

Česká zemědělská univerzita v Praze

Fakulta agrobiologie, potravinových a přírodních zdrojů

Katedra veterinárních disciplín



**Proapoptotické a antiapoptotické faktory během stárnutí
oocytů prasete**

Diplomová práce

Autor práce: Antonín Kaplan

Obor studia: Reprodukční biotechnologie

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

Čestné prohlášení

Prohlašuji, že svou diplomovou práci " Proapoptotické a antiapoptotické faktory během stárnutí oocytů prasete" jsem vypracoval samostatně pod vedením vedoucí diplomové práce a s použitím odborné literatury a dalších informačních zdrojů, které jsou citovány v práci a uvedeny v seznamu literatury na konci práce. Jako autor uvedené diplomové práce dále prohlašuji, že jsem v souvislosti s jejím vytvořením neporušil autorská práva třetích osob.

V Praze dne 03.05.2021

Poděkování

Rád bych touto cestou poděkoval prof. Ing. Mgr. Markétě Sedmíkové, Ph.D. za vedení mé diplomové práce. Dále bych rád poděkoval Ing. Lence Hackerové a Ing. Kateřině Havlíkové za poskytnuté rady, trpělivost a pomoc se zpracováním informací. Nesmím také zapomenout poděkovat za podporu, kterou mi při studiu poskytovala má rodina a přátelé.

Proapoptotické a antiapoptotické faktory během stárnutí oocytů prasete

Souhrn

Kultivace oocytů *in vitro* je důležitá biotechnologická metoda uplatňující se v běžné praxi *in vitro* fertilizace (IVF) zvířat i lidí. Ve zralých oocytech vystavených prodloužené kultivaci dochází k řadě biochemických i morfologických změn vedoucích k apoptóze, které jsou mimo jiné charakteristické i mírou exprese proapoptotických a antiapoptotických faktorů rodiny Bcl-2.

Tato diplomová práce se zaměřuje na detailnější poznání chování faktorů zapojených do procesu apoptózy během prodloužené kultivace, tedy stárnutí oocytů. Cílem práce bylo ověřit hypotézu, že se během stárnutí prasečích oocytů exprese proapoptotického proteinu Bax zvyšuje, zatímco exprese antiapoptotického proteinu Bcl – xl se snižuje.

Za účelem ověření hypotézy byla provedena imunolokalizace proapoptotického faktoru Bax a antiapoptotického faktoru Bcl – xl v prasečích oocytech dozrálých do druhé meiotické metafáze (MII) a následně vystavených prodloužené kultivaci. Míra exprese daného proteinu byla měřena v čase, kdy oocyt dosáhl druhé meiotické metafáze (MII) (0 hodin), a dále po 24, 48 a 72 hodinách. Oocyty byly snímány konfokálním mikroskopem a získané snímky byly hodnoceny analýzou obrazu.

Oba proteiny rodiny Bcl – 2, tedy proapoptotický faktor Bax a antiapoptotický faktor Bcl – xl, byly lokalizovány jak v oocytech ve stádiu MII (0 hodin kultivace), tak v oocytech, které byly vystaveny stárnutí během prodloužené kultivace po dobu 24, 48 a 72 hodin. Nejvyšší nárůst exprese proapoptotického faktoru Bax oproti oocytům ve stádiu MII byl naměřen po 24 hodinách kultivace *in vitro*, takže je zřejmé, že k indukci procesu apoptózy ve stárnoucím oocytu prasete dochází již během prvních 24 hodin stárnutí. Následný postupný pokles exprese poukazuje na degradaci proteinů Bax indukovanou aktivací kaspáz. V případě sledování exprese antiapoptotického markeru Bcl – xl byl pozorován pokles relativní optické intenzity sledovaného signálu proteinu s dobou kultivace *in vitro*. Tento pokles v expresi je s ohledem na aktivaci proapoptotického faktoru Bcl – xl v prvních 24 hodinách logický.

Klíčová slova: Apoptóza, BAX, Bcl-xl

Proapoptotic and antiapoptotic factors during aging of porcine oocytes

Summary

In vitro oocyte culture is an important biotechnological method used in the common practice of in vitro fertilization (IVF) of animals and humans. A number of biochemical and morphological changes leading to apoptosis occur in mature oocytes exposed to prolonged culture, which are characterized, among other things, by the level of expression of proapoptotic and antiapoptotic factors of the Bcl-2 family.

This diploma thesis focuses on a more detailed understanding of the behavior of factors involved in the process of apoptosis during prolonged cultivation, ie oocyte aging. The aim of the study was to verify the hypothesis that during the aging of porcine oocytes, the expression of the proapoptotic protein Bax increases, while the expression of the antiapoptotic protein Bcl - xl decreases.

To verify the hypothesis, immunolocalization of proapoptotic factor Bax and antiapoptotic factor Bcl - xl was performed in porcine oocytes matured to the second meiotic metaphase (MII) and subsequently exposed to prolonged culture. The level of expression of a given protein was measured at the time when the oocyte reached the second meiotic metaphase (MII) (0 hours), and then at 24, 48 and 72 hours. Oocytes were scanned with a confocal microscope and the images obtained were evaluated by image analysis.

Both Bcl-2 family proteins, proapoptotic factor Bax and antiapoptotic factor Bcl-xl, were localized in both MII-stage oocytes (0 hours of culture) and in oocytes that were aging during prolonged cultivation for 24, 48 and 72 days. hours. The highest increase in proapoptotic factor Bax expression over MII stage oocytes was measured after 24 hours of in vitro culture, so it is clear that induction of the apoptosis process in the aging pig oocyte occurs during the first 24 hours of aging. The subsequent gradual decrease in expression indicates the degradation of Bax proteins induced by caspase activation. In the case of monitoring the expression of the antiapoptotic marker Bcl - xl, a decrease in the relative optical intensity of the monitored protein signal was observed with the time of in vitro culture. This decrease in expression is logical with respect to the activation of the proapoptotic factor Bcl - xl in the first 24 hours.

Keywords: Apoptosis, BAX, Bcl-xl

Obsah

1.	Úvod.....	1
2.	Vědecká hypotéza a cíle práce.....	2
3.	Teoretická část.....	3
3.1.	Struktura vaječnicku.....	3
3.2.	Oogeneze.....	4
3.3.	Vývoj folikulů.....	5
3.4.	Stárnutí oocytů.....	7
3.5.	Apoptóza.....	9
3.5.1.	Vnější dráha apoptózy	10
3.5.2.	Vnitřní dráha apoptózy.....	11
3.5.3.	Apoptóza a oocyt.....	12
3.6.	Proteiny Bcl – 2 rodiny	13
3.6.1.	Proapoptotické proteiny	14
3.6.2.	Antiapoptotické proteiny	15
3.7.2.	Endoplazmatické retikulum a rodina Bcl-2	24
3.6.	Metody detekce apoptózy	25
3.6.1.	Světelná mikroskopie	25
3.6.2.	Elektronová mikroskopie	25
3.6.3.	Gelová elektroforéza	26
3.6.4.	Detekce apoptózy testem TUNEL.....	26
3.6.5.	Commet test	27
4.6.6.	Annexin V test	27
4.	Materiál a metodika.....	29
4.1.	Materiál	29
4.2.	Metodika.....	29
4.2.1.	Aspirace oocytů.....	29
4.2.2.	Kultivace oocytů	29
4.2.3.	Fixace oocytů.....	29
4.2.4.	Imunolokalizace	30
4.2.5.	Snímání a hodnocení oocytů	30
4.3.	Statistická analýza	30
5.	Výsledky	31
5.2.	Expres Bcl-xl během prodloužené kultivace prasečích oocytů	32
6.	Diskuse	35
7.	Závěr	37

8. Seznam použité literatury.....	38
--	-----------

1. Úvod

Zralé ovulované oocyty se vyznačují poměrně krátkou životností a jejich vývojová kompetence je zachována pouze po omezenou dobu. Z tohoto důvodu musí být savčí oocyty oplozovány do několika hodin po ovulaci. Pokud k oplození nedojde, zůstávají oocyty ve vejcovodu nebo v kultuře *in vitro*, kde podléhají komplexu funkčních a morfologických změn označovaných jako stárnutí, které mohou vést až k jejich apoptotickému nebo nekrotickému zániku. Všechny tyto změny významně snižují kvalitu a životaschopnost oocytů, což vede k poklesu úspěšnosti metod reprodukčních biotechnologií, které poslední dobou dosahují velkého rozvoje nejen u lidí, ale také u zvířat. I přes značný pokrok ve vývoji reprodukčních technologií je právě kvalita oocytů kultivovaných v *in vitro* podmínkách stále neuspokojivá, a proto by nemělo být stanovení podmínek pro optimální zrání ani vhodné načasování oplození podceňováno.

Stárnutí oocytů může v konečném důsledku vést až k jejich partenogenetické aktivaci, lýze nebo fragmentaci, která je znakem řízené buněčné smrti, apoptózy. Na regulaci apoptotického procesu se významně podílejí proteiny z rodiny Bcl – 2 zahrnující jednak faktory proapoptotické, které podporují smrt oocytu a mezi které řadíme také protein Bax, a jednak antiapoptotické faktory, které naopak řízenou buněčnou smrt v oocytu oddalují a mezi které patří protein Bcl – xl. Relativní množství nebo rovnováha mezi těmito pro – a antiapoptotickými proteiny ovlivňuje nejen nastartování apoptózy, ale také výsledný osud buňky.

V reprodukčních biotechnologiích jsou oocyty získávány především pro účely *in vitro* oplození (IVF). U těchto oocytů většinou k manifestaci morfologických změn souvisejících se stárnutím oocytu nedochází, protože zralé oocyty jsou během několika hodin použity právě pro účely IVF. I přesto v oocytu ke změnám, byť na pohled neviditelným, dochází. Tyto změny se mohou následně projevit nejen na kvalitě zygoty, ale také na úspěšnosti embryonálního vývoje. Proto je důležité pochopit příčiny stárnutí oocytu a případně dokázat optimalizovat *in vitro* podmínky tak, aby ke stárnutí oocytů docházelo v co nejmenší možné míře. V *in vitro* podmínkách lze navodit stárnutí oocytů prasete prodlouženou kultivací po dobu 24 – 72 hodin. Během této doby lze studovat nejen zapojení dílčích signálních drah, ale také expresi jednotlivých pro a antiapoptotických faktorů.

2. Vědecká hypotéza a cíle práce

Cílem práce bylo ověřit následující hypotézy:

Hypotéza 1: Exprese proapoptického proteinu BAX se s prodlouženou kultivací zralých prasečích oocytů zvyšuje.

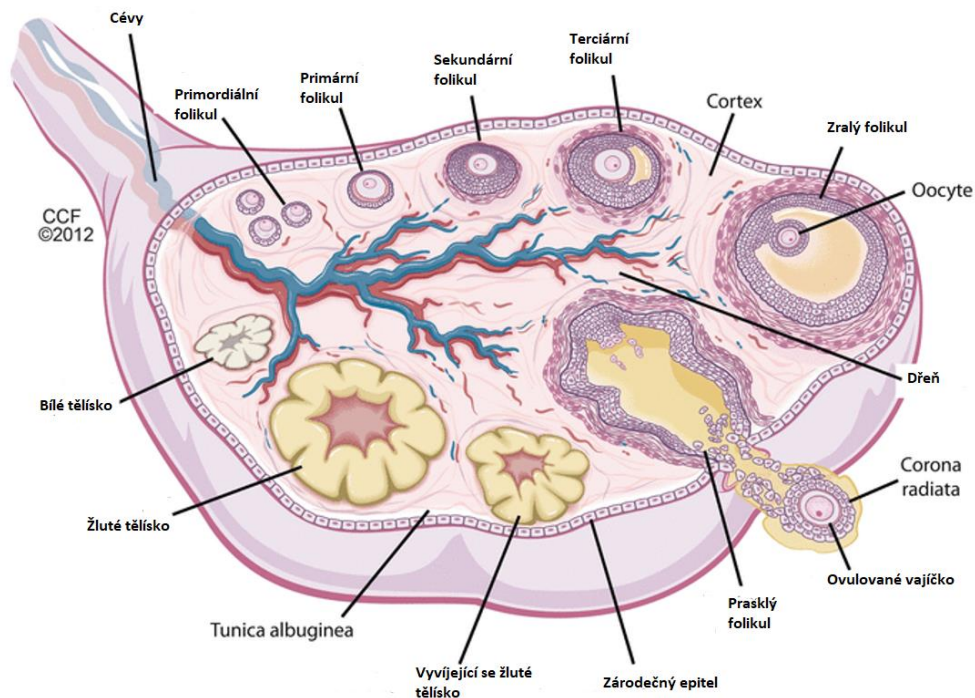
Hypotéza 2: Exprese antiapoptického proteinu Bcl – xl se během stárnutí zralých prasečích oocytů snižuje.

3. Teoretická část

3.1. Struktura vaječnicku

Vaječník, který je hlavním a párovým reprodukčním orgánem samice, obsahuje nejen zárodečné buňky, ale funguje také jako endokrinní orgán vylučující estrogen a progesteron v reakci na gonadotropinovou a parakrinní signalizaci (Coutsoukis 2007).

Vaječník zahrnuje několik různých vrstev a typů tkání, jak je znázorněno na obr. 1. Vnitřní vrstvou je dřev sestávající z nepravidelně uspořádaných fibroelastických pojivových tkání a rozsáhlých nervových a cévních systémů, jenž vstupují do vaječnicku skrz hilus (vaječnickovou branku) (Hafez & Hafez 2016). Dřev je obalena kůrou, která je tvořena stromální tkání a obsahuje nejrozličnější vývojová stadia ovariálních folikulů včetně jejich derivátů. Na povrchu vaječnicku se nachází tenká vrstva epiteliálních buněk, známá jako zárodečný epitel, která během růstu plodu produkuje tisíce primordiálních folikulů (Heffner & Schust 2010). Pod zárodečným epitelem je silná vrstva bílé pojivové tkáně známá jako *tunica albuginea* (Desai *et al.* 2017), která je složená převážně ze strukturních kolagenů a dalších extracelulárních proteinů. Na rozdíl od ostatních stromálních oddílů jsou tunica albuginea a vnější kůra avaskulární (bezcévné) (Hummitzsch *et al.* 2019).



Obr. 1: Toto schéma zobrazuje vyvíjející se folikul a oocyt v kůře vaječnicku. Vnější vrstva zahrnuje tenkou vrstvu epiteliálních buněk známou jako zárodečný epitel, která během růstu plodu vede k vzniku prvotních oocytů. Těsně pod ním je silná vrstva pojivové tkáně známá jako tunica albuginea. Dřev (*medulla*), umístěná ve středu vaječnicku, obsahuje krevní cévy, které jsou životně důležité pro přežití a funkci vaječnicku (Desai *et al.* 2017).

U prasnic jsou vaječníky asi 5 cm dlouhé a z důvodu mnoha folikulů a žlutých tělísek vystupujících na jejich povrch připomínají svým tvarem hrozen (Nickel *et al.* 1979; Hafez & Hafez 2016).

3.2. Oogeneze

Oocyt je samičí pohlavní buňka, která se vyvíjí ve folikulech vaječníku procesem zvaným oogeneze. Jedná se o zdlouhavý proces, který zahrnuje vznik, růst a zrání buňky. Od spermatogeneze se liší v několika důležitých bodech. Zatímco gameta vytvořená spermatogenezí ztrácí většinu své cytoplazmy i organel a přeměňuje se na pohyblivou buňku schopnou přežít a fungovat mimo reprodukční systém samce, gameta vytvořená oogenezí několikanásobně zvětšuje svůj objem cytoplazmy tak, aby vytvořila všechny potřebné látky k zahájení a udržení metabolismu a vývoje zygoty (Alberts *et al.* 2002; Rodrigues *et al.* 2008; Tulsiani & Abou-Haila 2012).

Pohlavní buňky pocházejí z primordiálních zárodečných buněk (PGCs), jejichž tvorba je zahájena již během časně embryogeneze (Wassarman 1988). PGCs mají původ v proximálním epiblastu (ektodermu), odkud migrují přes žloutkový váček a zadní střevo až do genitální lišty (Hurk & Zhao 2005; Nikolic *et al.* 2016). U prasete mohou být PGCs pozorovány již 18. den embryonálního vývoje (Black & Erickson 1968). Během migrace vykazují PGCs vysokou mitotickou aktivitu, díky níž se jejich počet mnohonásobně zvyšuje (Wassarman & Albertini 1994). Jakmile dosáhnou genitální lišty, ztrácí schopnost pohybu (Picton *et al.* 1998). Ačkoli se primordiální zárodečné buňky v genitální liště mohou diferencovat na samčí nebo samičí gamety, genetické založení samice a ovariální somatické buňky ovlivňují diferenciaci PGCs na oogonie (Upadhyay & Zamboni 1982). Pro oogonie je charakteristická vysoká úroveň proliferace s neúplnou cytokinezí, díky čemuž vzniká skupina buněk vzájemně propojených cytoplazmatickými můstky, což umožňuje přenos látek mezi buňkami. Migrace a proliferace oogonií do vyvíjejících se pohlavních žláz je řízena mnoha faktory (Pepling 2006).

Oogonie postupně ztrácí schopnost proliferace a v reakci na působení retinové kyseliny vstupují do meiotického dělení. Retinová kyselina aktivuje protein STRA8, který je nezbytný pro replikaci premeiotické DNA a následný vstup buňky do meiotické profáze (Bowles *et al.* 2006; Sánchez & Smitz 2012). Prasečí oogonie zahajují meiotické dělení přibližně 40. den embryonálního vývoje (Hunter 2000). Buňky, které vstoupí do meiotického dělení, jsou označovány jako primární oocyty (Albert *et al.* 2007).

Primární oocyty vstupují do profáze prvního meiotického dělení, ve které nastává řada zásadních událostí. Dochází nejen ke spiralizaci a kondenzaci chromozomů, ale také k párování homologních chromozomů a následnému crossing overu. Při crossing overu se mezi homologními chromozomy tvořícími tzv. bivalenty vyměňují úseky DNA, díky čemuž se udržuje genetická variabilita potomstva (Alberts *et al.* 2007; Hunt & Hassold 2008). V této fázi je meiotické dělení pozastaveno v tzv. prvním meiotickém bloku a k opětovnému zahájení meiózy dochází prostřednictvím hormonální stimulace až v době pohlavní dospělosti (Sánchez

& Smitz 2012). Aby byl oocyt schopný dokončit meiotické dělení, musí nejprve projít fází růstu, ve které probíhá syntéza a skladování RNA a dalších molekul. Meiotická kompetence je definována jako schopnost buňky překročit kontrolní bod G₂ a dokončit meiózu. Meioticky kompetentní oocyt prasnice musí zvětšit svůj průměr přibližně čtyřikrát, tj. na 120 μm (Hunter 2000). Kromě syntézy látek dochází v období růstu ke vzniku zony pellucidy (ZP), kortikálních granul i nových mitochondrií (Wassarman & Albertini 1994; Hurk & Zhao 2004). Na konci růstové fáze, před meiotickým zráním, získává jádro oocytu charakteristický tvar, který se označuje jako zárodečný váček (GV) (Wassarman & Albertini 1994).

Pro udržení oocytů pod meiotickou zástavou jsou rozhodující především zvýšené hladiny cyklického adenosinmonofosfátu (cAMP) produkovaného adenylcyklázou (Nogueira *et al.* 2003) a hladiny cyklického guanosinmonofosfátu (cGMP) tvořeného guanylylcyklázou (Bornslaeger *et al.* 1984). Předpokládá se, že cAMP jednak proniká do oocytů prostřednictvím mezerových spojů kumulárních buněk (Sela-Abramovich *et al.* 2006), jednak je endogenně tvořen přímo v oocytu pomocí receptorů spřažených s G-proteinem 3 a 12 (GPR3, 12) (Vaccari *et al.* 2008).

K zrání oocytů obvykle dochází až po pohlavní dospělosti, což je u prasnic přibližně ve věku 10 měsíců, kdy je meioticky kompetentní oocyt stimulován hormony, zejména LH. Pod těmito hormonálními vlivy obnovuje buňka své meiotické dělení (Wassarman & Albertini, 1994; Alberts *et al.* 2002). Pro výstup oocytu z prvního meiotického bloku je nezbytné také krátkodobé snížení aktivity MPF (maturation promoting factor) (Picard *et al.* 1985). Dochází k rozpadu zárodečného váčku (GVBD) a k rozdělení chromozomů a cytoplazmy, která je však rozdělena asymetricky. Tím vznikají dvě buňky lišící se velikostí – větší sekundární oocyt a menší polové tělísko (Wassarman & Albertini 1994). Po vydělení prvního pólového tělíska vstupuje sekundární oocyt do druhého meiotického dělení, které je zastaveno v metafázi II neboli druhém meiotickém bloku (Alberts *et al.* 2007). Ten je udržován především vysokou aktivitou MPF (Picard *et al.* 1985; Ito & Kashiwazaki 2012). Zde oocyt zůstává do chvíle, dokud nedostane aktivační stimul zprostředkovaný oplozením spermií. V takovém případě dochází k vydělení druhého pólového tělíska a vzniká buňka s haploidní sestavou chromozomů tzv. ootida (*ovum*) (Sánchez & Smitz 2012). Pokud k oplození nedojde, oocyt podstoupí apoptózu (Wassarman & Albertini 1994).

3.3. Vývoj folikulů

Folikulogenezi lze definovat jako proces, ve kterém primordiální folikul, skládající se z malé zárodečné buňky a vrstvy plochých buněk granulózy, roste a postupně se diferencuje až v antrální (preovulační) folikul (Silva *et al.* 2009). Celý průběh lze na základě reakce na gonadotropiny (FSH a LH) rozdělit do dvou odlišných fází. Zatímco první fáze je relativně pomalá a není přímo závislá na hladinách gonadotropinu (Gougeon 1996; Baerwald *et al.* 2012), jelikož klíčovými růstovými faktory jsou především TGF-β, aktivin, morfogenetické proteiny kostí (BMP) či Anti-Müllerian hormon (AMH) (Desai *et al.* 2017), další fáze je mnohem rychlejší, protože folikul již na působení gonadotropinů reaguje (Vegetti 2006).

