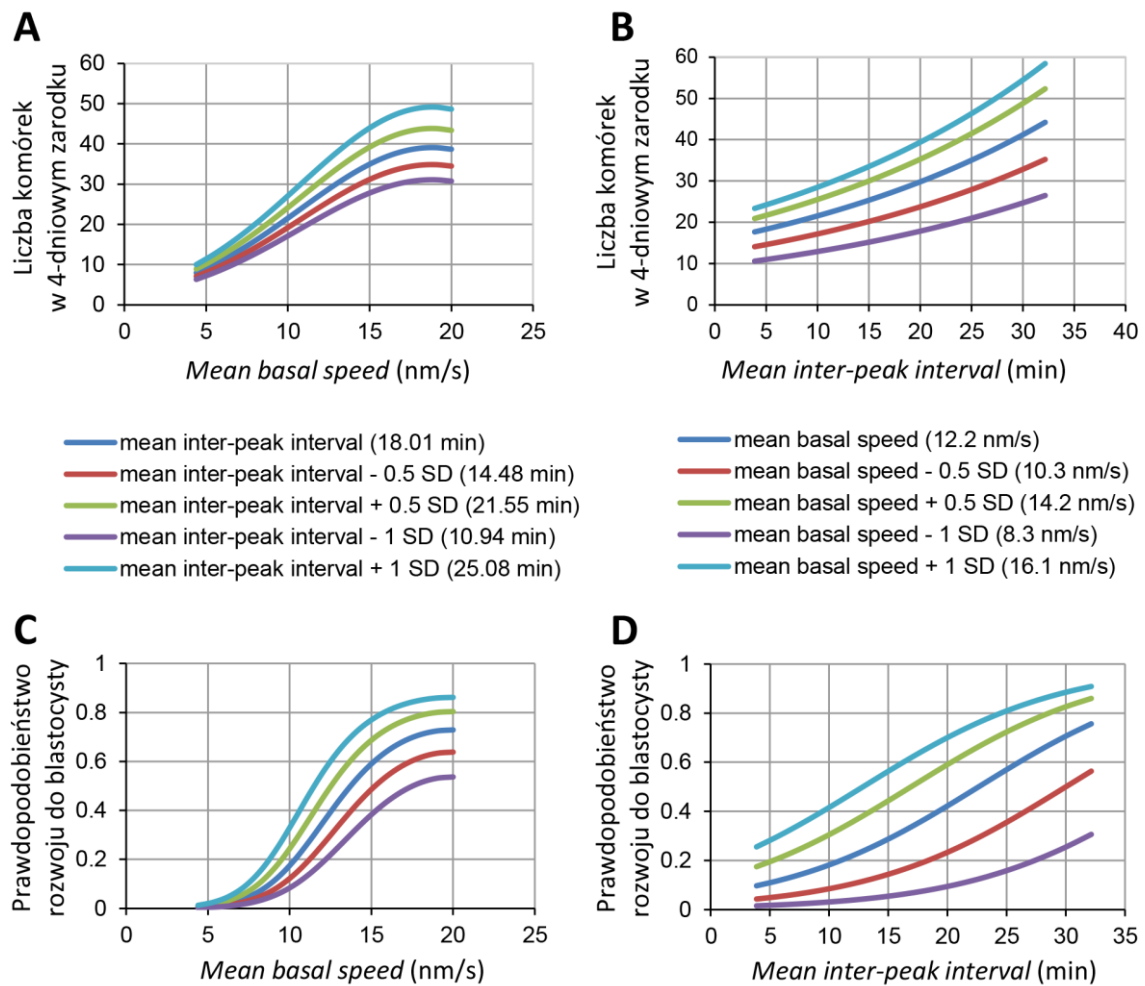
(A) Asymetryczna lokalizacja filamentów aktynowych i miozyny w zygotie myszy. Filamenty aktynowe akumulują się głównie w rejonie wzgórka zapłodnienia. Panel lewy – utrwalona zygot, filamente aktynowe wybarwione falloidyną. Panel prawy – przyżyciowe zdjęcia zygot ekspresujących motyw utrofiny ometkowany EGFP, wiążący się z filamentami aktynowymi (górne zdjęcie) lub regulatorowy lekki łańcuch miozyny II z metką GFP (dolne zdjęcie). FC – wzgórek zapłodnienia. (B) Ruch cytoplazmy w zygotach traktowanych nokodazolem (inhibitor polimeryzacji mikrotubul), cytochalazyną D (inhibitor polimeryzacji filamentów aktynowych) lub ML-7 (inhibitor kinazy MLCK, a w konsekwencji miozyny II). (C) Korelacja czasowa między szybkimi ruchami cytoplazmy (linia niebieska) a zmianami we fluorescencji barwnika FuraRed, indykatora $[Ca^{2+}]_i$ (linia zielona) w przykładowej zygotie. (D) Prędkość ruchu cytoplazmy (linia niebieska) w zygotie traktowanej związkiem BAPTA, chelatorem Ca^{2+} ; $[Ca^{2+}]_i$ pokazane jako fluorescencja FuraRed (linia zielona).

aktynowe, podobnie jak i miozyna, akumulują się w korteksie oocytu nad chromosomami żeńskimi (rejon, gdzie tworzy się drugie ciało kierunkowe) oraz nad chromatyną męską (wzgórek zapłodnienia), czyli w miejscach, które pełnią funkcję pomp napędzających ruch cytoplazmy (Rycina 4A). Zablokowanie funkcjonalności cytoszkieletu aktyno-miozynowego poprzez podanie specyficznych inhibitorów drobnocząsteczkowych całkowicie uniemożliwiło powstawanie szybkich ruchów cytoplazmy, a także znacząco obniżyło prędkość ruchu cytoplazmy w okresach *inter-peak*. Podobnej zmiany nie zanotowaliśmy, gdy zahamowana została dynamika mikrotubul (Rycina 4B). Pokazaliśmy również, że oscylacyjne zmiany prędkości cytoplazmy korelują czasowo z oscylacjami $[Ca^{2+}]_i$: wzrostowi

$[Ca^{2+}]_i$ towarzyszy szybki ruch cytoplazmy (Rycina 4C). Co więcej, oscylacje $[Ca^{2+}]_i$ są konieczne do wygenerowania szybkich ruchów cytoplazmy: jeśli zostaną zablokowane poprzez podanie związku chelatującego wolne jony Ca^{2+} w cytoplazmie oocytu, gwałtowne ruchy cytoplazmy nie powstaną (Rycina 4D). W literaturze możemy znaleźć wiele danych wskazujących na związek jonów Ca^{2+} z regulacją kurczliwości cytoszkieletu aktyno-miozynowego, np. poprzez zależne od Ca^{2+} kinazy takie jak: MLCK (z ang. *myosin light chain kinase*), CaMKII (z ang. *Ca²⁺/calmodulin-dependent kinase II*) czy cPKC (z ang. *conventional protein kinase C*) (Halet i wsp., 2004; Markoulaki i wsp., 2003, 2004; Ducibella i Fissore, 2008). Dlatego wydaje się nam wysoce prawdopodobnym, że zarówno szybkie ruchy cytoplazmy, jak i towarzyszące im pulsacje wzgórka zapłodnienia, związane są z zależną od Ca^{2+} kurczliwością cytoszkieletu aktyno-miozynowego i z niesymetrycznym rozłożeniem tego cytoszkieletu w oocycie.

W trakcie badań nad dynamiką ruchów cytoplazmy pojawiło się pytanie o ich funkcję. Niestety, zaburzenie ruchu cytoplazmy w taki sposób, by nie zakłócić działania innych ważnych dla zarodka komponentów komórki, jest trudne. Pewnym rozwiązaniem może być tu wspomniane już wcześniej zapłodnienie techniką ICSI, które umożliwia wprowadzenie plemnika bądź to w pobliże korteksu oocytu (wtedy powstaje wzgórek zapłodnienia i oscylacyjne ruchy cytoplazmy), bądź w rejon centralny komórki (brak wzgórka zapłodnienia i ruchów cytoplazmy). Doświadczenia z wykorzystaniem tych dwóch typów ICSI wykazały, że brak pulsacyjnych ruchów cytoplazmy nie wpływa negatywnie na rozwój zarodków, przynajmniej na etapie rozwoju przedimplantacyjnego (dane niepublikowane, Ajduk, Seres, Yu, Zernicka-Goetz). Wynik ten sugeruje zatem, że pulsacje cytoplazmy nie odgrywają istotnej roli w rozwoju zarodka. Można je jednak wykorzystać jako łatwe do zwizualizowania odzwierciedlenie kluczowych dla zarodka parametrów, takich jak wzór oscylacji $[Ca^{2+}]_i$ i funkcjonalność cytoszkieletu aktyno-miozynowego. Analiza dynamiki cytoplazmy mogłaby zatem dostarczyć informacji o potencjale rozwojowym zarodków i znaleźć zastosowanie w procedurach ewaluacji jakości zarodków stosowanych w praktyce medycznej i weterynaryjnej.

W kolejnej serii doświadczeń udało nam się powiązać dynamikę cytoplazmy w zapłodnionych oocytach myszy z ich potencjałem rozwojowym, mierzonym jako zdolność do rozwoju przed- i poimplantacyjnego. W pierwszej kolejności, zebraliśmy dane dotyczące 71 zarodków uzyskanych przez zapłodnienie *in vitro*: (i) średnią prędkość cytoplazmy w okresie *inter-peak* (tzw. *mean basal speed*, parametr, który, jak wykazaliśmy wcześniej, odzwierciedla funkcjonalność cytoszkieletu aktyno-miozynowego), (ii) średni czas pomiędzy kolejnymi okresami *speed-peak* (tzw. *mean inter-peak interval*, odpowiadający średniemu czasowi pomiędzy kolejnymi wyrzutami Ca^{2+}), (iii) liczbę komórek, z których zbudowane były poszczególne zarodki po 4 dniach hodowli *in vitro* i (iv) zdolność zarodków do osiągnięcia stadium blastocysty. Analiza statystyczna tych danych wykazała, że dla różnych wartości *mean inter-peak interval* występują statystycznie istotne zależności między *mean basal speed* a liczbą komórek w 4-dniowym zarodku. Liczba komórek w 4-dniowym zarodku początkowo wzrastała wraz z *mean basal speed* aż do osiągnięcia pewnej granicznej wartości (średnia + 1.7 odchylenia standardowego (SD)), kiedy to do krzywa opisująca zależność między tymi zmiennymi ulegała wypłaszczeniu lub zaczynała opadać. Ponadto, dla różnych wartości *mean basal speed*, średnia liczba komórek w 4-dniowym zarodku wzrastała proporcjonalnie do długości *mean inter-peak interval* (1,3 razy przy wydłużeniu *mean inter-peak interval* o 1 SD, czyli ok. 7 min) (Rycina 5A-B). Podobne zależności zaobserwowaliśmy pomiędzy parametrami opisującymi dynamikę ruchu cytoplazmy a zdolnością zarodka do osiągnięcia stadium blastocysty w czasie 4 dni hodowli. Analiza statystyczna wykazała, że prawdopodobieństwo rozwinięcia się blastocysty wzrasta wraz ze wzrostem *mean basal speed* oraz *mean inter-peak interval* (Rycina 5C-D). Następnie sprawdziliśmy, czy analiza dynamiki ruchu cytoplazmy w zapłodnionych oocytach pozwala na odróżnienie zarodków, które z wysokim



Rycina 5. Matematyczne modele wiążące dynamikę ruchu cytoplazmy z jakością przedimplantacyjnego zarodka myszy.

(A) Zależność między *mean basal speed* a liczbą komórek w 4-dniowym zarodku myszy z uwzględnieniem różnych wartości *mean inter-peak interval*. (B) Zależność między *mean inter-peak interval* a liczbą komórek w 4-dniowym zarodku myszy z uwzględnieniem różnych wartości *mean basal speed*. (C) Zależność między *mean basal speed* a prawdopodobieństwem osiągnięcia przez zarodek stadium blastocysty z uwzględnieniem różnych wartości *mean inter-peak interval*. (D) Zależność między *mean inter-peak interval* a prawdopodobieństwem osiągnięcia przez zarodek stadium blastocysty z uwzględnieniem różnych wartości *mean basal speed*.

prawdopodobieństwem będą w stanie zaimplantować się w macicy i przejść pełen rozwój poimplantacyjny, od tych, dla których tak mierzony potencjał rozwojowy jest niski. W tym celu uzyskiwaliśmy zarodki przez zapłodnienie *in vitro* i analizowaliśmy w nich wybrane parametry opisujące ruch cytoplazmy (*mean basal speed* i *mean inter-peak interval*). Następnie, w oparciu o modele statystyczne opisane wcześniej, przydzielaliśmy je do jednej z dwóch grup – zarodków o wysokim lub niskim potencjale rozwojowym – i na stadium 2-komórkowym transferowaliśmy, osobno dla każdej z grup, do jajowodów samic biorkrzyń. Założyliśmy, że zarodki o wysokim potencjale rozwojowym to takie, które wg. naszego modelu po 4 dniach hodowli *in vitro* miałyby od 25 do 52 komórek i były zdolne do osiągnięcia stadium blastocysty z prawdopodobieństwem 0,25-0,9. Z kolei zarodki o niskim potencjale rozwojowym miałyby po 4 dniach hodowli od 9 do 24 komórek i tworzyłyby blastocystę z prawdopodobieństwem 0-0,25. Zarodki ocenione jako posiadające wysoki potencjał rozwojowy

rozwijały się do stadium cylindra zarodkowego (6,5 *dpc*) 5 razy częściej (83,3%, vs. 16,7%), a do dnia narodzin (19,5 *dpc*) prawie 3 razy częściej (87,5%, vs. 31,6%) niż zarodki o niskim potencjale rozwojowym. Podsumowując, wyniki te potwierdziły, że dynamika cytoplazmy w zapłodnionym oocyte może być wyznacznikiem zdolności rozwojowych zarodków myszy. Jest to tym ciekawsza ewentualność, że, jak pokazały nasze dalsze analizy, obrazowanie zapłodnionych oocytów konieczne do określenia parametrów opisujących ruch cytoplazmy, nie wpływa negatywnie na rozwój zarodków, przynajmniej na etapie przedimplantacyjnym.

Znaczenie wyników. Do oceny potencjału rozwojowego zarodków stosuje się wiele różnych metod – począwszy od analiz genetycznych, poprzez testy biochemiczne, po przeżyciowe obrazowanie mikroskopowe (przegląd w **Ajduk i Żernicka-Goetz, 2013**). Opisana przez nas metoda analizy ruchu cytoplazmy (objęta patentem międzynarodowym, którego jestem współautorem) wpisuje się w to ostatnie podejście do ewaluacji zarodków. Jej innowacyjność przejawia się tym, że w sposób nieinwazyjny dostarcza informacji o wzorze oscylacji $[Ca^{2+}]_i$, wzbudzonych w oocyte przez plemnik, oraz o funkcjonalności cytoszkieletu aktyno-miozynowego. Zakłócona funkcjonalność cytoszkieletu aktyno-miozynowego prowadzi m.in. do zaburzeń w cytokinezie i w przemieszczaniu się organelli w komórce (przegląd w Sun i Schatten, 2006 oraz D'Avino i wsp., 2015), a w konsekwencji zmniejsza potencjał rozwojowy zarodków. Analiza prędkości cytoplazmatycznej (*mean basal speed*) może być zatem szczególnie użyteczna w przypadku oocytów kriokonserwowanych, ponieważ procedura ta często przyczynia się do uszkodzeń cytoszkieletu aktynowego komórki (Saunders i wsp., 1999; Hosu i wsp., 2008; Luciano i wsp., 2009). Oscylacje $[Ca^{2+}]_i$ indukują z kolei szereg procesów niezbędnych do prawidłowego rozwoju embrionalnego, takich jak zakończenie drugiego podziału mejotycznego w oocyte, wytworzenie bloku przeciwko polispermii czy inicjacja podziałów mitotycznych zarodka. Co więcej, wykazano, że regulują one aktywność mitochondriów, translację matczynej mRNA i ekspresję genomu zarodkowego (Dumollard i wsp., 2004; Ozil i wsp., 2005, 2006; Campbell i Swann, 2006; Toth i wsp., 2006; przegląd w Ducibella i wsp., 2006; Sanders i Swann, 2016). Wszystkie wyżej wymienione procesy wymagają, aby $[Ca^{2+}]_i$ było podwyższone przez pewien określony czas, a ten zależy, między innymi, od częstotliwości wyrzutów Ca^{2+} , a zatem długości *mean inter-peak interval* (Ozil i wsp., 2005, 2006; Toth i wsp., 2006). Co ważne, wykazano, że zarówno zbyt krótki, jak i zbyt długi okres podwyższonego $[Ca^{2+}]_i$ zmienia wzorzec ekspresji genów zarodkowych i upośledza rozwój przedimplantacyjny lub poimplantacyjny (Ozil i wsp., 2006; Toth i wsp., 2006).

