Česká zemědělská univerzita v Praze

Fakulta agrobiologie, potravinových a přírodních zdrojů

Katedra veterinárních disciplín

Úloha kalcineurinu během meiotického zrání a partenogenetické aktivace prasečích oocytů

Disertační práce

Autor práce: Ing. Kristýna Hošková

Školitel: doc. MVDr. Radko Rajmon, Ph.D.

Školitelka specialistka: doc. Ing. Eva Chmelíková, Ph.D.

2014

Prohlášení

Prohlašuji, že jsem doktorskou disertační práci na téma „Úloha kalcineurinu během meiotického zrání a partenogenetické aktivace prasečích oocytů“ vypracovala samostatně a použila jen pramenů, které cituji a uvádím v přiložené bibliografii.

V Praze dne:

Podpis autora práce

Kristýna Hošková

Poděkování

Na tomto místě bych ráda poděkovala všem, kteří se podíleli na vzniku mé disertační práce. Děkuji svému školiteli, doc. MVDr. Radko Rajmonovi, Ph.D., za jeho vstřícný a chápavý přístup a mé vedení po celou dobu doktorského studia. Dále děkuji své školitelce specialistce, doc. Ing. Evě Chmelíkové, Ph.D., za cenné odborné i přátelské rady, čas i energii, kterou mi trpělivě věnovala při sepisování práce i v laboratoři. Chtěla bych vyjádřit poděkování také prof. Ing. Jaroslavu Petrovi, DrSc. za jeho ochotu kdykoliv pomoci a také za mnoho rad a vědomostí, které mi předal během celého studia. Dále bych ráda poděkovala Ing. Tereze Žalmanové, Ing. Lence Tůmové, PhD., Ing. Kateřině Kheilové, PhD. a Ing. Janu Nevoralovi, kteří se mnou ochotně sdíleli pracovní i osobní slasti i strasti. Mé velké díky patří také všem ostatním kolegům v laboratoři a kanceláři, kteří vytvářejí perfektní pracovní, přátelské a veselé prostředí a jsou jedním z důvodů, proč člověka práce těší. V neposlední řadě bych chtěla poděkovat Jirkovi a Leje za pomoc v rámci i nad rámec jejich možností a věčný optimismus. Poděkování patří i celé mé rodině, která mě vždy podporovala. Ke vzniku této práce, zejména ve finální fázi vývoje, významně přispěla káva, takže i jí patří mé díky.

Seznam zkratek

AKAP – protein ukotvující protein kinázu A (protein kinase A anchoring protein)

APC/C – komplex podporující anafázi (anaphase-promoting complex/cyclosome)

ATP – adenosintrifosfát

Ca – Io – kalcium ionofor A 23187

CaM – kalmodulin

CaMKII – kalcium/kalmodulin dependentní kináza II

cAMP – cyklický adenosin monofosfát

cdc2 – cell division cycle 2 kinase

cGMP – cyklický guanosin monofosfát

CK1 - casein kinase 1

CsA – cyklosporin A

CSF – cytostatický faktor

DAG – diacylglycerol

DMSO – dimetylsulfoxid

DNA – deoxyribonukleová kyselina

eCG – equinní choriový gonadotropin

eNOS – endotelová izoforma syntázy oxidu dusnatého

Emi 1 – inhibitor mitózy 1(early mitotic inhibitor 1)

ER – endoplazmatické retikulum

ERK – kináza regulovaná extracelulárním signálem (extracellular signal-regulated kinase)

FITC – fluorescein-5- izothiokyanát

FSH – folikulostimulační hormon

GAPDH – glyceraldehyd-3-fosfát dehydrogenáza

GV – zárodečný váček (germinal vesicle)

GVBD – rozpad zárodečného váčku (germinal vesicle breakdown)

GSK3 - gylocogen synthase kinase

hCG – humánní choriový gonadotropin

IGF-1 - Insulin Like Growth Faktor 1

iNOS – indukovatelná izoforma syntázy oxidu dusnatého

IP3 – inositol 1,4,5-trifosfát

IP_3R – inositol 1,4,5-trifosfátový receptor

LH – luteinizační hormon

MI – metafáze prvního meiotického dělení

MII – metafáze druhého meiotického dělení

MAPK – mitogeny aktivovaná protein kináza (mitogen-activated protein kinase)

MPF – faktor podporující metafázi (metaphase promoting factor)

mRNA – mediátorová ribonukleová kyselina

MTOC – mikrotubuly organizující centrum

NFAT – jaderný faktor aktivovaných T-lymfocytů (nuclear factor of activated T-cells)

nNOS – neuronová izoforma syntázy oxidu dusnatého

NO – oxid dusnatý

NOS – syntáza oxidu dusnatého

PBS – fosfátový pufr (phosphate buffered saline)

PDE – fosfodiesteráza

PGC – primordiální zárodečné buňky (primordial germ cells)

PKA – protein kináza A

PKC – protein kináza C

PLC – fosfolipáza C

PP2A, PP2B, PP2C, PP3 – kalcineurin

RNA – ribonukleová kyselina

RyR – ryanodinový receptor

TNF-α – tumor necrosis factor- α

Obsah

1. Úvod 1
2. Literární přehled 3
2.1. Množení zárodečných buněk 3
2.2 Folikulogeneze a její regulace 5
2. 3. Růst oocytu 10
2. 4. Zisk meiotické kompetence 11
2. 5. Znovuzahájení meiózy a meiotické zrání oocytů 13
2. 6. Vybrané faktory ovlivňující znovuzahájení meiózy a meiotické zrání 16
2. 7. Aktivace oocytu 27
2. 8. Kalcineurin 33
2. 8. 1. Struktura kalcineurinu 33
2. 8. 2. Distribuce kalcineurinu v organismu 35
2. 8. 3. Aktivace a regulace kalcineurinu 35
2. 8. 4. Cílové substráty kalcineurinu 37
2. 8. 5. Inhibitory kalcineurinu 38
2. 8. 6. Funkce a účinky kalcineurinu v reprodukci 41
3. Hypotézy a cíle 44
4. Materiál a metody 45
4. 1. Materiál 45
4.1.1. Odběr vaječníků 45
4.1.2. Získávání oocytů 45
4.1.3. Kultivační systém 45
4.1.4 Inhibitory 47
4. 2. Metody 47
4.2.1. Hodnocení jaderného zrání a podílu aktivovaných oocytů 47
4.2.2. Průkaz přítomnosti kalcineurinu metodou Western Blot 48
4.2.3. Imunocytochemická lokalizace kalcineurinu 48
4.2.4. Hodnocení aktivity MPF a MAPK 50
4. 3. Experimentální schéma 51
5. Výsledky 56
5. 1. Detekce podjednotek A a B kalcineurinu 56
5.2. Lokalizace podjednotek A a B kalcineurinu v průběhu meiotického zrání a partenogenetické aktivace oocytů 57

5. 3. Vliv inhibitorů kalcineurinu na meiotické zrání oocytů 62
5. 4. Vliv inhibitorů kalcineurinu na aktivaci oocytů 64
5. 5. Vliv inhibice kalcineurinu na úroveň aktivity MPF a MAPK během aktivace oocytů 66
6. Diskuze 68
7. Závěr 74
8. Seznam literatury 75

1. Úvod

Rozvoj reprodukčních biotechnologií v posledních letech je neustále na vzestupu, stávající metody jsou zdokonalovány a zároveň jsou vytvářeny nové, efektivnější, které jsou aplikovatelné u hospodářských zvířat, ale i v humánní medicíně. Tyto postupy významně přispívají k zefektivnění možností reprodukce a snížení počtu stále častěji se vyskytujících problémů s reprodukcí spojených. Postupy běžně používané v praxi se prolínají s metodami základního výzkumu a na významu tak nabývají techniky v *in vitro* podmínkách.