Primordiální folikuly se začínají formovat již v počátečním stádiu oogeneze, kdy na oocyty, které se nacházejí v prvním meiotickém bloku, začínají nasedat tzv. pregranulózní buňky mající původ v somatických buňkách vaječníku a mezonefros (Sawyer *et al.* 2002). Tyto primordiální folikuly obklopené jednou vrstvou plochých buněk mají průměr 22,1 μm (Greenwald & Moor 1989) a představují základní jednotky vaječníku (Fair 2003). U prasničky je při narození přítomno odhadem 500 000 primordiálních folikulů (Kanitz *et al.* 2001). Vznik vrstvy pregranulozních buněk je pro následný vývoj oocytu nezbytný. Oocyty bez těchto buněk totiž podléhají apoptóze (Pepling and Spradling 2001). Primordiální folikuly zůstávají v klidovém stádiu až do doby, kdy jsou tzv. rekrutovány neboli nabrány do kohorty rostoucích folikulů, jejichž osudem je atrézie nebo ovulace (Hirshfield 1991; Knox 2005). Obecně lze recruitment (nábor) rozdělit na iniciační a cyklický recruitment. Během iniciačního recruitmentu stimulují intraovariální a / nebo jiné neznámé faktory některé primordiální folikuly k zahájení růstu, zatímco zbytek folikulů zůstává po celé měsíce nebo roky v klidu. Alternativně může být iniciační recruitment způsoben také uvolněním inhibičních stimulů, které udržují folikuly ve stagnaci. Iniciační recruitment je považován za kontinuální proces, který začíná těsně po tvorbě folikulů, dlouho před nástupem puberty. Naproti tomu cyklický recruitment začíná po nástupu puberty a je výsledkem nárůstu cirkulujícího FSH během každého reprodukčního cyklu, který zachrání kohortu antrálních folikulů z atrézie. Během cyklického náboru přežije pouze omezený počet folikulů, který dosáhne preovulační velikosti (McGee & Hsueh 2000). Jelikož je recruitment nevratný proces, je nezbytné, aby byla aktivována pouze určitá skupina primordiálních folikulů. Aktivace je řízena na základě rovnováhy mezi inhibičními a stimulačními faktory (Adhikari & Liu 2009).

Z primordiálních folikulů se přeměnou vrstvy pregranulózních buněk ve vrstvu buněk granulózních, mající kubický tvar, stávají folikuly primární (Hurk and Zhao 2004). K této přeměně dochází nezávisle na FSH (Meduri *et al.* 2002). Mezi oocytem a granulózními buňkami se vytváří mezerové spoje neboli gap junctions, které jsou tvořeny proteiny konexiny. Tyto mezerové spoje umožňují nejen buněčnou komunikaci mezi oocytem a granulózními buňkami, ale také mezi granulózními buňkami navzájem. Jelikož prostřednictvím mezerových spojů dochází k přenosu živin, molekul a nejrůznějších signálů, je jejich přítomnost pro růst oocytu nezbytná (Picton *et al.* 1998; Wright *et al.* 2001).

Granulózní buňky folikulu postupně proliferují a vytváří více vrstev. Folikul, který obsahuje dvě a více vrstev granulózních buněk, se označuje jako sekundární či preantrální. Oocyt nacházející se v tomto stádiu folikulu vstupuje do růstové fáze a vytváří se u něj *zona pellucida* i vrstva buněk *theca folliculi*, kde se tvoří receptory pro luteinizační hormon (LH), prostřednictvím nichž aktivuje LH syntézu androgenů, které následně stimulují v granulózních buňkách tvorbu FSH receptorů. Jelikož však sekundární folikul nedokáže exprimovat enzym aromatázu, který je potřebný pro přeměnu androgenů na estrogény, k syntéze estrogenů v tomto stádiu folikulu nedochází (Hirao *et al.* 1994; Fair 2003; Hurk & Zhao 2004).

V průběhu dalšího vývoje, který je již závislý na působení gonadotropních hormonů, dochází uvnitř sekundárních folikulů k formování dutiny, tzv. antra, která je postupně zaplňována tekutinou tvořenou granulózními buňkami. Vaskularizací folikulu a zvýšením propustnosti krevních cév se antrální folikul zvětšuje. Jakmile se dutina plně vyvine, označují

se tyto folikuly jako terciální neboli antrální (Eppig 2001; Hurk & Zhao 2004). V tomto stádiu dochází k diferenciaci vrstvy buněk *theca folliculi* na *theca folliculi interna* a *theca folliculi externa*. Folikulární buňky se oddělují na dvě skupiny buněk – kumulární a murální. Zatímco kumulární buňky se nachází v blízkosti oocyty, se kterým tvoří tzv. kumulo-oocytární komplex, murální buňky obklopují stěnu folikulu (Driancourt, 1991; Hurk & Zhao 2004). Jelikož kumulární buňky nemají receptory pro LH, signál pro dozrání a ovulaci v podobě tzv. LH peaku vnímají prostřednictvím faktorů vylučovaných murálními buňkami. Celý folikulární vývoj je zakončen buď ovulací nebo atresii (Eppig *et al.* 1997).

V případě ovulace se folikul vyvine ve žluté tělísko, které vylučuje estrogen a progesteron nezbytný pro implantaci embrya a ranou fází březosti. Pokud nedojde k implantaci, tělísko degeneruje do struktury pojivové tkáně známé jako *corpus albicans* (Jones & Shikanov 2019). Prasnice může v závislosti na věku, stavu výživy a dalších faktorech ovulovat od 15 do 30 folikulů (Soede *et al.* 2011). Morbeck *et al.* (1992) uvádí, že u prasnice uplyne od náboru folikulů do zformování antra zhruba 84 dní.

Z celkového množství primárních folikulů doroste do antrálních folikulů pouze 10 %, které dále po vystavení zvýšené hladiny luteinizačního hormonu (LH) uvolní zralý oocyt. Zbýlých 90 % folikulů podstoupí apoptózu neboli programovanou buněčnou smrt (Zeleznik 2004; Hsueh *et al.* 2015).

3.4. Stárnutí oocytů

Je prokázáno, že kvalita oocytů určuje vývojový potenciál budoucího embrya (Wang & Sun 2007). Oocyty zastavené ve stádiu MII jsou po ovulaci oplozeníšopné, tato schopnost je však časově limitovaná a dle druhu přetrvává od 8 do 24 hodin po ovulaci (Austin 1974). Pokud během této doby nedojde k oplodnění, neoplozené buňky, které zůstanou ve vejcovodu (*in vivo*) nebo v kultuře (*in vitro*), podléhají časově závislému zhoršení kvality, procesu zvanému stárnutí oocytů (Tatone *et al.* 2008).

Funkční změny spojené se stárnutím oocytů zahrnují sníženou míru oplodnění, vyšší riziko polyspermie, spontánní parthenogenezi oocyty, chromozomální anomálie (Mailhes *et al.* 1998), apoptózu (Perez & Tilly 1997), zvýšenou náchylnost k aktivačním podnětům (Goud *et al.* 1999), nástup anafáze II (Xu *et al.* 1997; Abbott *et al.* 1998), částečnou exocytózu kortikálních granulí (CG), strukturální změny a tvrdnutí *zona pellucida*, pokles faktoru podporujícího zrání (MPF), snížení aktivity mitogenem aktivované proteinkinázy (MAPK) (Xu *et al.* 1997), epigenetické změny (Liang *et al.* 2008) a abnormální nebo zpomalený vývoj embryí (Tarin *et al.* 1999).

Zralé oocyty s intaktním prvním polárním tělískem (PB1) jsou obaleny v glykoproteinovém obalu zvaném *zona pellucida*. Mezi hlavní složky oocytů patří kortikální granula, která jsou pravidelně seřazena pod kůrou oocytů, mikrofilamenta lokalizovaná pod plazmatickou membránou (PM) a uvnitř mikroklků, dělicí vřeténko v MII fázi se zarovnanými chromozomy na mikrotubulech a centrosomy umístěnými na dvou protilehlých pólech (Sun & Schatten, 2007; Schatten 2008). Stárnutí oocytů způsobuje četné morfologické a buněčné změny, včetně změn ve struktuře plazmatické membrány, *zona pellucida*, cytoskeletu, mitochondriích,

lokalizaci dělicího vřeténka, vychýlení chromozomů, disperzi centrosomálního materiálu, přemístění PB1 a CG, jakož i předčasné exocytóze CG.

Zatímco *Zona pellucida* nestárnoucích oocytů sestává z granulofibrilárního, vzájemně propojeného retikula s póry, *zona pellucida* starých oocytů vykazuje tuhý, dlážděný vzhled, který se skládá z těsných agregací granulofibrilárního materiálu oddělených od sebe menším prostorem (Longo 1981). Stárnutí oocytů také vede ke zvýšení počtu lysozomů a agregátů tubulů z hladkého endoplazmatického retikula (ER) a malých komplexů mitochondriálních vezikul (Sundstrom *et al.* 1985).

V čerstvě zralých oocytech procházejí malé CG pod kůrou oocytů přesně koordinovanou kortikální reakcí vyvolanou při oplodnění, která uvolní jejich obsah do perivitelinního prostoru, což má za následek modifikaci *zona pellucida* a extracelulární blok polyspermie (Okadaet *et al.* 1993). Ve zralých oocytech vystavených prodlouženému stárnutí je kortikální reakce spuštěna spontánně bez oplodnění. CG jsou vytěšňovány a dochází k částečné exocytóze (Xu *et al.* 1997; Goudet *et al.* 2005).

Postovulační stárnutí oocytů vede nejen k morfologickým, ale také biochemickým a molekulárním změnám (Miao *et al.* 2009). Intracytoplazmatická hladina glutathionu (GSH), která hraje hlavní roli v ochraně oocytů před poškozením reaktivními formami kyslíku (ROS), se ve stárnoucích oocytech snižuje (Boerjan & de Boer 1990). Zvyšuje se také úroveň peroxidace lipidů, která je ukazatelem stupně oxidačního stresu (Takahashi *et al.* 2003). Kromě toho se s postupující dobou kultivace zralých oocytů zvyšuje množství ROS (Takahashi *et al.* 2009). Ve stárnoucích oocytech také klesá intracytoplazmatická hladina adenosintrifosfátu (ATP) (Igarashi *et al.* 2005) a klesá exprese antiapoptotického proteinu Bcl-2 (Takahashi *et al.* 2009). Postovulační stárnutí oocytů narušuje intracelulární regulaci Ca²⁺, což je jeden z nejdůležitějších faktorů pro oplodnění a následný embryonální vývoj (Takahashi *et al.* 2000).

Mitochondriální dysfunkce je silný mediátor postovulačního procesu stárnutí oocytů. Pro normální funkci oocytů jsou důležité aktivní mitochondrie, přičemž tyto organely představují primární zdroj produkce ATP v oocytech (Dumollard *et al.* 2007). Funkčnost mitochondrií se však zhoršuje s prodloužujícím se časem od ovulace, což je faktor, o kterém se předpokládá, že silně ovlivňuje kvalitu oocytů. Snižená mitochondriální integrita ve zralém oocytu podrobenému stárnutí *in vitro* byla prokázána ztrátou potenciálu mitochondriální membrány (Zhang *et al.* 2011) a poklesem úrovně produkce ATP (Chi *et al.* 1988).

Jelikož je známo, že poškození mitochondrií způsobuje zvýšenou produkci reaktivních forem kyslíku (ROS) a uvolňování proapoptotických faktorů, jako je cytochrom c (Liu *et al.* 2009), které dále působí aktivačně na kaspázy (Takai *et al.* 2007) a endonukleázy (Fujino *et al.* 1996), je pravděpodobné, že mitochondriální dysfunkce je spojnicí mezi postovulačním stárnutím oocytů a apoptózou. Ztráta mitochondriální integrity může dále vést k ztrátě mitochondriální DNA (Shigenaga *et al.* 1994).

Oxidační stres má také schopnost přímo ovlivňovat nástup apoptózy v postovulačních oocytech. Ukázalo se, že aplikace peroxidu vodíku na zralé oocyty *in vitro* způsobuje pokles hladin antiapoptotického proteinu Bcl-2 (Takahashi *et al.* 2009), indukuje expresi proapoptotického Bax a kaspázy-3 a vyvolává fragmentaci DNA (Chaube *et al.* 2007) a uvolňování cytochromu c (Liu *et al.* 2000). Důležité je, že tyto patologické jevy jsou společné

jak pro oxidační stres, tak pro stárnutí oocytů, a bylo prokázáno, že úleva od oxidačního stresu prostřednictvím antioxidační léčby zpomaluje nástup fragmentace a aktivace kaspázy spojené s postovulačním stárnutím (Lord *et al.* 2013).

3.5. Apoptóza

Počet buněk v určité tkáni je určován zejména množením buněk (proliferací) a fyziologickou buněčnou smrtí (apoptózou). Oba děje jsou regulovány stimulačními a inhibičními faktory, které mohou existovat buď v rozpuštěné formě (růstové faktory a cytokiny), nebo jsou prezentovány navázané na povrchu okolních buněk. Od apoptózy je potřeba odlišit nekrózu, která je charakterizována jako pasivní náhodná smrt buněk v důsledku poruch prostředí s nekontrolovatelným uvolňováním zánětlivého buněčného obsahu (Levrán *et al.* 2002; Fink & Cookson 2005; Sen & Caiazza 2013).

Apoptózu považujeme za geneticky naprogramovanou buněčnou smrt, která je následovaná čistou destrukcí buňky a recyklací jejích součástí. Termín “programovaná buněčná smrt” byl použit k popisu buněčných úmrtí, ke kterým dochází na předvídatelných místech a v předvídatelných dobách během vývoje, aby bylo zdůrazněno, že smrt může být do určité míry naprogramována dle vývoje organismu. Následně bylo zjištěno, že programovaná buněčná smrt slouží také jako hlavní mechanismus pro přesnou regulaci počtu buněk a jako obranný mechanismus k odstranění nežádoucích a potenciálně nebezpečných buněk, jako jsou buňky nádorové, buňky infikované virem nebo buňky s nenapravitelně poškozenou DNA. Kromě prospěšných účinků může nevhodná aktivace buněčné smrti způsobovat nebo přispívat k řadě onemocnění, včetně syndromu získané imunodeficiencie (AIDS), neurodegenerativních onemocnění a ischemických cévních mozkových příhod. Naopak porucha v aktivaci PCD může být zodpovědná za některá autoimunitní nebo onkologická onemocnění (Estaquier *et al.* 2011; Koolman & Klaus-Heinrich 2012).

Bylo zjištěno, že apoptóza je také nezbytnou součástí funkce a vývoje vaječnicků. Zatímco během života plodu je apoptóza lokalizována především do oocytů, v dospělosti je detekována v granulózniích buňkách sekundárních a antrálních folikulů (Hussein 2005).

Jakmile je v buňce zahájena apoptóza, ztrácí spojení se sousedními buňkami. Její membrána se zmenšuje a části cytoplazmy se odškrcují ve formě takzvaných apoptotických tělísek, které jsou následně fagocytovány okolními buňkami, především makrofágy, aniž by došlo ke vzniku zánětlivého projevu. Signálem pro fagocytující buňky je translokace fosfatidylserinu z vnitřní na vnější stranu buněčné membrány (Grimsley & Ravichandran 2003; Koolman & Klaus-Heinrich 2012). Apoptotický proces je spojen s dalšími morfologickými změnami, které zahrnují svaštění buňky, změny buněčné membrány, smrštění buněčného jádra, kondenzaci chromatinu a fragmentaci DNA (Koolman & Klaus-Heinrich 2012).

Za tuto charakteristickou morfologii jsou zodpovědné především kaspázy, které jsou klíčovými efektoři apoptózy. Ty mohou být u savců aktivovány dvěma primárními cestami: (i) vnitřní neboli mitochondriální, ve které hrají roli protein p53 a mitochondrie, a (ii) vnější, kdy je aktivován receptor smrti Fas signálem přicházejícím z vnějšku buňky (Ghobrial *et al.* 2005).

Je však nutné zmínit, že tyto dráhy zprostředkovávající tzv. iniciační fázi, mohou být aktivovány celou řadou endogenních i exogenních podnětů. V následné efektorové, nevratné fázi jsou postupně aktivovány proteolytické enzymy, které jsou zapojeny do štěpení svých proteinových substrátů (Scaffidy 1998). Na regulaci apoptotického programu se podílí celá řada molekul. U savců se jedná zejména o čtyři hlavní skupiny proteinů, konkrétně proteiny Bcl – 2 (B-cell lymphoma 2), proteiny rodiny TNFR (Tumor Necrosis Factor Receptor), adaptorové proteiny a kaspázy (Guthrieet & Garrett 1999).

Pro spuštění apoptózy je v některých buňkách nezbytná aktivace vnější i vnitřní signální dráhy. Buňky lze z tohoto hlediska rozdělit do dvou tříd, a to na buňky I. typu, u kterých je apoptóza spuštěna pouze aktivací kaspázy-8 v komplexu DISC, a buňky II. typu, u nichž jsou pro aktivaci zapotřebí signály z vnitřní i vnější mitochondriální dráhy (Gross *et al.* 1999; Jin & El-Deiry 2005).

3.5.1. Vnější dráha apoptózy

Vnější apoptotická dráha, která je aktivována prostřednictvím extracelulárních podnětů, zahrnuje interakce zprostředkované transmembránovými receptory. Mezi receptory podněcující buněčnou smrt patří členové genové nadrodiny receptorů pro tumor nekrotizující faktor (TNF) (Locksley *et al.* 2001). Členové rodiny TNF receptorů mají kromě podobné extracelulární domény bohaté na cystein také cytoplazmatickou doménu, která se nazývá doména smrti (Ashkenazi & Dixit 1998). Tato doména hraje rozhodující roli při přenosu signálu smrti z buněčného povrchu do intracelulárních signálních drah. Dosud nejlépe charakterizovanými ligandy a odpovídajícími receptory smrti jsou FasL / FasR, TNF- α / TNFR1, Apo3L / DR3, Apo2L / DR4 a Apo2L / DR5 (Chicheportiche *et al.* 1997; Ashkenazi & Dixit 1998; Suliman *et al.* 2001).

Sled událostí, které definují vnější dráhu apoptózy, lze nejlépe charakterizovat pomocí modelů FasL / FasR a TNF- α / TNFR1. V těchto modelech dochází k shlukování receptorů a k vazbě s homologním ligandem. Po navázání ligandu jsou přijímány cytoplazmatické adaptorové proteiny, které mají odpovídající domény smrti a které se vážou na příslušné receptory (Hsu *et al.* 1995). Vazba ligandu Fas (FasL) na receptor Fas (FasR) vede k navázání adaptorového proteinu FADD (doména smrti spojená s Fas) a vazba ligandu TNF (TNF- α) k receptoru TNF (TNFR1) vede k navázání adaptorového proteinu TRADD (doména smrti asociovaná s TNFR) (Wajant 2002). FADD se poté asociuje s prokaspázou-8 a prokaspázou-10 za vzniku signálního komplexu vyvolávajícího smrt (DISC), který zprostředkovává autokatalytickou aktivaci prokaspázy-8 a prokaspázy-10 (Kischkel *et al.* 1995). Ty šíří signál smrti prostřednictvím aktivace efektorových kaspáz, jako jsou kaspázy-3, kaspáza-6 a kaspáza-7, které proteolýzou degradují proteinové substráty odpovědné např. za udržení integrity genomu (Jin & Deiry 2005; Yamada *et al.* 2017). Bylo zjištěno, že aktivní kaspáza-8 může u buněk typu II štěpit protein Bid, který je členem rodiny Bcl-2, na aktivní protein tBid, jenž putuje k mitochondriím, kde po inserci do mitochondriální membrány způsobí uvolnění cytochromu c, čímž aktivuje vnitřní apoptotickou dráhu (Wang *et al.* 1996; Yin *et al.* 1999; Yamada *et al.* 2017) Apoptózu zprostředkovanou receptorem smrti lze inhibovat proteinem

zvaným c-FLIP, který se váže na FADD a kaspázu-8, což je činí neaktivními (Kataoka *et al.* 1998; Scaffidi 1999).

3.5.2. Vnitřní dráha apoptózy

Vnitřní signální dráha může být vyvolána buď permeabilizací vnější mitochondriální membrány, nebo přímým poškozením DNA, tepelným šokem či aktivací onkogenů (Jin & El-Deiry 2005; Wang & Youle 2009). Cesta závislá na mitochondriích je regulována rodinou proteinů Bcl-2, která se skládá ze dvou antagonistických skupin. Zatímco jedna, zahrnující Bcl-2, Bcl-XL, Ced-9, Bcl-w a Mcl-1, podporuje přežití buněk (antiapoptotické faktory), druhá, včetně Bax, Bid a Bak, podporuje buněčnou smrt (proapoptotické faktory) (Adams & Cory 1998). Jedním ze zajímavých aspektů regulace apoptózy členy rodiny Bcl-2 je jejich subcelulární lokalizace a translokace. Určité pro- a antiapoptotické členy, jako jsou Bcl-2, Bcl-XL a Bak, sídlí převážně v mitochondriích, zatímco ostatní členové, jako Bax, Bid a Bad, sídlí v cytosolu zdravých buněk. Brzy po přijetí stresového signálu se tyto členové rodiny cytosolických Bcl-2 translokují do vnější mitochondriální membrány (Gross *et al.* 1999a). Po translokaci Bax a Bid do mitochondrií dochází za spoluúčasti Bak k tomu, že mitochondrie ztrácejí svůj membránový potenciál ($\Delta\Psi_m$) a uvolňují mezimembránové prostorové proteiny, zejména cytochrom c do cytosolu buňky (Nechushtan *et al.* 2001; Elmore 2007).

V mitochondriální tvorbě ATP má cytochrom c zásadní roli, protože převádí elektrony mezi transmembránovými komplexy III (ubichinol-cytochrom c-reduktáza) a IV (cytochrom c-oxidáza). Jakmile se však cytochrom c uvolní z mitochondrií, má smrtící funkci, neboť aktivuje kaspázy. Jakmile je cytochrom c v cytosolu, váže molekulu adaptéru APAF-1, což vede k jeho rozsáhlým konformačním změnám, oligomerizaci a vytvoření heptamerní struktury zvané apoptosom (Li & Zhan 2019). Apoptosom přijímá a aktivuje pro-kaspázu-9, která štěpí a aktivuje efektorové kaspázy-3 a -7, jež účinně zabijí buňku během několika minut prostřednictvím paralelního štěpení stovek různých substrátů. Kromě cytochromu c uvolňují mitochondrie po permeabilizaci jejich vnější membrány (MOMP z anglického mitochondrial outer membrane permeabilization) řadu dalších proteinů, které podporují a usnadňují aktivitu kaspáz – mezi ně patří např. SMAC (také nazývaný Diablo) a Omi (také nazývaný HtrA2), (Hague & Paraskeva 2004). Důležité je, že MOMP často vede k buněčné smrti bez ohledu na aktivitu kaspáz (Tait *et al.* 2014).