Do momentu publikacji naszej pracy nie istniała metoda pozwalająca na uzyskanie informacji o jakości cytoszkieletu aktyno-miozynowego i wzorze oscylacji $[Ca^{2+}]_i$ w sposób nieinwazyjny, ponieważ wcześniejsze metody ich obrazowania wykorzystywały barwniki fluorescencyjne i szkodliwe naświetlanie. Według niedawno opublikowanych badań, informacji o jakości cytoszkieletu może co prawda dostarczyć aspiracyjny pomiar właściwości mechanicznych komórki (Yanez i wsp., 2016), lecz nie pozwala on na analizę oscylacji $[Ca^{2+}]_i$. Oczywiście, aby opracowana przez nas metoda analizy zarodków mogła stać się techniką wykorzystywaną w praktyce medycznej lub weterynaryjnej, potrzebne są dalsze badania. Należy potwierdzić, że podobne ruchy cytoplazmy występują w zapłodnionych oocytach innych gatunków ssaków, w tym ludzi, oraz stworzyć i zwalidować model predykcyjny wiążący określone parametry ruchu cytoplazmy z prawdopodobieństwem implantacji i/lub żywych narodzin. Do tej pory udało się wykazać, że oscylacyjne ruchy cytoplazmy występują w oocytach ludzkich aktywowanych partenogenetycznie po nieskutecznej próbie zapłodnienia techniką ICSI (Swann i wsp., 2012). Dodatkowo, opisano zależność między dynamiką cytoplazmy a jakością blastocyst powstałych z zapłodnionych oocytów w wyniku hodowli *in vitro* oraz stworzono model pokazujący związek między parametrem *mean inter-peak interval* i wybranymi parametrami morfokinetycznymi (tzn. związanymi z tempem bruzdkowania), a liczbą komórek w 5-dniowym zarodku myszy (Milewski et al., 2018, więcej szczegółów w pkt. 4. opisu osiągnięcia habilitacyjnego).

Analiza ruchu cytoplazmy może być także wykorzystana do oceny jakości niezapłodnionych oocytów. Praca Yi i wsp. (2011) pokazała, że aktywno-zależny ruch cytoplazmy skierowany w stronę korteksu oocyta utrzymuje wrzeciono metafazy drugiego podziału mejotycznego we właściwej, podbłonowej pozycji. Dodatkowo, choć analiza ruchu cytoplazmy nie dostarcza informacji o amplitudzie poszczególnych wyrzutów Ca^{2+} tworzących oscylacje $[Ca^{2+}]_i$, może stanowić interesującą (i tańszą, gdyż niewymagającą zastosowania fluorescencji) alternatywę do procedury testującej jakość ludzkich plemników poprzez badanie ich zdolności do wywoływania oscylacji $[Ca^{2+}]_i$ w oocytach myszy (ang. *mouse oocyte calcium analysis*, MOCA, Vanden Meerschaut i wsp., 2013; Durban i wsp., 2015)

2. Regulacja czasu trwania fazy M pierwszego podziału zarodkowego myszy

Praca oryginalna: Ajduk A, Strauss B, Pines J, Zernicka-Goetz M. (2017) Delayed APC/C activation extends the first mitosis of mouse embryos. *Scientific Reports* 7: 9682.

Wstęp. Faza M, czyli okres między rozpadem otoczki jądrowej (NEBD, z ang. *nuclear envelope breakdown*) a początkiem anafazy, jest kluczowy dla utrzymania prawidłowej ploidii komórki. To właśnie wtedy chromosomy muszą zostać w odpowiedni sposób przyłączone do mikrotubul wrzeciona mitotycznego, aby umożliwić symetryczne rozdzielenie chromatyd siostrzanych do komórek potomnych. Czas potrzebny do powstania w pełni funkcjonalnego wrzeciona podziałowego zapewnia mechanizm regulujący aktywność kompleksu ligazy ubikwityny APC/C, (z ang. *anaphase promoting complex/cyclosome*). Głównym elementem tego mechanizmu jest punkt kontrolny związany z wrzecionem (SAC, z ang. *spindle assembly checkpoint*), który monitoruje sposób podłączenia chromosomów do mikrotubul wrzeciona (przegląd w Musacchio i Salmon, 2007 i Lara-Gonzalez i wsp., 2012). Dopóki nie powstaną prawidłowe połączenia, białkowy kompleks MCC (z ang. *mitotic checkpoint complex*) hamuje aktywność APC/C względem części białek, wiążąc CDC20, aktywator APC/C (Sudakin i wsp., 2001; Chao i wsp., 2012; Izawa i Pines, 2015; Alfieri i wsp., 2016, Yamaguchi i wsp., 2016). Wyjątkiem jest tu cyklina A2, białko gromadzone w czasie interfazy i konieczne do tego, by komórka mogła zainicjować przejście do fazy M. W typowym podziale mitotycznym ulega ona ubikwitynacji przez APC/C i degradacji w czasie NEBD (den Elzen i Pines, 2001; Geley i wsp., 2001). Jest to możliwe dlatego, że cyklina A2 współzawodniczy z białkiem BUBR1, składnikiem MCC, i wiąże CDC20 (Di Fiore i Pines, 2010). Kompleks cyklina A2-CDC20 wiąże się następnie z APC/C poprzez białko CKS (Wolthuis i wsp., 2008, Di Fiore i wsp., 2015), co pozwala na selektywną ubikwitynację cykliny A2, podczas gdy pozostałe substraty APC/C, np. cyklina B1, białko współtworzące kompleks MPF (z ang. *M-phase promoting factor*), utrzymujący komórkę w fazie M, pozostają nienaruszone. Ubikwitynacja i degradacja cykliny B1, konieczne do spadku aktywności MPF i inicjacji anafazy, są możliwe dopiero po unieczynnieniu SAC i uwolnieniu przez MCC białka CDC20, które wiąże się z APC/C (Clute i Pines, 1999; Hagting i wsp., 2002).

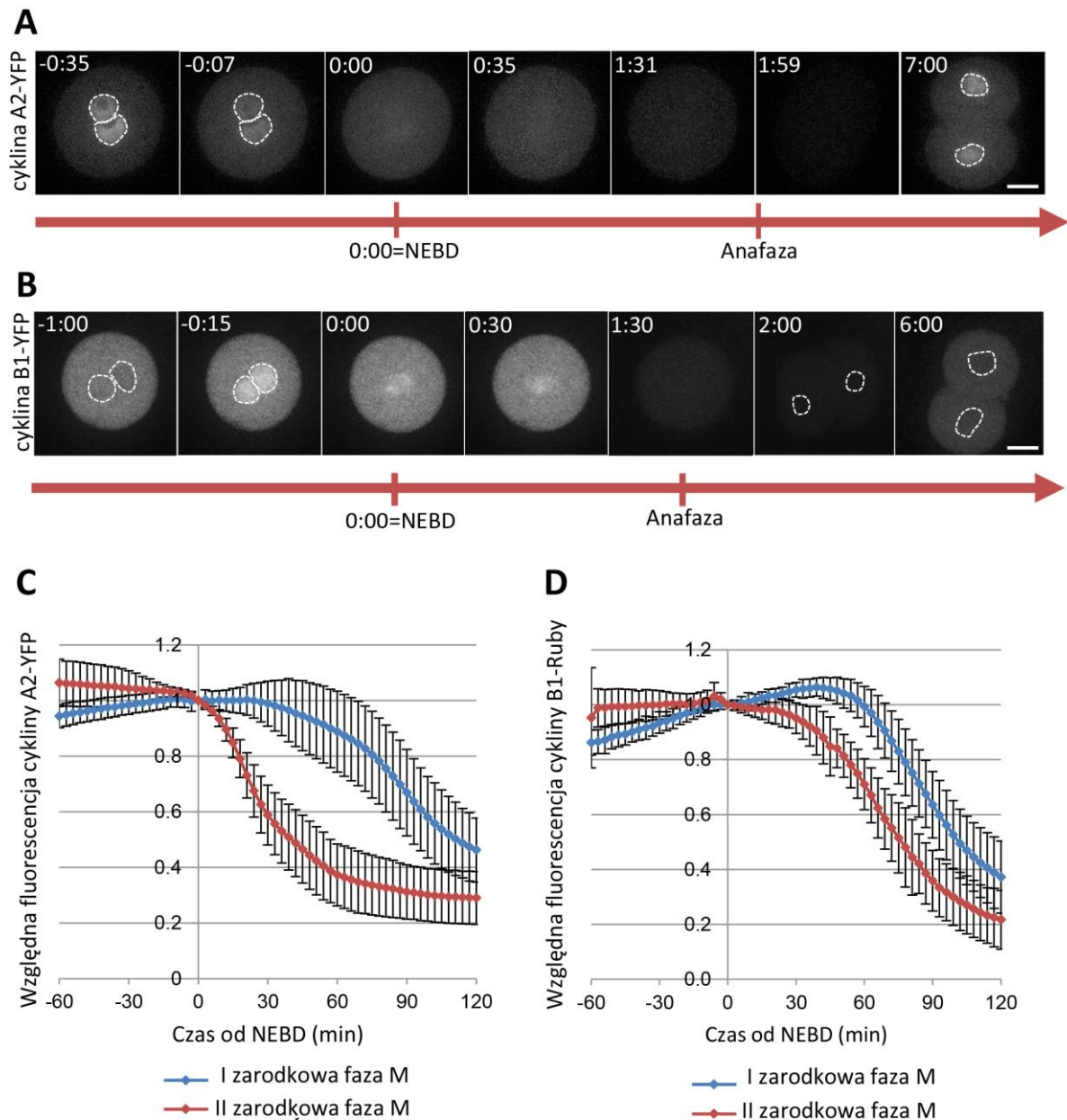
Pierwsza faza M w zarodkach zwierząt trwa znacznie dłużej niż ma to miejsce w kolejnych podziałach bruzdkowania, np. w zarodkach myszy aż 90-120 min, podczas gdy druga faza M już tylko 60-80 min (Sikora-Polaczek i wsp., 2006; Maciejewska i wsp., 2009; przegląd w Kubiak i wsp., 2008a). Dla porównania, w komórkach somatycznych długość fazy M waha się od 30 do 60 minut, w zależności od rodzaju komórki i długości regulowanej przez SAC prometafazy, czyli okresu, w którym tworzą się wrzeciono i prawidłowe połączenia między chromosomami i mikrotubulami (Rieder i wsp., 1994; Gorbsky i wsp., 1998; Howell i wsp., 2000; Jones i wsp., 2004; Meraldi i wsp., 2004). Przed publikacją pracy Ajduk et al. (2017) mechanizm odpowiadający za wydłużenie pierwszej zarodkowej fazy M był nieznany. Postulowano jednakże, że może być on związany z białkiem EMI2, będącym inhibitorem CDC20 (Rauh i wsp., 2005; Tung i wsp., 2005; Shoji i wsp., 2006; Kubiak i wsp., 2008b). EMI2 jest obecne

w oocytach w metafazie drugiego podziału mejotycznego, hamując w nich aktywność APC/C, a w konsekwencji utrzymując je w tym stadium aż do momentu zapłodnienia. Dopiero wniknięcie plemnika i związane z nim oscylacje $[Ca^{2+}]_i$ prowadzą do degradacji EMI2 (Rauh i wsp., 2005; Liu i Maller, 2005; Schmidt i wsp., 2005; Hansen i wsp., 2006). Białko EMI2 ulega jednak resyntezie w zygotach (Shoji i wsp., 2006). Alternatywnie, wydłużenie zygotycznej fazy M może być spowodowane utrzymaniem się w cytoplazmie zarodka puli stabilnej cykliny A2, która, oddziaływując z APC/C, hamuje wydajną ubikwitynację cykliny B1 (Winston i wsp., 2000; Kubiak i Ciemerych, 2001; Izawa i Pines, 2011).

Wyniki. Nasze badania zaczęliśmy od scharakteryzowania dynamiki degradacji cykliny A2 i B1 w dzielących się 1- i 2-komórkowych zarodkach myszy. W tym celu zarodki zostały nastrzyknięte egzogennym mRNA kodującym znakowaną fluorescencyjnie cyklinę A2 lub B1 i filmowane poklatkowo w czasie podziału mitotycznego z wykorzystaniem mikroskopu konfokalnego bądź fluorescencyjnego. Wykazaliśmy, że cyklina A2 w czasie interfazy lokalizowała się w jądrach zarodków, z których była uwalniana do cytoplazmy podczas NEBD, ulegała degradacji przed inicjacją anafazy, a następnie była resyntetyzowana i importowana do jąder komórek potomnych. Choć w zarodkach 2-komórkowych degradacja cykliny A2 rozpoczynała się w czasie NEBD, dokładnie tak jak w komórkach somatycznych (den Elzen i Pines, 2001; Geley i wsp., 2001), w zygotach była opóźniona średnio o ponad 30 min, a jej późniejszy przebieg był spowolniony (Rycina 6A, C). Cyklina B1, z kolei, lokalizowała się w cytoplazmie przez większość interfazy i przemieszczała się do jądra dopiero podczas profazy, około 30 minut przed NEBD. W czasie NEBD cyklina B1 była uwalniana do cytoplazmy, gdzie pozostawała związana z wrzecionem mitotycznym. Uległa degradacji w podobnym tempie podczas pierwszego i drugiego podziału mitotycznego, ale, tak jak w przypadku cykliny A2, początek degradacji cykliny B1 w czasie pierwszego podziału mitotycznego był znacząco opóźniony (około 30 min) w porównaniu z drugim podziałem (Rycina 6B, D). Opóźnienie degradacji cykliny A2 i cykliny B1 w zygotach w porównaniu do zarodków 2-komórkowych przekładało się na wydłużenie czasu trwania całej fazy M. Jednakże analiza korelacji między początkiem degradacji cykliny i czasem trwania fazy M wykazała, że tylko opóźnienie w degradacji cykliny B1, a nie w degradacji cykliny A2, korelowało z wydłużeniem długości fazy M ($R=0,67$, $p<0,001$). Sugeruje to, że dłuższy czas trwania pierwszego podziału mitotycznego jest spowodowany opóźnionym rozkładem cykliny B1, a nie cykliny A2, i że stabilna pula cykliny A2 nie odgrywa roli dodatkowego regulatora APC/C. Konkluzję tę potwierdziły dalsze doświadczenia, w których pokazaliśmy, że nadekspresja cykliny A2 nie wpłynęła znacząco na czas inicjacji degradacji cykliny B1. Co więcej, obrazując jednocześnie degradację fluorescencyjnie wyznakowanych cykliny A2 i B1, ujawniliśmy, że degradacja cykliny B1 jest inicjowana średnio 3 minuty po inicjacji degradacji cykliny A2, kiedy to poziom cykliny A2 zdążył ulec zmniejszeniu jedynie o średnio 0,7%.

Szukając alternatywnych przyczyn wydłużenia fazy M w zygotach myszy, wykazaliśmy, że zahamowanie SAC przy użyciu drobnocząsteczkowego inhibitora kinazy MPS1, kluczowego elementu SAC (Santaguida i wsp., 2010; Tipton i wsp., 2013), przyspiesza początek degradacji zarówno cykliny B1, jak i cykliny A2 (Rycina 7A-B). Ta druga obserwacja była zaskakująca, gdyż w komórkach somatycznych SAC nie reguluje degradacji cykliny A2 (den Elzen i Pines, 2001; Geley i wsp., 2001). Doszliśmy jednak do wniosku, że choć SAC wpływa na czas degradacji cykliny B1 i A2, a zatem może być odpowiedzialny za przedłużenie pierwszej fazy M zarodka myszy, nie jest jedynym mechanizmem opóźniającym degradację tych białek. Inaktywacja SAC podczas pierwszego podziału zarodkowego nie skróciła bowiem okresu pomiędzy NEBD a początkiem degradacji cykliny B1 i cykliny A2 do długości podobnej do okresu obserwowanego w kolejnym podziale zarodkowym.