Prase je z fyziologického hlediska velmi podobné člověku a jeho orgány jsou úspěšně používány při xenostransplantacích v humánní medicíně. Zároveň, délka meiózy prasečích a lidských oocytů je obdobná a výsledky reprodukčních studií slouží tedy jako model pro lidskou reprodukci. Na rozdíl od často používaného myšího modelu, umožňuje výrazně delší průběh meiózy prasečích oocytů detailní pohled na děje probíhající během tohoto procesu a činí tak prase ideálním kandidátem pro výzkum oogeneze.

Oocyty představující reprodukční potenciál každé samice, mohou být však zdárně využity jen v případě dostatečného množství kvalitních oocytů schopných v *in vivo* či *in vitro* podmínkách zdárně projít a dokončit meiotické zrání a být úspěšně oplozeny. Kultivace oocytů v *in vitro* podmínkách umožňuje detailní studium pochodů oogeneze a embryogeneze, čímž lze zmapovat molekulární mechanismy, které do nich zasahují. Regulačních faktorů podílejících se na řízení reprodukčních procesů je mnoho a každým rokem vzrůstá počet studií popisujících nové. Tyto faktory se vzájemně ovlivňují a tvoří velmi složité signální kaskády, které vyžadují bezchybné zapojení a někdy i vyblokování jednotlivých členů ve správnou dobu a správným způsobem. Za významné regulátory oogeneze je považováno také široké spektrum kináz a fosfatáz.

Jedním z faktorů podílejícím se na regulaci vývoje oocytu může být i protein fosfatáza 2B, kalcineurin, který byl identifikován již v 70. letech minulého stolení. V dalších letech byl nalezen v různých typech živočišných i lidských tkání, kde bylo prokázáno jeho zapojení do celé řady fyziologických a biochemických procesů v organismu. V oocytech byla přítomnost kalcineurinu prozatím potvrzena pouze u bezobratlých a nižších obratlovců, kde se podílí na regulaci meiotického zrání, aktivace i oplození oocytů. Vhledem k evoluční konzervovanosti sekvencí kalcineurinu napříč živočišnými druhy můžeme předpokládat, že podobnou úlohu by mohl sehrávat i u savců. Zda je však kalcineurin v savčích oocytech

přítomen a zda, a případně jak, se zapojuje do jejich meiotického zrání a procesů spojených s aktivací oocytů, však zůstávají otázkou.

2. Literární přehled

Funkcí vaječníků je nejen produkce vyváženého poměru hormonů, ale i cyklická produkce samičích gamet – oocytů. V obou procesech hrají významnou úlohu folikuly, protože po celou dobu svého vývoje (folikulogeneze) vytvářejí optimální prostředí také pro oocyty. Oocyty se tak mohou postupně vyvíjet v procesu označovaném jako oogeneze, z neoplozeníschopných rostoucích oocytů v oocyty meioticky kompetentní s ukončeným růstem, připravené k ovulaci a následnému oplození. Samotná oogeneze probíhá ve třech fázích, ve kterých jsou na počátku zmnoženy zárodečné buňky a poté následuje růst a zrání samotných oocytů.

2.1. Množení zárodečných buněk

U savců začíná vývoj samičích zárodečných buněk (oocytů) již v časném embryonálním vývoji a ukončen je až v dospělosti, po skončení pohlavní aktivity samice. Zahrnuje sérii buněčných přeměn od primordiálních zárodečných buněk (primordial germ cells – PGCs) extragonadálního původu přes oogonie až po finální stadium samičích pohlavních buněk - oocyty (Wassarman et Albertini, 1994). Začátek oogeneze je zahájen seskupením PGCs v průběhu časného fetálního vývoje ve žloutkovém váčku endodermu v zadní části střeva embrya. Odtud následně migrují, zprvu pasivně, později améboidním pohybem podél dorsálního mesenteria genitální lišty na klenbě coelomu do místa budoucích gonád. Zde postupně kolonizují celou genitální lištu. K procesu migrace přispívají chemotaktické substance jako transformující růstový faktor β1 a další intercelulární signální molekuly (Picton, 2001; Kanitz et al., 2001) a je ovlivněna působením extracelulární matrix, kde dochází ke změnám v distribuci kolagenu IV, fibronektinu a lamininu (Vanderhyden, 2002). Migrace PGCs je u prasete zahájena 18. den embryonálního vývoje a do genitální lišty vstupují 26. den (Wassarman et Albertini, 1994).

Po dosažení povrchu epitelu vaječníků se PGCs přesouvají do jejich kůry a společně s epiteliálními buňkami dávají vzniknout kortikálním gonadálním provazcům. Poté, co PGCs doputují do místa budoucích vaječníků, ztrácejí pohyblivost a začínají se intenzivně mitoticky dělit. Od této doby je nazýváme oogoniemi (Wassarman et Albertini, 1994). Oogonie se vyznačují relativně velkým objemem a sférickým jádrem s jedním nebo dvěma jadérky, popřípadě několika menšími mikronukleoly (Bielańska-Osuchowska, 2006). Doba, po kterou se oogonie mitoticky dělí je druhově specifická, u prasete pokračuje až do 7. dne po narození

a počet zárodečných buněk se tedy velmi rychle zvyšuje (Hunter, 2000). Embrya prasat mají ve 20. dni vývoje v budoucích gonádách přibližně 5000 zárodečných buněk, přičemž nejvyššího počtu je dosaženo cca 50. den jejich vývoje. Po narození se toto množství snižuje o více než 50% apoptozou, případně nekrózou (Kanitz et al., 2001). Dlouhou dobu byl považován za jediný zdroj oocytů v dospělosti zásoba nerostoucích oocytů z prenatálního období samice. Toto dogma však bylo vyvráceno vědeckým týmem vedeným Johnsonem et al. (2004), kteří jako první prokázali, že mitoticky aktivní buňky jsou ve vaječnících juvenilních i dospělých myší a prokázal tedy vznik samičích zárodečných buněk i postnatálně. Stejný tým (Johnson et al., 2005) následně potvrdil, že zásobárnou budoucích oocytů může být také extragonadální tkáň jako kostní dřeň samice. Tato teorie však nebyla dosud potvrzena žádným dalším vědeckým týmem (Eggan et al., 2006). V nedávné době byla zveřejněna studie z humánní oblasti popisující vznik mitoticky aktivních buněk izolovaných z vaječníku žen v reprodukčním věku (White, 2012).

V průběhu prenatálního období je u zárodečných buněk zahájeno také meiotické dělení, při kterém dochází postupně k redukci počtu chromozomů. Oogonie vstupují do stadia *preleptotene,* interfáze po posledním mitotickém dělení oogonií. V buňce je dokončována replikace DNA, oogonie se oddělují z provazce, obklopují se vrstvou plochých pregranulózních buněk a tenkou bazální membránou (*lamina basalis*). Oocyty jsou připraveny zahájit meiotické dělení vstupem do profáze I. (Wassarman et Albertini, 1994).