V případě poškození DNA buňky, které je důvodem pro spuštění apoptózy, hraje zásadní roli gen p53 kódující stejnojmenný protein – tzv. tumor supresorový protein p53 (Jin & El-Deiry 2005). Ten může nejen aktivovat proteiny opravující poškozenou DNA, ale také je schopen zadržet buňku v konkrétní fázi růstového cyklu a u nereparabilní buňky iniciovat apoptózu (Muller *et al.* 1998). Poškození DNA vede ke vzniku proteinů aktivujících p53, který zainhibuje buňku v G1 / S fázi až do doby, dokud není poškození opraveno (Taskin *et al.* 1997). V případě, že reparace DNA není možná, zvýší se exprese proteinu p53, což indukuje tvorbu proapoptotických proteinů z rodiny Bcl-2 proteinů, konkrétně Noxa a Puma, které mohou aktivovat další proapoptotické členy rodiny Bcl-2 proteinů (Danial 2007; Zhang & Xu 2013).

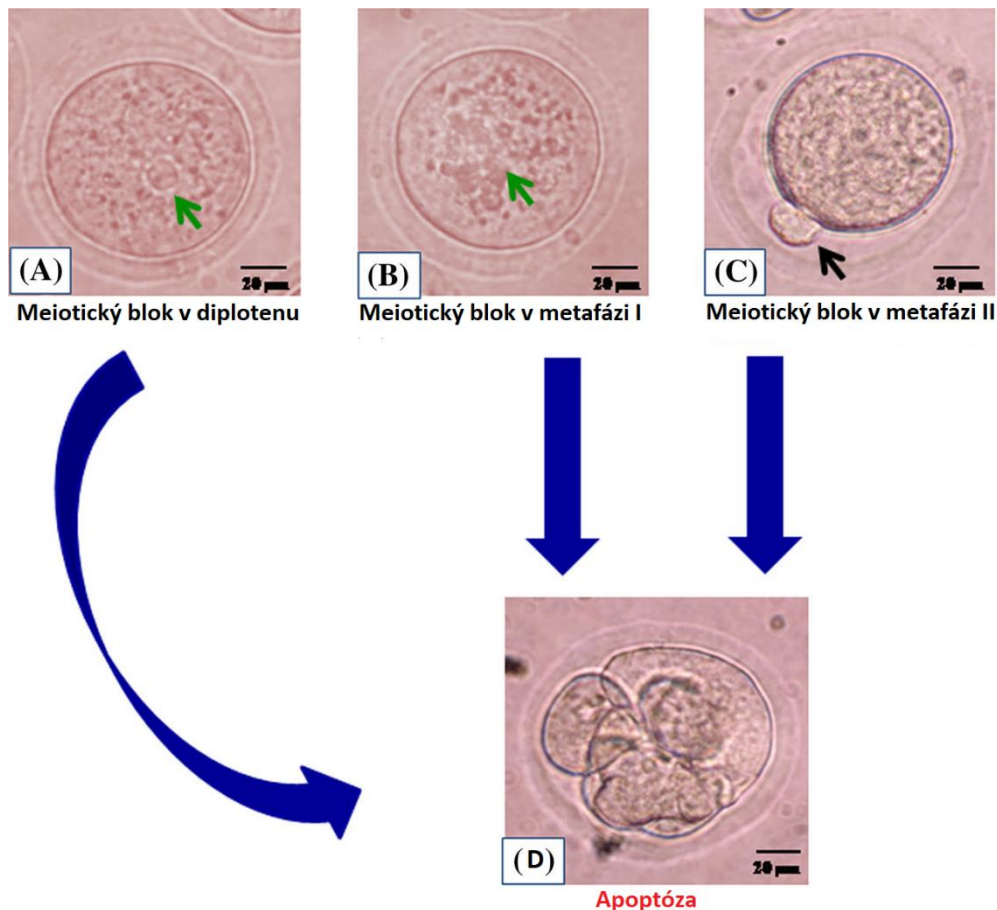
3.5.3. Apoptóza a oocyt

Apoptóza neboli programovaná buněčná smrt, hraje hlavní roli nejen v eliminaci zárodečných buněk ve všech stádiích oogeneze, ale dokonce i po ovulaci. Více než 99 % zárodečných buněk je ve vaječniku eliminováno apoptózou prostřednictvím folikulární atrezie, zatímco méně než 1 % těchto buněk se vyvine do oogonie (Tilly 2001; Donnez & Dolmans 2013). Tyto oogonie vstupují do meiózy za vzniku primárních oocytů (Morita & Tilly 1999). Primární oocyty jsou zadržovány v diplotenním stadiu po dobu několika měsíců až několika let v závislosti na druhu savců. Tyto zadržované oocyty jsou obklopeny několika vrstvami buněk granulózy uvnitř folikulárního mikroprostředí (Tripathi *et al.* 2010).

Pro přežití obou typů buněk je důležitá komunikace mezi oocyty zastavenými v diplotene a obklopujícími granulózními buňkami (Albertini 2011). Apoptóza buněk granulózy nebo jejich předčasné odstranění zbavují oocyty růstových faktorů, živin a faktorů přežití, což může vést k apoptóze oocytů, které jsou udržovány v diplotene a kultivované *in vitro*. Studie naznačují, že apoptóza granulózních buněk uvnitř folikulárního mikroprostředí vede k apoptóze oocytů u potkanů (Chaube *et al.* 2014). Buňky granulózy chrání oocyty před poškozením pomocí oxidačního stresu v *in vitro* podmínkách (Tatemoto *et al.* 2000; Ritter *et al.* 2011). Tvorba reaktivních forem kyslíku (ROS) nebo vyčerpání antioxidantního systému vede k apoptóze oocytů (Chaube *et al.* 2014). Avšak apoptózu granulárních buněk v ovulovaných oocytech můžeme použít jako prediktor kvality oocytů (Li *et al.* 2008).

Během reprodukčního života samic savců včetně člověka je selektivně doplňován počet folikulů obsahující primární oocyty. Folikulární oocyty obnovují meiózu v reakci na nárůst hypofyzárních gonadotropinů i při *in vitro* kultivaci (Chaube 2002; Tiwari *et al.* 2016). I když u těchto oocytů zastavených v diplotene často dochází k spontánnímu obnovení meiózy následnému udržování stádia metafáze-1 (MI), jsou tyto oocyty citlivější na podmínky kultivace *in vitro* a často umírají apoptózou (Chaube *et al.* 2005).

V době ovulace Graafovy folikuly prasknou, čímž se uvolní oocyty, zastavené ve stadiu metafáze-II (M-II). Po ovulaci mají tyto oocyty první polární tělíčko a čekají na oplození (obr. 2c). Studie naznačují, že během raného reprodukčního života jsou ovulovány nejprve kvalitní a zdravé oocyty. Jak dochází ke stárnutí matky, stává se oocyt náchylnější k apoptóze a zvyšuje se pravděpodobnost neplodnosti či vývojových defektů plodu. Apoptóza tedy hraje hlavní roli při eliminaci většiny zárodečných buněk ve všech stádiích oogeneze a reguluje množství oocytů u různých druhů savců včetně člověka (Santonocito *et al.* 2013).



Obr. 2: Fotografie vyobrazují morfologické znaky meiotického bloku (A) v diplotene (zelená šipka ukazuje zárodečné váčky), (B) zástava v M-I (zelená šipka ukazující rozpad zárodečných váčků), (C) zástava v M-II (černá šipka ukazující první pólového tělíčko) a (D) apoptóza savčích oocytů. Existují různé faktory, které mohou vyvolat apoptózu oocytů v různých stádiích buněčného cyklu a snižovat ovariální rezervu. (Tiwari *et al.* 2015)

3.6. Proteiny Bcl – 2 rodiny

Ústřední role rodiny Bcl-2 při regulaci apoptotické buněčné smrti byla poprvé identifikována v 80. letech. Od té doby došlo k významnému pokroku nejen v identifikaci jednotlivých členů této rodiny, ale také k porozumění jejich funkcí, především tomu, jak jejich interakce určují, zda buňka bude žít či zemře (Westphal *et al.* 2014).

Protein Bcl-2 byl poprvé lokalizován v B – buňkách maligního lymfomu (**B** – cell lymphoma), odkud je také odvozen jeho název (Tsujimoto *et al.* 1985). Do dnešní doby bylo identifikováno přibližně 25 různých typů proteinů rodiny Bcl-2 (Ola *et al.* 2011). Zatímco některé z těchto proteinů (například Bad, Bax nebo Bid) jsou proapoptotické, což znamená, že podporují buněčnou smrt, jiné (například Bcl-2 a Bcl-xL) jsou antiapoptotické, tj. podporují přežití buněk. Proapoptotické proteiny jsou obvykle lokalizovány v cytosolu buněk, kdežto antiapoptotické proteiny se nacházejí na jejich povrchu. Relativní množství nebo rovnováha

mezi těmito pro – a antiapoptotickými proteiny ovlivňuje citlivost buněk na signály smrti (Cory & Adams 2002). Jejich nerovnováha může vést k předčasné buněčné smrti hyperaktivací proapoptotických proteinů nebo indukci nádorů hyperaktivací antiapoptotických proteinů (Letai *et al.* 2002; Sinha *et al.* 2013).

Bez vztahu k jejich roli v apoptóze jsou všichni členové rodiny Bcl-2 charakterizováni tím, že obsahují alespoň jednu ze čtyř konzervovaných BH (Bcl-2 homologních) domén, označovaných jako BH1-4 (Cory & Adams 2002). Obecně platí, že antiapoptotičtí členové vykazují zachování sekvence ve všech čtyřech doménách, zatímco proapoptotické molekuly se vyznačují ztrátou konzervace sekvence prvního α -helikálního segmentu, BH4. U některých proapoptotických proteinů byla zachována pouze doména BH3, která se považuje za kritickou doménu smrti (Puthalakath & Strasser 2002). Většina proteinů rodiny Bcl-2 obsahuje na svých karboxylových koncích také oblast vázající membránu (MBR) ve formě C terminálního konce, mitochondriální cílené nebo hydrofobní aminokyselinová sekvence, která usnadňuje vazbu a lokalizaci těchto proteinů na vnější mitochondriální membránu (MOM) nebo na membránu endoplazmatického retikula (ER) (Shamas-Din *et al.* 2013). Rozdělení proteinů rodiny Bcl – 2 do funkčních skupin včetně jejich zástupců je uvedeno v tabulce (Tab. 1).

Rodina	Skupina	Podskupina	Členové	Domény
Bcl – 2	Antiapoptotická	multidoménové	Bcl – 2, Bcl – w, Bcl – xL, Mcl – 1	BH1, BH2, BH3, BH4
	Proapoptotická	multidoménové	Bak, Bax, Bok	BH1, BH2, BH3
		Tzv. BH3 – only	Bad, Bim, Bid, Bmf, Noxa, PUMA, Hrk	BH3

Tab. 1: Rozdělení proteinů rodiny Bcl – 2 do funkčních skupin včetně jejich zástupců dle Chipuk & Green (2011) a Siddiqui *et al.* (2015).

3.6.1. Proapoptotické proteiny

Proapoptotičtí členové jako je Bax, Bak a Bok obvykle sdílejí sekvenční podobnost v BH1, BH2, BH3, ale ne v doméně BH4 (Leibowitz & Yu 2010; Reed 2006). Protein Bax je monomerní protein v cytosolu, který se během apoptózy integruje do mitochondrií a následně oligomerizuje, což vede k uvolnění apoptogenních faktorů, jako je cytochrom c a k aktivaci kaspázové kaskády. Bak je naopak integrální mitochondriální membránový protein, který také během apoptózy prochází konformačními změnami za vzniku větších agregátů (Petros *et al.* 2004). Bax a Bak jsou přítomny i v ER, kde regulují hladinu vápníku, čímž mohou pomoci iniciovat apoptózu (Klee & Pimentel-Muinos 2005). Lokalizace Bcl-2 na membránu ER pomáhá regulovat funkce Bax a Bak nacházejících se na membráně ER. P53 také může aktivovat Bax, kterému chybí jasně identifikovatelná doména BH3 (Chipuk *et al.* 2004).

Proteiny obsahující pouze BH3 doménu zahrnují Bad, Bid, Bik, Bim, Bmf, DP5, Noxa a Puma. Tyto proteiny jsou proapoptotické a jedinou oblastí, kterou sdílejí

navzájem s ostatními Bcl-2 proteiny, je doména BH3 (Willis & Adams 2005). Nadměrná exprese těchto proteinů podporuje apoptotickou smrt, aby však došlo k apoptóze, musí být přítomen protein Bax nebo Bak (Zong *et al.* 2001). To je umisťuje před BAX a BAK v řetězci událostí, které vedou k aktivaci kaspáz. Všechny proteiny obsahující pouze BH3 domény se silně váží alespoň na některé antiapoptotické proteiny. Zatímco některé z těchto proteinů (Bim, Puma a Bid) se vážou na všechny antiapoptotické proteiny, jiné mají repertoár omezenější (Chen *et al.* 2005). BAD například váže Bcl-2, Bcl-xL a Bcl-w, ale ne MCL-1 nebo A1. Noxa naopak váže pouze MCL-1 a A1. Zdá se, že BH3 doména je zcela zodpovědná za tuto interakci a je absolutně nutná pro aktivitu proteinů obsahujících pouze tuto doménu. Dále bylo zjištěno, že Bim, Bid a Puma také interagují s Bax (Cartron *et al.*, 2004; Willis *et al.*, 2007).

3.6.2. Antiapoptotické proteiny

Antiapoptotická podrodina zahrnuje proteiny Bcl-2, Bcl-xL, Bcl-w a MCL-1, které mají všechny čtyři BH domény, označené BH1-4, a hydrofobní C koncovou část. Doména BH4 obvykle chybí v proapoptotických proteinech, a proto je klíčovým faktorem pro antiapoptotickou aktivitu (Warren *et al.* 2019). BH4 doména se skládá z 26 aminokyselin a její struktura vykazuje po interakci s membránami amfipatický charakter podobný antimikrobiálním peptidům. Konformace β -listu domény BH4 ve vodném prostředí je soustředěna do α -šroubovicové struktury vhodné pro příznivou interakci s negativně nabitými membránami (Khemtemourian *et al.* 2006). Ukazuje se, že proteiny jsou převážně umístěny mimo membránu, avšak jejich přesné vložení a tvorba komplexu nejsou dobře známy. Bcl-2 se trvale nachází v membránách, zatímco Bcl-xL a Bcl-w se vážou na membránu až po cytotoxickém signálu (Cory & Adams 2002).

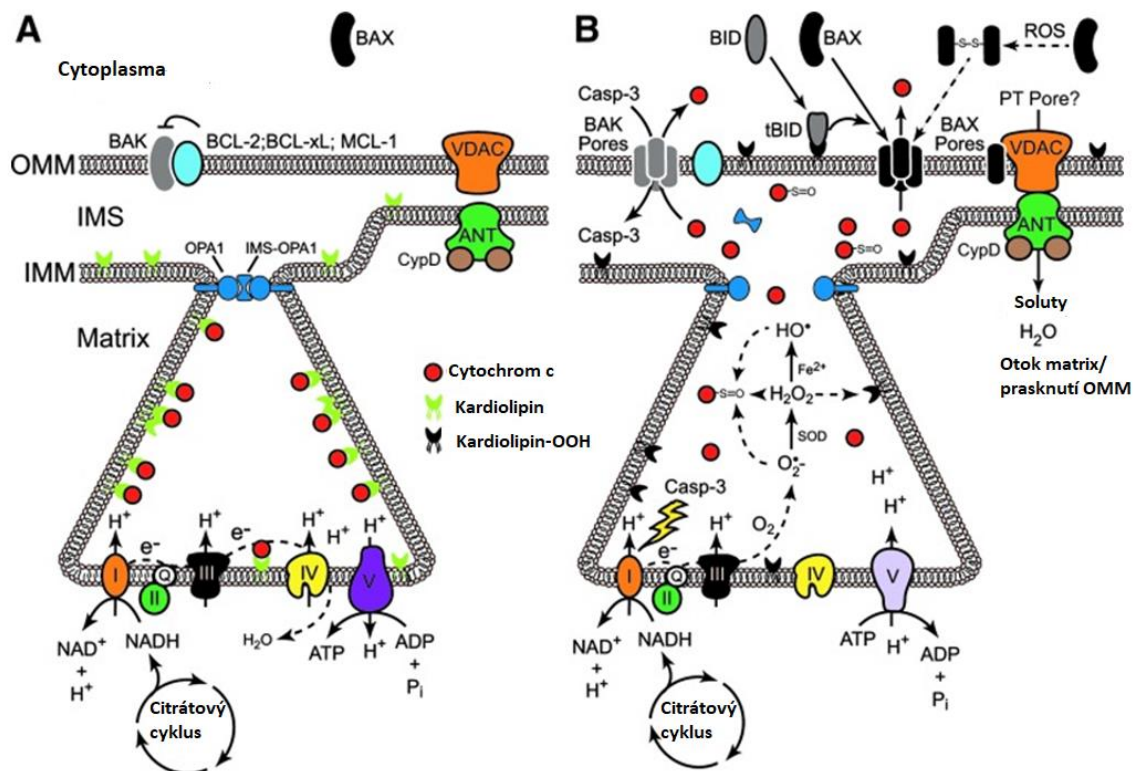
Bcl-2 brání v oligomerizaci proapoptotickým proteinům BAX a BAK, která by jinak vedla k uvolnění několika apoptogenních molekul z mitochondrie. Je také známo, že Bcl-2 se váže na a deaktivuje BAX a další pro-apoptotické proteiny, čímž inhibuje apoptózu (Kale *et al.* 2018). Bcl-2 může také regulovat aktivaci několika iniciátorových kaspáz, jako je kaspáza 2, která působí nezávisle na uvolňování cytochromu c z mitochondrií. Kromě toho Bcl-2 přímo blokuje uvolňování cytochromu c, a proto brání v aktivaci APAF-1 a kaspázy-9 (Reed 1998; Flora *et al.* 2012).

Bcl-2 nebyl lokalizován pouze na vnější mitochondriální membráně, ale také v jaderném obalu a membráně endoplazmatického retikula (ER). V ER reguluje ukládání vápníku, jehož intracelulární hladiny prokázaly vliv na apoptózu. Bcl-2 spojený s ER je schopen chránit před apoptózou vyvolanou různými spouštěči. Bcl-xL také reaguje s proapoptotickými členy, jako jsou Bax a Bak prostřednictvím jejich BH3 domény (Simonen *et al.* 2004; Khemtemourian *et al.* 2006). Je možné, že antiapoptotický účinek Bcl-2 a Bcl-xL se převede na proapoptotický v případě, že jsou tyto proteiny po zahájení apoptózy štěpeny kaspázami (Bellows *et al.* 2000).

3.7. Struktura a funkce mitochondrií při apoptóze

Mitochondrie je organela obklopená dvěma membránami, které se odlišují nejen složením, ale také strukturou a funkcí (Gurp *et al.* 2003; Martin 2012). Vnější mitochondriální membrána (OMM z anglického outer mitochondrial membrane) vykazuje oproti vnitřní mitochondriální membráně (IMM z anglického inner mitochondrial membrane) vyšší propustnost pro molekuly až do 5 000 daltonů. Tato propustnost je zprostředkována napěťově závislým aniontovým kanálem (VDAC z anglického voltage-dependent anion channel), který ve své otevřené konfiguraci představuje nejhojnější protein vnější membrány. Větší proteiny mohou být transportovány do mitochondrií za podmínky, že na svém N-konci obsahují tzv. signální sekvenci. Takové proteiny mohou být aktivně přeneseny prostřednictvím vícepodjednotkového komplexu TOM (translocase of the outer membrane) (Herrmann & Neupert 2000). Vnější mitochondriální membrána je přesto pro proapoptotické proteiny, které se nacházejí v mezimembránovém prostoru mitochondrií, nepropustná. To je pro regulaci apoptózy u savců zcela klíčové. Mechanismy, kterými se tyto iniciátory apoptózy uvolňují z mitochondrií, však zůstávají nejasné. Aby se zachovala integrita této membrány a zabránilo se uvolňování proapoptotických proteinů z mezimembránového prostoru, je nutné udržovat propustnost vnější mitochondriální membrány zejména prostřednictvím napěťově závislých aniontových kanálů (Mohamad *et al.* 2005). Vnější mitochondriální membrána může být spolu s cisternami endoplazmatického retikula spojena do struktury označované MAM (mitochondria-associated ER-membrane). Toto spojení je důležité především z hlediska vápníkové signalizace mezi těmito dvěma organelami (Hayashi *et al.* 2009).

Vnitřní mitochondriální membrána je vysoce nepropustná, proto téměř všechny proteiny mohou být přes tuto membránu transportovány pouze prostřednictvím speciálních membránových přenašečů zvaných TIM (the translocase of the inner membrane) nebo Oxa1 (Herrmann & Neupert 2000). Spletitá vnitřní mitochondriální membrána tvoří funkční krysty, které se setkávají v místě jejich propojení působením komplexů OPA1. V krystách je na kardiopin vázán cytochrom c, který se zapojuje se do elektronového transportního řetězce (ETC) tím, že přenáší elektrony mezi komplexy III a IV. Protonový gradient generovaný z ETC je využit pro produkci ATP prostřednictvím F1F0-ATP syntázy neboli komplexu V (Wu & Bratton 2013).



Obr. 3: Regulace permeability vnější mitochondriální membrány pomocí členů Bcl-2 rodiny a reaktivních forem kyslíku. (A) Mitochondrie před permeabilizací vnější mitochondriální membrány. (B) Mitochondrie během permeabilizace vnější mitochondriální membrány (Wu & Bratton 2013).