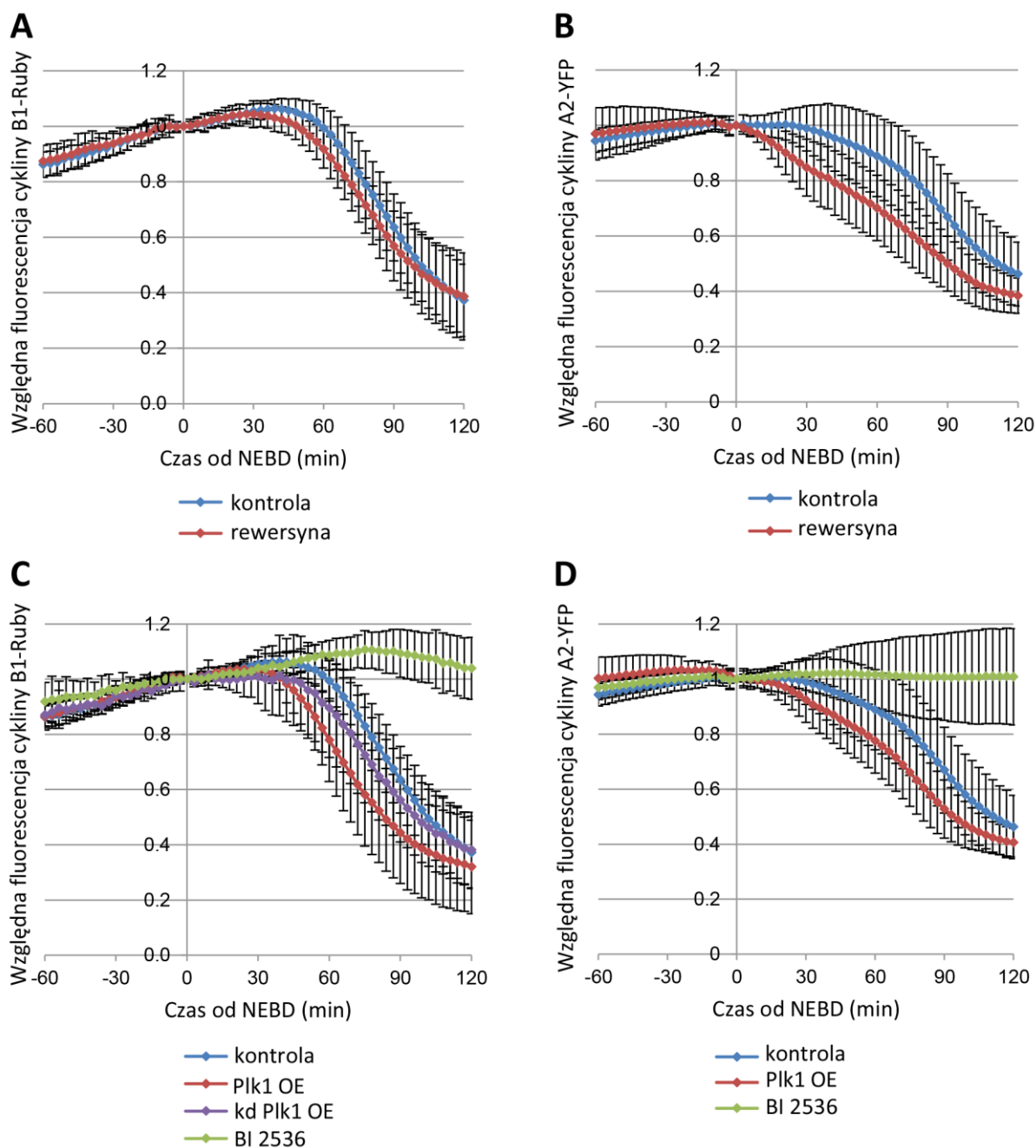
Następnym mechanizmem, który poddany został eksperymentalnej weryfikacji, było hamowanie APC/C przez białko EMI2, które po degradacji wywołanej przez zapłodnienie ulega resyntezie w zygotach (Shoji i wsp., 2006). Doświadczenia z wykorzystaniem specyficznych względem



Rycina 6. Czasowa i przestrzenna dynamika cyklin A2 i B1 w czasie pierwszego i drugiego podziału mitotycznego zarodka myszy.

(A) Wybrane zdjęcia z poklatkowego nagrania dzielącej się zygoty ekspresyjnej cyklinę A2 z metką YFP. (B) Wybrane zdjęcia z poklatkowego nagrania dzielącej się zygoty ekspresyjnej cyklinę B1 z metką YFP. Czas (h:min) w (A) i (B) liczony od momentu rozpadu otoczki jądrowej przedjadrzy (NEBD). Skala w (A) i (B) 20 μm . (C) Degradacja cykliny A2-YFP w dzielących się zarodkach 1- i 2-komórkowych. (D) Pomiar degradacji cykliny B1-Ruby w dzielących się zarodkach 1- i 2-komórkowych. Wykresy w (C) i (D) pokazują wartość uśrednioną dla grupy \pm odchylenie standardowe.

EMI2 cząsteczek morfolino wykazały, że deplecja EMI2 w zygotach myszy nie przyspieszyła momentu rozpoczęcia degradacji cykliny B1. Zatem EMI2 nie jest najprawdopodobniej zaangażowane w regulację aktywności APC/C w zygotach, a tym samym nie odpowiada za wydłużenie zygotycznej fazy M.



Rycina 7. Rola punktu kontrolnego związanego z wrzecionem (SAC) i kinazy PLK1 w regulacji degradacji cyklin B1 i A2 w zygotach myszy.

(A) Degradacja cykliny B1-Ruby w dzielących się zygotach kontrolnych i traktowanych rewersyną (inhibitorem kinazy MPS1, składnika SAC). (B) Degradacja cykliny A2-YFP w dzielących się zygotach kontrolnych i traktowanych rewersyną. (C) Degradacja cykliny B1-Ruby w dzielących się zygotach kontrolnych, nastrzykniętych RNA aktywnej lub nieaktywnej formy PLK1 (PIK1 OE lub kd PIK1 OE) oraz traktowanych BI 2536 (inhibitor PLK1). (D) Degradacja cykliny A2-YFP w dzielących się zygotach kontrolnych, nastrzykniętych RNA aktywnej formy PLK1 (PIK1 OE) oraz traktowanych BI 2536. Wykresy pokazują wartość uśrednioną dla grupy +/- odchylenie standardowe.

Następnie sprawdziliśmy, czy opóźniona aktywacja APC/C jest związana z działaniem kinazy PLK1. PLK1 może oddziaływać na APC/C poprzez zbadane już przez nas wcześniej mechanizmy, takie jak SAC (PLK1 reguluje jego aktywność (przegląd w Combes i wsp., 2017) i EMI2 (fosforylacja katalizowana przez PLK1 kieruje EMI2 do degradacji (Liu i Maller, 2005; Schmidt i wsp., 2005; Hansen i

wsp., 2006)), ale i poprzez bezpośrednią fosforylację APC/C (Golan i wsp., 2002; Kraft i wsp., 2003; Fujimitsu i wsp., 2016; Zhang i wsp., 2016). Wykazaliśmy, że nadekspresja PLK1 w zygotie skróciła czas między NEBD a inicjacją degradacji cykliny B1 oraz całkowitą długość fazy M do długości typowych dla drugiego podziału zarodkowego. Efekt ten nie został zaobserwowany, gdy zastosowano nadekspresję nieaktywnej enzymatycznie wersji kinazy PLK1 (Rycina 7C). Odkryliśmy również, że chociaż PLK1 nie wpływa na degradację cykliny A2 w komórkach somatycznych (Lenart i wsp., 2007), nadekspresja PLK1 znacząco przyspieszyła początek degradacji cykliny A2 w zygotach, chociaż nadal następował on później (licząc do NEBD) niż w zarodkach 2-komórkowych (Rycina 7D). Analogicznie, zahamowanie aktywności PLK1 za pomocą drobnocząsteczkowego inhibitora uniemożliwiło degradację zarówno cykliny B1, jak i cykliny A2 (Rycina 7C-D). Co ważne, PLK1 nie wydaje się wpływać na aktywność APC/C w zygotach poprzez SAC (jej wpływ przez regulację stabilności EMI2 też został wykluczony, gdyż nasze wcześniejsze wyniki wskazują, że EMI2 nie bierze udziału w regulacji aktywności APC/C w zygotach): zastosowanie inhibitora kinazy MPS1, nie zdołało uruchomić degradacji cykliny B1 zahamowanej przez inhibitor PLK1. Barwienia immunofluorescencyjne wykazały subtelną, ale potencjalnie istotną różnicę w lokalizacji aktywnej, ufosforylowanej formy PLK1 (pPLK1) w zarodkach 1- i 2-komórkowych. Zarówno w pierwszej, jak i drugiej, fazie M pPLK1 lokalizowała się na biegunach wrzeciona i chromosomach; jednak w zarodkach 2-komórkowych silniej akumulowała się na kinetochorach, podczas gdy w zygotach rozmieszczona była w sposób bardziej rozproszony wzdłuż całego chromosomu.

Podsumowując, nasze wyniki wskazują, że regulacja degradacji cykliny A2 i B1 w zygotach różni się znacząco od tego, co możemy obserwować w późniejszych etapach rozwoju zarodkowego czy w komórkach somatycznych. Za opóźnioną aktywację APC/C prowadzącą do opóźnionej degradacji cyklin B1 i A2 w zygotach, a w konsekwencji przedłużenia pierwszej zarodkowej fazy M, odpowiada najprawdopodobniej mechanizm zależny od PLK1. Istnieje możliwość, że pewną rolę odgrywa tu też odmienna lokalizacja aktywnego PLK1 w zygotach, jednak potwierdzenie tej hipotezy wymaga dalszych badań.

Znaczenie wyników. Nasze badania jasno wskazały, że reguły rządzące cyklem komórkowym w komórkach somatycznych ssaków nie do końca stosują się do zygot. Różnice były najwyraźniej widoczne w przypadku regulacji degradacji cykliny A2. Pokazaliśmy także, że, wbrew wcześniejszym sugestiom (Kubiak i Ciemerych, 2001; Kubiak i wsp., 2008b), wydłużenie zygotycznej fazy M nie jest związane ani ze stabilną pulą cykliny A2, ani z EMI2, a SAC jest odpowiedzialny za nie jedynie częściowo (zgodnie z wcześniejszymi danymi (Sikora-Polaczek i wsp., 2006) SAC hamuje degradację cykliny B1 jedynie na ok. 10-20 min po NEBD, podobnie, jak ma to miejsce w komórkach somatycznych (Howell i wsp., 2000; Meraldi i wsp., 2004)). Wydaje się natomiast, że kluczową rolę w regulacji aktywności APC/C może odgrywać PLK1, działając najprawdopodobniej na drodze bezpośredniej fosforylacji kompleksu (Golan i wsp., 2002; Kraft i wsp., 2003; Fujimitsu i wsp., 2016; Zhang i wsp., 2016). Jeśli PLK1 jest rzeczywiście w zygotycznej fazie M czynnikiem ograniczającym, to powinna ulegać w tym stadium niższej ekspresji lub być inaczej regulowana niż w czasie późniejszych podziałów zarodkowych – aby zidentyfikować te różnice potrzeba dalszych badań.

Ciekawym zagadnieniem jest też rola, jaką opóźnienie degradacji cyklin może odgrywać w zygotach. W komórkach somatycznych, podobnie jak i w oocytach, cyklina A2 wspomaga korekcję połączeń między chromosomami a mikrotubulami, tworzących się w czasie formowania wrzeciona podziałowego (Kabeche i Compton, 2013; Zhang i wsp., 2017). Podobną funkcję może też pełnić cyklina B1 (Chen i wsp., 2008). W czasie pierwszego podziału zarodkowego utworzenie wrzeciona podziałowego jest odmienne niż w kolejnych podziałach zarodkowych, ponieważ powstaje ono z dwóch odrębnych grup chromosomów – matczynek i ojcowskich (przegląd w Destouni i Vermeesch, 2017). Być może zatem proces ten wymaga dłuższego czasu w zygotach niż w komórkach innego typu,

w związku z czym cykliny A2 i B1 są potrzebne przez dłuższy czas. Kluczowe znaczenie pierwszej zarodkowej fazy M dla późniejszego rozwoju zarodka znalazło swoje odzwierciedlenie w morfokinetycznych protokołach ewaluacji jakości zarodków. Aberracje w czasie jej trwania lub w jej przebiegu są parametrami silnie różnicującym zarodki o różnych zdolnościach rozwojowych (**pkt. 4 osiągnięcia habilitacyjnego**, Meseguer i wsp., 2011; Rubio i wsp., 2012; Athayde Wirka i wsp., 2014; Liu i wsp., 2014; Vera-Rodriguez i wsp., 2015; Yang i wsp., 2015; przegląd w Milewski i Ajduk, 2017).

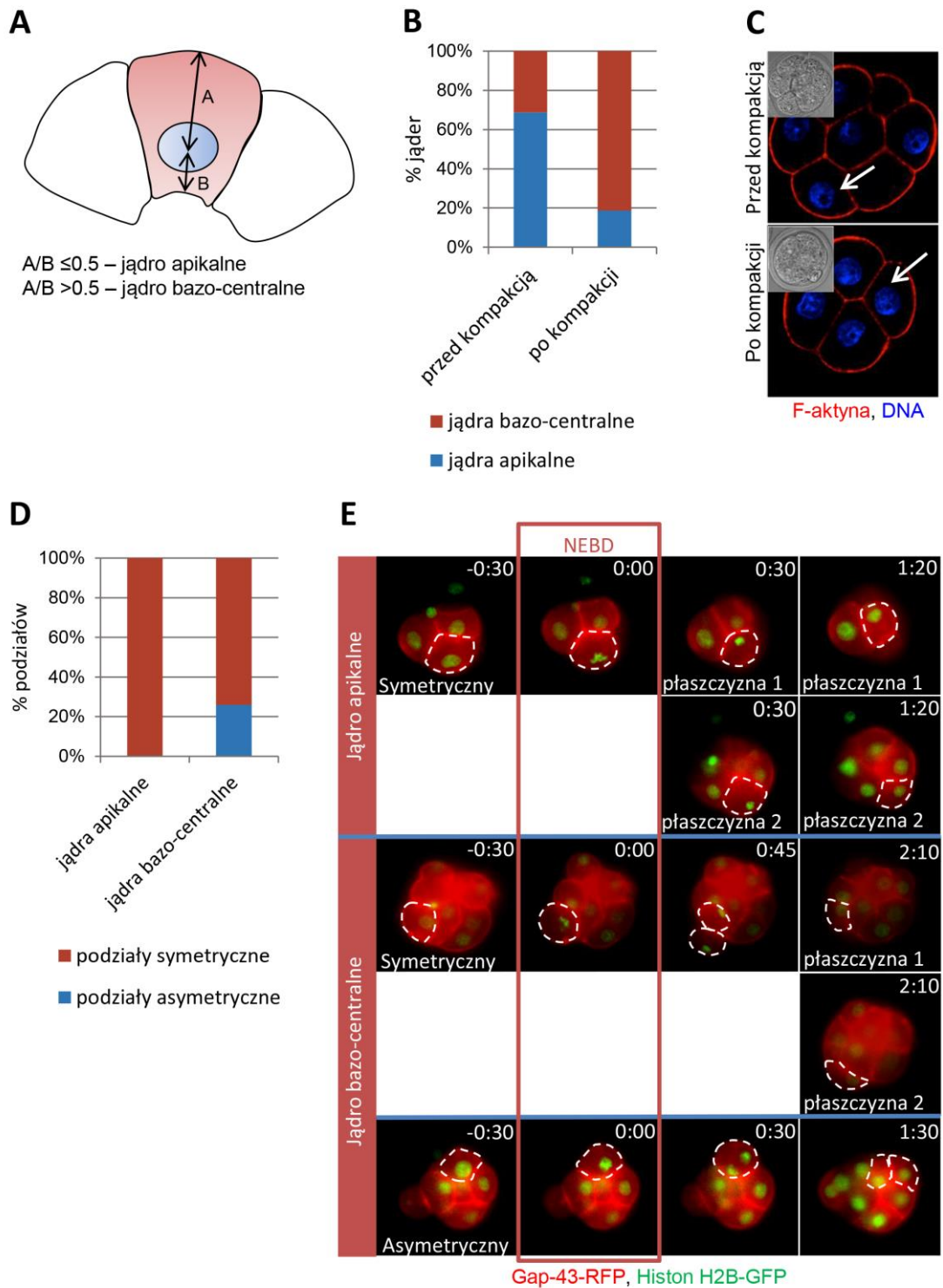
3. Regulacja geometrii podziałów w zarodku 8-komórkowym myszy i jej związek z różnicowaniem komórek zarodkowych

Praca oryginalna: Ajduk A, Biswas Shivhare S, Zernicka-Goetz M. (2014) The basal position of nuclei is one pre-requisite for asymmetric cell divisions in the early mouse embryo. *Developmental Biology* 392: 133-140.