Profáze prvního meiotického dělení je členěna do 5 fází (*leptotene, zygotene, pachytene, diplotene a diakineze*). V *leptotene* dochází ke spiralizaci chromozomů, jejich kondenzaci v jádře a chromozomy jsou viditelné jako štíhlá vlákna. Zároveň zanikají jaderné póry, chromatin se mění v heterochromatický obsahující denzní granula, jejichž počet se postupně zvyšuje (Sládeček, 1986, Wassarmann, 1988). Fáze *zygotene* je charakteristická přikládáním homologních chromozomů a vznikem bivalentů. V následujícím stádiu, *pachytene,* dochází ke zkracování bivalentních chromozomů a jejich podélnému rozštěpení na 2 chromatidy. Následným překřížení odpovídajících úseků homologních chromozomů (crossing – over) je zajištěno rekombinací nesesterských chromatid. Poté, v *diplotenním* stadiu, se od sebe chromatidy začínají oddalovat, nicméně zůstávají spojeny v chiazmatech, kde je dokončována výměna genetického materiálu. V posledním stádiu - *diakinezi*, též označovaném jako *diktyotenní stádium*, se rekombinované chromozomy zcela oddalují a dochází k zastavení meiózy – I. meiotickému bloku. Tato syntetická aktivita charakterizuje změnu oogonie v oocyt (Wassarmann, 1988), mluvíme o tzv. primárním oocytu. V tomto

období primární oocyt přetrvává různě dlouhou dobu a jeho jádro je označováno jako zárodečný váček – germinal vesicle, GV (Sládeček, 1986, Wassarmann, 1988, Wassarman et Albertini 1994).

Vznik primárních oocytů začíná u prasat od 35. dne embryonálního vývoje (Hunter, 2000), většinou však kolem 40. dne (Black et Erickson, 1968, Wassarman et Albertini, 1994), kdy jsou všechny oogonie ve stadiu profáze I. meiotického dělení a zastavují se v I. meiotickém bloku.

2.2 Folikulogeneze a její regulace

Během folikulogeneze dorůstá folikul do velikosti ovulačního, prochází změnami, které mu umožňují endokrinní aktivitu a tvoří prostředí pro oocyt, který roste společně s folikulem a prochází sérií definovaných fází, ve kterých se formuje až do svého konečného stadia růstu (Bielańska-Osuchowska, 2006).

Současně se zahájením meiotického dělení začíná být primární oocyt obklopován jednou vrstvou plochých pregranulozních buněk a celý komplex tvoří primordiální folikul (Romanovský et al., 1988; Wassarman et Albertini, 1994), označovaný též jako nerostoucí (Wassarman et Albertini, 1994) a je tak odstartován proces folikulogeneze. Somatické buňky primordiálního folikulu nejsou endokrinně aktivní a neobsahují receptory pro folikulostimulační hormon (Oktay et al., 1997). U prasnice je množství těchto folikulů při narození přibližně 500 000 (Black et Erickson, 1968) a do puberty se jejich množství sníží na cca 210 000 až 420 000. Více než 99% těchto folikulů vzniklých v časném embryonálním vývoji je přitom předurčena k zániku atrézií (Kanitz et al., 2001).

Později podstupuje část primordiálních folikulů intenzivní proliferaci, při které jsou ploché (pre)granulózní buňky přeměňovány na kubické a označují se jako granulózní (Eppig, 2001). Z nerostoucích primordiálních folikulů se stávají rostoucí primární folikuly, granulozní buňky se začínají dělit a oocyt zahajuje svůj růst ve folikulu (Wassarman et Albertini, 1994; Sládeček, 1986).

Většina primárních folikulů zůstává dlouhou dobu v klidovém stavu vývoje. Postupným zvyšováním počtu vrstev granulózních buněk obklopujících rostoucí oocyt vzniká *membrana granulosa* a folikul je označován jako sekundární, preantrální (Epigg, 2001). Vazivová vrstva obalující granulózní buňky, epiteliální buňky a buňky v blízkosti bazální

membrány se diferencují v *theca foliculi interna* a *externa* (Eppig, 2001; Kanitz, 2001). Buňky *theca foliculi interna* jsou endokrinně aktivní a produkují pod vlivem luteinizačního hormonu (LH) androgeny, které jsou granulózními buňkami přeměňovány na estrogeny (Vanderhyden, 2002). V těsné blízkosti oocytu jsou granulózní buňky vyšší, cylindrické a tvoří vrstvu nazývanou *corona radiata* (Eppig, 2001). Jednou z důležitých změn v růstové fázi sekundárního oocytu je vytvoření glykoproteinové vrstvy – *zona pellucida*, která tvoří bariéru mezi oocytem a vrstvou buněk *corona radiata* a hraje významnou roli při oplození (Kanitz, 2001). U prasat dosahují tyto folikuly velikosti okolo 2 mm a mohou se objevit již záhy po narození samice (Oxender et al., 1979; Kanitz, 2001).

S postupující folikulogenezí se mezi folikulárními buňkami objevují štěrbiny, které se pod vlivem gonadotropinů plní folikulární tekutinou – *liquor foliculi*. Postupně se štěrbiny začínají slévat a ve folikulu se utváří dutina – *antrum foliculi*, která se následně zvětšuje a vzniká terciární (antrální) folikul (Romanovský et al., 1985). V antrálním folikulu se granulózní buňky dělí dle umístění na kumulární buňky, které jsou spojeny s oocytem a jejichž součástí je *corona radiata* a murální granulózní buňky lemující folikulární stěnu. Murální granulózní buňky nejblíže antru se nazývají periantrální granulózní buňky (Eppig, 2001). Uvnitř folikulu se nachází oocyt obalený vrstvou kumulárních buněk, který se v důsledku zvětšování folikulu přesouvá ze své původní centrální pozice excentricky, k okraji folikulu a tvoří vejconosný hrbolek – *cumulus oophorus*. Během několika následujících dní se folikulární buňky začnou rychle dělit, jejich počet se zvětší až na 50 000 a v této fázi hovoříme o Graafově folikulu, který se vlivem zvyšující se produkce folikulární tekutiny vyklenuje nad povrch vaječníku a je připraven k ovulaci a tvoří tedy poslední vývojové stadium folikulu (Wassarman et Albertini 1994; Romanovský et al. 1985; Picton et al. 2008). U prasete dosahují velikosti 8 - 10 mm (Hunter, 2000).

Celková délka vývoje folikulu z primordiálního stadia až do zformování *antra* je druhově specifická. Zatímco u hlodavců (myš, potkan) se jedná o týdny, u velkých hospodářských zvířat jsou potřeba 4 měsíce (Wassarman et Albertini, 1994) i déle (5-6 měsíců, Hunter, 2000). Stejně tak i doba zahájení růstu primordiálních folikulů je druhově odlišná. U hlodavců, zajíců a šelem začíná až postnatálně, zatímco u člověka a domácích zvířat, včetně prasete, začíná již v prenatálním období (Picton, 2001). U prasat se primární folikuly objevují přibližně od 70. dne březosti, sekundární od narození a antrální folikuly asi od 60. dne věku (Oxender et al., 1979). První antrální folikul u prasnice se objevuje přibližně od 70. dne po narození (Hunter, 2000; Oxender et al., 1979) a $^{3}/_{4}$ primordiálních folikulů

projde atrezií před dosažením pohlavní zralosti a navíc z tohoto množství dosáhne ovulace pouze zlomek (Telfer et al. 2000). Oocyty v těchto folikulech zůstávají ve stejné fázi meiotického zrání až do pohlavní dospělosti, dokud neobdrží impuls ke znovuzahájení meiózy před ovulací. V případě, že nedojde k ovulaci, oocyt i celý folikul zanikají procesem označovaným jako atrézie (Wassarman et Albertini, 1994).

Faktory podílející se na regulaci oogeneze a folikulogeneze se liší v období před a po narození samice. Obecně lze říci, oogeneze/folikulogeneze je v prenatálním období řízena intraovariálními faktory (Hunter et Paradis, 2009) a postnatální vývoj je ovlivňován neurohumorálně, řídící centra jsou reprezentována jednotlivými částmi mozku (kůra koncového mozku, hypotalamus, hypofýza), ovárii a také dělohou. Tento řídicí systém lze považovat za uzavřený kruh, ve kterém funkčně nadřazené orgány ovlivňují funkce níže položených struktur a naopak. Celé řízení je založeno na principu zpětných vazeb, které mohou být pozitivní nebo negativní. Negativní zpětnou vazbou jsou kontrolovány téměř veškeré biologické děje související s reprodukcí, nicméně méně běžná pozitivní vazba zde hraje také svoji nezastupitelnou roli (Noakes et al., 1996).