Jedním ze způsobů aktivace vnitřní apoptotické dráhy je permeabilizace vnější mitochondriální membrány. Členové BH3-only rodiny (např. TBID), antagonizují členy antiapoptotické rodiny nebo přímo aktivují BAX a BAK, což vede k tvorbě pórů ve vnější mitochondriální membráně, kterými může procházet cytochrom c. Existují určité důkazy, že ROS může také oxidovat BAX, což vede k tvorbě BAX dimerů (připojených pomocí disulfidické vazby), které se následně translokují do vnější mitochondriální membrány. V místě spojení krist, tBID a neoligomerizované BAX a BAK způsobují na OPA1 závislé otevření spojení prostřednictvím mechanismů, které zůstávají nevyřešeny. V kristách narušuje ROS interakci cytochromu c s kardiolipinem přímou oxidací kardiolipinu. Cytochrom c poté volně prochází z kristálního prostoru do mezimembránového prostoru a následně do cytoplazmy přes póry otevřené pomocí BAX a BAK, kde může aktivovat apoptosom Apaf-1 (D'Alessio *et al.* 2005). Ztráta cytochromu c z elektronového transportního řetězce (ETC) spouští produkci O_2 , protože elektrony jsou přenášeny na O_2 , spíše než na komplex IV. Je pozoruhodné, že cytochrom c může být také přímo oxidován, zejména na Met-80, což narušuje jeho interakci s hemovým železem. Absence hemu mění konformační tvar cytochromu c a inhibuje jeho schopnost stimulovat aktivaci apoptosomu. Jakmile jsou kaspázy aktivovány, mohou procházet permeabilizovanou vnější mitochondriální membránou a cílovými podjednotkami v komplexech I a II, což dále narušuje ETC a nutí komplex V, aby běžel opačně v marné snaze

obnovit protonový gradient a membránový potenciál. V některých případech, zejména po vystavení ROS a Ca^{2+} , mohou mitochondrie podléhat přechodné propustnosti, přičemž vnitřní mitochondriální membrána se stane propustná pro vodu a soluty. V tomto případě začne matrix bobtnat, a protože povrch vnitřní mitochondriální membrány výrazně převyšuje povrch vnější mitochondriální membrány (OMM), OMM nakonec praskne a cyt c unikne do cytoplazmy (obr. 3B) (Tait & Green 2010).

3.7.1.1. Účinky reaktivních forem kyslíku na členy rodiny Bcl-2

Peroxid vodíku (H_2O_2) indukuje dimerizaci BAX přímou tvorbou disulfidické vazby Cys-62 a Cys-126, která podporuje jeho translokaci z cytoplazmy (D'Alessio *et al.* 2005). Ve většině případů však oxidační stres mění funkci členů rodiny Bcl-2 regulací kináz, které je fosforylují. Obecně řečeno, reaktivní formy kyslíku jsou schopné aktivovat p38 mitogenem aktivovanou proteinovou kinázu (MAPK), c-Jun N-koncovou kinázu (JNK), extracelulární signálně regulovanou kinázu (ERK) a dráhy Akt, v závislosti na kontextu (Torres 2003; Ahn 2014).

3.7.1.2. Cytochrom c a reaktivní formy kyslíku

Předpokládá se, že oxidanty hrají důležitou roli při uvolňování cytochromu c z mitochondrií a ve schopnosti cytochromu c stimulovat tvorbu apoptosomu. Uvolňování cytochromu c však také narušuje elektronový transportní řetězec (ETC) a stimuluje produkci reaktivních forem kyslíku (Wu & Bratton 2013).

3.7.1.3. Úloha reaktivních forem kyslíku v uvolňování cytochromu c

Kardiolipin je jedinečný fosfolipid nacházející se ve vnitřní mitochondriální membráně (IMM), kde se asociuje s několika enzymy potřebnými pro oxidativní fosforylaci, včetně cytochromu c (Rytomaa & Kinnunen 1995; Dai *et al.* 2014). Vzhledem k tomu, že mitochondrie jsou hlavním intracelulárním zdrojem reaktivních forem kyslíku, zejména v komplexech I a III, je kardiolipin ve stresovaných mitochondriích přímo vystaven relativně vysokým koncentracím reaktivních forem kyslíku. Kardiolipin navíc obsahuje čtyři typicky nenasycené mastné acylové řetězce (ve srovnání s dvěma ve většině fosfolipidů), a je proto citlivější na oxidaci. Cytochrom c vázaný na kardiolipin slouží také jako peroxidáza, která může oxidovat kardiolipin způsobem závislým na H_2O_2 (Kagan *et al.* 2005). Jakmile je kardiolipin oxidován, disociuje se z enzymů ve vnitřní mitochondriální membráně, včetně cytochromu c, a obohacuje vnější mitochondriální membránu (Petrosillo *et al.* 2001; Wu & Bratton 2013). Zdá se, že tBID cílí na vnější mitochondriální membránu, alespoň částečně, kvůli jeho silné vazebné afinitě ke kardiolipinu a poté podporuje BAX oligomerizaci, která nakonec vede k tvorbě pórů a uvolňování cytochromu c. Stručně řečeno, uvolňování cytochromu c je proces závislý na kardiolipinu, ve kterém hraje důležitou roli oxidace kardiolipinu (Korytowski *et al.* 2011).

Zatímco tvorba póru pomocí BAX či BAK ve vnější mitochondriální membráně je nejrozšířenějším modelem pro permeabilizaci vnější mitochondriální membrány, alternativní model zahrnuje aktivaci přechodně propustného póru i závislého na BAX / BAK (PT pór), složený z napětově závislého aniontového kanálu (VDAC), adeninového nukleotidového transportéru (ANT) a cyklofilinu D. Na rozdíl od vnější mitochondriální membrány je vnitřní mitochondriální membrána nabitá a nepropustná pro vodu a rozpuštěné látky, ale v reakci na určité proapoptotické podněty se otevřou PT póry, což má za následek katastrofické bobtnání matrix, prasknutí vnější mitochondriální membrány, a nakonec uvolnění cytochromu c (Garrido *et al.* 2006). Důležité je, že nejnámější induktory permeability zahrnují oxidační stres a influx Ca^{2+} . I když existuje značná neshoda ohledně existence PT póru tak jak je definována a jeho role v uvolňování cytochromu c, jakož i mechanismů, kterými členové proapoptotické a antiapoptotické Bcl-2 rodiny regulují přechod propustnosti (Lemasters *et al.* 2009).

3.7.1.4. Modely permeability vnější mitochondriální membrány

3.7.1.4.1. Model přímé aktivace

Charakteristickým rysem modelu přímé aktivace je vyžádání BH3 proteinu k přímé vazbě a aktivaci multiregionové oblasti Bcl-2 proapoptotických proteinů, Bax a Bak. Model přímé aktivace klasifikuje BH3 proteiny jako aktivátory nebo senzibilizátory na základě jejich afinity k vazbě na multiregionové Bcl-2 proteiny. Aktivátorové BH3 proteiny - tBid, Bim a Puma - se vážou na proapoptotické i antiapoptotické Bcl-2 multiregionové proteiny (Kim *et al.* 2009). Senzibilizační BH3 proteiny - Bad, Noxa, Bik, Bmf, Hrk a Bnip3 - se vážou na antiapoptotické proteiny, čímž uvolňují proteiny BH3 aktivátoru k podpoře permeabilizace vnější mitochondriální membrány (MOMP) (Letai *et al.* 2002; Sinha *et al.* 2013). Antiapoptotické proteiny se vážou jak na aktivátor, tak na senzibilizační BH3 proteiny, ale nejsou schopny tvořit komplex s Bax a Bak. Buňka tedy musí izolovat antiapoptotické BH3 proteiny, aby zabránila aktivaci Bax / Bak a apoptóze (Kim *et al.* 2009).

3.7.1.4.2. Model přemístění

V modelu přemístění se proteiny BH3 neváží přímo na Bax a Bak, aby způsobily jejich aktivaci. Bax a Bak jsou konstitutivně aktivní, a proto musí být inhibovány antiapoptotickými proteiny, aby buňka přežila. K zahájení apoptózy vytlačují BH3 proteiny Bax a Bak z antiapoptotických proteinů, aby podporovaly Bax nebo Bak zprostředkovanou permeabilitu vnější mitochondriální membrány (MOMP). Protože BH3 proteiny selektivně interagují s omezeným spektrem antiapoptotických proteinů, je k indukci apoptózy v buňkách exprimujících více členů antiapoptotické Bcl-2 rodiny nutná kombinace BH3 proteinů (Chen *et al.* 2005). Na podporu tohoto modelu jsou v dělicích se buňkách přítomny heterodimery Bak s Mcl-1 a Bcl-xl, a nadměrná exprese Noxa vytěsňuje heterodimery Bak – Mcl-1, uvolňuje Bak a tvoří komplexy Noxa – Mcl-1. V těchto buňkách je nutná kombinace Bad a Noxa

k neutralizaci účinků jak Bcl-xl, tak Mcl-1, aby byla konečně vyvolána apoptóza (Willis *et al.* 2005).

3.7.1.4.3. Zabudovaný model

Zabudovaný model zahrnuje roli membrány jako „místa působení“ pro většinu proteinů rodiny Bcl-2, protože permeabilita vnější mitochondriální membrány (MOMP) se nevyskytuje, dokud Bax a Bak nedosáhnou své konečné aktivní konformace na membráně. Interakce s membránami vedou k výrazným změnám v konformacích proteinů rodiny Bcl-2, které řídí jejich afinitu k relativním lokálním koncentracím vazebných partnerů (Garcia-Saez *et al.* 2009). Například cytoplazmatické multiregionové proteiny Bax a Bcl-xl procházejí po interakci s vnější mitochondriální membránou (MOM) reverzibilními konformačními změnami, které zvyšují afinitu k vazbě na BH3 protein, což způsobuje další konformační změnu a umožňuje inzerci do membrány (Edlich *et al.* 2011).

V tomto modelu se senzibilizační BH3 proteiny vážou pouze na antiapoptotické proteiny. Důsledky této interakce však zahrnují vlastnosti modelů přemístění i přímé aktivace, protože senzibilizační BH3 proteiny neutralizují dvojí funkci antiapoptotických proteinů vytěsněním jak aktivátorových BH3 proteinů, tak Bax nebo Bak z membránově zformovaných konformátorů antiapoptotických proteinů. Protože jsou to aktivované formy Bax a Bak, které jsou vázány na antiapoptotické proteiny v membráně, senzibilizační proteiny uvolňují konformery Bax a Bak kompetentní k oligomerizaci a permeabilizaci membrán (Lovell *et al.* 2008).

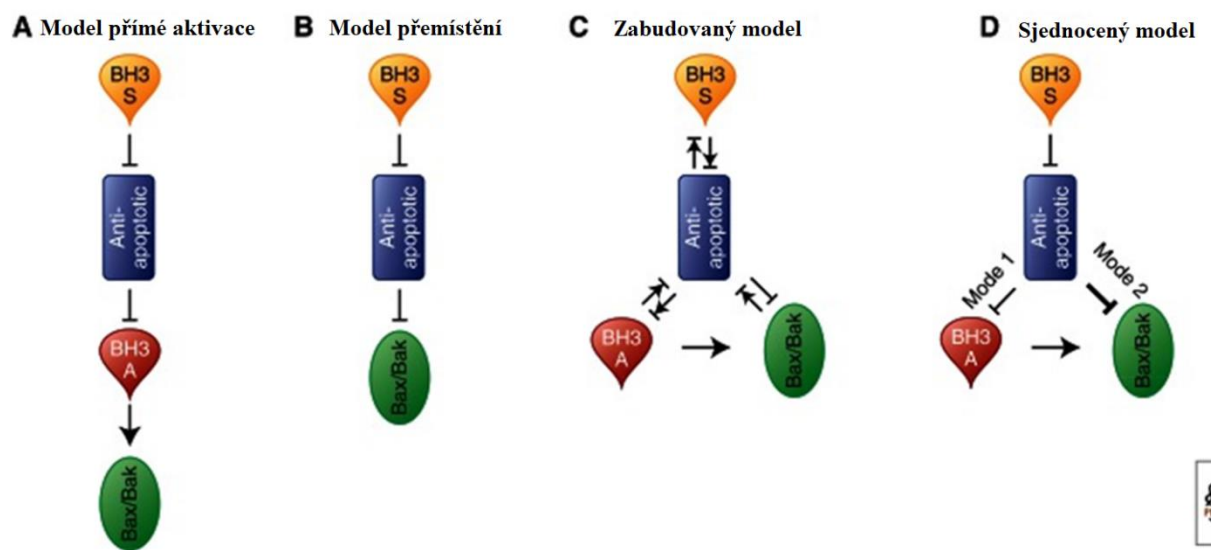
Dalším charakteristickým rysem tohoto modelu je dvojí role přiřazená aktivátorovým BH3 proteinům, které přímo aktivují proapoptotické proteiny a také se vážou na antiapoptotické proteiny. Když aktivátorové BH3 proteiny interagují s Bax a Bak, podporují jejich inzerci do membrány, načež Bax a Bak oligomerizují a permeabilizují buněčné membrány. Podobně interakce aktivátorových BH3 proteinů s antiapoptotickými proteiny podporuje jejich inzerci do membrán. V tomto případě však protein BH3 funguje jako senzibilizátor, protože vázaný antiapoptotický protein není schopen vázat Bax nebo Bak. Oddělení však probíhá oběma způsoby a vazbou na BH3 protein jej antiapoptotický protein inhibuje na membráně. Protože interakce aktivátorových BH3 proteinů s proapoptotickými i antiapoptotickými proteiny rodiny Bcl-2 je reverzibilní, je proto možné, aby jeden protein BH3 interagoval s proapoptotickými i antiapoptotickými proteiny (v závislosti na jejich relativních úrovních exprese), čímž se mění jejich konformace na membránách (Aranovich *et al.* 2012).

3.7.1.4.4. Sjednocený model

Sjednocený model funkce rodiny Bcl-2 navazuje na zabudovaný model. Tento model rozlišuje známé interakce antiapoptotických Bcl-2 proteinů k oddělení aktivátorových BH3 proteinů jako 1. mód a oddělení aktivních forem Bax a Bak jako 2. mód. Ačkoli v buňkách probíhají oba způsoby inhibice současně, v unifikovaném modelu je inhibice apoptózy prostřednictvím 1. módu méně účinná a je snáze překonatelná BH3 senzibilizátory, aby

podporovala permeabilitu vnější mitochondriální membrány (MOMP), než inhibice prostřednictvím 2. módu. Důležité je, že sjednocený model také zahrnuje funkce Bax a Bak v mitochondriálním štěpení a fúzi a předpokládá, že tento proces ovlivňuje pouze represe 2. módu (Llambi *et al.* 2011).

Duální funkce přiřazená antiapoptotickým proteinům je tedy sdílena jak zabudovanými, tak sjednocenými modely. V prvním případě je však souhra mezi členy rodiny Bcl-2 určována konkurenčními rovnovahami, proto hojnost proteinů a specifické podmínky buněčné fyziologie včetně posttranslačních modifikací určí převládající interakce. Výsledkem je, že zabudovaný model se liší od sjednoceného modelu v tom, že předpovídá, že buď mód 1 nebo mód 2 mohou být dominantní v závislosti na okolnostech, jako je konkrétní forma stresu a typ buňky (Shamas-Din *et al.* 2013).



Obr. 4: Schémata hlavních mechanismů pro regulaci permeability vnější mitochondriální membrány (MOMP) proteiny Bcl-2. (↑) Aktivace; (↓) inhibice; (⊥ ↑) vzájemný oddělení. Spárované symboly vpřed a vzad označují, že model výslovně odkazuje na rovnováhu. (A) Model přímé aktivace, (B) Model přemístění, (C) Zabudovaný model, (D) Sjednocený model (Shamas-Din *et al.* 2013).

3.7.1.5. Multidoména a její proapoptotičtí členové

Bax (Bcl-2-asociovaný X protein) byl identifikován koimunoprecipitací s Bcl-2. Na rozdíl od Bcl-2 nadměrná exprese Bax podporovala buněčnou smrt a protichůdné funkce určili rheostat model, kdy relativní koncentrace proapoptotických a antiapoptotických členů rodiny Bcl-2 určují buněčný osud. Objev Bcl-xl naznačil, že antiapoptotickou funkci může zprostředkovat více členů než jen Bcl-2, krátce nato byl Bak (antagonista / zabiják Bcl-2) klonován a rozpoznán jako druhý proapoptotický protein fungující podobně jako Bax, přestože je více homologní s Bcl-2 než Bax (Martinou & Youle 2011). Buňky, ve kterých byl vyřazen gen kódující buď Bax nebo Bak, byly stále náchylné k apoptóze. Buňky Bax - / - / Bak - / -

s dvojitým knockoutem však byly rezistentní vůči téměř všem podnětům smrti. Demonstrace, že jsou společně nezbytné pro téměř všechny typy smrti apoptotických buněk (kromě cest receptorů smrti, kde jsou efektorové kaspázy přímo aktivovány iniciátorovými kaspázami), poskytuje mechanismus pro integraci proapoptotických a antiapoptotických signálů prostřednictvím společného mechanismu Bax a Bak zprostředkovanou membránovou permeabilizací. (Wei *et al.* 2001; Czabotar *et al.* 2013).

Bax i Bak zprostředkovávají funkci smrti v MOM, kde oligomerizují a permeabilizují vnější mitochondriální membránu (MOM), což vede k uvolnění proteinů mezimembránového prostoru (IMS), jako je cytochrom c, HTRA2, DIABLO a endonukleáza G (Kuwana & Newmeyer 2003; Siddiqui *et al.* 2015).

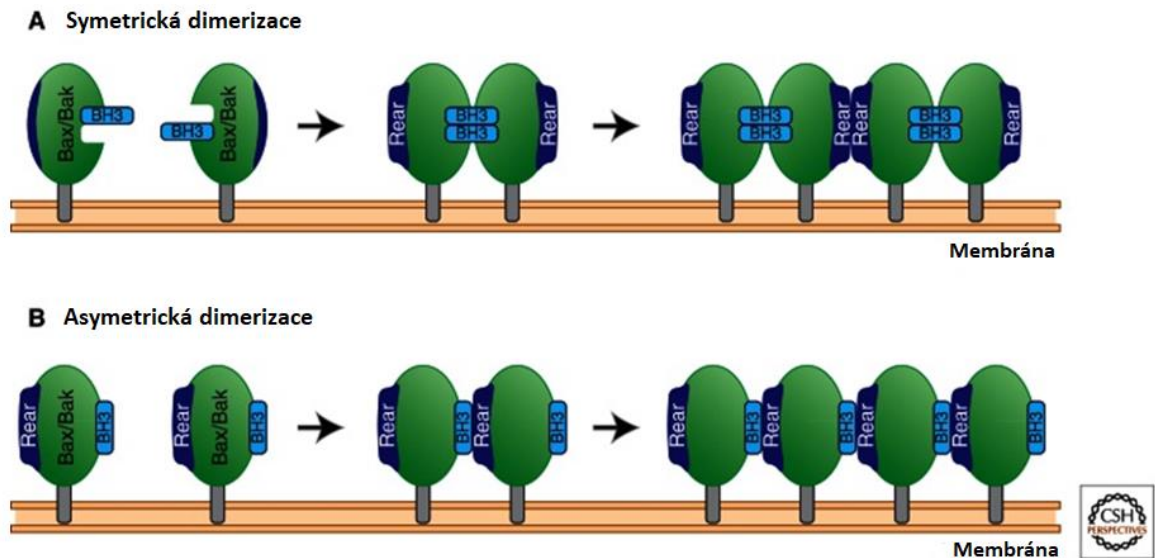
Zatímco Bax má vysokou afinitu k antiapoptotickým proteinům, Bcl-2 a Bcl-xl, Bak má vysokou afinitu k antiapoptotickým proteinům, Mcl-1 a Bcl-xl. Další rozdíl spočívá v tom, že Bak je konstitutivně vázán na vnější mitochondriální membránu (MOM), zatímco Bax je primárně cytosolický, ale po apoptotických podnětech migruje na vnější mitochondriální membránu (Llambi *et al.* 2011). Rozdíl v lokalizaci Bax a Bak v nestresovaných buňkách je výsledkem polohy šroubovice 9. Studie ukazují, že v počátečním kroku aktivace je spirála 9 Baxu navázána na hydrofobní kapsu v „cis“, což brání helixu 9 v zavedení do vnější mitochondriální membrány (Suzuki *et al.* 2000; Czabotar *et al.* 2013). Narušení interakce šroubovice 9 s hydrofobní kapsou způsobuje konstitutivní cílení Bax na mitochondrie (Brock *et al.* 2010). Naopak, uvázání šroubovice 9 na hydrofobní jádro Baxu ruší cílení Bax na vnější mitochondriální membránu (MOM) a permeabilizaci membrány (Gavathiotis *et al.* 2010).

3.7.1.6. Mechanismus aktivace Bax / Bak a tvorba pórů

Byla zjištěna konformační změna v amino-koncové oblasti u Bax i Bak, která koreluje s aktivací. Když Bax přechodně interaguje s membránami, vystavuje amino-terminální epitop, který lze detekovat pomocí monoklonální protilátky 6A7 (Dewson *et al.* 2009). Po interakci s BH3 proteiny, které způsobují membránovou inzerci Bax, je změna epitopu detekovaná 6A7 „uzamčena“, to znamená, že již není reverzibilní. Expozice epitopu 6A7 byla přičítána konformační změně v α helixu 1 u Bax. Sekvence událostí je pravděpodobně odlišná pro amino-koncovou konformační změnu v Bak, protože protein je konstitutivně vázán na membránu (Peyerl *et al.* 2007).

Po aktivaci je další krok vedoucí k oligomerizaci a tvorbě pórů stále předmětem debaty. Nedávno byla identifikována druhá hydrofobní kapsa Bax prostřednictvím vazby s BH3 peptidem Bim (Gavathiotis *et al.* 2010). Tato nová vazebná plocha zvaná „zadní kapsa“ je složena ze spirál 1 a 6 a je umístěna na opačné straně od kanonické „přední“ BH3 vazebné kapsy Bax (složena ze spirál 2–4). V cytoplazmatické formě Baxu je zadní kapsa maskována nestrukturovanou smyčkou mezi šroubovicemi 1 a 2, stejně jako přední kapsa maskovaná šroubovicí 9. Pokud je smyčka šroubovice 1–2 přivázána k zadní kapse, nemůže Bax vystavit epitop 6A7 ani uvolnit šroubovici 9 z přední kapsy, což Bax deaktivuje. To naznačuje, že Bax

musí podstoupit několik konformačních změn, aby se mohl vázat na membrány a oligomerizovat za vzniku pórů. Bax a Bak také obsahují další dvě domněle transmembránové oblasti umístěné ve šroubovicích 5 a 6. Po aktivaci Bax vloží šroubovice 5, 6 a 9 do vnější mitochondriální membrány (Annis *et al.* 2005). Naproti tomu šroubovice 9 Baku je konstitutivně transmembránová a Bak po aktivaci vloží (alespoň) $\alpha 6$ do vnější mitochondriální membrány. Navíc Bak po aktivaci BH3 proteiny bez své karboxyterminální transmembránové domény je stále schopen vložit se do membrán a oligomerizovat, což způsobuje tvorbu pórů. Jedna nebo více domén Bak kromě helixu 9 tedy musí být ukotvena v membránách (Oh *et al.* 2010).