Praca przeglądowa: Ajduk A, Zernicka-Goetz M. (2016) Polarity and cell division orientation in the cleavage embryo: from worm to human. *Molecular Human Reproduction* 22: 691-703.

Wstęp. Jednym z kluczowych dla rozwoju zarodka myszy etapów bruzdkowania jest podział ze stadium 8- do 16-komórkowego. To wówczas dochodzi do segregacji komórek dwóch typów: (i) komórek zewnętrznych, tworzących później trofektodermę blastocysty, oraz (ii) komórek wewnętrznych, budujących następnie węzeł zarodkowy. Początkowo uważano, że o różnych właściwościach komórek tych dwóch typów decyduje ich mikrośrodowisko, tzn. posiadanie (w przypadku komórek zewnętrznych) lub nie (w przypadku komórek wewnętrznych) kontaktu z otoczeniem zarodka (hipoteza *inside-outside*, Tarkowski i Wróblewska, 1967). Według alternatywnego modelu, los komórek jest determinowany na skutek polaryzacji wzdłuż osi apikalno-bazalnej: komórki zewnętrzne są spolaryzowane (tzn. dziedziczą domenę polarną uformowaną w rejonie apikalnym blastomeru), zaś komórki wewnętrzne - apolarne (Johnson i Ziomek, 1981a, b). Obecnie przeważa pogląd, że mikrośrodowisko komórki i polaryzacja wzajemnie od siebie zależą (Cockburn i Rossant, 2010; Nance, 2014).

Polaryzacji wzdłuż osi apikalno-bazalnej ulegają jako pierwsze blastomery zarodka 8-komórkowego i zbiega się ona w czasie z procesem kompaktacji (przegląd w Nance, 2014). Polarność blastomerów przejawia się zarówno w cechach morfologicznych komórek (np. tworzenie mikrokosmków w rejonie apikalnym (Reeve i Ziomek, 1981)), jak i na poziomie molekularnym (np. akumulacja w rejonie apikalnym białek aPKC, PAR6, PAR3 (Plusa i wsp., 2005; Vinot i wsp., 2005) i transkryptów *Cdx2* (Skamagki i wsp., 2013)). W okresie poprzedzającym opublikowanie naszych badań (Ajduk et al., 2014) uważano, że w większości przypadków podziały w czasie przejścia ze stadium 8- do 16-komórkowego przebiegają bądź to symetrycznie, tzn. w płaszczyźnie równoległej do apikalno-bazalnej osi polaryzacji, prowadząc do powstania dwóch polarnych komórek zewnętrznych, bądź asymetrycznie, tzn. w płaszczyźnie prostopadłej od osi polaryzacji, prowadząc do powstania komórki spolaryzowanej (zewewnętrznej) i apolarnej (wewnętrznej) (Johnson i Ziomek, 1981a; Sutherland i wsp., 1990). Znane też były białka predestynujące komórki do asymetrycznych lub symetrycznych podziałów: wysoka ekspresja czynnika transkrypcyjnego CDX2, markera trofektodermi, sprzyja podziałom symetrycznym, zaś niska – podziałom asymetrycznym (Jedrusik i wsp., 2008). Z asymetrycznymi podziałami koreluje też ekspresja metylotransferazy CARM1, enzymu hamującego transkrypcję CDX2 (Parfitt i Zernicka-Goetz, 2010). Ekspresja CARM1 i CDX2 jest powiązana z ekspresją markerów polaryzacji, takich jak aPKC lub PAR3: wysoka ekspresja CDX2 (niska ekspresja CARM1) zwiększa akumulację aPKC i PAR3 w apikalnej części blastomerów (Jedrusik i wsp., 2008; Parfitt i Zernicka-Goetz,



Rycina 8. Lokalizacja jąder w blastomerach 8-komórkowego zarodka myszy a płaszczyzna podziału z 8- na 16-komórek.

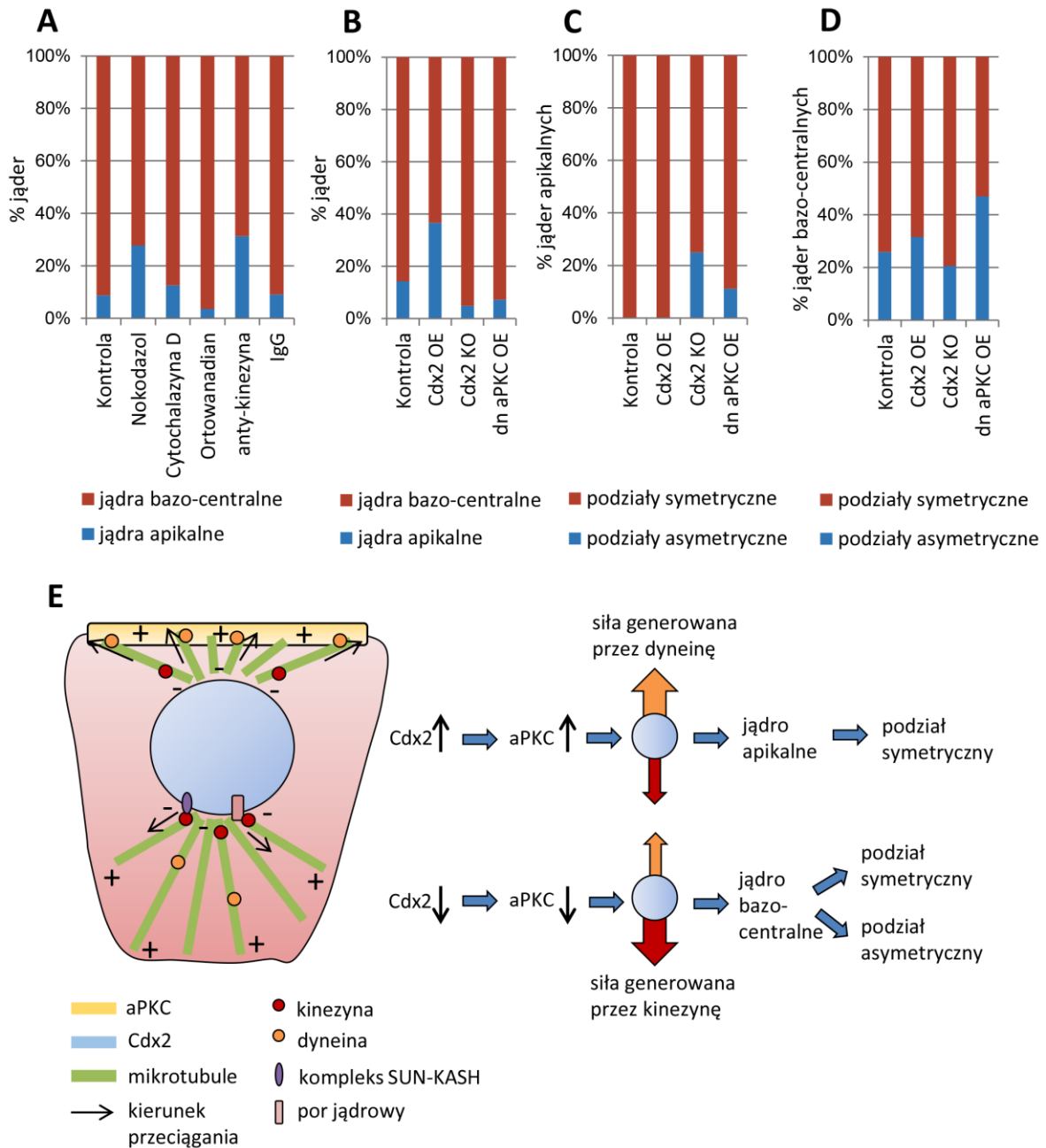
(A) Schemat podziału jąder komórkowych na położone apikalnie i bazo-centralnie. (B) Procent blastomerów z jądrami położonymi apikalnie i bazo-centralnie w zarodkach 8-komórkowych przed i po kompaktacji. (C) Przykładowe zarodki 8-komórkowe utrwalone przed i po kompaktacji; jądra komórkowe oznaczone strzałkami; insert przedstawia zdjęcie zarodka w świetle przechodzącym. (D) Procent podziałów symetrycznych i asymetrycznych zaobserwowanych dla blastomerów z jądrami położonymi apikalnie i bazo-centralnie. (E) Wybrane zdjęcia z nagrania poklatkowego pokazującego podział 8-komórkowego zarodka eksprymującego GAP43-RFP (znacznik błony komórkowej) oraz histon H2B-GFP (znacznik chromatyny).

2010). Jednak dokładny mechanizm regulujący orientację podziału w zarodkach ssaków pozostawał w dużej mierze nieznanym.

Wyniki. Jednym z najbardziej uderzających procesów reorganizacji wewnętrznej struktury blastomeru w czasie kompaktacji (a zatem w czasie ustalania się apikalno-bazalnej osi polaryzacji) jest translokacja jąder komórkowych z rejonu korykalnego ku centrum komórki (Reeve i Kelly, 1983; **Ajduk et al., 2014**) (Rycina 8A-C). Aby zbadać biologiczne znaczenie tego przemieszczenia, zastosowaliśmy technikę mikroskopii konfokalnej połączonej z filmowaniem poklatkowym i powiązaliśmy lokalizację jądra komórkowego (z wizualizowanego dzięki fluorescencyjnie wyznakowanemu histonowi H2B) w blastomerze tuż przed podziałem z 8- na 16-komórek z płaszczyzną tego podziału. Analiza filmów wykazała, że na 30 minut przed NEBD tylko 14% jąder było wciąż zlokalizowanych w rejonie apikalnym komórki, pozostałe znajdowały się w części bazo-centralnej. Co ważne, wykazaliśmy, że blastomery z jądrami zlokalizowanymi apikalnie dzieliły się tylko symetrycznie, natomiast te z jądrami w położeniu bazo-centralnym – zarówno asymetrycznie (26%), jak i symetrycznie (74%) (Rycina 8D-E). Wynik ten sugeruje, że blastomery z jądrami komórkowymi, które pozostały w położeniu apikalnym, stanowią rodzaj „żelaznej rezerwy” dla podziałów symetrycznych, tzn. tworzą pulę komórek, które na pewno podzielią się w ten sposób, podczas gdy płaszczyzna podziału blastomerów z jądrami o położeniu bazo-centralnym jest zmienna i potencjalnie regulowana przez warunki mikrośrodowiska blastomeru.

Następnie zbadaliśmy mechanizm translokacji jąder komórkowych. Depolimeryzacja mikrofilamentów aktynowych nie wpłynęła na przemieszczanie jąder. Natomiast doświadczenia z użyciem inhibitora polimeryzacji mikrotubul wykazały, że za ruch jąder w kierunku bazo-centralnym odpowiadają mikrotubule: w zarodkach ze zdepolimeryzowanymi mikrotubulami znacząco więcej jąder pozostało w rejonie apikalnym komórki, a średnia odległość między jądrem a apikalną częścią błony komórkowej była krótsza niż w zarodkach kontrolnych. Eksperymenty, w których za pomocą przeciwciał blokowaliśmy w zarodkach aktywność kinezy, wykazały, że białkiem motorycznym zaangażowanym w transport jąder ku części bazo-centralnej jest właśnie kinezy. Dyneina natomiast okazała się związana z utrzymaniem jąder w części apikalnej komórki (Rycina 9A). Oba te typy białek motorycznych mogą łączyć się z otoczką jądrową za pośrednictwem kompleksu SUN-KASH (Crisp et al., 2006; McGee i wsp., 2006; przegląd w Tapley i Starr, 2013) lub poprzez interakcje z komponentami porów jądrowych (Cai i wsp., 2001; Padmakumar i wsp., 2005; Payne i wsp., 2003; Splinter i wsp., 2010).

Ze względu na wcześniejsze doniesienia dotyczące wpływu poziomu ekspresji CDX2 na płaszczyznę podziałów blastomerów (Jedrusik i wsp., 2008), postanowiliśmy też sprawdzić, czy poziom ten koreluje z lokalizacją jądra komórkowego. Nadekspresja CDX2 w blastomerach zwiększyła odsetek jąder komórkowych, które przed podziałem z 8 na 16 komórek pozostawały w rejonie apikalnym komórki (37% vs. 14% w zarodkach kontrolnych), a komórki te dzieliły się symetrycznie. Analogicznie, w zarodkach pozbawionych CDX2 odsetek jąder w rejonie apikalnym uległ zmniejszeniu (5% vs. 14% w zarodkach kontrolnych). Ponieważ zwiększona ekspresja CDX2 ułatwia akumulację kinazy aPKC w rejonie szczytowym komórki (Jedrusik i wsp., 2008), postawiliśmy hipotezę, że aPKC może być łącznikiem między poziomem ekspresji CDX2 a lokalizacją jądra komórkowego. Rzeczywiście, jedynie 7% blastomerów ekspresujących nieaktywną wersję aPKC (tzw. *dominant negative* aPKC, dn aPKC) miało jądra komórkowe zlokalizowane w części apikalnej (vs. 14% w kontroli). Co więcej, podziały asymetryczne zdarzały się w blastomerach z dn aPKC dwukrotnie częściej, niż w blastomerach kontrolnych (44% vs. 22%) i w zdecydowanej większości (98%) przechodziły je blastomery, w których jądro komórkowe było zlokalizowane w rejonie bazo-centralnym (Rycina 9B-D).



Rycina 9. Mechanizm przemieszczania się jąder w blastomerach zarodka 8-komórkowego myszy.

(A) Procent blastomerów z jądrami w położeniu apikalnym i bazo-centralnym w zarodkach 8-komórkowych kontrolnych, traktowanych nokodazolem (inhibitor polimeryzacji mikrotubul), cytochalazyną D (inhibitor polimeryzacji filamentów aktynowych), ortowanadianem (inhibitor dyneiny) oraz nastrzykniętych przeciwciałem skierowanym przeciwko kinezyźnie lub kontrolnym przeciwciałem IgG. (B) Procent blastomerów z jądrami w położeniu apikalnym i bazo-centralnym w zarodkach 8-komórkowych kontrolnych, z nadekspresją CDX2 lub nieaktywnej formy aPKC (Cdx2 OE lub dn aPKC OE) lub będących knock-outami pod względem genu *Cdx2* (Cdx2 KO). (C) i (D) Procent podziałów symetrycznych i asymetrycznych dla blastomerów z jądrami położonymi apikalnie (C) i bazo-centralnie (D) pochodzących z 8-komórkowych zarodków kontrolnych, z nadekspresją CDX2 lub nieaktywnej formy aPKC (Cdx2 OE lub dn aPKC OE) lub będących knock-outami pod względem genu *Cdx2* (Cdx2 KO). (E) Model interakcji między CDX2, aPKC, mikrotubulami, dyneiną i kinezyną, regulujących lokalizację jądra komórkowego w blastomerach 8-komórkowego zarodka myszy. Szczegóły w tekście.

Znaczenie wyników. Nasze badania wskazują, że poziom ekspresji CDX2 i aPKC, wpływa, poprzez cytoszkielet mikrotubularny, na lokalizację jąder w 8-komórkowym zarodku myszy, a w konsekwencji na płaszczyznę podziału komórki w czasie przejścia ze stadium 8- do 16-komórkowego. Im wyższa ekspresja CDX2 w blastomerze, tym intensywniej aPKC akumuluje się w rejonie apikalnym. W komórkach *C. elegans* i *Drosophila* aPKC reguluje, wraz z białkami G, aktywność dyneiny (Srinivasan i wsp., 2003; NguyenNgoc i wsp., 2007; Park i Rose, 2008; przegląd w Suzuki i Ohno, 2006; Neumuller i Knoblich, 2009). A zatem w zarodkach myszy aPKC może także wzmacniać oddziaływanie dyneiny z mikrotubulami i w rezultacie wspomagać utrzymanie jąder komórkowych w rejonie apikalnym, zwiększając częstość podziałów symetrycznych. W innych typach komórek ssaczych aPKC i dyneina oddziałują na mikrotubule we współpracy z podjednostką $G\alpha$ oraz białkami LGN i NuMa, zatem istnieje możliwość, że oddziaływania takie mają miejsce także w blastomerach myszy (przegląd w: **Ajduk i Zernicka-Goetz, 2016**). Z drugiej strony, gdy ekspresja CDX2 jest niska, jądro nie jest w sposób efektywny kotwiczone w rejonie apikalnym komórki i zostaje przetransportowane przez kinezyiny w kierunku bazo-centralnym. Blastomery z tak usytuowanym jądrem mogą ulegać podziałom asymetrycznym i symetrycznym (Rycina 9E). Nasze wyniki nie tłumaczą niestety, dlaczego część z nich dzieli się w sposób równoległy do osi polaryzacji, a część w sposób prostopadły. Najprawdopodobniej, inne czynniki, oprócz pozycji jądra komórkowego, regulują płaszczyznę podziału. Ostatnie badania wykazały, że rozdział komórek na wewnętrzne i zewnętrzne może zależeć nie tylko od płaszczyzny podziału blastomeru, ale i od jego właściwości biomechanicznych. Samarage i wsp. (2015) pokazali, że cytoszkielet aktyno-miozynowy jest w stanie wygenerować napięcie na tyle silne, by doprowadzić do zacieśnienia obszaru apikalnego blastomeru i wciągnięcia go do wnętrza zarodka.