Vznik ovariálních folikulů a oocytů probíhá zejména v prenatálním období, kdy dochází k vytvoření vaječníku jeho řízení Hunter et Paradis (2009) dělí na 3 období:

1) řízení iniciace folikulárního růstu a preantrální vývoj ovariálních struktur

2) řízení antrálního vývoje folikulů

3) řízení periovulační periody.

Přesný mechanismus řízení folikulogeneze, iniciace a výběru primordiálních folikulů určených k růstu a nepodléhající regresi, není stále zcela objasněn. Některé regulační faktory produkované oocytem mají vliv na průběh folikulogeneze. Za klíčové intraovariální faktory podílejícími se na řízení migrace PGC a ovlivňující časný folikulární vývoj u prasete jsou považovány ligand c-kit/Kit, superrodina TGF- β (transformující růstový faktor β) a anti Mullerův hormon (Hunter et Paradis, 2009). Růst a vývoj folikulů je závislý také na přísunu metabolických faktorů a živin krví, jak je patrné z rozmístění rostoucích folikulů v částech ovarií bohatých na cévy (Picton, 2001).

Vývoj antrálních folikulů začíná formací dutiny, k čemuž dochází u prasat zhruba 70 dní po narození (Oxender et al., 1979) a v této době začne být folikul závislý na gonadotropinech (Morbeck et al., 1992). Celá kaskáda je spuštěna proteiny kisspeptiny

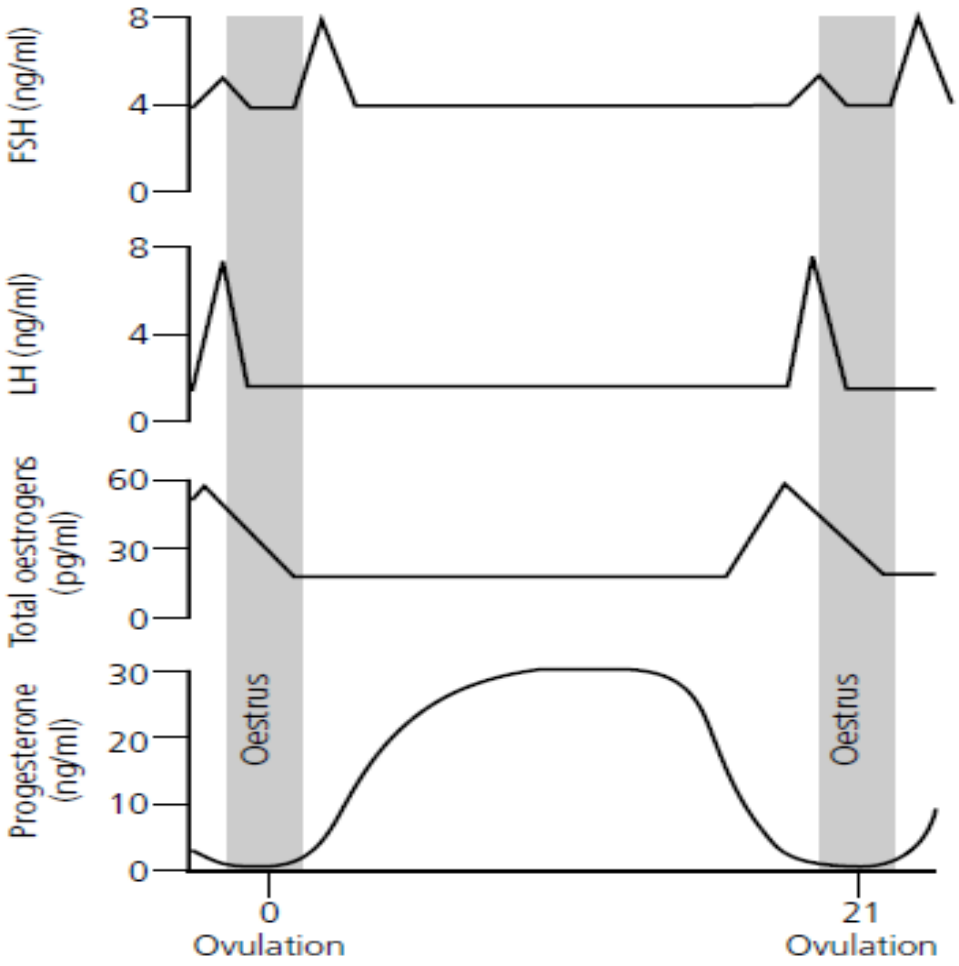
(Gottsch et al., 2009) a následně je uvolněn z hypothalamu polypeptid ze skupiny releasing hormonů – GnRH (Gonadotropin Releasing Hormon). Portálním cévním systémem se dostává do adenohypofýzy a pod jeho vlivem jsou uvolňovány gonadotropní hormony - LH a FSH (luteinizační a folikulostimulační hormon). FSH se v průběhu cyklu uvolňuje pulzním způsobem a antrální folikuly u prasat podstupují stejné růstové fáze (recruitment a selekce) jako je tomu u jiných hospodářských zvířat (Knox, 2005). FSH působí při náboru "spících" folikulů do skupiny rostoucích folikulů a reguluje tak jejich počet pro další vývoj (Knox, 2005). Vlivem negativního působení inhibinu produkovaného folikuly a současném zvýšení hladiny estradiolu dochází ke snížení produkce FSH a naopak navýšení produkce LH, čímž dochází k inhibici náboru nových folikulů a podpoře dalšího folikulární vývoje - selekci (Lucy et al, 2001; Wheaton et al., 1998). Dalším nezbytným růstovým faktorem při časném vývoji antrálních folikulů je IGF-1 (Insulin Like Growth Faktor 1), který zvyšuje počet FSH receptorů na folikulu (Guthrie, 2004).

Díky zvyšujícím se koncentracím estradiolu se začne uvolňovat LH, nastoupí tzv. LH vlna, čímž je podpořena tvorba velkých antrálních folikulů. Protože tyto folikuly obsahují dostatek LH receptorů, začnou tvořit velké množství estradiolu, zatímco malé folikuly, u kterých se nevyvinuly receptory pro LH, jsou závislé na FSH, podléhají atresii a v růstu pokračují pouze velké folikuly s dostatečným množstvím LH receptorů (Soede et al., 2011). Vznik velkých antrálních folikulů vede ke zvýšení produkce estradiolu, která stimuluje LH vlnu (Obrázek 1). Dosažení maximálních hladin estradiolu následně inhibuje produkci obou výše zmíněných gonadotropinů. Tím je zahájeno finální zrání folikulů za současného poklesu hladiny estradiolu (Noguchi et al., 2010). Během 2-3 dnů před ovulací (periovulační perioda) dosahuje produkce estradiolu preovulačním folikulem maximum. Tyto zvýšené koncentrace způsobí navození preovulační vlny LH mechanismem pozitivní zpětné vazby, což zapříčiní okamžitý pokles periferních koncentrací estradiolu (Noguchi et al., 2010). Samotný oocyt nemá receptory pro gonadotropiny, jeho úspěšné zrání je proto závislé na předání LH signálu prostřednictvím okolních granulózních a folikulárních buněk. K vzájemné komunikaci dochází prostřednictvím mezibuněčných spojů *gap junctions* (Eppig et al., 1991).