Obr. 5: Modely tvorby dimerů Bax a Bak. (A) Symetrická dimerizace: Aktivní monomery Bax a Bak se šroubovicemi zabudovanými do MOM vystavují své BH3 oblasti, které se zase vážou na „přední kapsu“ složenou z hydrofobní drážky BH1-3 sousedního monomeru. Tato vazba mění konformaci „zadní kapsy“ složené ze šroubovic 1 a 6, což umožňuje homodimerům vytvářet tetramery a dále šířit oligomerizaci. (B) Asymetrická dimerizace: Aktivní Bax a Bak vystavují své oblasti BH3, které interagují se zadní kapsou na sousedním monomeru a tvoří oligomer prostřednictvím následných interakcí zadní kapsy: oblasti BH3 (Shamas-Din *et al.* 2013).

Ať už se váže na „přední“ nebo „zadní“ kapsu, oblast BH3 umístěná v α šroubovici 2 jak Bax, tak Bak je nezbytná pro homodimerizaci (Dewson *et al.* 2008). Objevily se dva modely jak proapoptotické proteiny tvořící póry, tak šířící dimery na větší oligomery. Asymetrické a symetrické modely dimerů navrhují, aby monomery Bax a Bak interagovaly prostřednictvím svých oblastí BH3 a šroubovice 6, liší se však v tom, které kapsy proteinů používají k oligomerizaci (obr. 5). Model asymetrického dimeru byl navržen po identifikaci zadní kapsy (Gavathiotis *et al.* 2010). V tomto modelu aktivací BH3 proteiny iniciují aktivaci Bax vazbou na zadní kapsu, což způsobuje alosterické konformační změny, které přemísťují šroubovici 9, což umožňuje Bax cílit na vnější mitochondriální membránu. Sekvenční oligomerizace probíhá v BH3 oblasti aktivované vazby Bax na zadní kapsu jiného monomeru Bax, čímž je její oblast BH3 vystavena dalšímu šíření oligomerizace (Kim *et al.* 2009).

3.7.2. Endoplazmatické retikulum a rodina Bcl-2

Důkazy o zásadní roli endoplazmatické retikulum (ER) v mnoha apoptotických drahách a zapojení členů rodiny Bcl-2 do zprostředkování těchto drah jsou stále více zjevné (Oakes *et al.* 2006). Například Bcl-2 a Bcl-xl s narušeným ER mohou inhibovat apoptózu iniciovanou různými podněty (Germain *et al.* 2005; Bhatt *et al.* 2008) jako je BAX, BAK (Chami *et al.* 2004). Stejně tak řada proteinů obsahujících pouze BH3 doménu může prostřednictvím své aktivity podporovat apoptózu ER (Puthalakath *et al.* 2007; Upton *et al.* 2008). Proteiny rodiny Bcl-2 na ER regulují apoptózu jak přímou modulací signálních drah vedoucích k aktivaci kaspáz, tak modulací signalizace Ca²⁺ ER (Oakes *et al.* 2006; Rong & Distelhorst 2008). Naopak, samotné proteiny rodiny Bcl-2 mohou být modulovány signály vycházejícími z ER, a proto mají zásadní roli v apoptotických drahách iniciovaných stresem ER (Oakes *et al.* 2006).

Regulace uvolňování vápníku z ER je relevantním modulačním krokem při určování buněčného osudu v reakci na nesčetné množství fyziologických a cytotoxických podnětů. Vápník se uvolňuje z ER primárně přes kanály membránově spojené s inositol 1,4,5-trisfosfátem (IP3), nazývané také receptory IP3 (IP3R). Zajímavé je, že IP3R jsou distribuovány ve specializovaných subdoménách ER - membránách asociovaných s mitochondriemi (MAM) lokalizovaných v těsné blízkosti mitochondrií (Phillips & Voeltz 2016). MAM usnadňují rychlý a lokalizovaný přenos vápníku a vytvářejí meziorgánovou vazbu s důležitými důsledky pro cytosolické pufování vápníku, metabolismus mitochondrií a buněčnou smrt (Phillips & Voeltz 2016; Rizzuto *et al.* 2012).

Buněčný výsledek zvýšení koncentrace cytosolického vápníku a jeho následné vychytávání mitochondriemi závisí na intenzitě a trvání samotného vápníkového signálu a na přítomnosti nebo nepřítomnosti příslušných regulačních proteinů. Například vysokofrekvenční cytosolické oscilace vápníku jsou účinně přenášeny do mitochondrií, což vede k aktivaci několika mitochondriálních enzymů závislých na vápníku, samotné F-ATP syntázy a nosičů metabolitů, a to má za následek zvýšení mitochondriální respirace a produkci ATP (Rizzuto *et al.* 2012). Na druhou stranu, trvalé uvolňování vápníku z ER může přetížít mitochondriální matrix a spustit mechanismus mitochondriální permeabilizace a uvolňování cytochromu c nezávisle na BAX a BAK pomocí přechodného póru propustnosti mitochondrií (MPTP) (Bernardi *et al.* 2015). MPTP je spojen s expanzí mitochondriální matrix, vyvoláním dostatečného otoku k prasknutí vnitřní a vnější mitochondriální membrány, což způsobuje uvolňování apoptotických mediátorů, včetně cytochromu c, a náhlé snížení hladiny ATP (Baines *et al.* 2005).

Studie podporují roli rodiny Bcl-2 při kontrole obsahu vápníku ER i při jeho uvolňování (Monaco *et al.* 2012; Rong & Distelhorst 2008). Obecně platí, že proapoptotičtí členové rodiny Bcl-2 podporují trvalé uvolňování vápníku a následné uvolňování cytochromu c, zatímco antiapoptotické proteiny Bcl-2 vykazují dvojí funkci, inhibují proapoptotické uvolňování vápníku a podporují antiapoptotickou oscilační signalizaci vápníku (Rong & Distelhorst 2008). Důkazy naznačují, že molekulární mechanismus, který je základem kontroly homeostázy vápníku ER proteiny Bcl-2, je částečně zprostředkován IP3R. Nejprve Bcl-2 interaguje

s centrální modulační a vazebnou doménou IP3R prostřednictvím domény BH4. Funkčním důsledkem této interakce je inhibice uvolňování vápníku zprostředkovaného IP3 a apoptózy indukované IP3R (Rong *et al.* 2009). Za druhé, Bcl-2, Bcl-xl a MCL-1 přímo interagují s C-terminální doménou všech tří izoform IP3R (Li *et al.* 2007; Eckenrode *et al.* 2010). Na rozdíl od inhibice IP3R zprostředkované Bcl-2 tyto interakce senzibilizují IP3R na nízké hladiny IP3, což vyvolává vysokofrekvenční oscilační vzorec uvolňování vápníku, který koreluje se zvýšenou mitochondriální bioenergetikou a odolností proti buněčné smrti (White *et al.* 2005; Eckenrode *et al.* 2010).

3.6. Metody detekce apoptózy

Existuje mnoho způsobů, jak mohou buňky zemřít. Proto bylo vyvinuto několik metod detekce buněčné smrti. Klasifikace buněčné smrti představovala určité obtíže, které byly překonány zavedením přísných výběrových kritérií, která by se měla vztahovat i na detekční metody. Výběr testů je založen na morfologických kritériích a rozlišitelných znacích apoptotických cest. Detekce apoptózy zahrnuje metody související s membránovými změnami, fragmentací DNA, cytotoxicitou a buněčnou proliferací, mitochondriálním poškozením, imunologickou detekcí a testy založenými na jejich mechanismu.

3.6.1. Světelná mikroskopie

Světelná mikroskopie pomohla při identifikaci různých morfologických změn, ke kterým dochází během apoptózy. Během časného procesu apoptózy je vidět smrštění buněk a pyknóza rutinním mikroskopem s barevným světlem (Elmore 2007). Při barvení hematoxylinem a eosinem se apoptotická buňka jeví jako kulatá nebo oválná hmota s tmavou eozinofilní cytoplazmou a hustými fialovými fragmenty nukleárního chromatinu (Johnson *et al.* 2000; Alabsi *et al.* 2016). Se smršťováním buněk jsou buňky menší, cytoplazma je hustá a orgány jsou těsněji zabalené. Pyknóza je výsledkem kondenzace chromatinu, což je nejcharakterističtější rys apoptózy. Zmenšené buněčné fragmenty, jako apoptotická tělíska, jsou fagocytována sousedními buňkami, degradována nebo vytlačována z lumenu. V podstatě neexistuje zánětlivá reakce spojená ani s procesem apoptózy, ani s odstraněním apoptotických buněk, protože: (a) apoptotické buňky neuvolňují své buněčné složky do okolní intersticiální tkáně; (b) jsou rychle fagocytovány okolními buňkami, což pravděpodobně brání sekundární nekróze; a (c) pohlcující buňky neprodukují protizánětlivé cytokiny (Kurosaka *et al.* 2003; Fresco *et al.* 2010).

3.6.2. Elektronová mikroskopie

Elektronová mikroskopie definuje subcelulární změny lépe. Ukazuje nejvíce patrné změny jako je fáze kondenzace chromatinu a elektronově hustý jaderný materiál agregovaný periferně pod jadernou membránou (Louagie *et al.* 1998). Dochází k rozsáhlému

bobtnání plazmatické membrány, následuje Karyorhýza a separace buněčných fragmentů do apoptotických tělísek. Apoptotická tělíška se skládají z cytoplazmy s těsně zabalenými organelami s jaderným fragmentem nebo bez něj. Integrita organel je stále udržována, a to vše je uzavřeno v intaktní plazmatické membráně. Apoptózu lze studovat buď pod skenovacím elektronovým mikroskopem SEM nebo transmisním elektronovým mikroskopem TEM (Yasuhara *et al.* 2003).

3.6.3. Gelová elektroforéza

Fragmentace DNA během apoptózy probíhá ve dvou fázích. Dochází k postupné degradaci DNA, zpočátku na fragmenty DNA s vysokou molekulovou hmotností (HMW) o velikosti přibližně 300 kb, které jsou detekovány gelovou elektroforézou. Charakteristickým znakem apoptotických fragmentů DNA je, že se vytvářejí jednořetězcové i dvouřetězcové zlomy (Higuchi 2004; Saadat *et al.* 2015).

DNA se z apoptotické buňky extrahuje a vysráží se polyethylenglykolem (PEG), agarózou nebo polyakrylamidem. Fragmentovaná DNA zůstává v supernatantu a lze ji snadno podrobit gelové elektroforéze nebo kvantifikaci pomocí fluorescenčních barviv (Stellwagen 2009). Fragmentace DNA do oligonukleosomálních žebříčků je charakteristicky pozorována u časných událostí apoptózy v rozmezí 20–300 kb. Nedávné důkazy však naznačují, že všechny apoptotické buňky nemusí vykazovat rozsáhlou fragmentaci DNA. Jelikož i několik zlomů dvouřetězcové DNA způsobí, že buňka nebude schopna úspěšně podstoupit mitózu, lze takovou fragmentaci DNA považovat za biochemickou definici smrti (Archana *et al.* 2013).

3.6.4. Detekce apoptózy testem TUNEL

Terminal deoxynucleotidyl transferase (TdT) dUTP Nick End Labeling neboli TUNEL je test který byl navržen k detekci apoptotických buněk, které procházejí rozsáhlou degradací DNA během pozdních stádií apoptózy. Metoda je založena na schopnosti TdT značit tupé konce dvouvláknových zlomů DNA nezávisle na templátu (Kyrylkova *et al.* 2012).

Biochemickým znakem apoptózy je degradace DNA endonukleázami, které produkují fragmenty dvouřetězcových oligonukleosomálních DNA. Tyto fragmenty DNA lze rozdělit do žebříčkového vzoru na elektroforéze na agarosovém gelu (Saraste 1999). Tato metoda však nemůže poskytnout informace týkající se histologické lokalizace fragmentace DNA na úrovni jedné buňky nebo ve smíšených populacích buněk (Kyrylkova *et al.* 2012).

TUNEL je test na lokalizaci fragmentace apoptotické DNA *in situ*. Metoda se opírá o identifikaci tupých konců dvouvláknových zlomů DNA pomocí TdT nezávislou na templátu. Enzym katalyzuje přidání značených dUTP na 3'-hydroxylové konce DNA, které lze vizualizovat pomocí imunohistochemických technik (Rode *et al.* 2004).

Kinetika barvení testu TUNEL závisí na koncentraci činidla, fixaci tkáně, rozsahu proteolýzy a dostupnosti zlomů řetězců DNA, které se u různých typů tkání liší (Saraste 1999). Proto je důležité standardizovat techniku pomocí tkáňových řezů s ošetřením DNAsy jako pozitivní kontroly a bez ošetření TdT jako negativní kontroly apoptózy, aby se zabránilo falešně pozitivním nebo negativním výsledkům (Kyrylkova *et al.* 2012).

Je třeba mít na paměti, že poškození DNA není jen vlastností apoptózy, ale může nastat i při nekróze. Přesnost testu TUNEL jako metody detekce apoptózy byla proto v několika studiích zpochybňována (Orita *et al.* 1999). Mělo by tedy být standardní použít spolu s testem TUNEL další nezávislou metodu k potvrzení a charakterizaci apoptózy. Mezi tyto metody patří imunohistochemické barvení pro apoptózou indukovanou proteázovou kaspázu 3, Western bloty PARP štěpené kaspázami, detekce fosfatidylserinu na buněčném povrchu anexinem V atd. (Rode *et al.* 2004; Loo 2011).

3.6.5. Commet test

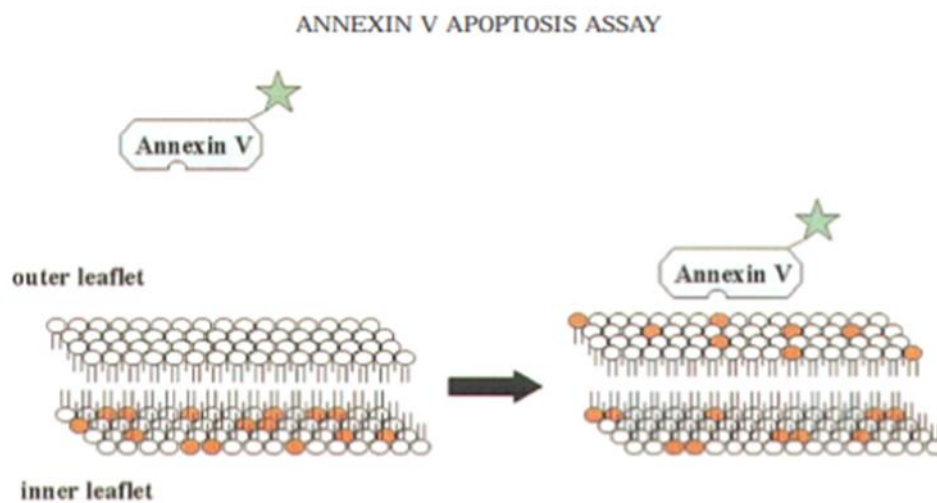
Kometový test je jednobuněčný gelový elektroforetický test, který se v současné době používá jako kvalitativní a kvantitativní test genotoxicity. Některé výsledky tohoto testu a současné znalosti o apoptóze nás však vedou k podezření na přítomnost některých falešně pozitivních výsledků (Choucroun *et al.* 2001; Araldi *et al.* 2015).

Tento test se často používá k hodnocení genotoxicity testovaných látek (Fairbairn *et al.* 1995). Snímky získané pro každé buněčné jádro obsahují „hlavu“ a „ocas“, přičemž celek tvoří obraz podobný kometě. Interpretace výsledků je založena na hypotéze, že poškození jaderné DNA způsobené genotoxickým činidlem produkuje nízkomolekulární řetězce DNA (Tice & Strauss 1995). Tyto rozbité řetězce DNA se uvolňují v průběhu lýzy a po elektroforéze produkují ocas komety, zatímco nepoškozená DNA s vysokou molekulovou hmotností nemigruje a tvoří hlavu komety. Čím více DNA je genotoxickým činidlem poškozeno a rozděleno na kousky s nízkou molekulární hmotností, tím větší je ocas komety a tím větší jsou parametry komety (Florent *et al.* 1999). Komety s malou nukleoidní hlavou a velkým, širokým ocasem pocházejí ze silně poškozených buněk a představují buňky zapojené do apoptózy (Lorenzo *et al.* 2013).

4.6.6. Annexin V test

Ztráta asymetrie plazmatické membrány je časná událost u apoptózy, nezávislá na typu buňky, která vede k expozici zbytků fosfatidylserinu (PS) na vnějším listu plazmatické membrány. Ukázalo se, že Annexin V silně a specificky interaguje s PS a lze jej použít k detekci apoptózy zaměřením na ztrátu asymetrie plazmatické membrány. Značený annexin V lze použít jak v průtokové cytometrii, tak ve světelné mikroskopii v životně důležitém i fixovaném materiálu pomocí vhodných protokolů. Expozice PS na listu vnější membrány buněk je usnadněno zjištěním, že se annexin V specificky váže na PS v přítomnosti vápníku (Blankenberg 2008).

Na základě jevu, který je PS vystaven během apoptózy, a na schopnosti anexinu V vázat se na PS s vysokou afinitou, se využívá zevně aplikovaný haptenem (tj. FITC nebo biotin) značený anexin V k detekci apoptózy. Haptenem značený anexin V se váže v přítomnosti millimolárního Ca (2+) na zbytky PS, které jsou vystaveny na vnějším listu plazmatické membrány apoptotických buněk (Obr. 6), (Engeland *et al.* 1998). Annexin V není schopen vázat se na normální životně důležité buňky, protože molekula není schopna proniknout přes fosfolipidovou dvojvrstvu. V mrtvých buňkách je však vnitřní list membrány k dispozici pro vazbu zevně aplikovaného anexinu V, protože je ztracena integrita plazmatické membrány. K rozlišení mezi mrtvými a apoptotickými buňkami lze k buněčné suspenzi současně přidat barvivo nepropustné pro membránu, jako je propidium jodid (PI). Tímto způsobem lze rozlišit vitální, apoptotické a mrtvé buňky na základě dvojitého značení pro anexin V a PI a analyzovat je průtokovou cytometrií nebo fluorescenční mikroskopií (Blankenberg 2008).



Obr. 6: Schematické znázornění ztráty asymetrie membránových lipidů během apoptózy. Vitální buňky si zachovávají přísně asymetrické složení lipidové dvojvrstvy, přičemž zbytky PS (červené kruhy) směřují k cytosolu. Během apoptózy se tyto molekuly PS exponují na listu vnější membrány. Haptenem značený anexin V se může vázat s vysokou afinitou na exponovaný PS v přítomnosti milimolární koncentrace Ca (2+), (Engeland *et al.* 1998).

4. Materiál a metodika

4.1. Materiál

Oocyty byly získávány z vaječníků prasnic poražených na jatkách. Prasnice měly porážkovou hmotnost 120 kg, a nebyla u nich známá fáze pohlavního cyklu. Vaječníky byly transportovány do laboratoře v termoskách. Pokud není uvedeno jinak, byly pro veškeré pokusy použity chemikálie SIGMA-ALDRICH z USA.

4.2. Metodika

4.2.1. Aspirace oocytů

Z folikulů o velikosti 0,2-5 mm byly oocyty aspirovány za použití jehly 20 G (Sterican, Německo). Výběr oocytů vhodných k další kultivaci probíhal v Petriho misce pod stereomikroskopem (Nikon SMZ 645, Japonsko). Pomocí denudační skleněné pipety byly vybrány oocyty vhodné ke kultivaci na základě neporušenosti cytoplazmy, velikosti oocytu a ucelenosti kumulárních buněk. Tyto oocyty byly přeneseny do několika kapek kultivačního média M199 (Gibco-BRL, Life Technologies, Scotland) obohaceného o sodium bicarbonate (32.5 mM), calcium L-lactate (2.75mM), gentamicin (0.025 mg/ml), HEPES (6.3 mM) a 10 % fetální bovinní sérum (Gibco-BRL).

4.2.2. Kultivace oocytů

Oocyty byly kultivovány v modifikovaném médiu M199, viz. výše. Kultivace probíhala v 1ml kultivačního média s přidavkem hormonů LH a FSH (PG.600, MERCK, Německo) při 39 °C a 5% CO₂ v kultivačních destičkách (VWR International) po dobu 48 hodin do stádia druhé meiotické metafáze. Ke všem pokusům byla provedena kontrola zrání. Oocyty byly použity k další kultivaci pouze tehdy, pokud bylo procento oocytů dozrálých do stádia druhé meiotické metafáze vyšší jak 85 %.

Po skončení meiotického zrání byly oocyty zbaveny vrstvy kumulárních buněk opakovaným nasáváním do dedudační skleněné pipety. Následně byly oocyty přeneseny do kultivačního média bez přidavku hormonů a dále kultivovány po dobu 24,48 a 72 hodin. V každé pokusné skupině bylo minimálně 8 oocytů a experimenty byly 3x opakovány.

4.2.3. Fixace oocytů

Z oocytů byla odstraněna *zona pellucida* prostřednictvím 0,5% pronázy. Oocyty jí byly vystaveny zhruba po dobu jedné minuty, dokud nedošlo k nabobtnání *zona pellucida*. Ta byla

následně mechanicky odstraněna pomocí opětovného nasávání přes denudační skleněnou pipetu.

Oocyty bez ZP byly 4x opláchnuty ve 100 µl fosfátového pufru (PBS) s 0,1% bovinním sérovým albuminem (BSA). Poté byly oocyty fixovány po dobu 40 min ve 2,5% paraformaldehydu v PBS při laboratorní teplotě. Fixované oocyty byly uchovávány při 4 °C pro imunocytochemické stanovení.

4.2.4. Imunolokalizace

Fixované oocyty byly přeneseny do 0,5% roztoku Tritonu X-100 v PBS, kde byly inkubovány po dobu 2 hodin a následně byly propláchnuty v 0,1% roztoku Tweenu 20 v PBS. Po promytí byly oocyty inkubovány v králičí polyklonální protilátce anti-Bcl-xl (Thermo Fisher scientific, USA) nebo v anti-BAX (Proteintech, Velká Británie). Protilátky byly ředěny v 0,1% roztoku Tweenu 20 v PBS v poměru 1:200. Inkubace s primárními protilátkami probíhala přes noc při +4 °C. Po inkubaci byly oocyty 3x promyty v 0,1% roztoku Tweenu 20 ředěném v PBS (1 : 100).