Do polaryzacji blastomerów, kluczowej dla rozwoju zarodka, dochodzi w okresie kompaktacji. Nie może więc dziwić, że czas kompaktacji jest jednym z istotnych parametrów morfokinetycznych branych pod uwagę w ocenie potencjału rozwojowego zarodka (patrz **pkt. 4 osiągnięcia habilitacyjnego**, Motato i wsp., 2016, przegląd w Milewski i Ajduk, 2017). Dodatkowo, pojedyncze blastomery zarodków w stadium 8-komórkowym były tradycyjnie wykorzystywane jako źródło materiału do przedimplantacyjnej diagnostyki genetycznej (PGD/PGS) (Harton i wsp., 2011, **Ajduk i Zernicka-Goetz, 2013**), gdyż, jak uważano, zarodek może zrekompensować w trakcie rozwoju ich utratę. Rzeczywiście, zarodki zarówno myszy, jak i człowieka, wykazują się na tym stadium dużymi zdolnościami regulacyjnymi, jednak badania z ostatnich lat, w tym opisana tu nasza praca, wskazują na coraz więcej różnic pomiędzy uważanymi dotychczas za równocenne blastomerami zarodka 8-, a nawet 4-komórkowego (Piotrowska-Nitsche i Zernicka-Goetz, 2005; Piotrowska-Nitsche i wsp., 2005; Torres-Padilla i wsp., 2007; Bischoff i wsp., 2008; Jedrusik i wsp., 2008; Plachta i wsp., 2011; Burton i wsp. 2013; Tabansky i wsp. 2013; **Ajduk i wsp., 2014**; Goolam i wsp., 2016). Zróżnicowanie to może, przynajmniej częściowo, tłumaczyć dane pokazujące, że biopsja blastomerów na stadium 8-komórkowym negatywnie wpływa na rozwój zarodka (np. De Vos i wsp., 2009; Goossens i wsp., 2008, przegląd w Zacchini i wsp., 2017). Obecnie, w klinikach leczenia niepłodności coraz częściej jako źródło materiału do analiz genetycznych stosuje się jednak komórki trofektodermy (Sermon i wsp., 2016).

4. Związek między ruchem cytoplazmy oraz tempem bruzdkowania a zdolnością zarodka do poprawnego rozwoju przedimplantacyjnego

Praca oryginalna: Milewski R, Szpila M, **Ajduk A.** (2018) Dynamics of cytoplasm and cleavage divisions correlates with preimplantation embryo development. *Reproduction* 155: 1-14

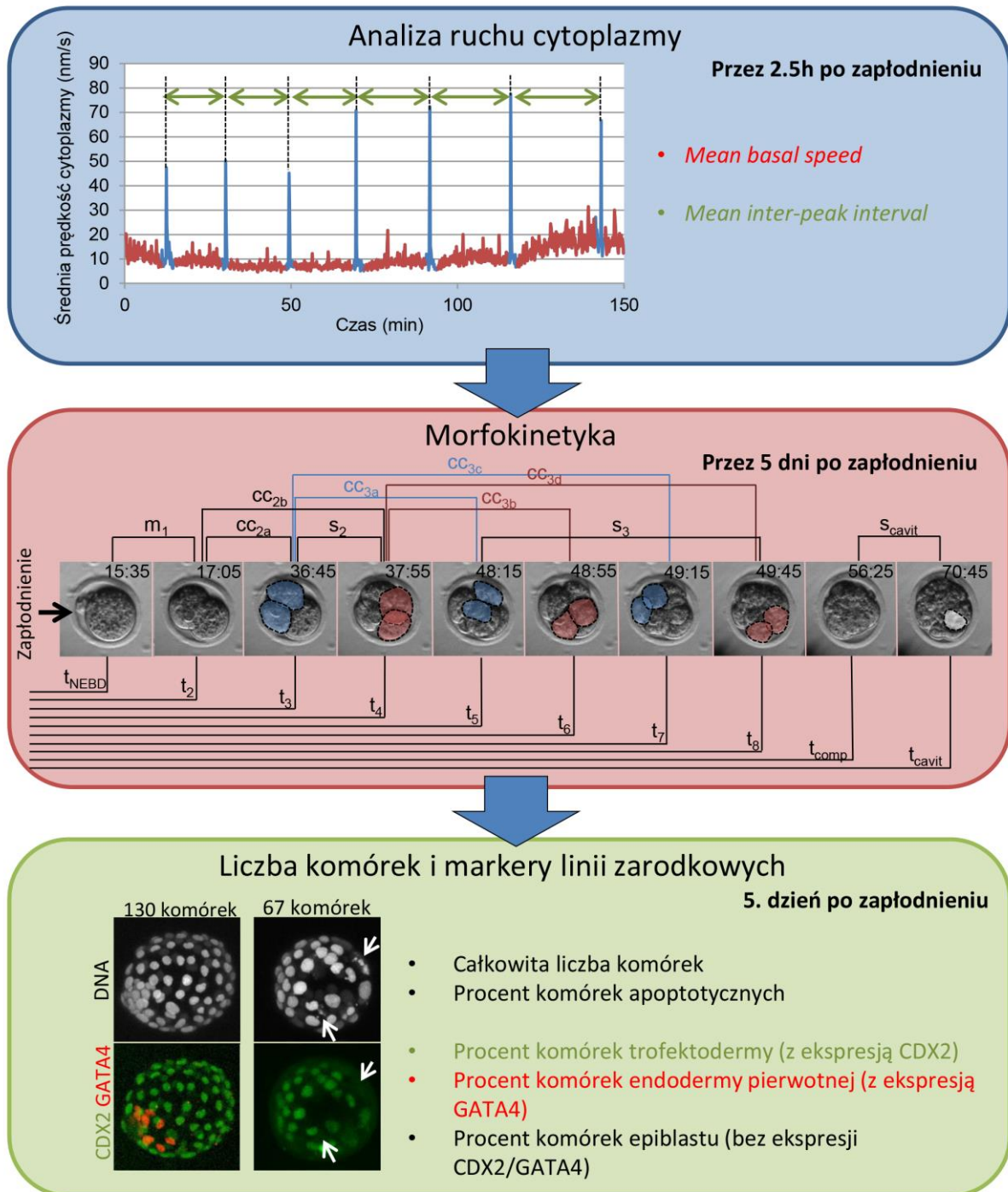
Wstęp. Ostatnia z prac wchodzących w skład mojego osiągnięcia habilitacyjnego (**Milewski et al., 2018**) niejako spina klamrą opisane powyżej badania, dotyczące ruchu cytoplazmy wywołanego

zapłodnieniem oraz różnych aspektów regulacji tempa i geometrii bruzdkowania. Celem tej części moich badań było opracowanie modelu statystycznego, który pozwoliłby powiązać parametry opisujące dynamikę cytoplazmy (*mean basal speed*, *mean inter-peak interval*, patrz **pkt. 1 osiągnięcia habilitacyjnego**) oraz parametry morfokinetyczne, związane z tempem bruzdkowania, ze zdolnością zarodków do rozwoju przedimplantacyjnego. Poszukiwanie nowych sposobów oceny jakości zarodków jest prężnie rozwijającą się dziedziną biologii i medycyny reprodukcyjnej, ponieważ pozwala na zwiększenie efektywności procedur zapłodnienia *in vitro*, stosowanych zarówno w leczeniu niepłodności u ludzi, jak i w placówkach zajmujących się rozrodem zwierząt hodowlanych oraz rzadkich i zagrożonych wyginięciem.

Analizę morfokinetyczną stosuje się w ocenie jakości zarodków od kilku lat. Jej pojawienie się związane było z rozwojem bezpiecznych metod obrazowania poklatkowego komórek zwierzęcych (Bischoff i wsp., 2008; Nakahara i wsp., 2010; Pribenszky i wsp., 2010). W skład parametrów morfokinetycznych zalicza się czasy podziałów blastomerów i głównych procesów morfologicznych, takich jak kompakcja i kawitacja (tj. tworzenie się jamy blastocysty), liczone od momentu zapłodnienia, jak i wartości takie jak długość cyklu komórkowego i synchronizacja podziałów w każdej rundzie bruzdkowania. Dynamika podziałów bruzdkowania odzwierciedla najprawdopodobniej jakość jądrowych i cytoplazmatycznych komponentów zarodka (przegląd w **Ajduk i Zernicka-Goetz, 2013** oraz Milewski i Ajduk, 2017). Starając się zoptymalizować algorytm oceny zarodków, połączyliśmy analizę morfokinetyczną z analizą dynamiki cytoplazmy w świeżo zapłodnionych oocytach, która dostarcza informacji o wzorze indukowanych przez plemnik oscylacji $[Ca^{2+}]_i$ oraz o funkcjonalności cytoszkieletu aktyno-miozynowego (**Ajduk i wsp., 2011**).

Wyniki. Schemat doświadczalny wykorzystany w naszych badaniach wyglądał następująco. Oocyty myszy były zapładniane *in vitro* i filmowane poklatkowo wkrótce po zapłodnieniu w celu uzyskania informacji na temat ruchu cytoplazmy. Następnie, zapłodnione oocyty były przenoszone indywidualnie do szalki hodowlanej, w której kontynuowano ich obrazowanie przez 5 dni (zdjęcia wykonywano przy użyciu mikroskopu z kamerą zamontowanego wewnątrz inkubatora przeznaczonego do hodowli zarodków). W celu potwierdzenia nieinwazyjności takiego schematu obrazowania zarodków, porównaliśmy ich rozwój z zarodkami kontrolnymi, niepoddawanyymi obrazowaniu i wykazaliśmy, że w znaczący sposób nie upośledza ono rozwoju zarodka. Po 5 dniach zarodki indywidualnie utrwalono i barwiono immunofluorescencyjnie w celu określenia całkowitej liczby komórek oraz odsetka komórek tworzących pierwsze linie zarodkowe – trofektoderme, epiblast i pierwotną endoderme. Dodatkowo określaliśmy też odsetek komórek z pofragmentowaną chromatyną (najprawdopodobniej komórki apoptotyczne (Martelli i wsp., 2001; Vanden Berghe i wsp., 2013)) (Rycina 10).

Potwierdziliśmy, że dynamika cytoplazmy odzwierciedla zdolność zarodków myszy do tworzenia blastocysty. Zgodnie z oczekiwaniami (patrz **pkt. 1 osiągnięcia habilitacyjnego**), zarodki, które nie uległy kawitacji, miały znacznie niższą wartość *mean basal speed* niż te, które utworzyły blastocysty i wykazywały tendencję do generowania częstszych oscylacji $[Ca^{2+}]_i$ (krótszy *mean inter-peak interval*). Co więcej, analiza regresji wykazała, że wzrost *mean basal speed* o 1 nm/s lub wydłużenie *mean inter-peak interval* o 1 min zwiększa prawdopodobieństwo osiągnięcia przez zarodek stadium blastocysty odpowiednio o 30 i 15%. Nie zauważyliśmy natomiast statystycznie istotnych korelacji między *mean basal speed* lub *mean inter-peak interval* a całkowitą liczbą komórek w 5-dniowym zarodku myszy, odsetkiem komórek apoptotycznych i odsetkami komórek reprezentujących pierwsze zarodkowe linie komórkowe. Analiza regresji wykazała jednak, że *mean basal speed* i *mean*



Rycina 10. Schemat łączonej analizy ruchu cytoplazmy i morfokinetyki zarodków myszy. Szczegóły w tekście.

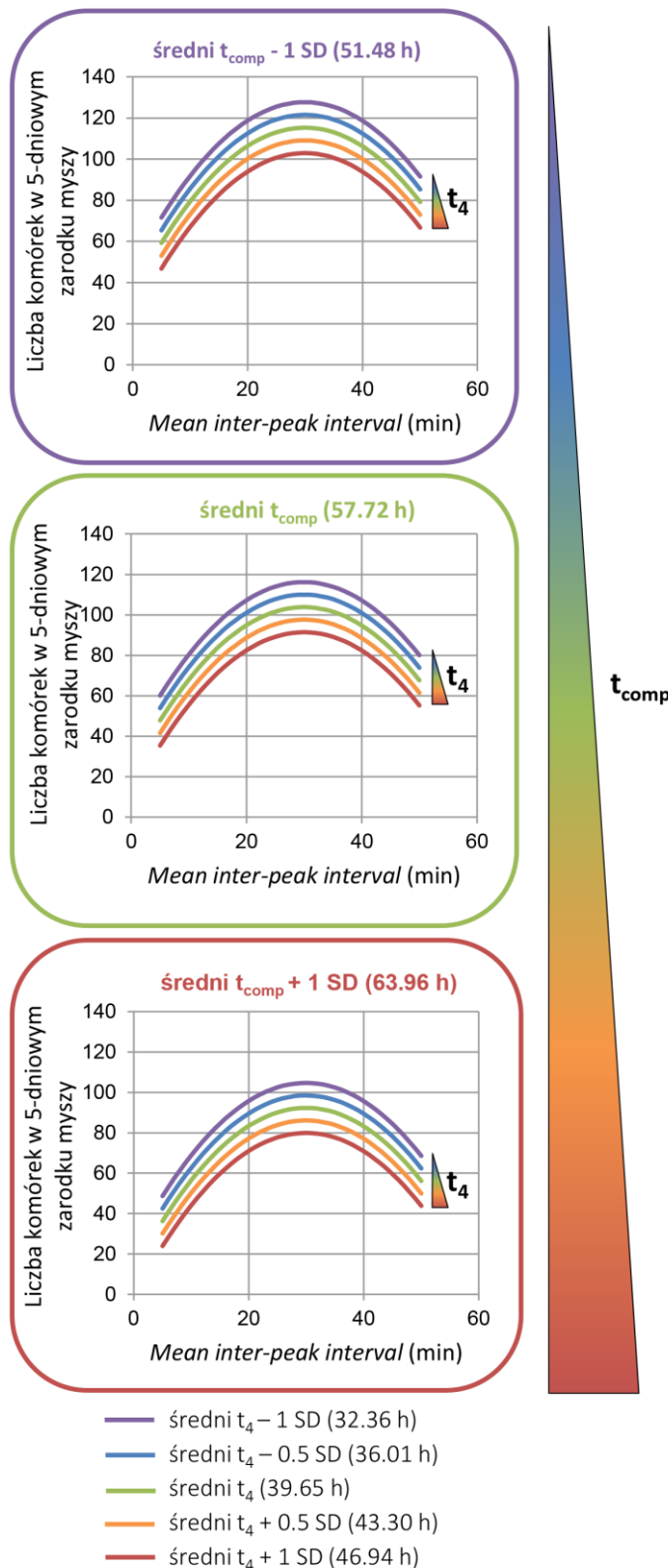
inter-peak interval wyjaśniają pewien procent zmienności w całkowitej liczbie komórek zarodkowych, w odsetku komórek apoptotycznych i odsetku komórek endodermy pierwotnej. Nie zaobserwowaliśmy związku między parametrami ruchu cytoplazmy a odsetkiem komórek trofektodermi i epiblastu.