Interval mezi preovulačním peakem LH a peakem estradiolu je u prasat poměrně stálý (10,6 - 12,6 hodin) a stejně tak je tomu i u preovulačního peaku LH, který u prasete nastává 36-40 hod. před ovulací (Hunter, 2000). Preovulační vlna LH také iniciuje folikulární změny vedoucí k ovulaci a luteinizaci folikulární stěny, což spouští sekreci progesteronu (Soede et al., 2011). Proces ovulace u všech folikulů trvá 1 - 3 hod. u spontánně ovulovaných prasnic a

až 6 hodin u prasnic se synchronizovaným folikulárním růstem (Soede et al., 1998). Zvýšená koncentrace estradiolu ve folikulární tekutině se projevuje také na úrovni oocytů a je jedním z faktorů, kterým jsou primární oocyty udržovány ve stadiu zárodečného váčku (germinal vesicle – GV), tedy v I. meiotickém bloku. Následný pokles periferní koncentrace estradiolu způsobený preovulační vlnou LH, umožní ve spolupráci s dalšími faktory, znovuzahájení meiózy oocytů, tedy prolomení tohoto bloku (Hunter, 2000). V *in vitro* podmínkách jsou oocyty schopny zahájit meiózu spontánně po aspiraci z folikulů a jejich následné kultivaci za vhodných kultivačních podmínek (Telfer et al., 2000; Kanitz, 2001; Romanovský et al. 1985; Gilbert, 2000).

Obrázek č. 1 Schéma hormonálního profilu estrálního cyklu prasnice



Převzato z: Noakes et al. (1996).

2. 3. Růst oocytu

V průběhu folikulogeneze dochází k několikanásobnému zvětšení oocytu, řadě morfologických změn, intenzivní transkripci, translaci a syntéze nových organel a redistribuci těch stávajících (Kanitz, 2001; Picton, 1998; Wassarman et Albertini, 1994). Oocyty prasete rostou z původních 30 μm (bez *zona pellucida*) do průměru plně dorostlých oocytů, 120 - 125 μm (Hyttel et al., 1997, Wassarman et Albertini 1994). Syntéza a absorpce výživných a informačních molekul v růstové fázi oocytu jsou nezbytné jak pro růst, vývoj a dokončení meiózy, tak i pro oplození samotného oocytu a časný embryonální vývoj (Picton et al., 1998).

Přestože po celé období růstu jsou primární oocyty blokovány ve stadiu profáze I, jejich jádro (GV) se zvětšuje a dochází ke změnám v jeho stavbě, resp. distribuci a postupné kondenzaci chromatinu (Garagna et al., 2004). GV rostoucích oocytů obsahuje jedno velké jadérko, ale častěji jedno či dvě malá, které se během růstu zvětšuje. Jeho zvětšování je doprovázeno změnami ve struktuře, která se postupně mění z difúzní v kompaktní (Wassarman, 1988). Tyto změny svědčí o intenzivní syntéze RNA během růstu oocytu a vysoké míře transkripce rRNA (Moore, 1978). Množství RNA v oocytu se během růstu zvýší asi 300krát. V momentě, kdy oocyt dosáhne tří čtvrtin své konečné velikosti je množství RNA téměř stejné jako v plně dorostlém oocytu, který obsahuje přibližně 60-65 % rRNA, 20-25 % tRNA a 10-15 % mRNA (Bachvarova, 1985; Wassarman, 1988). Nicméně syntéza RNA pokračuje i v plně dorostlých oocytech, ačkoliv ve zmenšené míře a klesá v době zahájení meiotického zrání. Zda rostoucí oocyt sám syntetizuje všechny proteiny, není zcela jasné. Obecně lze říci, že v průběhu růstu oocytu je škála potřebných syntetizovaných proteinů obdobná, v jednotlivých fázích vývoje oocytu se však množství syntetizované RNA (Wassarman, 1988).

Během růstu oocytu se zvyšuje také množství endoplazmatického retikula koncentrovaného kolem jádra primárního oocytu a následně distribuovaného v cytoplazmě. V oocytu v terciárním folikulu se jeho množství snižuje (Fair et al., 1997). V průběhu růstu oocytu dochází také k prudkému nárůstu počtu mitochondrií i Golgiho aparátu a ke změnám v jejich tvaru i ultrastruktuře (Wassarman, 1988). V prasečích oocytech s dokončeným růstem dosahují mitochondrie velikosti 0,8 μm a mají kulovitý či oválný tvar (Norberg, 1972). U rostoucích oocytů je Golgiho komplex lokalizován na okraji oocytu v blízkosti *gap junctions*, kde vznikají kortikální granula (Rozinek et al., 1991). Tato lokalizace souvisí s úlohou Golgiho komplexu při vzniku kortikálních granul (Wassarman, 1988). U oocytů s ukončeným růstem dochází k jeho redistribuci do oblasti zárodečného váčku (Rozinek et al., 1991).

Kortikální granula jsou malé organely ohraničené membránou, které se nacházejí v kortikální oblasti oocytu. Po penetraci spermie do oocytu dochází k fúzi kortikálních granul s oolemou a vylití jejich obsahu do perivitelinního prostoru oocytu. Tímto mechanismem je zabráněno na základě změn funkčních vlastností *zona pellucida* polyspermickému oplození (Wassarman, 1988). Glykoproteinový obal *zona pellucida* obklopuje oocyty všech savců (Wassarman, 1988) a vytváří se okolo sekundárního oocytu. Během růstu oocytu se zvětšuje a u prasete dosahuje tloušťky 8,6 μm (Norberg, 1972). Postupně se *zona pellucida* odděluje od folikulárních buněk, nicméně je zachováno spojení mezi oocytem a nejvnitřnější vrstvou folikulárních buněk, *corona radiata*, protřednictvím výběžků, které provrtávají *zona pellucida* (Wassarman, 1988).

Vývoj a růst folikulu jsou tedy úzce propojeny a závisí na vzájemné komunikaci oocytu, kumulárních buněk, buněk granulózy a théky prostřednictvím *gap junctions*. Tyto buněčné kanály obsahující hexamer proteinů, connexin, a umožňují přenos látek s malou molekulovou hmotností (méně než 1kDa), jako ATP, metabolity, aminokyseliny, ionty či cAMP. Oocyt tak dostává biologicky aktivní molekuly, substrát pro energetický metabolismus a specifické buněčné signály koordinující jeho růst a zrání. Oocyt rovněž využívá těchto spojů pro aktivní kontrolu proliferace, morfogeneze a diferenciace granulózních buněk. Růst oocytu i jeho rychlost závisí mj. také na počtu granulózních buněk, které jsou s oocytem spojené prostřednictvím těchto spojů (Wassarman et Albertini 1994; Kanitz, 2001). Celý proces je zároveň regulován pomocí parakrinních signálů granulózních buněk (Hunter, 2000) a endokrinně, hypofyzárními gonadotropiny (Picton et al. 2008; Eppig, 2001; Krisher, 2004; Susiarjo, 2007). Granulózní a kumulární buňky jsou tedy pro růst oocytu nezbytné a oocyty zbavené těchto buněk nejsou schopné dokončit růstovou fázi oogeneze.