Dále byly oocyty inkubovány se sekundární protilátkou anti-rabbit IgG konjugovanou s fluorescein isothiocyánátem (FITC; ABCAM, Velká Británie) a ředěnou v 0,1% roztoku Tweenu 20 v PBS v poměru 1 : 100. Po 40 minutách inkubace při pokojové teplotě byly oocyty dvakrát propláchnuty v 0,1% roztoku Tweenu 20 v PBS a přeneseny na podložní sklíčko s pár kapkami Vectashieldu s DAPI (Vector Laboratories, USA) pro obarvení chromatinu. Preparáty byly skladovány při 4 °C až do hodnocení. Kontrolní skupina oocytů byla inkubována pouze se sekundární protilátkou.

4.2.5. Snímání a hodnocení oocytů

Oocyty byly snímány konfokálním mikroskopem (Leica SPE, Německo) při zvětšení 400x. Získané obrázky byly hodnoceny analýzou obrazu Nis-Elements (Nikon). Vyhodnocena byla průměrná intenzita signálu, která byla u všech skupin stanovena jako relativní, vztažená k průměrné intenzitě signálu oocytů ve stádium MII.

4.3. Statistická analýza

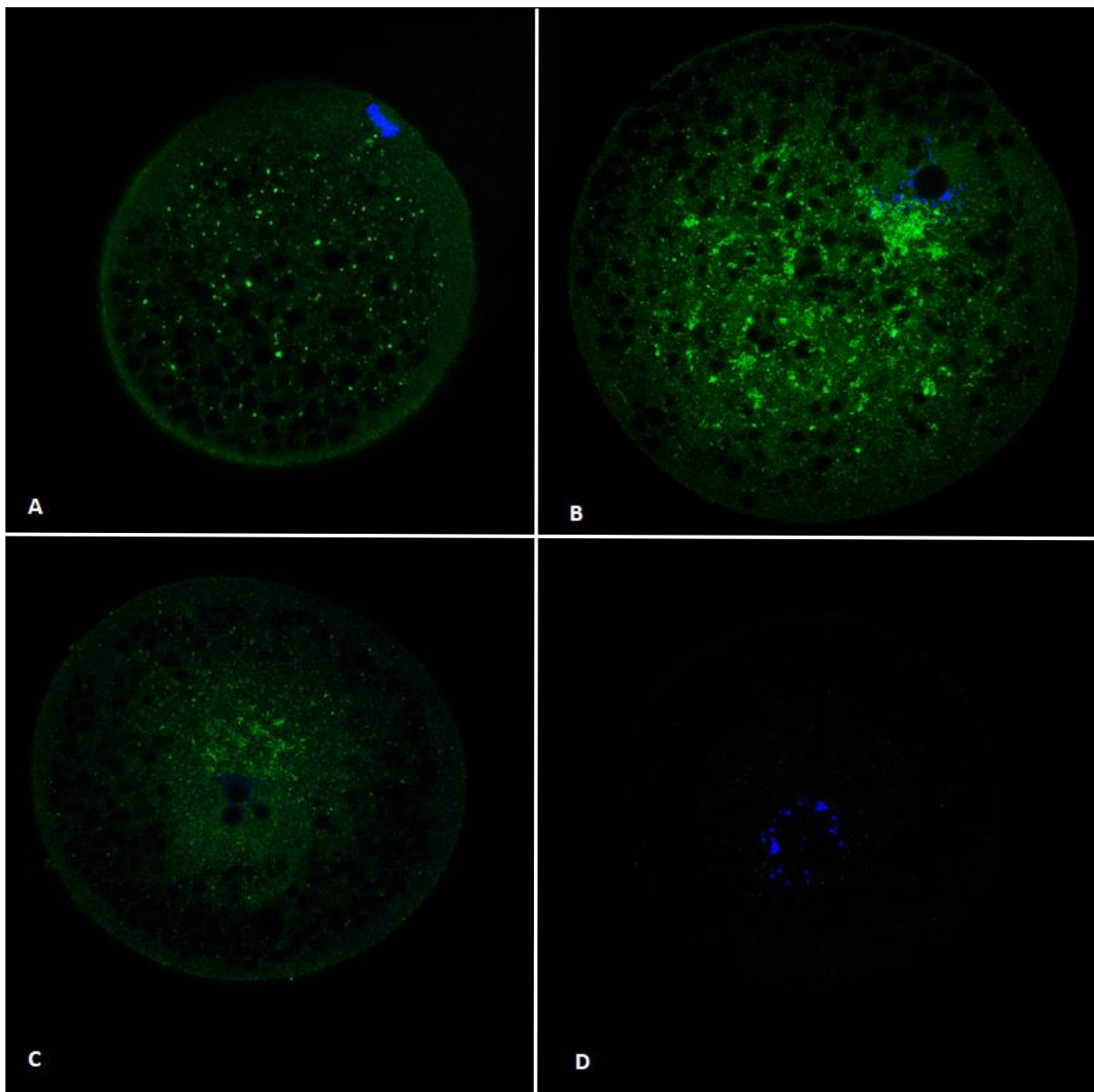
Získané výsledky byly podrobeny statistické analýze v programu STATISTICA 6.0 za užití jednofaktorové analýzy rozptylu (ANOVA). Rozdíly v p-hodnotě, které byly menší než 0,05 byly považovány za statisticky významné.

5. Výsledky

Cílem práce bylo prokázat přítomnost proapoptotického faktoru Bax a antiapoptotického faktoru Bcl-x1 v prasečích oocytech během prodloužené kultivace *in vitro* po dobu 24, 48 a 72 hodin, kdy byly oocyty vystaveny stárnutí.

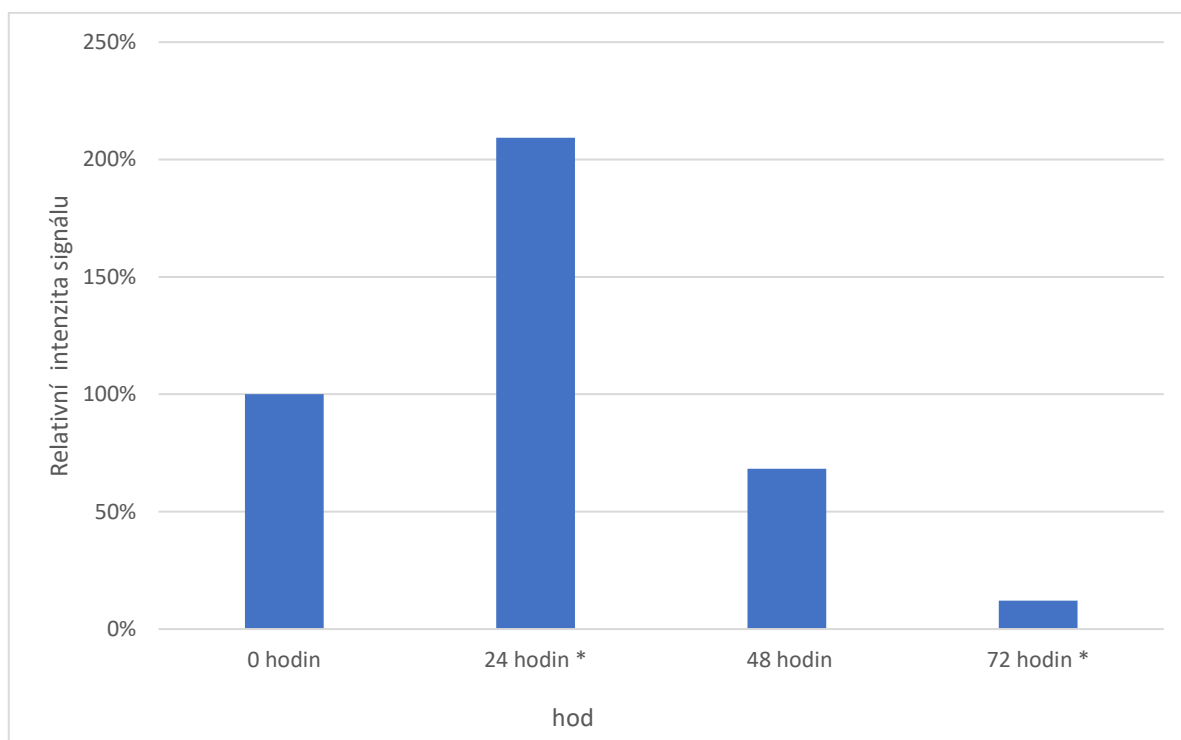
5.1. Expres Bax během prodloužené kultivace prasečích oocytů

V oocytech byl proapoptotický faktor Bax nalezen jak v oocytech ve stádiu MII (0 hodin kultivace), tak v oocytech, které byly vystaveny stárnutí během prodloužené kultivace po dobu 24, 48 a 72 hodin (obr. 12).



Obr. 12: Proapoptotický faktor Bax v prasečích oocytech během prodloužené kultivace. A – oocyt ve stádiu MII, B – oocyt kultivovaný po dobu 24 hodin, C – oocyt kultivovaný po dobu 48 hodin, D – oocyt kultivovaný po dobu 72 hodin. Modře je označen chromatin (DAPI) a zeleně protein Bax (FITC), zvětšení 400x.

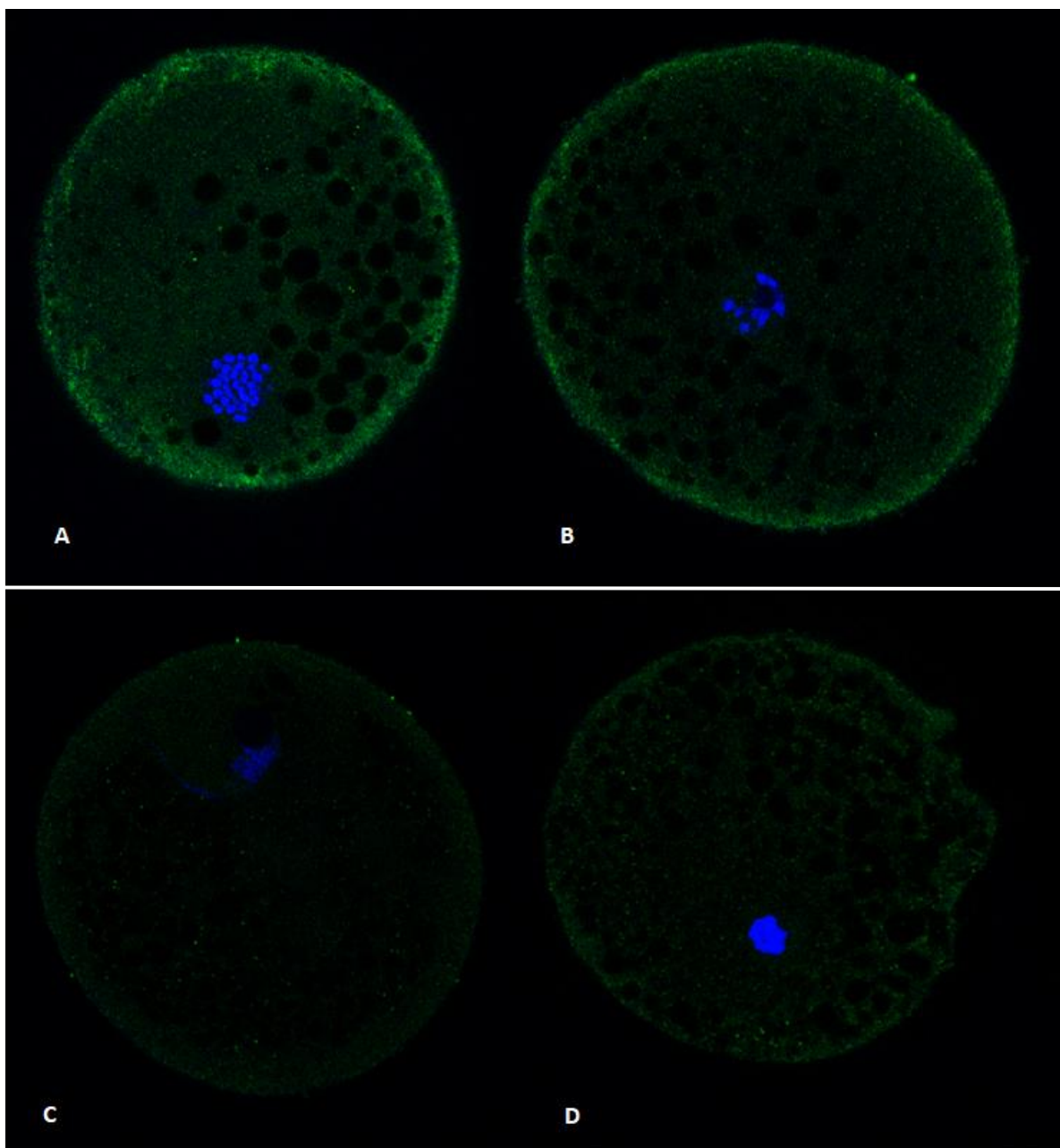
Protein byl v oocytech lokalizován v ložiscích, přičemž průměrná intenzita signálu se během prodloužené kultivace měnila. Během prvních 24 hodin intenzita signálu signifikantně oproti intenzitě signálu v oocytech ve stádiu druhé meiotické metafáze signifikantně významně vzrostla (100 % v MII vs. 210 % po 24 hodinách *in vitro* kultivace). S pokračující kultivací pak intenzita signálu klesala (100 % v MII vs. 60 % po 48 hodinách *in vitro* kultivace), pokles však nebyl hodnocen jako statisticky významný. Signifikantní snížení intenzity signálu bylo zjištěno až po 72 hodinách kultivace (graf.1) (100 % v MII vs. 10 % po 72 hodinách *in vitro* kultivace).



Graf 1: Hodnoty relativní intenzity signálu faktoru Bax u prasečích oocytů; 0 hodin – oocyty ve stádiu MII, relativní intenzita signálu = 100 %; 24 hodin – oocyty kultivované po dobu dalších 24 hodin; 48 hodin – oocyty kultivované po dobu dalších 48 hodin; 72 hodin – oocyty kultivované po dobu dalších 72 hodin (n=8). * statisticky významný rozdíl ($p \leq 0,05$).

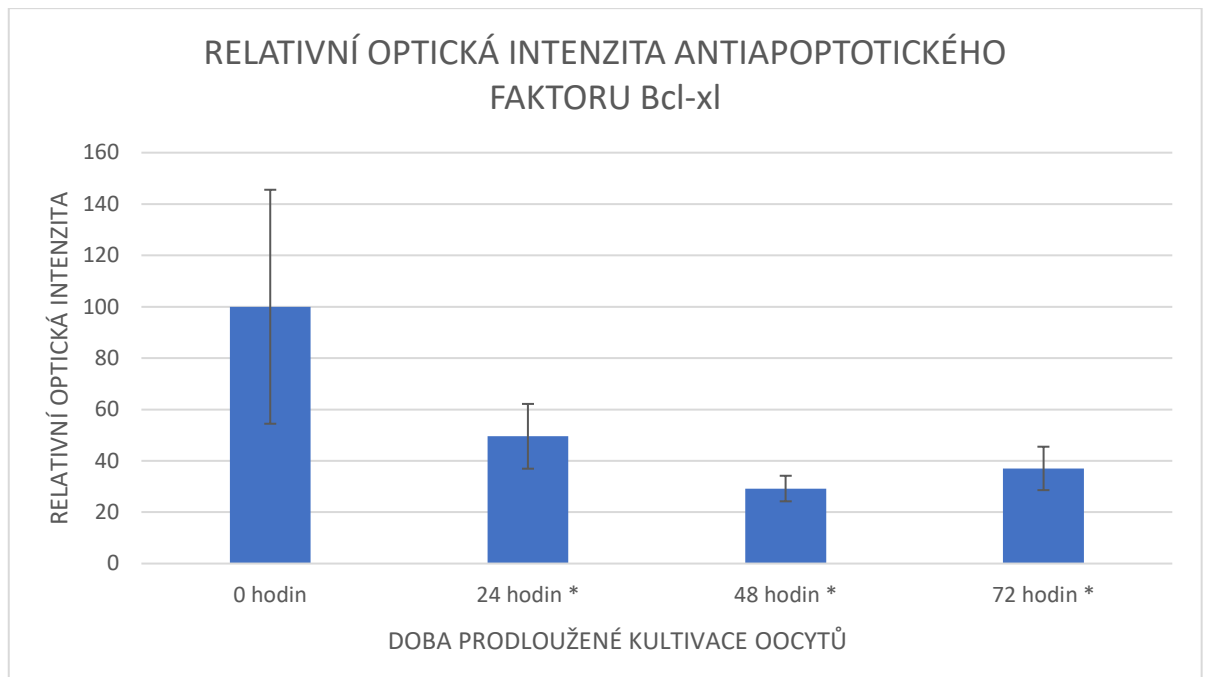
5.2. Exprese Bcl-xl během prodloužené kultivace prasečích oocytů

V oocytech byl antiapoptotický faktor Bcl-xl nalezen jak v oocytech ve stádiu MII (0 hodin kultivace), tak v oocytech, které byly vystaveny stárnutí *in vitro* během prodloužené kultivace po dobu 24, 48 a 72 hodin (obr. 13).



Obr. 13: Antiapoptotický faktor Bcl-x1 v prasečích oocytech během prodloužené kultivace. A – oocyt ve stádiu MII, B – oocyt kultivovaný po dobu 24 hodin, C – oocyt kultivovaný po dobu 48 hodin, D – oocyt kultivovaný po dobu 72 hodin. Modře je označen chromatin (DAPI) a zeleně protein BCL-x1 (FITC), zvětšení 400x.

Protein byl v oocytech lokalizován v ložiscích, přičemž podobně jako v případě proteinu Bax se průměrná intenzita signálu se během prodloužené kultivace měnila. Oproti oocytům ve stádiu druhé meiotické metafáze došlo v průběhu 24, 48 a 72 hodin prodloužené kultivace k signifikantnímu snížení signálu (graf.2).



Graf 2.: Hodnoty relativní intenzity signálu faktoru Bcl-x1 u prasečích oocytů. 0 hodin – oocyty ve stádiu MII, relativní intenzita signálu = 100 %; 24 hodin – oocyty kultivované po dobu dalších 24 hodin; 48 hodin – oocyty kultivované po dobu dalších 48 hodin; 72 hodin – oocyty kultivované po dobu dalších 72 hodin (n=8). * statisticky významný rozdíl ($p \leq 0,05$).

6. Diskuse

Cílem předložené diplomové práce bylo ověření hypotézy, podle které se s prodlouženou kultivací zralých prasečích oocytů zvyšuje exprese proapoptotického faktoru Bax a se současným nárůstem exprese Bax dochází k poklesu anti-apoptotického faktoru Bcl-xl.

Z literatury je známo, že oocyty s ukončeným růstem, které jsou *in vitro* kultivovány do stádia druhé meiotické metafáze při následné kultivaci, velmi rychle podléhají morfologickým i funkčním změnám, které jsou souhrnně označovány jako stárnutí (Kikuchi *et al.* 2000, Liang *et al.* 2012; Ma *et al.* 2015). Během stárnutí může docházet ke spontánní partenogenetické aktivaci oocytů, jejich lýze i fragmentaci. Fragmentace je projevem řízené buněčné smrti, apoptózy (Jeřeta *et al.* 2008). Na regulaci průběhu apoptózy se významně podílejí proteiny z rodiny Bcl-2. Jedná se o širokou škálu proteinů zahrnující jednak faktory, které oocyty podporují v apoptóze – proapoptotické faktory, mezi které řadíme také protein Bax, a faktory které naopak v buňkách řízenou buněčnou smrt oddalují a jsou označovány jako antiapoptotické faktory a patří mezi ně například protein Bcl-xl (Wolter *et al.* 1997; Luo *et al.* 1998). Pro nastartování apoptózy je klíčové, které faktory převažují (Hsu & Hsueh 2000).

Expresе proteinů byla sledována pomocí relativní optické intenzity signálu proteinů Bax a Bcl-xl. Je známo, že se proapoptotický protein Bax o molekulové hmotnosti 21 kDa vyskytuje v cytoplazmě a v mitochondriální membráně oocytů (Petros *et al.* 2004). Pomocí imunocytochemické metody byl Bax protein nalezen ve všech sledovaných skupinách oocytů. Z výsledků je zřejmé, že oproti oocytům ve stádiu druhé meiotické metafáze byl nejvýraznější nárůst exprese proteinu po 24 hodinách kultivace *in vitro*, následně se exprese detekovaného proteinu snižovala. Je tedy zřejmé, že k indukci procesu apoptózy ve stárnoucím oocytu prasete dochází již během prvních 24 hodin stárnutí. Tento fakt byl prokázán také u oocytů myši (Felici *et al.* 1999). Protein Bax patří mezi významné proapoptotické proteiny rodiny Bcl-2, který se při indukci apoptózy přesouvá z cytoplazmy oocytu do membrán jednotlivých organel, především do vnější mitochondriální membrány, kde oligomerizuje a aktivuje na kaspázách dependentní signální kaskádu apoptózy. Jedním z mechanismů, kterým protein Bax napomáhá k aktivaci kaspázové kaskády, může být navození změn v permeabilitě vnější mitochondriální membrány, která vede k uvolnění cytochromu c do cytozolu (Cory & Adams 2002). Cytochrom c v cytoplazmě interaguje s proteinem Apaf-1 a tvoří s ním oligomerní komplex – apoptozóm (Zou *et al.* 1999). Apoptozóm posléze interaguje s iniciační kaspázou, která následně aktivuje kaspázy efektorové. Jakmile je kaspázová kaskáda aktivována, dochází k masivní degradaci všech proteinů v oocytu, tedy i proteinů BAX (Fan *et al.* 2005). Tento jev byl prokázán také v našich experimentech, kdy při stárnutí po 48 a 72 hodinách *in vitro* dochází ke snížení exprese proapoptotického markeru, lze tedy usuzovat, že v této době je už aktivována dráha kaspázy a Bax proteiny degradovány.

V případě sledování exprese antiapoptotického markeru Bcl-xl byl pozorován pokles relativní optické intenzity sledovaného signálu proteinu s dobou prodloužené kultivace *in vitro*.

Anti-apoptický protein Bcl-xl o molekulové hmotnosti 26 kDa se vyskytuje v mitochondriálních membránách, endoplazmatickém retikulu a jaderné membráně (Jin & El-Deiry 2005). Expres Bcl-xl byla prokázána i u partenogeneticky aktivovaných prasečích embryí (Jeong *et al.* 2005). Jeho cílená exprese v oocytu výrazně oddaluje spontánní apoptózu (Morita *et al.* 1999). Poměr Bcl-xl k proteinu BAX lze použít k predikci tendence oocytů k přežití nebo k apoptóze (Yang & Rajamahendran, 2002). Pokles v expresi proteinu Bcl-xl je tedy logický, vzhledem k tomu, že v prvních 24 hodinách stárnutí byl aktivován proapoptický marker BAX.