Następnie zanalizowaliśmy zależność między parametrami morfokinetycznymi a zdolnością zarodków do rozwoju przedimplantacyjnego. Co ciekawe, parametrami morfokinetycznymi, które kilkakrotnie przewijały się w naszej analizie i były silnie powiązane z jakością zarodka, były długość

pierwszej zarodkowej fazy M (parametr m_1) oraz czas kompaktacji (parametr t_{comp}). Zarodki, które nie wytworzyły jamki, dzieliły się i ulegały kompaktacji wolniej niż te, które osiągnęły stadium blastocysty. Pokazaliśmy, że w zależności od parametru, wydłużenie o 1 godzinę zmniejszyło prawdopodobieństwo, że zarodek osiągnie stadium blastocysty od 10% (dla czasu osiągnięcia stadium 4 komórek, t_4) do prawie 100% (dla m_1). Ponadto, wszystkie badane parametry morfokinetyczne korelowały z całkowitą liczbą komórek w 5-dniowym zarodku, a korelacja była najsilniejsza ($R < -0,5$) dla czasów osiągnięcia stadiów od 3- do 8-komórek (od t_3 do t_8) i dla t_{comp} . Ponownie, w zależności od parametru, wydłużenie o 1 godzinę zmniejszyło całkowitą liczbę komórek w różnym stopniu: od około 2 komórek (dla czasu kawitacji, t_{cavit}) do prawie 55 komórek (dla m_1). Część z parametrów morfokinetycznych korelowała z odsetkiem komórek apoptotycznych: im wolniejsze podziały, tym więcej było takich komórek. Najsilniejszą korelację zaobserwowaliśmy dla parametrów od t_3 do t_5 ($R > 0,35$). Wydłużenie czasu podziałów o 1 godzinę zwiększało odsetek komórek apoptotycznych od 0,3 punktu procentowego (dla czasu kawitacji, t_{cavit}) do 5,7 punktów procentowych (dla czasu inicjacji fazy M w zygocie, t_{NEBD}). Co ciekawe, kilka parametrów morfokinetycznych związanych z pierwszymi trzema rundami podziałów bruzdkowania (do t_6) korelowało ze zdolnością zarodka do tworzenia endodermy pierwotnej, chociaż związek ten był słabszy niż dla całkowitej liczby komórek zarodkowych lub dla odsetka komórek apoptotycznych. Najsilniejszą korelację ($R < -0,25$) obserwowano dla t_{NEBD} , t_2 i ponownie dla t_3 i t_5 . Zwiększenie wartości tych parametrów o 1 godzinę zmniejszało odsetek komórek endodermy pierwotnej od 0,3 (dla t_5) do 1,0 (dla t_2) punktu procentowego. Nie zaobserwowaliśmy korelacji między analizowanymi parametrami morfokinetycznymi, a odsetkiem komórek trofektodermi i epiblastu.

Ponieważ, jak wykazały nasze analizy, tylko niewielka liczba parametrów opisujących dynamikę cytoplazmy i parametrów morfokinetycznych była współzależna, byliśmy w stanie połączyć te dwa zestawy parametrów i stworzyć statystyczny model oceniający potencjał rozwojowy zarodka, zdefiniowany jako całkowita liczba komórek po 5-dniowej hodowli *in vitro* (Rycina 11). Uwzględnił on trzy parametry: (i) *mean inter-peak interval* (w formie liniowej i kwadratowej), (ii) t_4 i (iii) t_{comp} , i wyjaśniał 45% zmienności całkowitej liczby komórek zarodka ($R^2 = 0,451$), czyli więcej, niż każdy z parametrów z osobna. Według naszego modelu, wydłużenie parametrów t_4 lub t_{comp} o 1 godzinę (przy niezmiennych wartościach pozostałych dwóch parametrów) prowadziło do zmniejszenia całkowitej liczby komórek zarodka odpowiednio o 1.70 i 1.84 komórki. Z kolei wzrost *mean inter-peak interval* (mii) o 1 min, przy niezmiennych wartościach pozostałych dwóch parametrów, zwiększał całkowitą liczbę komórek o $5.39 - 0.09(2m_{ii} + 1)$ komórek. Oznacza to, że wzrost *mean inter-peak interval* z 10 do 11 min prowadzi do wzrostu całkowitej liczby komórek o 3.5 komórki. Gdy jednak *mean inter-peak interval* wzrasta z 20 do 21 min, całkowita liczba komórek zwiększa się tylko o 1.7 komórki, a gdy *mean inter-peak interval* wzrasta z 40 do 41 min, całkowita liczba komórek spada o 1.9 komórki. Nasz model odzwierciedlał zatem dwie znane z wcześniejszych badań obserwacje: po pierwsze, wolniejsze podziały bruzdkowania i opóźniona kompaktacja wskazują na niższy potencjał rozwojowy zarodka; po drugie, istnieje zakres częstości oscylacji $[Ca^{2+}]_i$ (czyli i długości *mean inter-peak interval*) optymalny dla rozwoju zarodka: zbyt częste i zbyt rzadkie wyrzuty Ca^{2+} negatywnie wpływają na jego jakość.

Znaczenie wyników. Nasze analizy wykazały, że zarówno parametry cytoplazmatyczne, jak i morfokinetyczne, a także ich kombinacja, mogą służyć jako wskaźniki zdolności rozwojowych zarodka. Należy jednak pamiętać, że parametry te nie muszą być bezpośrednio powiązane z jakością zarodka, a raczej odzwierciedlają jedynie jego pewne właściwości, które są dla niej kluczowe. I tak, jak wspomniano już wcześniej, analiza ruchów cytoplazmatycznych dostarcza danych związanych z jakością komórki jajowej: funkcjonalnością jej cytoszkieletu i maszynerii komórkowej zaangażowanej w generowanie oscylacji $[Ca^{2+}]_i$ w odpowiedzi na zapłodnienie (patrz **pkt. 1 opisu osiągnięcia habilitacyjnego**). Analiza morfokinetyczna z kolei dotyczy głównie tempa podziałów bruzdkowania oraz kompaktacji i kawitacji, które to najprawdopodobniej odzwierciedla jakość komponentu



Rycina 11. Model wiążący parametry opisujące ruch cytoplazmy oraz tempo bruzdkowania i kompaktacji z jakością przedimplantacyjnego zarodka myszy.

Wykresy pokazują zależność między *mean inter-peak interval* (oś X), t_4 (zakodowany jako kolor krzywych) oraz t_{comp} (zakodowany jako kolor obramowań wykresów) a liczbą komórek w 5-dniowym zarodku myszy (oś Y).

cytoplazmatycznego i jądrowego zarodka (przegląd w **Ajduk i Zernicka-Goetz, 2013** i Milewski i Ajduk, 2017). Opóźnione podziały mogą być oznaką problemów z cytoszkieletem lub metabolizmem energetycznym komórki, a także świadczyć o uszkodzeniach DNA lub aberracjach chromosomowych, które aktywowały jeden z punktów kontrolnych cyklu komórkowego. Co ciekawe, niedawne badania na zarodkach myszy wykazały, że stan aneuploidii nie wydłuża znacząco cyklu komórkowego, przynajmniej w stadiach od 8 do 128 komórek (Bolton i wsp., 2016; Vazquez-Diez i wsp., 2016). W ludzkich zarodkach w stadium od 1 do 8 komórek aneuploidia zmieniała jednak czasy podziałów bruzdkowania (Chavez i wsp., 2012; Vera-Rodriguez i wsp., 2015), wskazując, że mogą występować różnice w sposobie, w jaki ploidia wpływa na tempo podziałów komórkowych zależne od gatunku i/lub stadium rozwojowego. Nasze wyniki pokazują, że czasy podziału drugiej i trzeciej rundy bruzdkowania są najlepszymi wskaźnikami potencjału rozwojowego zarodka. Rzeczywiście, są one często stosowane w algorytmach oceny jakości zarodków ludzkich i

zwierzęcych (Wong i wsp., 2010; Cruz i wsp. 2012; Conaghan i wsp., 2013; VerMilyea i wsp., 2014; Cetinkaya i wsp., 2015; Milewski i wsp., 2015; Motato i wsp., 2016; Weinerman i wsp. 2016; przegląd w Milewski i Ajduk, 2017). Wydaje się to logiczne, ponieważ nieprawidłowości występujące we wczesnych etapach rozwoju zarodkowego są dziedziczone przez większą liczbę potomnych komórek i w konsekwencji mogą silniej wpływać na żywotność zarodka. Szczególnie interesującym parametrem

jest też czas kompaktacji, ponieważ kompaktacja obejmuje reorganizację cytoszkieletu i formowanie nowych międzykomórkowych połączeń między blastomerami, ale nie zależy bezpośrednio od progresji cyklu komórkowego (Kojima i wsp., 2014). Ponieważ cytoszkielet często ulega uszkodzeniu podczas mrożenia zarodków i oocytów (Saunders i wsp., 1999; Hosu i wsp., 2008; Luciano i wsp., 2009; Dalcin i wsp., 2013; Hendriks i wsp., 2015; Kulíková i wsp., 2016), czas kompaktacji może być szczególnie przydatnym parametrem w sytuacji, gdy stosowano procedurę krioprezerwacji.

Co ciekawe, nasza analiza wskazuje, że istnieje istotna różnica między morfokinetyką zarodków myszy i człowieka. U myszy parametry morfokinetyczne mają tendencję do monotoniczności, to znaczy jednokierunkowa zmiana ich wartości (na przykład wzrost) prowadzi do jednokierunkowej zmiany wartości zależnej. Przeciwnie, u ludzi wiele parametrów morfokinetycznych jest niemonotonicznych, np. zarówno zbyt szybkie, jak i zbyt wolne podziały bruzdkowania wskazują na niską jakość zarodka, a zatem wydłużenie czasów bruzdkowania najpierw wiąże się ze zwiększeniem jakości zarodka, a następnie, po osiągnięciu wartości granicznej, z jej obniżeniem (np. Meseguer i wsp., 2011; Milewski i wsp., 2015, 2016a, b; Motato i wsp., 2016; przegląd w Milewski i Ajduk, 2017). Ta rozbieżność jest prawdopodobnie spowodowana faktem, że w odróżnieniu od zarodków ludzkich, w zarodkach myszy nie obserwuje się tzw. bruzdkowania bezpośredniego (z ang. *direct cleavage*), czyli podziału na 3 lub więcej komórek potomnych w czasie krótszym niż 5 godzin, negatywnie wpływającego na żywotność zarodków (Rubio i wsp., 2012; Campbell i Fishel, 2015).

Na koniec należy mocno zaznaczyć, że nasze analizy, w tym wieloczynnikowy model, który stworzyliśmy, mają jedynie charakter korelatywny. Aby mogły być zastosowane w praktyce, medycznej lub weterynaryjnej, należałoby, poza potwierdzeniem ich przydatności dla gatunków innych niż mysz, opracować na ich podstawie model predykcyjny i przeprowadzić jego walidację.

Podsumowując, analiza dynamiki rozwoju przedimplantacyjnego zarodków ssaków, począwszy od ruchu cytoplazmy w zapłodnionych oocytach, po tempo i geometrię podziałów bruzdkowania, oraz czas kompaktacji i kawitacji, dostarcza wielu informacji istotnych zarówno z punktu widzenia badań podstawowych, jak i potencjalnych zastosowań praktycznych w medycynie i weterynarii. Technika mikroskopowego obrazowania poklatkowego stała się obecnie nieodzownym narzędziem w tego typu badaniach, a dalszy rozwój technologii optycznych, obserwowany w ostatnich latach, wróży kolejne odkrycia w tej dziedzinie biologii. Im lepiej poznamy molekularne i komórkowe mechanizmy regulujące wczesny rozwój zarodka, tym bardziej świadomie i odpowiedzialnie możemy optymalizować procedury wspomaganego rozrodu i udoskonalać diagnostykę i terapię niepłodności.

5. Omówienie pozostałych osiągnięć naukowo - badawczych (artystycznych).

1. Rozwój w dojrzewających oocytach myszy zdolności do odpowiedzi na zapłodnienie

Praca oryginalna: Ajduk A, Maleszewski M. (2004) Sperm-derived activating ability does not persist in mouse oocytes inseminated during in vitro maturation. *Molecular Reproduction and Development* 68: 240-249. – **OPARTA NA WYNIKACH PRACY MAGISTERSKIEJ**

Praca oryginalna: Jedrusik A, Ajduk A, Pomorski P, Maleszewski M (2007) Mouse oocytes fertilised by ICSI during in vitro maturation retain the ability to be activated after refertilisation in metaphase II and can generate Ca²⁺ oscillations. *BMC Developmental Biology* 7: 72. ([AJ and AA equally participated in the work](#)) – **OPARTA NA WYNIKACH PRACY DOKTORSKIEJ**

Praca oryginalna: Ajduk A, Ciemerych MA, Nixon V, Swann K, Maleszewski M. (2008a) Fertilization differently affects the levels of cyclin B1 and M-phase promoting factor activity in maturing and

metaphase II mouse oocytes. *Reproduction* 136: 741-752. – **OPARTA NA WYNIKACH PRACY DOKTORSKIEJ**

Praca oryginalna: Archacka K, **Ajduk A**, Pomorski P, Szczepanska K, Maleszewski M, Ciemerych MA. (2008) Defective calcium release during in vitro fertilization of maturing oocytes of LT/Sv mice. *International Journal of Developmental Biology* 52: 903-912.

Praca przeglądowa: **Ajduk A**, Małagocki A, Maleszewski M. (2008b) Cytoplasmic maturation of mammalian oocytes: development of a mechanism responsible for sperm-induced Ca^{2+} oscillations. *Reproductive Biology* 8: 3-22.

Od początku swojej działalności badawczej zajmowałam się biologią rozwoju i rozrodu ssaków. W czasie studiów magisterskich i doktoranckich prowadziłam badania nad sposobem, w jaki oocyty myszy nabywają w czasie dojrzewania (czyli w okresie między zakończeniem profazy pierwszego podziału mejotycznego a osiągnięciem stadium metafazy drugiego podziału mejotycznego) zdolności do odpowiedniej reakcji na zapłodnienie (przegląd w **Ajduk i wsp., 2008b**). Szczególnie interesowało mnie tworzenie się w dojrzewających oocytach mechanizmu pozwalającego oocytowi generować w odpowiedzi na plemnik długotrwałe oscylacje cytoplazmatycznego stężenia wolnych jonów Ca^{2+} ($[Ca^{2+}]_i$). Wskazaliśmy, że jeśli oocyt zostanie zapłodniony w czasie dojrzewania mejotycznego, to zapłodnienie to wywoła jedynie krótkie oscylacje $[Ca^{2+}]_i$, które nie prowadzą do degradacji cykliny B1. Jedynie polispermiczne zapłodnienie oocytów dojrzewających przekładało się na przejściowe obniżenie aktywności kompleksu MPF (z ang. *M-phase promoting factor*), które jednak nie było związane z oscylacjami $[Ca^{2+}]_i$, a raczej z inaktywującą defosforylacją kinazy CDK1, składowej MPF (**Ajduk i wsp., 2008a**). Co więcej, pokazaliśmy, że plemnikowy czynnik odpowiedzialny za indukcję oscylacji $[Ca^{2+}]_i$ i aktywację oocytu zostaje w ciągu dojrzewania oocytu unieczynniony (**Ajduk i Maleszewski, 2004**). Dodatkowo, nasze badania udowodniły, że zapłodnienie w czasie dojrzewania mejotycznego zmniejsza zdolność oocytów do generowania oscylacji $[Ca^{2+}]_i$ przy ponownym zapłodnieniu w metafazie drugiego podziału mejotycznego: powstałe za drugim razem oscylacje $[Ca^{2+}]_i$ trwają krócej i mają mniej wyrzutów Ca^{2+} niż w oocytach kontrolnych, niezapłodnionych w czasie dojrzewania. Nawet te skrócone oscylacje $[Ca^{2+}]_i$ były jednak wystarczające, by doprowadzić do aktywacji oocytów i wytworzenia w nich przedjądrzy (**Jędrusik i wsp., 2007**). W czasie doktoratu uczestniczyłam też w badaniach nad zakłóceniami dojrzewania mejotycznego obserwowanymi w oocytach myszy LT/Sv. Oocyty tego szczepu myszy często ulegają spontanicznej aktywacji partenogenetycznej, gdy są wciąż w stadium metafazy pierwszego podziału mejotycznego, co może prowadzić do rozwoju teratom jajnika. Wykazaliśmy, że w oocytach LT/Sv zdolność do aktywacji w odpowiedzi na plemnik wykształca się wolniej niż w oocytach typu dzikiego. Co więcej, nawet po wydłużonej hodowli *in vitro* nie dochodzi w nich w większości przypadków do powstania długotrwałych oscylacji $[Ca^{2+}]_i$ (**Archacka i wsp., 2008**).

2. Optymalizacja technik zapłodnienia *in vitro* i transgenezy

Praca oryginalna: **Ajduk A**, Yamauchi Y, Ward MA. (2006) Sperm chromatin remodeling after intracytoplasmic sperm injection differs from that of in vitro fertilization. *Biology of Reproduction* 75: 442-451.

Praca oryginalna: Yamauchi Y, **Ajduk A**, Riel JM, Ward MA. (2007a) Ejaculated and epididymal mouse spermatozoa are different in their susceptibility to nuclease-dependent DNA damage and in their nuclease activity. *Biology of Reproduction* 77: 636-647.

Praca oryginalna: Yamauchi Y, Doe B, **Ajduk A**, Ward MA. (2007b) Genomic DNA damage in mouse transgenesis. *Biology of Reproduction* 77: 803-812.