2. 4. Zisk meiotické kompetence

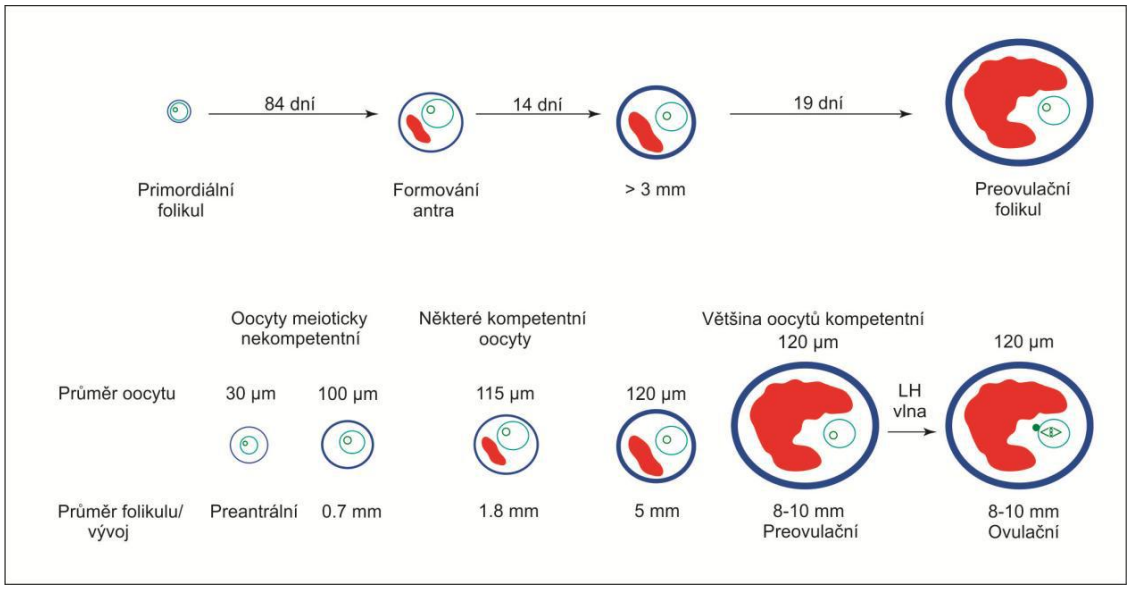
Meiotická kompetence je schopnost oocytu dokončit meiózu. V průběhu tohoto procesu se z oocytů neschopných znovu zahájit meiózu stávají oocyty plně kompetentní, schopné projít G2 fází buněčného cyklu a dokončit meiotické dělení do metafáze II (MII). Tuto schopnost oocyt získává postupně během své růstové fáze při vývoji z preantrálního folikulu v antrální (Hunter, 2000; Wassarman, 1988, Wassarman et Albertini, 1994; Matzuk et al., 2002). Zisk meiotické kompetence probíhá ve dvou fázích. Oocyty jsou nejdříve schopné zahájit meiotické dělení, prochází rozpadem zárodečného váčku (germinal vesicle

breakdown – GVBD) a kondenzace chromozomů a následného dosažení metafáze I (MI). Poté oocyt získává schopnost dokončit svůj vývoj z metafáze I až do stádia metafáze II (Wassarman, 1988, Motlík et al., 1984).

Zisk meiotické kompetence závisí na velikosti oocytu i celého folikulu, které jsou druhově specifické. Pouze meioticky kompetentní oocyty jsou schopné projít I. a II. meiotickým blokem v profázi I a metafázi II. Na počátku svého vývoje nejsou oocyty schopny meiotické zrání zahájit a jsou tedy zcela meioticky nekompetentní. Tyto oocyty neprojdou GVBD, nejsou schopné prolomit meiotický blok a zůstávají v profázi I. Meioticky nekompetentní oocyty dosahují u skotu velikosti 95 μm a u prasete velikosti 100 μm (Telfer, 2000). Později, v průběhu růstu, získávají oocyty částečnou meiotickou kompetenci, tzn. jsou schopné meiotické zrání zahájit, projít GVBD a vstoupit do MI, nejsou však schopné meiotické zrání dokončit. Pouze oocyty s ukončeným růstem se následně stávají plně meioticky kompetentní, schopné dokončit meiotické zrání dosažením MII, kde nastává II. meiotický blok. Tyto oocyty pocházejí z antrálních folikulů jejichž velikost je druhově specifická (Motlík et al., 1984; Romanovský et al. 1985; Wassarman et Albertini 1994; Telfer et al. 2000).

U prasete oocyty menší než 100 μm vyjmuté z folikulů velikosti 0,4 – 0,8 mm nemají žádnou nebo jen omezenou meiotickou kompetenci (Motlík et al., 1984, Motlík et Kubelka, 1990). Oocyty o velikosti 110 μm, které pocházejí z folikulů větších než 1 mm jsou schopné projít rozpadem zárodečného váčku, ale většina z nich zastaví meiózu ve stadiu MI, jsou tedy pouze částečně meioticky kompetentní (Telfer et al., 2000). Plně meioticky kompetentní oocyty s ukončeným růstem o velikosti 120 μm, pocházejí z antrálních folikulů větších než 2 mm v průměru a po 48 hodinové kultivaci *in vitro* jsou schopné dosáhnout stadia MII (Motlík et al., 1984; Hunter, 2000; Kanitz, 2001, Telfer et al. 2000) (viz. Obrázek č. 2)

Obrázek č. 2. Schéma korelace mezi růstem folikulu a oocytu u prasat



Převzato z: Hunter (2000)

2. 5. Znovuzahájení meiózy a meiotické zrání oocytů

Obnovení meiózy zastavené ve stadiu *diktyotene* a její následné zastavení v metafázi II je označováno jako zrání oocytu. Pouze oocyty, které prošly meiotickým zráním, jsou připraveny na oplození a následný embryonální vývoj. U savců dokončují oocyty první meiotické dělení v Graafových folikulech ještě před ovulací. *In vivo* je meiotické zrání znovu zahájeno vlivem hormonálních stimulů gonadotropinů FSH a LH. V podmínkách *in vitro* je impulzem pro znovuzahájení meiózy vyjmutí oocytu z folikulu a kultivace ve vhodném kultivačním médiu (Wassarman, 1988; Sirard et al., 1993). Většina savčích oocytů ovuluje v metafázi druhého meiotického dělení a v této fázi zůstávají do oplození či partenogenetické aktivace (Swann, 1993; Lawrence et al., 1997).

Z původního obrovského počtu primordiálních oocytů pouze zlomek podstoupí prolomení II. meiotického bloku, což je nezbytnou součástí úspěšného vývoje oocytů schopných oplození (Gilbert, 2000). Pro úspěšný průběh zrání oocytu i schopnosti fertilizace musí tento proces zahrnovat jak syntézu komponentů cytoplazmy, tak přeskupení a redukci počtu chromozomů. Oba tyto procesy probíhají souběžně a vzájemně se ovlivňují a jejich přesné načasování je nezbytné proto, aby oocyt dosáhl jaderného a cytoplazmatického zrání současně (Hunter, 2000).

Meiotické zrání je charakterizováno rozpadem zárodečného váčku, kondenzací chromozomů v bivalenty, oddělením homologních chromozomů, vydělením prvního pólového tělíska a zastavením meiózy ve fázi seřazení chromozomů ve druhé metafázní figuře. V průběhu zrání se snižuje počet mitochondrií, které jsou zároveň lokalizovány více perinukleárně. Kortikální granula, pocházející z Golgiho aparátu, se přemisťují na periferii oocytu. Společně se změnami v uspořádání jádra (např. kondenzace chromatinu, GVBD, formace dělícího vřeténka) je meiotické zrání doprovázeno značnou fosforylací a defosforylací cytoplazmatických proteinů – zejména kinázy cdc2 (v MPF) a MAPK (Kanitz, 2001; Wassarman et Albertini, 1994). K dokončení meiózy a vydělení druhého pólového tělíska dochází po fertilizaci ovulovaného oocytu (Wassarman et Albertini, 1994).