Protein Bcl-xl je zapojen do regulace apoptózy díky své schopnosti se kompetitivně vázat na Apaf-1 současně s kaspázou 9, čímž může blokovat aktivaci vnitřní signální dráhy apoptózy (Pan *et al.* 1998).

Studie dále potvrdily, že Bcl-xl, Bcl-2, MCL-1, Bax a Bak regulují uvolňování vápníku z endoplazmatického retikula interakcí s inositol trifosfátovými receptory (IP₃R) a ligandem řízenými vápníkovými kanály (Lewis *et al.* 2014). Kromě toho se Bcl-2 a Bcl-xl mohou lokalizovat na membránách endoplazmatického retikula asociovaných s mitochondriemi, přičemž IP₃R (typu III) podporují přenos vápníku do mitochondrií (Li *et al.* 2007). Nadměrná exprese Bcl-2 a Bcl-xl vede ke snížení mitochondriálních zásob Ca²⁺ a k jeho zvýšenému ukládání v endoplazmatickém retikulu, zatímco nadměrná exprese Bax nebo Bak má opačný účinek a vede k indukci apoptózy (Pan *et al.* 2001; Li *et al.* 2002). Jelikož je endoplazmatické retikulum hlavním intracelulárním zásobním místem pro Ca²⁺ a je známo, že apoptóza nastává i při narušení buněčné homeostázy Ca²⁺, například po vyčerpání zásob Ca²⁺ z endoplazmatického retikula nebo při zvýšení mitochondriální hladiny Ca²⁺, můžeme tedy předpokládat, že stejně jako v mitochondriích, může Bax a Bak iniciovat apoptózu uvolňováním apoptogenních faktorů z lumen endoplazmatického retikula do cytosolu či do mitochondrií.

V provedených experimentech jsme prokázali důležitou úlohu proteinů Bax a Bcl-xl při regulaci procesu apoptózy, která je jedním z projevů stárnutí oocytů. Z výsledků je patrné i vzájemné propojení signálních drah těchto proteinů. Je zde také zřejmé, že k indukci apoptózy dochází již během prvních 24 hodin prodloužené kultivace oocytů a po aktivaci apoptózy dochází k poměrně rychlé degradaci proteinů, včetně proteinů Bax a Bcl-xl, která pravděpodobně vedla v našich experimentech k poklesu relativní intenzity signálu těchto proteinů s pokračující dobou kultivace oocytů. Hypotéza této diplomové práce se tedy potvrdila. Provedenými experimenty bylo sledováno zvýšení relativní intenzity signálu proteinu Bax se současným poklesem relativní intenzity signálu Bcl-xl, avšak pouze během prvních 24 hodin prodloužené kultivace.

7. Závěr

Byla prokázána významná role proapoptického faktoru Bax a antiapoptického faktoru Bcl - xl během stárnutí oocytů prasete. Výsledky ukázaly, že signální dráhy těchto důležitých proteinů jsou v dráze apoptózy propojeny. Bylo prokázáno, že v průběhu stárnutí se hladina proteinu Bax a Bcl – xl mění. Zatímco v prvních 24 hodinách stárnutí stoupá exprese proteinu Bax, protein Bcl – xl vykazuje opačný trend. Je tedy zřejmé, že k indukci procesu apoptózy ve stárnoucím oocytu prasete dochází již během prvních 24 hodin stárnutí. Pokles v expresi Bcl – xl může souviset s degradací některých proteinů při aktivaci enzymů kaspáz. Úlohu proteinů Bcl – 2 rodiny v prasečích oocytech je ale třeba ještě detailněji popsat.

8. Seznam použité literatury

- Abbott AL, Xu Z, Kopf GS, Ducibella T, Schultz RM. 1998. In vitro culture retards spontaneous activation of cell cycle progression and cortical granule exocytosis that normally occur in in vivo unfertilized mouse eggs. *Biology of Reproduction* **59**:1515-1521.
- Adams JM, Cory S. 1998. The Bcl-2 protein family arbiters of cell survival. *Science* **281**:1322–1326.
- Adhikari D, Liu K. 2009. Molecular mechanisms underlying the activation of mammalian primordial follicles. *Endocrine Reviews* **5**:438 – 464.
- Albertini DF. 2011. A cell for every reason: the ovarian granulosa cell. *Journal of Assisted Reproduction and Genetics* **28**:877–878.
- Alberts B, Johnson A, Lewis J, Raff M, Roberts K, Walter P. 2002. *Molecular Biology of the Cell*. Garland Science. New York.
- Ashkenazi A, Dixit VM. 1998. Death receptors: signaling and modulation. *Science* **5381**:1305-1308.
- Bearwald AR, Adams GP, Pierson RA. 2012. Ovarian antral folliculogenesis during the human menstrual cycle: a review. *Human reproduction update* **1**:73-91
- Black JL, Erickson BH. 1968. Oogenesis and ovarian development in the prenatal pig. *The Anatomical record* **1**:45-55.
- Boerjan ML, de Boer P. 1990. First cell cycle of zygotes of the mouse derived from oocytes aged postovulation in vivo and fertilized in vivo. *Molecular Reproduction and Development* **25**:155–163.
- Bornslaeger EA, Schultz RM. 1958. Regulation of mouse oocyte maturation: effect of elevating cumulus cell cAMP on oocyte cAMP levels. *Biology of Reproduction* **33**:698-704.
- Bowles J, Knight D, Smith C, Wilhelm D, Richman J, Mamiya S, Yashiro K, Chawengsaksophak K, Wilson MJ, Rossant J, Hamada H, Koopman P. 2006. Retinoid signaling determines germ cell fate in mice. *Science* **5773**:596 – 600.
- Coutsoukis P. 2007. The ovaries. Available from http://www.theodora.com/anatomy/the_ovaries.html (accessed April 2021).
- D'Alessio M, Nicola MD, Coppola S, Gualandi G, Pugliese L, Cerella C, Cristofanon S, Civit areale P, Ciriolo MR, Bergamaschi A, Magrini A, Ghibelli L. 2005. Oxidative Bax dimerization promotes its translocation to mitochondria independently of apoptosis. *The FASEB Journal* **19**:1504–1506.
- Daniel NN. 2007. BCL-2 family proteins: critical checkpoints of apoptotic cell death. *Clinical Cancer Research* **24**:7254-7263.
- Desai N, Ludgin J, Sharma R, Anirudh RK, Agarwal A. 2017. *Female and Male Gametogenesis*. Clinical Reproductive Medicine and Surgery. Springer, Cham.

- Donnez J, Dolmans MM. 2013. Fertility preservation in women. *Nature Reviews Endocrinology* **9**:735–749.
- Driancourt MA. 1991. Follicular dynamics in sheep and cattle. *Theriogenology* **1**:55 – 68.
- Elmore S. 2007. Apoptosis: A review of programmed cell death. *Toxicologic Pathology* **35**:495-516.
- Eppig JJ, Wigglesworth K, Pendola F, Hirao Y. 1997. Murine oocytes suppress expression of luteinizing hormone receptor messenger ribonucleic acid by granulosa cells. *Biology of reproduction* **4**:976-984.
- Eppig JJ. 2001. Oocyte control of ovarian follicular development and function in mammals. *Reproduction* **6**:829-838.
- Estaquier J, Vallette F, Vayssiere JL, Mignotte B. 2011. The Mitochondrial Pathways of Apoptosis. *Advances in Mitochondrial Medicine* **942**:57–183.
- Fair T. 2003. Follicular oocyte growth and acquisition of developmental competence. *Animal Reproduction Science* **3**:203 – 216.
- Fink SL, Cookson BT. 2005. Apoptosis, pyroptosis, and necrosis: mechanistic description of dead and dying eukaryotic cells. *Infection and immunity* **4**:1907-16.
- Ghobrial IM, Witzig TE, Adjei AA. 2005. Targeting apoptosis pathways in cancer therapy. *CA Cancer J Clin* **55**:178–94.
- Gougeon A. 1996. Regulation of ovarian follicular development in primates: facts and hypotheses. *Endocrine reviews* **2**:121-155.
- Greenwald GS, Moor RM. 1989. Isolation and preliminary characterization of pig primordial follicles. *Journal of reproduction and fertility* **2**:561-571.
- Grimsley C, Ravichandran KS. 2003. Cues for apoptotic cell engulfment: eat-me, don't eat-me and come-get-me signals. *Trends in cell biology*. **12**:648-56.
- Gross A, McDonnell JM, Korsmeyer SJ. 1999. BCL-2 family members and the mitochondria in apoptosis. *Genes Development* **13**:1899-1911.
- Gross A, Yin XM, Wang K., Wei MC, Jockel J, Milliman C, Erdjument-Bromage H, Tempst P, Korsmeyer SJ. 1999. Caspase cleaved BID targets mitochondria and is required for cytochrome c release, while BCL-XL prevents this release but not tumor necrosis factor-R1/Fas death. *Journal of Biological Chemistry* **2**:1156-1163.
- Gurp MV, Festjens N, Loo GV, Saelens X, Vandenabeele P. 2003. Mitochondrial intermembrane proteins in cell death. *Biochemical and Biophysical Research Communications* **304**: 487-497.
- Guthrie HD, Garrett M. 1999. Factors regulating apoptosis during folliculogenesis in pigs. *Proceedings of American Society of Animal Science* **58**:1-15.
- Hafez B, Hafez ES. 2016. Anatomy of Female Reproduction. *Reproduction in Farm Animals*. 13-29.

- Hague A, Paraskeva C. 2004. Apoptosis and disease: a matter of cell fate. *Nature Cell Death and Differentiation* **11**:1-7.
- Hayashi T, Rizzuto R, Hajnoczky G, Su TP. 2009. MAM: more than just a housekeeper. *Trends Cell Biology* **2**:81-88.
- Heffner LJ, Schust DJ. 2010. *The Reproductive System at a Glance*. John Wiley & Sons.
- Herrmann JM, Neupert W. 2000. Protein transport into mitochondria. *Curr Opin Microbiol* **2**:210-214.
- Hirao Y, Nagai T, Kubo M, Miyano T, Miyaki M, Kato S. 1994. In vitro growth and maturation of pig oocytes. *Journal of Reproduction and Fertility* **2**:333 – 339.
- Hirshfield AN. 1991. Theca cells may be present at the outset of follicular growth. *Biology of Reproduction* **6**:1157 – 1162.
- Hsueh AJW, Kawamura K, Cheng Y, Fauser BCJM. 2015. Intraovarian Control of Early Folliculogenesis. *Endocrine Reviews* **36**:1-24.
- Hummitzsch K, Irving-Rodgers HF, Schwartz J, Rodgers RJ. 2019. Development of the Mammalian Ovary and Follicles. *The Ovary* **14**:71–82.
- Hunt PA, Hassold TJ. 2008. Human female meiosis: what makes a good egg go bad?. *Trends in Genetics* **2**:86-93
- Hunter MG. 2000. oocyte maturation and ovum quality in pigs. *Reviews of Reproduction* **2**:122 – 130.
- Hurk R, Zhao J. 2004. Formation of mammalian oocytes and their growth, differentiation and maturation within ovarian follicles. *Theriogenology* **6**:1717 – 1751.
- Hussein MR. 2005. Apoptosis in the ovary: molecular mechanisms. *Human Reproduction Update* **1**:162-178.
- Chaube SK, Prasad PV, Thakur SC, Shrivastav TG. 2005. Estradiol protects clomiphene citrate-induced apoptosis in ovarian follicular cells and ovulated cumulus-oocyte complexes. *Fertility and Sterility* **84**:1163–1172.
- Chaube SK, Shrivastav TG, Prasad S, Tiwari M, Tripathi A, Pandey AN, Premkumar V. 2014. Clomiphene citrate induces ROS-mediated apoptosis in mammalian oocytes. *Open Journal of Apoptosis* **3**:52–58.
- Chaube SK. 2002. Does cyclic adenosine 3'5' monophosphate act as a regulator for oocyte meiotic resumption in mammal? *HPPI* **25**:74–85.
- Chi M, Manchester JK, Yang VC, Curato AD, Strickler RC, Lowry OH. 1988. Contrast in levels of metabolic enzymes in human and mouse ova. *Biology of Reproduction* **39**:295–307.
- Chicheportiche Y, Bourdon PR, Xu H, Hsu YM, Scott H, Hession C, Browning JL. 1997. TWEAK, a New Secreted Ligand in the Tumor Necrosis Factor Family That Weakly Induces Apoptosis. *Journal of Biological Chemistry* **51**:32401–32410.

- Igarashi H, Takahashi T, Takahashi E, Tezuka N, Nakahara K, Takahashi K, Kurachi H. 2005. Aged mouse oocytes fail to readjust intracellular adenosine triphosphates at fertilization. *Biology of Reproduction* **72**:1256-1261.
- Ito J, Kashiwazaki N. 2012. Molecular mechanism of fertilization in the pig. *Animal Science Journal* **10**:669 – 682.
- Jin Z, El-Deiry WS. 2005. Overview of cell death signaling pathways. *Cancer biology therapy* **2**:139-163.
- Jones ASK, Shikanov A. 2019. Follicle development as an orchestrated signaling network in a 3D organoid. *Journal of Biological Engineering* **13**.
- Kanitz W, Brussow KP, Becker F, Torner H, Schneider F, Kubelka M, Tomek W. 2001. Comparative aspects of follicular development, follicular and oocyte maturation and ovulation in cattle and pigs. *Archiv Fur Tierzucht* **44**: 9-23.
- Kischkel FC, Hellbardt S, Behrmann I, Germer M, Pawlita M, Krammer PH, Peter ME. 1995. Cytotoxicity-dependent APO-1 (Fas/CD95)-associated proteins form a death-inducing signaling complex (DISC) with the receptor. *The EMBO Journal* **22**:5579–5588.
- Knox RV. 2005. Recruitment and selection of ovarian follicles for determination of ovulation rate in the pig. *Domestic Animal Endocrinology*. **2**:385 – 397.
- Koolman J, Klaus-Heinrich R. 2012. *Barevný atlas biochemie*. Grada. Praha.
- Lartigue L, Kushnareva Y, Seong Y, Lin H, Faustin B, Newmeyer DD. 2009. Caspase-independent Mitochondrial Cell Death Results from Loss of Respiration, Not Cytotoxic Protein Release. *Molecular Biology of the Cell* **23**:4871–4884.
- Levrán D, Farhi J, Nahum H, Glezerman M, Weissman W. 2002. Maturation arrest of human oocytes as a cause of infertility. *Human Reproduction*, Oxford.
- Li N, Zhan X. 2019. Mitochondrial Dysfunction Pathway Networks and Mitochondrial Dynamics in the Pathogenesis of Pituitary Adenomas. *Frontiers in Endocrinology* **10**:690
- Li Q, McKenzie LJ, Matzuk MM. 2008. Revisiting oocyte-somatic cell interactions: in search of novel intrafollicular predictors and regulators of oocyte developmental competence. *Molecular Human Reproduction* **14**:673–678.
- Liang XW, Zhu JQ, Miao YL, Liu JH, Wei L, Lu SS, Hou Y, Schatten H, Lu KH, Sun QY. 2008. Loss of methylation imprint of Snrpn in postovulatory aging mouse oocyte. *Biochemical and Biophysical Research Communications* **371**:16-21.
- Liu H, Wang T, Huang K. 2009. Cholestane-3B, 5a, 6B-triol-induced reactive oxygen species production promotes mitochondrial dysfunction in isolated mice liver mitochondria. *Chemico-Biological Interactions* **179**:81–87.
- Locksley RM, Killen N, Lenardo MJ. 2001. The TNF and TNF receptor superfamilies: integrating mammalian biology. *Cell* **4**:487-501.
- Lord T, Nixon B, Jones KT, Aitken RJ. 2013. Melatonin prevents post-ovulatory oocyte aging in the mouse and extends the window for optimal fertilization in vitro. *Biology of Reproduction* **88**:1–9.

- Martin LJ. 2012. Biology of Mitochondria in Neurodegenerative Diseases. *Molecular Biology of Neurodegenerative Diseases* **107**:355-415.
- McGee EA, Hsueh AJ. 2000. Initial and cyclic recruitment of ovarian follicles. *Endocrinology Review* **2**:200 – 214.
- Meduri G, Charnaux N, Driancourt MA, Combettes L, Granet P, Vannier B, Loosfelt H, Milgrom E. 2002. Follicle – stimulating hormone receptors in oocytes? *The Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism* **5**:2266 – 2276.
- Miao YL, Kikuchi K, Sun QY, Schatten H. 2009. Oocyte aging: cellular and molecular changes, developmental potential and reversal possibility. *Human Reproduction* **15**:573-585.
- Mohamad N, Gutiérrez A, Núñez M, Cocca C, Martín G, Cricco G, Medina V, Rivera E, Bergoc R. 2005. Mitochondrial apoptotic pathways. *BIOCELL* **29**:149-161.
- Morbeck DE, Esbenshade KL, Flowers WL, Britt JH. 1992. Kinetics of Follicle Growth in the Prepubertal Gilt. *Biology of Reproduction* **3**:485-491.
- Muller M, Scaffidi CA, Galle PR, Stremmel W, Krammer PH. 1998. The role of p53 and the CD95 (APO-1/Fas) death system in chemotherapy-induced apoptosis. *Eur Cytokine Netw* **4**:685-686.
- Nechushtan A, Smith CL, Lamensdorf I, Yoon SH, Youle RJ. 2001. Bax and Bak coalesce into novel mitochondria-associated clusters during apoptosis. *The Journal of cell biology* **6**:1265-1276.
- Nickel R, Schummer S, Seiferle E, Sack WO. 1979. *The Viscera of the Domestic Mammals*. Springer-Verlag. Berlin Heidelberg.
- Nikolic A, Volarevic V, Armstrong L, Lako M, Stojkovic M. 2016. Primordial Germ Cells: Current Knowledge and Perspectives. *Stem Cells International* 1-8.
- Nogueira D, Cortvrindt R, De Matos DG, Vanhoutte L, Smitz J. 2003. Effect of Phosphodiesterase Type 3 Inhibitor on Developmental Competence of Immature Mouse Oocytes In Vitro. *Biology Of Reproduction* **6**:2045-2052.
- Pepling ME, Spradling AC. 2001. The mouse ovary contains germ cell cysts that undergo programmed breakdown to form follicles. *Developmental Biology* **2**:339 – 351.
- Pepling ME. 2006. From primordial germ cell to primordial follicle: mammalian female germ cell development. *Genesis* **12**:622 – 632.
- Perez GI, Tilly JL. 1997. Cumulus cells are required for the increased apoptotic potential in oocytes of aged mice. *Human Reproduction* **12**:2781-2783.
- Picard A, Peaucellier G, Le Bouffant F, Le Peuch C, Dorée M. 1985. Role of protein synthesis and proteases in production and inactivation of maturation – promoting activity during meiotic maturation of starfish oocytes. *Developmental Biology* **2**:311 – 320.
- Picton H, Briggs D, Gosden R. 1998. The molecular basis of oocyte growth and development. *Molecular and Cellular Endocrinology* **1**:27 – 37.

- Rodrigues P, Limback D, McGinnis LK, Plancha CE, Albertini DF. 2008. Oogenesis: Prospects and Challenges for the Future. *Journal of Cellular Physiology* **21**:355–365.
- Sánchez F, Smitz J. 2012. Molecular control of oogenesis. *Biochemica et Biophysica Acta* **12**:1896 – 1912.
- Santonocito M, Guglielmino MR, Vento M, Ragusa M, Barbagallo D, Borzi P, Casciano I, Scollo P, Romani M, Tatone C, Purrello M, Pietro CD. 2013. The apoptotic transcriptome of the human MII oocyte: characterization and age-related changes. *Apoptosis* **18**:201–211.
- Sawyer HT, Smith P, Heath DA, Juengel JL, Wakefield SJ, McNatty KP. 2002. Formation of ovarian follicles during fetal development in sheep. *Biology of Reproduction* **4**:1134 – 1150.
- Scaffidi C, Schmitz I, Krammer PH, Peter ME. 1999. The Role of c-FLIP in Modulation of CD95-induced Apoptosis. *Journal of Biological Chemistry* **3**:1541–1548.
- Scaffidi C, Fulda S, Srinivasan A, Friesen C, Li F, Tomaselli KJ, Debatin KM, Krammer PH, Peter ME. 1998. Two CD95 (APO/Fas) signaling pathways. *The EMBO Journal* **6**:1675 – 1687.
- Sela – Abramovich S, Edry I, Galiani D, Nevo N, Dekel N. 2006. Disruption of gap junctional communication within the ovarian follicle induces oocyte maturation. *Endocrinology* **5**:2280 – 2286.
- Sen A, Caiazza F. 2013. Oocyte Maturation: A story of arrest and release. *Frontiers in Bioscience* **5**:451-477.
- Shigenaga MK, Hagen TM, Ames BN. 1994. Oxidative damage and mitochondrial decay in aging. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **91**:10771–10778
- Schatten H. 2008. The mammalian centrosome and its functional significance. *Histochemistry and Cell Biology* **129**: 667-686.
- Silva JRV, Figueiredo JR, Hurk R. 2009. Involvement of growth hormone (GH) and insulin-like growth factor (IGF) system in ovarian folliculogenesis. *Theriogenology* **8**:1193-1208.
- Soede NM, Langendijk P, Kemp B. 2011. Reproductive cycles in pigs. *Animal Reproduction Science* **124**:251-258
- Suliman A, Lam A, Datta R, Srivastava RK. 2001. Intracellular mechanisms of TRAIL: apoptosis through mitochondrial-dependent and -independent pathways. *Oncogene* **17**:2122–2133.
- Sun QY, Schatten H. 2007. Centrosome inheritance after fertilization and nuclear transfer in mammals. *Advances in Experimental Medicine and Biology* **591**:58-71.
- Sundstrom P, Nilsson BO, Liedholm P, Larsson E. 1985. Ultrastructural characteristics of human oocytes fixed at follicular puncture or after culture. *Journal of In Vitro Fertilization and Embryo Transfer* **2**:195-206.
- Tait SW, Ichim G, Green DR. 2014. Die another way—non-apoptotic mechanisms of cell death. *Journal of Cell Science* **127**:2135–2144.