W czasie studiów doktoranckich podjęłam także współpracę z grupą prof. Moniki Ward z Institute for Biogenesis Research, University of Hawaii, która zaowocowała serią prac dotyczących optymalizacji technik sztucznego zapłodnienia i transgenezy. Wykazaliśmy, że chromatyna plemnika ulega przebudowie w różnym tempie, w zależności od sposobu, w który przeprowadzone zostało zapłodnienie: w przypadku docytoplazmatycznej iniekcji plemnika (technika ICSI, z ang. *intracytoplasmic sperm injection*) przebudowa chromatyny była bardziej asynchroniczna niż w przypadku zapłodnienia *in vitro* poprzez koinkubację gamet. Kapacytacja plemników przed ICSI, w przeciwieństwie do sztucznie indukowanej reakcji akrosomowej, wznagała tę asynchronię i dodatkowo opóźniała wytworzenie przedjądźry i inicjację replikacji DNA w zygocie (**Ajduk i wsp., 2006**). Dodatkowo, nasze doświadczenia pokazały, że plemniki izolowane z najądrzy myszy różnią się od plemników ejakulowanych podatnością na uszkodzenia DNA w czasie mrożenia, co wynika z różnej aktywności nukleaz, zarówno tych związanych z plemnikami, jak i z frakcją bezkomórkową nasienia (**Yamauchi i wsp., 2007a**). Wykazaliśmy również, że uzyskiwanie zarodków transgenicznym metodą polegającą na wstrzykiwaniu egzogenego DNA do przedjądźry zygot prowadzi do znaczących uszkodzeń genomowego DNA i że technika wprowadzania egzogenego DNA do oocyty za pośrednictwem ICSI może być tu dobrą alternatywą. Tzw. *ICSI-mediated transgenesis* prowadzi bowiem do mniejszych uszkodzeń genomowego DNA oraz rzadziej skutkuje zatrzymaniem rozwoju zarodkowego (**Yamauchi i wsp., 2007b**).

3. Obrazowanie przyżyciowe zarodków jako metoda oceny ich potencjału rozwojowego

Praca oryginalna: Karnowski K, **Ajduk A**, Wieloch B, Tamborski S, Krawiec K, Wojtkowski M, Szkulmowski M. (2017) Optical coherence microscopy as a novel, non-invasive method for the 4D live imaging of early mammalian embryos. *Scientific Reports* 7: 4165. ([AA and MS are corresponding authors](#))

Praca przeglądowa: Milewski R, **Ajduk A**. (2017) Time-lapse imaging of cleavage divisions in embryo quality assessment. *Reproduction* 154: R37-R53. (Review; [AA and RM equally participated in the work and are corresponding authors](#))

Po uzyskaniu stopnia doktora odbyłam 3-letni staż w grupie prof. Magdaleny Żernickiej-Goetz w Gurdon Institute, University of Cambridge. Badania wykonane w całości lub częściowo w czasie tego stażu stanowią główną część mojego osiągnięcia habilitacyjnego. (Wyjątkiem są tu wyniki opisane w pracy Milewski i wsp., 2018, lecz i one stanowią kontynuację tematyki zapoczątkowanej przeze mnie w czasie stażu.) Jak już zostało wspomniane w opisie osiągnięcia habilitacyjnego, techniki przyżyciowej wizualizacji komórek zwierzęcych stanowią cenne źródło zmiennych, które mogą być wykorzystane do tworzenia modeli statystycznych przewidujących potencjał rozwojowy zarodków (przegląd w **Milewski i Ajduk, 2017**). Po powrocie do Polski, oprócz kontynuacji badań z zastosowaniem tradycyjnych technik obrazowania (patrz pkt. 4 osiągnięcia habilitacyjnego), podjęłam też współpracę z grupami prof. Macieja Wojtkowskiego z Uniwersytetu Mikołaja Kopernika w Toruniu oraz prof. Krzysztofa Krawca z Politechniki Poznańskiej, której celem było opracowanie nowej, nieinwazyjnej metody obrazowania oocytów i zarodków ssaków, opartej na optycznej mikroskopii koherencyjnej (OCM, z ang. *optical coherence microscopy*). Pokazaliśmy, że OCM świetnie nadaje się do obrazowania komórek nieutrwalonych i nieznakowanych fluorescencyjnie. Aby uniknąć typowego dla OCM szumu optycznego i uzyskać wysokiej jakości wizualizacje wnętrza komórek (jądra komórkowego z jąderkiem, wrzeciona podziałowego, sieci retikulum endoplazmatycznego i mitochondriów) wykorzystaliśmy ruch cytoplazmy oraz specjalnie zoptymalizowane protokoły skanowania i analizy obrazu. Dodatkowo, wykazaliśmy, że OCM można też stosować do poklatkowego filmowania oocytów/zarodków (**Karnowski i wsp., 2017**). Ponieważ wiele z parametrów komórkowych, które można zanalizować za

pomocą OCM jest uznawana za wskaźniki potencjału rozwojowego zarodków, mamy nadzieję, że technika ta znajdzie też zastosowanie w praktyce medycznej i weterynaryjnej – obecnie kontynuujemy badania nad jej potencjalnymi zastosowaniami.

Dodatkowo, w ostatnich latach zajmowałam się też badaniem wpływu starzenia poowulacyjnego (związanego z czasem między owulacją a zapłodnieniem) i matczynego (związanego z wiekiem samicy) na potencjał rozwojowy oocytów ssaków. Badania te stały się podstawą pracy doktorskiej, kilku prac licencjackich i magisterskich, a także licznych doniesień konferencyjnych. W oparciu o uzyskane wyniki przygotowywane są obecnie publikacje.

Bibliografia

Abbott AL i Ducibella T. (2001) Calcium and the control of mammalian cortical granule exocytosis. *Frontiers in Bioscience* 6: D792–D806.

Alfieri C i wsp. (2016) Molecular basis of APC/C regulation by the spindle assembly checkpoint. *Nature* 536: 431–436.

Athayde Wirka K i wsp. (2014) Atypical embryo phenotypes identified by time-lapse microscopy: high prevalence and association with embryo development. *Fertility and Sterility* 101: 1637–1648 e1-5.

Biechele S i wsp. (2015) Unwind and transcribe: chromatin reprogramming in the early mammalian embryo. *Current Opinions in Genetics and Development* 34: 17–23.

Bischoff M i wsp. (2008) Formation of the embryonic-abembryonic axis of the mouse blastocyst: relationships between orientation of early cleavage divisions and pattern of symmetric/asymmetric divisions. *Development* 135: 953–962.

Bolton H i wsp. (2016) Mouse model of chromosome mosaicism reveals lineage-specific depletion of aneuploidy cells and normal developmental potential. *Nature Communications* 7: 11165.

Burton A i wsp. (2013) Single-cell profiling of epigenetic modifiers identifies PRDM14 as an inducer of cell fate in the mammalian embryo. *Cell Reports* 5: 687–701.

Cai Y i wsp. (2001) The docking of kinesins, KIF5B and KIF5C, to Ran-binding protein 2(RanBP2) is mediated via a novel RanBP2 domain. *Journal of Biological Chemistry* 276: 41594–41602.

Campbell A i Fishel S. (2015) Atlas of Time Lapse Embryology. (Taylor & Francis Group, CRC Press)

Campbell K i Swann K. (2006) Ca²⁺ oscillations stimulate an ATP increase during fertilization of mouse eggs. *Developmental Biology* 298: 225–233.

Cetinkaya M i wsp. (2015) Relative kinetic expressions defining cleavage synchronicity are better predictors of blastocyst formation and quality than absolute time points. *Journal of Assisted Reproduction and Genetics* 32: 27–35.

Chao WC i wsp. (2012) Structure of the mitotic checkpoint complex. *Nature* 484, 208–213.

Chavez SL i wsp. (2012) Dynamic blastomere behaviour reflects human embryo ploidy by the four-cell stage. *Nature Communications* 3: 1251.

Chen Q i wsp. (2008) Cyclin B1 is localized to unattached kinetochores and contributes to efficient microtubule attachment and proper chromosome alignment during mitosis. *Cell Research* 18: 268–280.

Clute P i Pines J. (1999) Temporal and spatial control of cyclin B1 destruction in metaphase. *Nature Cell Biology* 1: 82–87.

- Cockburn K i Rossant J. (2010) Making the blastocyst: lessons from the mouse. *Journal of Clinical Investigation* 120: 995–1003.
- Collins JE i Fleming TP (1995) Epithelial differentiation in the mouse preimplantation embryo: making adhesive cell contacts for the first time. *Trends in Biochemical Sciences* 20: 307-312.
- Conaghan J i wsp. (2013) Improving embryo selection using a computer-automated time-lapse image analysis test plus day 3 morphology: results from a prospective multicenter trial. *Fertility and Sterility* 100: 412.e5–419.e5.
- Combes G i wsp. (2017) Playing polo during mitosis: PLK1 takes the lead. *Oncogene* 36: 4819-4827.
- Crisp M i wsp. (2006) Coupling of the nucleus and cytoplasm: role of the LINC complex. *Journal of Cell Biology* 172: 41–53.
- Cruz M i wsp. (2012) Timing of cell division in human cleavage-stage embryos is linked with blastocyst formation and quality. *Reproductive Biomedicine Online* 25: 371–381.
- Dalcin L i wsp. (2013) Cytoskeleton structure, pattern of mitochondrial activity and ultrastructure of frozen or vitrified sheep embryos. *Cryobiology* 67: 137–145.
- D’Avino PP i wsp. (2015) Cytokinesis in animal cells. *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology* 7: a015834.
- Deguchi R i wsp. (2000) Spatiotemporal analysis of Ca^{2+} waves in relation to the sperm entry site and animal–vegetal axis during Ca^{2+} oscillations in fertilized mouse eggs. *Developmental Biology* 218: 299–313.
- den Elzen N i Pines J. (2001) Cyclin A is destroyed in prometaphase and can delay chromosome alignment and anaphase. *Journal of Cell Biology* 153: 121–136.
- Deng M i wsp. (2007) The Ran GTPase mediates chromatin signaling to control cortical polarity during polar body extrusion in mouse oocytes. *Developmental Cell* 12: 301–308.
- Destouni A i Vermeesch JR. (2017) How can zygotes segregate entire parental genomes into distinct blastomeres? The zygote metaphase revisited. *Bioessays* 39: 1600226
- De Vos A i wsp. (2009). Impact of cleavage-stage embryo biopsy in view of PGD on human blastocyst implantation: a prospective cohort of single embryo transfers. *Human Reproduction* 24: 2988–2996.
- Di Fiore B i Pines J. (2010) How cyclin A destruction escapes the spindle assembly checkpoint. *Journal of Cell Biology* 190: 501–509.
- Di Fiore B i wsp. (2015) The ABBA motif binds APC/C activators and is shared by APC/C substrates and regulators. *Developmental Cell* 32: 358–372
- Ducibella T i Fissore R (2008) The roles of Ca^{2+} , downstream protein kinases, and oscillatory signaling in regulating fertilization and the activation of development. *Developmental Biology* 315: 257–279.
- Ducibella T i wsp. (2006) Role of calcium signals in early development. *Seminars in Cell and Developmental Biology* 17: 324-332.
- Dumollard R i wsp. (2004) Sperm-triggered Ca^{2+} oscillations and Ca^{2+} homeostasis in the mouse egg have an absolute requirement for mitochondrial ATP production. *Development* 131: 3057–3067.
- Durban M i wsp. (2015) PLC ζ disruption with complete fertilization failure in normozoospermia. *Journal of Assisted Reproduction and Genetics* 32: 879-886.

- FitzHarris G i wsp. (2003) Cell cycle-dependent regulation of structure of endoplasmic reticulum and inositol 1,4,5-trisphosphate-induced Ca^{2+} release in mouse oocytes and embryos. *Molecular Biology of the Cell* 14: 288–301.
- Fujimitsu K i wsp. (2016) Cyclin-dependent kinase 1-dependent activation of APC/C ubiquitin ligase. *Science* 352: 1121–1214.
- Geley S. i wsp. (2001) Anaphase-promoting complex/cyclosome-dependent proteolysis of human cyclin A starts at the beginning of mitosis and is not subject to the spindle assembly checkpoint. *Journal of Cell Biology* 153: 137–148.
- Golan A i wsp. (2002) The cyclin-ubiquitin ligase activity of cyclosome/APC is jointly activated by protein kinases Cdk1-cyclin B and Plk. *Journal of Biological Chemistry* 277: 15552–15557.
- Goolam M i wsp. (2016) Heterogeneity in Oct4 and Sox2 targets biases cell fate in 4-cell mouse embryos. *Cell* 165: 61–74.
- Goossens V i wsp. (2008) Diagnostic efficiency, embryonic development and clinical outcome after the biopsy of one or two blastomeres for preimplantation genetic diagnosis. *Human Reproduction* 23: 481–492.
- Gorbsky GJ i wsp. (1998) Microinjection of antibody to Mad2 protein into mammalian cells in mitosis induces premature anaphase. *Journal of Cell Biology* 141: 1193–1205.
- Hagting A i wsp. (2002) Human securin proteolysis is controlled by the spindle checkpoint and reveals when the APC/C switches from activation by Cdc20 to Cdh1. *Journal of Cell Biology* 157: 1125–1137.
- Halet G i wsp. (2004) Conventional PKCs regulate the temporal pattern of Ca^{2+} oscillations at fertilization in mouse eggs. *Journal of Cell Biol.* 164, 1033–1044.
- Hansen DV i wsp. (2006) CaMKII and polo-like kinase 1 sequentially phosphorylate the cytostatic factor Emi2/XErp1 to trigger its destruction and meiotic exit. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA* 103: 608–613.
- Harton GL i wsp. (2011) ESHRE PGD Consortium/Embryology Special Interest Group–best practice guidelines for polar body and embryo biopsy for preimplantation genetic diagnosis/screening (PGD/PGS). *Human Reproduction* 26: 41–46.
- Hendriks WK i wsp. (2015) Cellular damage suffered by equine embryos after exposure to cryoprotectants or cryopreservation by slow-freezing or vitrification. *Equine Veterinary Journal* 47: 701–707.
- Hosu BG i wsp. (2008) Reversible disassembly of the actin cytoskeleton improves the survival rate and developmental competence of cryopreserved mouse oocytes. *PLoS ONE* 3: e2787.
- Howell BJ i wsp. (2000) Visualization of Mad2 dynamics at kinetochores, along spindle fibers, and at spindle poles in living cells. *Journal of Cell Biology* 150: 1233–1250.
- Izawa D i Pines J. (2011) How APC/C-Cdc20 changes its substrate specificity in mitosis. *Nature Cell Biology* 13: 223–233.
- Izawa D i Pines J. (2015) The mitotic checkpoint complex binds a second CDC20 to inhibit active APC/C. *Nature* 517: 631–634.
- Jedrusik A i wsp. (2008) Role of Cdx2 and cell polarity in cell allocation and specification of trophoblast and inner cell mass in the mouse embryo. *Genes and Development* 22: 2692–2706.
- Johnson MH i Ziomek CA. (1981a) The foundation of two distinct cell lineages within the mouse morula. *Cell* 24: 71–80.

- Johnson MH i Ziomek CA (1981b) Induction of polarity in mouse 8-cell blastomeres: specificity, geometry, and stability. *Journal of Cell Biology* 91: 303–308.
- Jones JT i wsp. (2004) Probing the precision of the mitotic clock with a live-cell fluorescent biosensor. *Nature Biotechnology* 22: 306–312.
- Kabeche L i Compton DA. (2013) Cyclin A regulates kinetochore microtubules to promote faithful chromosome segregation. *Nature* 502: 110–113.
- Keane RD i Adrian RJ. (1992) Theory of cross-correlation analysis of PIV images. *Applied Scientific Research* 49: 191–215.
- Kojima Y i wsp. (2014) Timing of developmental events in the early mouse embryo. *Seminars in Cell and Developmental Biology* 34: 65–75.
- Kraft C i wsp. (2003) Mitotic regulation of the human anaphase-promoting complex by phosphorylation. *EMBO Journal* 22: 6598–6609.
- Kubiak JZ i Ciemerych MA. (2001) Cell cycle regulation in early mouse embryos. *Novartis Foundation Symposia* 237: 79–89.
- Kubiak JZ i wsp. (2008a) Temporal regulation of the first mitosis in *Xenopus* and mouse embryos. *Molecular and Cellular Endocrinology* 282: 63–69.
- Kubiak JZ i wsp. (2008b) On the transition from the meiotic to mitotic cell cycle during early mouse development. *International Journal of Developmental Biology* 52: 201–217.
- Kulíková B i wsp. (2016) State of actin cytoskeleton and development of slow-frozen and vitrified rabbit pronuclear zygotes. *Cryobiology* 72: 14–20.
- Lara-Gonzalez P i wsp. (2012) The spindle assembly checkpoint. *Current Biology* 22: R966–980.
- Lenart P i wsp. (2007) The small-molecule inhibitor BI 2536 reveals novel insights into mitotic roles of polo-like kinase 1. *Current Biology* 17: 304–315.
- Li L i wsp. (2013) The maternal to zygotic transition in mammals. *Molecular Aspects of Medicine* 34: 919–938.
- Liu J i Maller JL. (2005) Calcium elevation at fertilization coordinates phosphorylation of XErp1/Emi2 by Plx1 and CaMK II to release metaphase arrest by cytostatic factor. *Current Biology* 15: 1458–1468.
- Liu Y i wsp. (2014) Prevalence, consequence, and significance of reverse cleavage by human embryos viewed with the use of the Embryoscope time-lapse video system. *Fertility and Sterility* 102: 1295–1300
- Luciano AM i wsp. (2009) Effect of different cryopreservation protocols on cytoskeleton and gap junction mediated communication integrity in feline germinal vesicle stage oocytes. *Cryobiology* 59: 90–95.
- Maciejewska Z i wsp. (2009) Spindle assembly checkpoint-related failure perturbs early embryonic divisions and reduces reproductive performance of LT/Sv mice. *Reproduction* 137: 931–942.
- Marangos P i wsp. (2003) Ca²⁺ oscillations at fertilization in mammals are regulated by the formation of pronuclei. *Development* 130: 1461–1472.
- Markoulaki S i wsp. (2003) Oscillatory CaMKII activity in mouse egg activation. *Developmental Biology* 258: 464–474.