Jaderné zrání je zahájeno rozpadem zárodečného váčku, kondenzací chromozomů do bivalentů, rozchodem homologních chromozómů, vydělením pólového tělíska a zastavením meiózy ve stadiu metafáze II, označovaném jako II. meiotický blok (Motlík et Kubelka, 1990; Hafez et Hafez, 2000). Před zahájením zrání se oocyt nachází ve stadiu zárodečného váčku s chromatinem ve formě jemných vláken a jasně ohraničenou jadernou membránou (Thibault et al., 1987; Hafez et Hafez, 2000). Následně, pod vlivem preovulační vlny LH nebo atretickou degenerací folikulu *in vivo* dochází k rozpadu zárodečného váčku. Během GVBD se výrazně mění morfologická struktura zárodečného váčku. Chromatin kondenzuje a chromozomy se stávají barvitelné. Poté se postupně kompletně rozpouští jaderná membrána na membránové dublety, které se připojují k endoplazmatickému retikulu, a jadérko zaniká krátce po kontaktu s cytoplazmou. Současně dochází k tvorbě dělícího vřeténka. U prasečích oocytů tento proces trvá v *in vitro* podmínkách až 18 hodin (Wassarman, 1988).

V následující metafázi I chromozómy ztratí kontakty s fragmenty jaderného obalu a seřadí se v ekvatoriální rovině u formujícího se dělícího vřeténka metafáze I. na které se přichytí páry chromozomů doposud spojené s bivalenty (Hafez et Hafez, 2000). U prasete je tohot stadia meózy dosaženo po 24 hodinách kultivace *in vitro*. Tato fáze trvá u prasete 24 hodin. Mikrotubuly s napojenými kinetochory a ostatními volnými mikrotubuly se organizují v mikrotubuly organizujících centrech (microtubule organizing centers – MTOCs). Mikrotubuly vybíhají z těchto center a procházejí mezi fragmenty jaderné membrány do nukleoplazmy (Thibault et al., 1987), kde jsou připojeny na kinetochory každé chromatidy všech chromozómálních homologů (Hafez et Hafez, 2000). Spolu s polárními mikrotubuly probíhajícími od pólu k pólu tvoří první meiotické dělící vřeténko (Calarco, 1972). V anafázi I (AI) se bivalenty pohybují směrem k opačným koncům vřeténka a vřeténko se otáčí o 90°,

což souvisí s mikrofilamety tvořenými především aktinem (Thibault et al., 1987). Po rozchodu homologních chromozomů k opačným koncům vřeténka proběhne asymetrické rozdělení cytoplazmy oocytu, přičemž obě její části obsahují polovinu chromozómálního kompletu (Hafez et Hafez, 2000). V anafázi, na rozdíl od mitotického dělení, putují k pólům dělícího vřeténka dvouchromatidové chromozómy z bivalentů. Tím je dosaženo redukce výchozího diploidního počtu chromozómů na hlaploidní (Wassarman, 1988; Romanovský et al., 1988; Eppig, 1991). V telofázi I (TI), poslední fází prvního meiotického dělení, se tvoří tzv. „midbody" (membránou obklopený vakuolární bazofilní kruh kolem střední části telofázního vřeténka) a vyděluje se první pólové tělísko (Wassarman et Albertini 1994). Rovněž se objevuje perivitelinní prostor a dochází ke snížení objemu oocytu (Thibault et al., 1987, Wassarman et Albertini 1994; Alberts et al. 1998; Hafez et Hafez, 2000). Následující II. redukční dělení je téměř shodné s mitózou, ale zúčastňuje se ho pouze haploidní sada dvouchromatidových chromozómů (Motlík et Kubelka, 1990). V oblasti oocytu bez organel bohaté na mikrofilamentární aktin, vzniká dělící aparát metafáze II (Hafez et Hafez, 2000). MTOCs nejsou spojeny s dělícím vřeténkem a nacházejí se v cytoplazmě v korové části oocytu (Hafez et Hafez, 2000). K vývoji po metafázi II, kdy dojde k oddělení chromatid a vydělení 2. pólového tělíska dochází až po oplození nebo partenogenetické aktivaci oocytu. Poté druhé pólové tělísko rovněž degeneruje. U prasete se oocyt dostane za 44 hodin od počátku meiotického zrání. Pokud nedojde k oplození nebo k partenogenetické aktivaci, oocyt zaniká (Wassarman, 1988).

Cytoplasmatické zrání zahrnuje události, při kterém se uskutečňuje celá řada biochemických a morfologických změn, které umožní oocytu dokončit jaderné zrání, oplození a následný embryonální a fetální vývoj (Gosden, 2002, Wassarman et Albertini 1994). Kvalita cytoplazmatického zrání patří mezi nepřímé ukazatele posouzení schopnosti zralého oocytu podstoupit normální oplození, rýhování a tvorbu blastocysty. Cytoplazmatické zrání probíhá i v době meiotického bloku, kdy je oocyt závislý na produkci, změně a redistribuci nových genů a organel (Stojkovic et al., 2001). Kromě dynamických změn cytoskeletu a endoplasmatického retikula v souvislosti s jaderným zráním dochází během cytoplazmatického zrání ke zvyšování počtu lipidových a glykogenových složek oocytu a zároveň jsou syntetizována kortikální granula, která migrují v oolemě oocytu. Rovněž se mění počet mitochondrií, jejich aktivita i distribuce v oocytu (Hyttel et al., 1997; Picton et al, 1998). Kolem zárodečného váčku se v době jeho rozpadu začínají mitochondrie seskupovat do tvaru prstence. Po vydělení pólového tělíska se dočasně rozptýlí, ale v době II.

meiotického bloku se opět shlukují. Tato redistribuce mitochondrií je umožněna prostřednictvím cytoskeletárních mikrotubulů a mikrofilament (Ferreira et al., 2009). Pokud však nedojde k vytvoření mitochondriálních shluků, meiotické zrání je z důvodu nedostatku potřebné energie zastaveno v metafázi I. (Thibault et al., 1987).

Do samotného průběhu i regulace meiotického zrání významně zasahují také kumulární buňky. Podílejí na udržení oocytu v meiotickém bloku, ale i na opětovném zahájení meiózy a podpoře následného cytoplazmatického zrání oocytu (Tanghe, 2002). Jedná se o skupinu těsně spojených granulózních buněk obklopujících oocyt a v antrálním folikulu tvoří tzv. c*umulus oophorus* lokalizovaný na periferii folikulu. Jako odpověď na LH peak z adenohypofýzy se začne významně měnit morfologie těchto buněk a syntetizovat kyselina hyaluronová, což má za následek rozvolnění doposud těsně spojených kumulárních buněk, zvětšení prostoru mezi nimi a obalení glykosaminoglykanovou matrix. Prostor mezi kumulárními buňkami je vyplněn hmotou mucinozní povahy, proto je tento proces nazýván též mucifikací, či expanzí (Wassarman et Albertini, 1994; Li et al. 2004; Gilbert, 2000). Expanzi kumulárních buněk doprovází a ovlivňuje zrání savčích oocytů, v *in vivo* i *in vitro* podmínkách. Expanze kumulárních buněk je významná nejen z hlediska meiotického zrání, ale usnadňuje také oplození a zodpovídá za optimální vyplavení celého kumulooocytárního komplexu z folikulu při ovulaci. Expandované buňky zůstávají v komplexu s oocytem až do doby oplození (Gilbert, 2000; Susiarjo, 2007; Vanderhyden, 2002; Wassarman et Albertini, 1994; Li et al., 2004).

2. 6. Vybrané faktory ovlivňující znovuzahájení meiózy a meiotické zrání

Vývoj oocytů je, podobně jako ostatní buněčné procesy, ovlivňován řadou faktorů, které regulují znovuzahájení meiotického zrání oocytů, stejně jako zabraňují spuštění meiózy v nevhodnou dobu. Tyto procesy vyžadují souhru mezi oocytem, extracelulárními membránami a prostředím a jsou ovlivněny řadou metabolických drah. Jejich bezchybný sled je nutným předpokladem pro dokončení meiotického zrání a následnou aktivaci či oplození oocytů. Opětovné zahájení meiózy spočívá ve dvou odlišných mechanismech – pozitivní stimulaci a odstranění inhibičních faktorů či signálů (Tosti et Boni, 2004).