- Tait SW, Green DR. 2010. Mitochondria and cell death: Outer membrane permeabilization and beyond. *Nature Reviews Molecular Cell Biology* **11**: 621–632.
- Takahashi T, Igarashi H, Kawagoe J, Amita M, Hara S, Kurachi H. 2009. Poor embryo development in mouse oocytes aged in vitro is associated with impaired calcium homeostasis. *Biology of Reproduction* **80**: 493–502.
- Takahashi T, Saito H, Hiroi M, Doi K, Takahashi E. 2000. Effects of aging on inositol 1,4,5-triphosphate-induced Ca(2+) release in unfertilized mouse oocytes. *Molecular Reproduction and Development* **55**:299-306.
- Takahashi T, Takahashi E, Igarashi H, Tezuka N, Kurachi H. 2003. Impact of oxidative stress in aged mouse oocytes on calcium oscillations at fertilization. *Molecular Reproduction and Development* **66**:143–152.
- Taskin M, Lallas TA, Barber HR, Shevchuk MM. 1997. bcl-2 and p53 in endometrial adenocarcinoma. *Modern patholog* **7**:728-734.
- Tatone C, Amicarelli F, Carbone MC, Monteleone P, Caserta D, Marci R, Artini PG, Piomboni P, Focarelli R. 2008. Cellular and molecular aspects of ovarian follicle ageing. *Human Reproduction* **14**:131-142.
- Tilly JL. 2001. Commuting the death sentence: how oocytes strive to survive. *Nature reviews. Molecular and Cellular Biology* **2**: 838–848.
- Tiwari M, Prasad S, Shrivastav TG, Chaube SK. 2016. Calcium Signaling During Meiotic Cell Cycle Regulation and Apoptosis in Mammalian Oocytes. *Journal of Cellular Physiology* **232**: 976-981.
- Tiwari M, Prasad S, Tripathi A, Pandey AN, Ali I, Singh AK, Shrivastav TG, Chaube SK. 2015. Apoptosis in mammalian oocytes: a review. *Apoptosis* **20**:1019–1025.
- Tripathi A, Prem Kumar KV, Chaube SK. 2010. Meiotic cell cycle arrest in mammalian oocytes. *Journal of Cellular Physiology* **223**:592–600.
- Tulsiani DR, Abou-Haila A. 2012. Biological processes that prepare mammalian spermatozoa to interact with an egg and fertilize it. *Scientifica* 1-12.
- Upadhyay S, Zamboni L. 1982. Ectopic germ cells: natural model for the study of germ cell sexual differentiation. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **21**:6584-6588.
- Vaccari S, Horner K, Mehlmann LM, Conti M. 2008. Generation of mouse oocytes defective in cAMP synthesis and degradation: endogenous cyclic AMP is essential for meiotic arrest. *Developmental Biology* **1**:124 – 134.
- Vegetti W, Alagna F. 2006. FSH and folliculogenesis: from physiology to ovarian stimulation. *Reproductive BioMedicine* **6**:684-694.
- Wajant H, Pfizenmaier K, Scheurich P. 2002. TNF-related apoptosis inducing ligand (TRAIL) and its receptors in tumor surveillance and cancer therapy. *APOPTOSIS* **5**:449–459.
- Wang Q, Sun QY. 2007. Evaluation of oocyte quality: morphological, cellular and molecular predictors. *Reproduction, Fertility and Development* **19**:1-12.

- Wang C, Youle RJ. 2009. The Role of Mitochondria in Apoptosis. *Annual Review of Genetics* **43**:95–118.
- Wang, K, Yin XM, Chao DT, Milliman CL, Korsmeyer SJ. 1996. BID: a novel BH3 domain-only death agonist. *Genes Development* **22**:2859-2869.
- Wassarman P M, Albertini DF. 1994. The mammalian ovum. The physiology of reproduction. Raven Press. New York.
- Wassarman PM. 1988. Zona pellucida glycoproteins. *Annual review of biochemistry* **1**:415-442.
- Westphal D, Kluck RM, Dewson G. 2014. Building blocks of the apoptotic pore: how Bax and Bak are activated and oligomerize during apoptosis. *Cell Death & Differentiation* **21**: 196–205.
- Wright C, Becker DL, Lin JS, Warner AE. 2001. Stage – specific and differential expression of gap junctions in the mouse ovary: connexin – specific roles in follicular regulation. *Reproduction* **1**:77 – 88.
- Wu CC, Bratton SB. 2013. Regulation of the Intrinsic Apoptosis Pathway by Reactive Oxygen Species. *Antioxidants & Redox Signaling* **19**: 546–558.
- Xu Z, Abbott A, Kopf GS, Schultz RM, Ducibella T. 1997. Spontaneous activation of ovulated mouse eggs: time-dependent effects on M-phase exit, cortical granule exocytosis, maternal messenger ribonucleic acid recruitment, and inositol 1,4,5-trisphosphate sensitivity. *Biology of Reproduction* **57**:743-750.
- Yamada A, Arakaki R, Kudo Y, Ishimaru N. 2017. Dual Role of Fas/FasL-Mediated Signal in Peripheral Immune Tolerance. *Frontiers in immunology* **8**:403.
- Yin XM, Wang K, Gross A, Zhao Y, Zinkel S, Klocke B, Roth KA, Korsmeyer SJ. 1999. Bid-deficient mice are resistant to Fas-induced hepatocellular apoptosis. *Nature* **6747**:886-891.
- Zelevnik AJ. 2004. The physiology of follicle selection. *Reproductive Biology and Endocrinology* **2**
- Zhang LN, Li JY, Xu W. 2013. A review of the role of Puma, Noxa and Bim in the tumorigenesis, therapy and drug resistance of chronic lymphocytic leukemia. *Cancer gene Therapy* **1**:1-7.
- Zhang N, Wakai T, Fissore RA. 2011. Caffeine alleviates the deterioration of Ca(2+) release mechanisms and fragmentation of in vitro-aged mouse eggs. *Molecular Reproduction and Development* **78**:684–701.
- Tsujimoto Y, Jaffe E, Cossman J, Gorham J, Nowell PC, Croce CM. 1985. Clustering of breakpoints on chromosome 11 in human B-cell neoplasms with the t(11; 14) chromosome translocation. *Nature* **315**:340–343.
- Ola MS, Nawaz M, Ahsan H. 2011. Role of Bcl-2 family proteins and caspases in the regulation of apoptosis. *Molecular and Cellular Biochemistry* **351**:41-58.

- Cory S, Adams J. 2002. The Bcl2 family: regulators of the cellular life-or-death switch. *Nature Reviews Cancer* **2**:647–656.
- Zou H, Li Y, Liu X, Wang X. 1999. An APAF-1.cytochrome c multimeric complex is a functional apoptosome that activates procaspase-9. *Journal of Biological Chemistry* **274**:11549-11556.
- Fan TJ, Han LH, Cong RS, Liang J. 2005. Caspase family proteases and apoptosis. *Acta Biochimica et Biophysica Sinica* **37**:719-727.
- Jeong BC, Kwak C, Cho KS, Kim BS, Hong SK, Kim JI, Lee C, Kim HH. 2005. Apoptosis induced by oxalate in human renal tubular epithelial HK-2 cells. *Urological Research* **33**:87-92.
- Morita Y, Tilly JL. 1999. Oocyte apoptosis: like sand through an hourglass. *Developmental Biology* **213**:1–17.
- Morita Y, Manganaro TF, Tao XJ, Martimbeau S, Donahoe PK, Tilly JL. 1999. Requirement for phosphatidylinositol-3'-kinase in cytokine-mediated germ cell survival during fetal oogenesis in the mouse. *Endocrinology* **140**:941-949.
- Yang MY, Rajamahendran R. 2002. Expression of Bcl-2 and Bax proteins in relation to quality of bovine oocytes and embryos produced in vitro. *Animal Reproduction Science* **70**:159-169.
- Pan G, Humke EW, Dixit VM. 1998. Activation of caspases triggered by cytochrome c in vitro. *FEBS* **426**:151-154.
- Lewis A, Hayashi T, Su TP, Betenbaugh MJ. 2014. Bcl-2 family in inter-organelle modulation of calcium signaling; roles in bioenergetics and cell survival. *Journal of Bioenergetics and Biomembranes* **46**:1-15.
- Li C, Wang X, Vais H, Thompson CB, Foskett JK, White C. 2007. Apoptosis regulation by Bcl-x(L) modulation of mammalian inositol 1,4,5-trisphosphate receptor channel isoform gating. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **104**:12565–12570.
- Li C, Fox CJ, Master SR, Bindokas VP, Chodosh LA, Thompson CB. 2002. Bcl-X(L) affects Ca(2+) homeostasis by altering expression of inositol 1,4,5-trisphosphate receptors. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **99**:9830-9835.
- Pan Z, Bhat MB, Nieminen AL, Ma J. 2001. Synergistic movements of Ca(2+) and Bax in cells undergoing apoptosis. *Journal of Biological Chemistry* **276**:32257-32263.
- Johnson VL, Ko SC, Holmstrom TH, Eriksson JE, Chow SC. 2000. Effector caspases are dispensable for the early nuclear morphological changes during chemical-induced apoptosis. *Journal of Cell Science* **113**:2941-2953.
- Alabsi AM, Lim KL, Paterson IC, Ali-Saeed R, Muharram BA. 2016. Cell Cycle Arrest and Apoptosis Induction via Modulation of Mitochondrial Integrity by Bcl-2 Family Members and Caspase Dependence in *Dracaena cinnabari*-Treated H400 Human Oral Squamous Cell Carcinoma. *BioMed Research International* **2016**:1-13.
- Kurosaka K, Takahashi M, Watanabe N, Kobayashi Y. 2003. Silent cleanup of very early apoptotic cells by macrophages. *Journal of Immunology* **171**:4672-4679.

- Fresco P, Borges F, Marques MPM, Diniz C. 2010. The Anticancer Properties of Dietary Polyphenols and its Relation with Apoptosis. *Current Pharmaceutical Design* **16**:114-134.
- Louagie H, Cornelissen M, Philippe J, Vral A, Thierens H, De Ridder L. 1998. Flow cytometric scoring of apoptosis compared to electron microscopy in gamma irradiated lymphocytes. *Cell Biology International* **22**:277-283.
- Higuchi Y. 2004. Glutathione depletion-induced chromosomal DNA fragmentation associated with apoptosis and necrosis. *Journal of Cellular and Molecular Medicine* **8**:455-464.
- Saadat YR, Saeidi N, Vahed SZ, Barzegari A, Barar J. 2015. An update to DNA ladder assay for apoptosis detection. *Bioimpacts* **5**:25-28.
- Stellwagen NC. 2009. Electrophoresis of DNA in agarose gels, polyacrylamide gels and in free solution. *Electrophoresis* **30**:188-195.
- Archana M, Bastian, Yogesh TL, Kumaraswamy KL. 2013. Various methods available for detection of apoptotic cells- A review. *Indian Journal of cancer* **50**:274-283.
- Kyrylkova K, Kyryachenko S, Leid M, Kioussi C. 2012. Detection of apoptosis by TUNEL assay. *Methods in molecular biology* **887**:41-47.
- Saraste A. 1999. Morphologic criteria and detection of apoptosis. *Herz* **24**:189-195.
- Rode HD, Eisel D, Frost I. 2004. Apoptosis, cell death and cell proliferation. 3rd ed. London: Roche Applied Science.
- Loo DT. 2011. In situ detection of apoptosis by the TUNEL assay: an overview of techniques. *Methods in Molecular Biology* **682**:3-13.
- Choucroun P, Gillet D, Dorange G, Sawicki B, Dewitte JD. 2001. Comet assay and early apoptosis. *Mutation Research* **478**:1-2.
- Araldi RP, Melo TC, Mandes TB, Junior PL, Nozima BHN, Ito ET, Carvalho RF, Souza EB, Stocco RC. 2015. Using the comet and micronucleus assays for genotoxicity studies: A review. *Biomedicine & Pharmacotherapy* **72**:74-82.
- Fairbairn DW, Olive PL, O'Neill KL. 1995. The comet assay: a comprehensive review. *Mutation Research* **339**:37-59.
- Tice RR, Strauss GH. 1995. The single cell gel electrophoresis/comet assay: a potential tool for detecting radiation-induced DNA damage in humans. *Stem Cells* **13**:207-214.
- Florent M, Godard T, Ballet JJ, Ballet P, Soal B. 1999. Detection by the comet assay of apoptosis induced in lymphoid cell lines after growth factor deprivation. *Cell Biology and Toxicology* **15**:185-192.
- Lorenzo Y, Costa S, Collins AR, Azqueta A. 2013. The comet assay, DNA damage, DNA repair and cytotoxicity: hedgehogs are not always dead. *Mutagenesis* **28**:427-432.
- Blankenberg GD. 2008. In Vivo Detection of Apoptosis. *The Journal of Nuclear Medicine*. **49**:81-95.
- Engeland MV, Nieland LJW, Ramaekers FCS, Schutte B, Reutelingsperger CPM. 1998. Annexin V-Affinity Assay: A Review on an Apoptosis Detection System Based on Phosphatidylserine Exposure. *Cytometry* **31**:1-9.

- Torres M. 2003. Mitogen-activated protein kinase pathways in redox signaling. *Frontiers in Bioscience* **8**:369–391.
- Ahn HJ, Kim KI, Hoan NN, Kim CH, Moon E, Choi KS, Yang SS, Lee JS. 2014. Targeting Cancer Cells with Reactive Oxygen and Nitrogen Species Generated by Atmospheric-Pressure Air Plasma. *PLoS ONE* **9**:e86173
- Rytomaa M, Kinnunen PK. 1995. Reversibility of the binding of cytochrome c to liposomes. Implications for lipid–protein interactions. *Journal of Biological Chemistry* **270**:3197–3202.
- Dai DF, Chiao YA, Marcinek DJ, Szeto HH, Rabinovitch PS. 2014. Mitochondrial oxidative stress in aging and healthspan. *Longevity & Healthspan* **3**:6.
- Kagan VE, Tyurin VA, Jiang J, Tyurina YY, Ritov VB, Amoscato AA, Osipov AN, Belikova NA, Kapralov AA, Kini V, Vlasova II, Zhao Q, Zou M, Di P, Svistunenko DA, Kurnikov IV, Borisenko GG. 2005. Cytochrome c acts as a cardiolipin oxygenase required for release of proapoptotic factors. *Nature Chemical Biology* **1**:223–232
- Petrosillo G, Ruggiero FM, Pistolesse M, Paradies G. 2001. Reactive oxygen species generated from the mitochondrial electron transport chain induce cytochrome c dissociation from beef-heart submitochondrial particles via cardiolipin peroxidation. Possible role in the apoptosis. *FEBS Letters* **509**:435–438
- Korytowski W, Basova LV, Pilat A, Kernstock RM, Girotti AW. 2011. Permeabilization of the mitochondrial outer membrane by Bax/truncated Bid (tBid) proteins as sensitized by cardiolipin hydroperoxide translocation: Mechanistic implications for the intrinsic pathway of oxidative apoptosis. *Journal of Biological Chemistry* **286**:26334–26343.
- Garrido C, Galluzzi L, Brunet M, Puig PE, Didelot C, Kroemer G. 2006. Mechanisms of cytochrome c release from mitochondria. *Cell Death & Differentiation* **13**:1423–1433.
- Kim H, Tu HC, Ren D, Takeuchi O, Jeffers JR, Zambetti GP, Hsieh JJ, Cheng EH. 2009. Stepwise activation of BAX and BAK by tBID, BIM, and PUMA initiates mitochondrial apoptosis. *Molecular Cell* **36**:487–499.
- Aranovich A, Liu Q, Collins T, Geng F, Dixit S, Leber B, Andrews DW. 2012. Differences in the mechanisms of proapoptotic BH3 proteins binding to Bcl-XL and Bcl-2 quantified in live MCF-7 cells. *Molecular Cell* **45**:754–763.
- Llambi F, Moldoveanu T, Tait SW, Bouchier-Hayes L, Temirov J, McCormick LL, Dillon CP, Green DR. 2011. A unified model of mammalian BCL-2 protein family interactions at the mitochondria. *Molecular Cell* **44**: 517–531.
- Shamas-Din A, Kale J, Leber B, Andrews DW. 2013. Mechanisms of action of Bcl-2 family proteins. *Cold Spring Harb Perspect Biol.* **5**:a008714.
- Wei MC, Zong WX, Cheng EH, Lindsten T, Panoutsakopoulou V, Ross AJ, Roth KA, MacGregor GR, Thompson CB, Korsmeyer SJ. 2001. Proapoptotic BAX and BAK: a requisite gateway to mitochondrial dysfunction and death. *Science* **292**:727–730.
- Czabotar PE, Westphal D, Dewson G, Ma S, Hockings C, Fairlie WD, Lee EF, Yao S, Robin AY, Smith BJ, Huang DCS, Kluck RM, Adams JM, Colman PM. 2013. Bax Crystal Structures

- Reveal How BH3 Domains Activate Bax and Nucleate Its Oligomerization to Induce Apoptosis. *Cell* **152**:519-531.
- Kuwana T, Newmeyer DD. 2003. Bcl-2-family proteins and the role of mitochondria in apoptosis. *Current Opinion in Cell Biology* **15**: 691-699.
- Siddiqui WA, Ahad A, Ahsan A. 2015. The mystery of BCL2 family: Bcl-2 proteins and apoptosis: an update. *Archives of Toxicology* **89**:289–317.
- Suzuki M, Youle RJ, Tjandra N. 2000. Structure of Bax: coregulation of dimer formation and intracellular localization. *Cell* **103**:645-654.
- Gavathiotis E, Reyna DE, Davis ML, Bird GH, Walensky LD. 2010. BH3-triggered structural reorganization drives the activation of proapoptotic BAX. *Molecular Cell* **40**: 481–492.
- Dewson G, Kratina T, Czabotar P, Day CL, Adams JM, Kluck RM. 2009. Bak activation for apoptosis involves oligomerization of dimers via their $\alpha 6$ helices. *Molecular Cell* **36**:696–703.
- Peyerl FW, Dai S, Murphy GA, Crawford F, White J, Marrack P, Kappler JW. 2007. Elucidation of some Bax conformational changes through crystallization of an antibody–peptide complex. *Cell Death & Differentiation* **14**: 447–452.
- Annis MG, Soucie EL, Dlugosz PJ, Cruz-Aguado JA, Penn LZ, Leber B, Andrews DW. 2005. Bax forms multispansing monomers that oligomerize to permeabilize membranes during apoptosis. *EMBO* **24**:2096-2103.
- Chipuk JE, Kuwana T, Bouchier-Hayes L, Droin NM, Newmeyer DD, Schuler M, Green DR. 2004. Direct activation of Bax by p53 mediates mitochondrial membrane permeabilization and apoptosis. *Science* **303**:1010-1014.
- Leibowitz B, Yu J. 2010. Mitochondrial signaling in cell death via the Bcl-2 family. *Cancer Biology & Therapy* **9**:417-422.
- Letai A, Bassik MC, Walensky LD, Sorcinelli MD, Weiler S, Korsmeyer SJ. 2002 Distinct BH3 domains either sensitize or activate mitochondrial apoptosis, serving as prototype cancer therapeutics. *Cancer Cell* **2**:183–192.
- Sinha K, Das J, Pal PB, Sil PC. 2013. Oxidative stress: the mitochondria-dependent and mitochondria-independent pathways of apoptosis. *Archives of Toxicology* **87**: 1157–1180.
- Puthalakath H, Strasser A. 2002. Keeping killers on a tight leash: transcriptional and post-translational control of the pro-apoptotic activity of BH3-only proteins. *Cell Death & Differentiation* **9**:505-512.
- Reed JC. 2006. Proapoptotic multidomain Bcl-2/Bax-family proteins: mechanisms, physiological roles, and therapeutic opportunities. *Cell Death and Differentiation* **13**:1378-1386.
- Petros AM, Olejniczak ET, Fesik SW. 2004. Structural biology of the Bcl-2 family of proteins. *Biochimica et Biophysica Acta* **1644**:83-94.
- Klee M, Pimentel-Muinos FX. 2005. Bcl-X(L) specifically activates Bak to induce swelling and restructuring of the endoplasmic reticulum. *Journal of Cell Biology* **168**:723-734.

- Willis SN, Adams JM. 2005. Life in the balance: how BH3-only proteins induce apoptosis. *Current Opinion in Cell Biology* **17**:617-625.
- Willis SN, Fletcher JI, Kaufmann T, van Delft MF, Chen L, Czabotar PE, Ierino H, Lee EF, Fairlie WD, Bouillet P, Strasser A, Kluck RM, Adams JM, Huang DC. 2007. Apoptosis initiated when BH3 ligands engage multiple Bcl-2 homologs, not Bax or Bak. *Science* **315**:856-859.
- Zong WX, Lindsten T, Ross AJ, MacGregor GR, Thompson CB. 2001. BH3-only proteins that bind pro-survival Bcl-2 family members fail to induce apoptosis in the absence of Bax and Bak. *Genes & Development* **15**:1481-1486.
- Chen L, Willis SN, Wei A, Smith BJ, Fletcher JI, Hinds MG, Colman PM, Day CL, Adams JM, Huang DC. 2005. Differential targeting of prosurvival Bcl-2 proteins by their BH3-only ligands allows complementary apoptotic function. *Molecular Cell* **17**:393-403.
- Cartron PF, Gallenne T, Bougras G, Gautier F, Manero F, Vusio P, Meflah K, Vallette FM, Juin P. 2004. The first alpha helix of Bax plays a necessary role in its ligand-induced activation by the BH3-only proteins Bid and PUMA. *Molecular Cell* **16**:807-818.
- Khemtemourian L, Sani MA, Bathany K, Grobner G, Dufourc EJ. 2006. Synthesis and secondary structure in membranes of the Bcl-2 anti-apoptotic domain BH4. *Journal of Peptide Science* **12**:58-64.
- Reed J. 1998. Bcl-2 family proteins. *Oncogene* **17**:3225–3236.
- Flora SJ, Gautam P, Kushwaha P. 2012. Lead and ethanol co-exposure lead to blood oxidative stress and subsequent neuronal apoptosis in rats. *Alcohol and Alcoholism* **47**:92-101.
- Simonen M, Hansjorg K, Heim J. 2004. The BH3 Domain of Bax is Sufficient for Interaction of Bax with itself and with other Family Members and it is Required for Induction of Apoptosis. *European Journal of Biochemistry* **249**:85-91.
- Bellows DS, Chau BN, Percy L, Lazebnik Y, Burns WH, Hardwick JM. 2000 “Antiapoptotic herpesvirus Bcl-2 homologs escape caspase-mediated conversion to proapoptotic proteins,” *Journal of Virology* **74**:5024–5031.