- Markoulaki S i wsp. (2004) Fertilization stimulates long-lasting oscillations of CaMKII activity in mouse eggs. *Developmental Biology* 272: 15–25.
- Maro B i wsp. (1984) Changes in actin distribution during fertilization of the mouse egg. *Journal of Embryology and Experimental Morphology* 81: 211–237.
- Maro B i wsp. (1986) Mechanism of polar body formation in the mouse oocyte: an interaction between the chromosomes, the cytoskeleton and the plasma membrane. *Journal of Embryology and Experimental Morphology* 92: 11–32.
- Martelli AM i wsp. (2001) Nuclear apoptotic changes: an overview. *Journal of Cellular Biochemistry* 82: 634–646.
- McGee MD i wsp. (2006) UNC-83 is a KASH protein required for nuclear migration and is recruited to the outer nuclear membrane by a physical interaction with the SUN protein UNC-84. *Molecular Biology of the Cell* 17: 1790–1801.
- Meraldi P i wsp. (2004) Timing and checkpoints in the regulation of mitotic progression. *Developmental Cell* 7: 45–60.
- Meseguer M i wsp. (2011) The use of morphokinetics as a predictor of embryo implantation. *Human Reproduction* 26: 2658–2671.
- Milewski R i Ajduk A. (2017) Time-lapse imaging of cleavage divisions in embryo quality assessment. *Reproduction* 154: R37-R53.
- Milewski R i wsp. (2015) A predictive model for blastocyst formation based on morphokinetic parameters in time-lapse monitoring of embryo development. *Journal of Assisted Reproduction and Genetics* 32: 571–579.
- Milewski R i wsp. (2016a) Morphokinetic parameters as a source of information concerning embryo developmental and implantation potential. *Ginekologia Polska* 87: 677–684.
- Milewski R i wsp. (2016b) Do morphokinetic data sets inform pregnancy potential? *Journal of Assisted Reproduction and Genetics* 33: 357–365.
- Motato Y i wsp. (2016) Morphokinetic analysis and embryonic prediction for blastocyst formation through an integrated time-lapse system. *Fertility and Sterility* 105: 376–384.e9.
- Munro E i wsp. (2004) Cortical flows powered by asymmetrical contraction transport PAR proteins to establish and maintain anterior-posterior polarity in the early *C. elegans* embryo. *Developmental Cell* 7: 413–424.
- Musacchio A i Salmon ED. (2007) The spindle-assembly checkpoint in space and time. *Nature Reviews Molecular Cell Biology* 8: 379–393.
- Nakahara T i wsp. (2010) Evaluation of the safety of time-lapse observations for human embryos. *Journal of Assisted Reproduction and Genetics* 27: 93–96.
- Nance J. (2014) Getting to know your neighbour: cell polarization in early embryos. *Journal of Cell Biology* 206: 823-832.
- Nance J i Zallen JA. (2011) Elaborating polarity: PAR proteins and the cytoskeleton. *Development* 138: 799–809.
- Neumuller RA i Knoblich JA (2009) Dividing cellular asymmetry: asymmetric cell division and its implications for stem cells and cancer. *Genes and Development* 23: 2675–2699.

- Nguyen-Ngoc T i wsp. (2007) Coupling of cortical dynein and G alpha proteins mediates spindle positioning in *Caenorhabditis elegans*. *Nature Cell Biology* 9: 1294–1302.
- Ozil JP i wsp. (2005) Egg activation events are regulated by the duration of a sustained $[Ca^{2+}]_{cyt}$ signal in the mouse. *Developmental Biology* 282: 39–54.
- Ozil JP i wsp. (2006) Ca^{2+} oscillatory pattern in fertilized mouse eggs affects gene expression and development to term. *Developmental Biology* 300: 534–544.
- Padmakumar VC i wsp. (2005) The inner nuclear membrane protein Sun1 mediates the anchorage of Nesprin-2 to the nuclear envelope. *Journal of Cell Science* 118: 3419–3430.
- Parfitt DE i Zernicka-Goetz M. (2010) Epigenetic modification affecting expression of cell polarity and cell fate genes to regulate lineage specification in the early mouse embryo. *Molecular Biology of the Cell* 21: 2649–2660.
- Park DH i Rose LS (2008) Dynamic localization of LIN-5 and GPR-1/2 to cortical force generation domains during spindle positioning. *Developmental Biology* 315: 42–54.
- Payne C i wsp. (2003) Preferentially localized dynein and perinuclear dynactin associate with nuclear pore complex proteins to mediate genomic union during mammalian fertilization. *Journal of Cell Science* 116: 4727–4738.
- Piotrowska-Nitsche K i Zernicka-Goetz M. (2005) Spatial arrangement of individual 4-cell stage blastomeres and the order in which they are generated correlate with blastocyst pattern in the mouse embryo. *Mechanisms of Development* 122: 487–500.
- Piotrowska-Nitsche K i wsp. (2005) Four-cell stage mouse blastomeres have different developmental properties. *Development* 132: 479–490.
- Plachta N i wsp. (2011) Oct4 kinetics predict cell lineage patterning in the early mammalian embryo. *Nature Cell Biology* 13 117–123.
- Plusa B i wsp. (2005) Down-regulation of Par3 and aPKC function directs cells towards the ICM in the preimplantation mouse embryo. *Journal of Cell Science* 118: 505–515.
- Pribenszky C i wsp. (2010) Pregnancy achieved by transfer of a single blastocyst selected by timelapse monitoring. *Reproductive Biomedicine Online* 21: 533–536.
- Raffel M i wsp. (1998) Particle Image Velocimetry: A Practical Guide (Springer).
- Rauh NR i wsp. (2005) Calcium triggers exit from meiosis II by targeting the APC/C inhibitor XErp1 for degradation. *Nature* 437: 1048–1052.
- Reeve WJ i Kelly FP. (1983) Nuclear position in the cells of the mouse early embryo. *Journal of Embryology and Experimental Morphology* 75: 117–139.
- Reeve WJ i Ziomek CA. (1981) Distribution of microvilli on dissociated blastomeres from mouse embryos: evidence for surface polarization at compaction. *Journal of Embryology and Experimental Morphology* 62: 339–350.
- Rieder CL i wsp. (1994) Anaphase onset in vertebrate somatic cells is controlled by a checkpoint that monitors sister kinetochore attachment to the spindle. *Journal of Cell Biology* 127: 1301–1310.
- Roegiers F i wsp. (1995) The sperm entry point defines the orientation of the calcium-induced contraction wave that directs the first phase of cytoplasmic reorganization in the ascidian egg. *Development* 121: 3457–3466.

- Rubio I i wsp. (2012) Limited implantation success of direct-cleaved human zygotes: a time-lapse study. *Fertility and Sterility* 98: 1458–1463.
- Samarage CR i wsp. (2015) Cortical Tension Allocates the First Inner Cells of the Mammalian Embryo. *Developmental Cell* 34: 435-447.
- Sanders JR i Swann K. (2016) Molecular triggers of egg activation at fertilization in mammals. *Reproduction* 152: R41-50.
- Santaguida S i wsp. (2010) Dissecting the role of MPS1 in chromosome biorientation and the spindle checkpoint through the small molecule inhibitor reversine. *Journal of Cell Biology* 190: 73–87.
- Sardet C i wsp. (2007) From oocyte to 16-cell stage: cytoplasmic and cortical reorganizations that pattern the ascidian embryo. *Developmental Dynamics* 236: 1716–1731.
- Saunders KM i Parks JE. (1999) Effects of cryopreservation procedures on the cytology and fertilization rate of in vitro-matured bovine oocytes. *Biology of Reproduction* 61: 178–187.
- Schmidt A i wsp. (2005) *Xenopus* polo-like kinase Plx1 regulates XErp1, a novel inhibitor of APC/C activity. *Genes and Development* 19: 502–513.
- Sermon K i wsp. (2016) The why, the how and the when of PGS 2.0: current practices and expert opinions of fertility specialists, molecular biologists, and embryologists. *Molecular Human Reproduction* 22: 845-857.
- Shoji S i wsp. (2006) Mammalian Emi2 mediates cytostatic arrest and transduces the signal for meiotic exit via Cdc20. *EMBO Journal* 25: 834–845.
- Sikora-Polaczek M i wsp. (2006) The first mitosis of the mouse embryo is prolonged by transitional metaphase arrest. *Biology of Reproduction* 74: 734–743.
- Skamagki M i wsp. (2013) Asymmetric localization of Cdx2 mRNA during the first cell-fate decision in early mouse development. *Cell Reports* 3: 442–457.
- Speksnijder JE i wsp. (1990) The activation wave of calcium in the ascidian egg and its role in ooplasmic segregation. *Journal of Cell Biology* 110: 1589–1598.
- Splinter D i wsp. (2010) Bicaudal D2, dynein, and kinesin-1 associate with nuclear pore complexes and regulate centrosome and nuclear positioning during mitotic entry. *PLoS Biology* 8: e1000350.
- Srinivasan DG i wsp. (2003) A complex of LIN-5 and GPR proteins regulates G protein signalling and spindle function in *C elegans*. *Genes and Development* 17: 1225–1239.
- Stack C i wsp. (2006) Calcium-responsive contractility during fertilization in sea urchin eggs. *Developmental Dynamics* 235: 1042–1052.
- Sudakin V i wsp. (2001) Checkpoint inhibition of the APC/C in HeLa cells is mediated by a complex of BUBR1, BUB3, CDC20, and MAD2. *Journal of Cell Biology* 154: 925–936.
- Sun QY i Schatten H. (2006) Regulation of dynamic events by microfilaments during oocyte maturation and fertilization. *Reproduction* 131: 193–205.
- Sun QY i wsp. (2001) Translocation of active mitochondria during pig oocyte maturation, fertilization and early embryo development in vitro. *Reproduction* 122: 155–163.
- Sutherland AE i wsp. (1990) Inner cell allocation in the mouse morula: the role of oriented division during fourth cleavage. *Developmental Biology* 137: 13–25.

- Suzuki A i Ohno S. (2006) The PAR-aPKC system: lessons in polarity. *Journal of Cell Science* 119: 979–987.
- Swann K i wsp. (2012) Phospholipase C-zeta induced Ca^{2+} oscillations cause coincident cytoplasmic movements in human oocytes that failed to fertilize after intracytoplasmic sperm injection. *Fertility and Sterility* 97: 742–747.
- Tabansky I i wsp. (2013) Developmental bias in cleavage-stage mouse blastomeres. *Current Biology* 23: 21–31.
- Tapley EC i Starr DA. (2013) Connecting the nucleus to the cytoskeleton by SUN–KASH bridges across the nuclear envelope. *Current Opinion in Cell Biology* 25: 57–62.
- Tarkowski AK i Wroblewska J. (1967) Development of blastomeres of mouse eggs isolated at the 4- and 8-cell stage. *Journal of Embryology and Experimental Morphology* 18: 155–180.
- Tipton AR i wsp. (2013) Monopolar spindle 1 (MPS1) kinase promotes production of closed MAD2 (C-MAD2) conformer and assembly of the mitotic checkpoint complex. *Journal of Biological Chemistry* 288: 35149–35158.
- Torres-Padilla ME i wsp. (2007) Histone arginine methylation regulates pluripotency in the early mouse embryo. *Nature* 445: 214–218.
- Toth S i wsp. (2006) Egg activation is the result of calcium signal summation in the mouse. *Reproduction* 131: 27–34.
- Tung JJ i wsp. (2005) A role for the anaphase-promoting complex inhibitor Emi2/XErp1, a homolog of early mitotic inhibitor 1, in cytostatic factor arrest of *Xenopus* eggs. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA* 102: 4318–4323.
- Vanden Berghe T i wsp. (2013) Determination of apoptotic and necrotic cell death *in vitro* and *in vivo*. *Methods* 61: 117–129.
- Vanden Meerschaut F i wsp. (2013) Diagnostic and prognostic value of calcium oscillatory pattern analysis for patients with ICSI fertilization failure. *Human Reproduction* 28: 87–98.
- Vázquez-Diez C i wsp. (2016) Micronucleus formation causes perpetual unilateral chromosome inheritance in mouse embryos. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA* 113: 626–631.
- Vera-Rodriguez M i wsp. (2015) Prediction model for aneuploidy in early human embryo development revealed by single-cell analysis. *Nature Communications* 6: 7601.
- VerMilyea MD i wsp. (2014) Computer automated time-lapse analysis results correlate with embryo implantation and clinical pregnancy: a blinded, multicentre study. *Reproductive Biomedicine Online* 29: 729–736.
- Vinot S i wsp. (2005) Asymmetric distribution of PAR proteins in the mouse embryo begins at the 8-cell stage during compaction. *Developmental Biology* 282: 307–319.
- Weaver C i Kimelman D. (2004) Move it or lose it: axis specification in *Xenopus*. *Development* 131: 3491–3499.
- Weinerman R i wsp. (2016) Morphokinetic evaluation of embryo development in a mouse model: functional and molecular correlates. *Biology of Reproduction* 94: 1–7.
- Westerweel J. (1997) Fundamentals of digital particle image velocimetry. *Measurement Science and Technology* 8: 1379–1392.
- Willert CE i Gharib M. (1991) Digital particle image velocimetry. *Experiments in Fluids* 10: 181–193.

- Winston N i wsp. (2000) Early development of mouse embryos null mutant for the cyclin A2 gene occurs in the absence of maternally derived cyclin A2 gene products. *Developmental Biology* 223: 139–153.
- Wolthuis R i wsp. (2008) Cdc20 and Cks direct the spindle checkpoint-independent destruction of cyclin A. *Molecular Cell* 30: 290–302.
- Wong CC i wsp. (2010) Non-invasive imaging of human embryos before embryonic genome activation predicts development to the blastocyst stage. *Nature Biotechnology* 28: 1115–1121.
- Yamaguchi M i wsp. (2016) Cryo-EM of mitotic checkpoint complex-bound APC/C reveals reciprocal and conformational regulation of ubiquitin ligation. *Molecular Cell* 63: 593–607.
- Yanez L i wsp. (2016) Human oocyte developmental potential is predicted by mechanical properties within hours after fertilization. *Nature Communications* 7: 10809.
- Yang ST i wsp. (2015) Cleavage pattern predicts developmental potential of day 3 human embryos produced by IVF. *Reproductive Biomedicine Online* 30: 625–634.
- Yi K i wsp. (2011) Dynamic maintenance of asymmetric meiotic spindle position through Arp2/3-complex-driven cytoplasmic streaming in mouse oocytes. *Nature Cell Biology* 13: 1252-1258.
- Zacchini F i wsp. (2017) Embryo biopsy and development: the known and the unknown. *Reproduction* 154: R143-R148.
- Zernicka-Goetz M i wsp. (2009) Making a firm decision: multifaceted regulation of cell fate in the early mouse embryo. *Nature Reviews Genetics* 10: 467–477.
- Zhang S i wsp. (2016) Molecular mechanism of APC/C activation by mitotic phosphorylation. *Nature* 533: 260–264.
- Zhang QH i wsp. (2017) Cyclin A2 modulates kinetochore-microtubule attachment in meiosis II. *Journal of Cell Biology* 216: 3133-3143.