Hlavními regulačními systémy řídící průběh meiotického zrání jsou MPF a MAPK, ale i cytostatický faktor, cyklické nukleotidy, protein kinázy, plynné molekuly či ionty jako

například vápník. Klíčovým mechanismem, kterými tyto faktory průběh meiotického zrání ovlivňují jsou fosforylace a defosforylace proteinů.

MPF (Maturation Promoting Factor)

MPF je považován za univerzální regulátor mitotického i meiotického cyklu (Nurse, 1990), který reguluje enzymatickou aktivitu přechodu z G2 fáze buněčného cyklu do M fáze. Je nezbytný pro opětovné zahájení meiózy, které je doprovázeno a regulováno zvýšením aktivity kináz (Christmann et al., 1994). MPF je heterodimerický komplex složený ze dvou podjednotek s odlišnou funkcí – katalytická podjednotka serin/threonin protein kináza $p34^{cdc2}$ z rodiny cyklin dependentních kináz, označovaná také jako CDK 1 (cyklin dependentní kináza) a regulační podjednotka cyklin B1 (Gautier et Maller 1988, Jones, 2004).

Zisk meiotické kompetence oocytu je spojen se zvýšením syntézy cyklinu B a aktivací CDK1. Po spojení obou podjednotek MPF vznikne neaktivní komplex $p34^{cdc2}$/cyklin B, tzv. pre-MPF, který se po vytvoření folikulárního antra již nehromadí, ale rozvíjí se schopnost tento komplex aktivovat (Gautier et al., 1991, Kanayama et al., 2002; Alberts et al., 1998; Wassarman et Albertini, 1994; Johnson et al., 2005). Aktivace celého komplexu je spojena také se specifickou fosforylací a defosforylací $p34^{cdc2}$ (Gautier et al., 1991), které se účastní řada kináz a fosfatáz (Stojkovic et al., 1999). Množství CDK 1 a cyklinu B je v nezralém oocytu a v oocytu s ukončenou růstovou fází podobné. Aktivace MPF je umožněna u oocytu s ukončeným růstem až po defosforylaci $p34^{cdc2}$ na reziduích threoninu 14 a tyrozinu 15 pomocí cdc25 fosfatázy. V době zastavení meiotického zrání je cdc25 kináza udržována v inaktivním stavu inhibiční fosforylací a defosforylací katalyzovanou různými kinázami a fosfatázami, včetně kalmodulin dependentní protein kinázy II (CaMKII), protein kinázou A (PKA) a protein fosfatázou 2 (PP2A). Pozitivní zpětnou vazbou cdc25c je MPF aktivován, což vede k hyperfosforylaci cdc25c. Tento sled událostí vede ke zvýšení MPF a inhibici protein fosfatázy PP2A (Zhao et al, 2008; Yamamoto et a., 2011). Aktivita cdc25 fosfatázy je regulována a aktivována také polo-like kinázou 1 (Plk1), která umožňuje přechod cyklinu B z cytoplazmy do jádra (Stojkovic et al., 1999, Anger et al, 2003) a/nebo Myt1 kinázou (Mueller et al., 1995). Na aktivaci MPF se podílí také přísun cAMP prostřednictvím *gap junctions* - dokud přísun cAMP trvá, jeho hladina v oocytu brání aktivaci MPF (Dekel et al., 1988). V nedávné době byla popsána další složka MPF, Greatwall kináza (Gw1), která

inhibicí anti-mitotických fosfatáz reguluje vstup oocytu a jeho udržení v M-fázi buněčného cyklu i znovuzahájení meiózy (Hara et al., 2012).

Vzniklý komplex MPF fosforyluje a reguluje řadu substrátů včetně jaderných laminů, histonu H1, transkripčních faktorů, kinesinových motorů a regulátorů cytoskeletu (Nigg, 2001). MPF se také podílí na fosforylaci dalších klíčových enzymů, jako je Mos a skupina MAP kináz (Fan et al., 2002b). Zvýšením MPF dochází k rozpadu jaderné membrány, kondenzaci chromozomů a vytvoření dělícího vřeténka (Gautier et Maller, 1988, Dunphy et al., 1988). Aktivace tohoto komplexu je pro znovuzahájení meiózy nezbytná u všech živočišných druhů.

Vedle výše zmíněných regulačních faktorů je aktivita MPF regulována zejména pomocí změn hladin cyklinu B v průběhu buněčného cyklu (Jones, 2004). Zatímco hladina CDK 1 je v buňce konstantní po celou dobu cyklu, cyklin B je průběžně syntetizován a degradován a jeho množství tedy kolísá (Pines, 1999), čímž je regulována aktivita CDK 1 (Alberts et al., 1998). Fosforylace cyklinu B během aktivace MPF probíhá na serinových zbytcích Ser-94 a Ser-96. K nárůstu MPF dochází krátce před rozpadem zárodečného váčku a kondenzací chromozomů a prudce se zvyšuje v metafázi I. Inhibice MPF blokuje rozpad zárodečného váčku (Wu et al., 2002). Následná přechodná inaktivace MPF způsobená rozpadem cyklinu B umožňuje přechod z metafáze I do anafáze I. K opětovné reaktivaci aktivity MPF dochází vlivem CSF (cytostatic factor) přítomného v cytoplazmě u oocytů zastavených v metafázi II., kdy hladina MPF dosahuje nejvyšších hodnot (Motlík et Kubelka, 1990; Hashimoto et Kishimoto, 1988; Stojkovic et al., 1999; Kikuchi et al., 1999). Po oplození či partenogenetické aktivaci oocytu aktivita MPF klesá a II. meiotické dělení je dokončeno (Kikuchi et al., 1999).

Na regulaci aktivity MPF se podílí také komplex podporující anafázi - APC (Anaphase Promoting Complex), který je zodpovědný za snížení hladiny MPF v anafázi. Pomocí APC dochází k navázání ubikvitinu na cyklin B a degradaci proteazomem. Tímto způsobem je regulována segregace chromozomů (King et al., 1996).

MAPK (Mitogen Activated Protein Kinase)

MAP kináza patří do rodiny serin/threonin protein kináz, které se přímo účastní přenosu extracelulárních signálů v buňce a jsou proto označovány také jako extracelulárně

regulované kinázy (ERK) (Ferrell, 1996). V savčích oocytech byly nalezeny dvě formy ERK – ERK 1 (p44) a ERK 2 (p42) a v literatuře jsou často popisovány jako tzv. klasické MAPK (Stojkovic et al., 1999, Ferrell, 1996). U savčích oocytů je MAPK aktivována a regulována kinázovou kaskádou zahrnující MAP kinázy - Erk kinázy, označované jako MEK, které fosforylují specifické serinové a threoninové zbytky (Ferrell, 1996, Payne et al., 1991). Na aktivaci MAPK se podílí také člen rodiny MEK – protoonkogen *mos* (Gotoh et al., 1995, Mansour et al., 1994).

MAPK je aktivována v době rozpadu zárodečného váčku (GVBD). Ve vztahu MAPK a MPF v časných fázích meiotického zrání jsou rozdíly mezi jednotlivými živočišnými druhy i ve výsledcích jednotlivých studií. U bovinních oocytů je aktivace MPF a MAPK zahájen ve stejnou dobu při GVBD (Motlík et al., 1998, Wehrend et Meinecke, 2001), zatímco např. MAPK oocytů kozy je aktivována po aktivaci MPF a GVBD. U myši se MAPK aktivuje až po aktivaci MPF (Stojkovic et al., 1999).

Také na časovou souslednost fáze meiotického zrání a dobu aktivace MAPK existuje v odborné literatuře několik odlišných pohledů. Inoue et al. (1995) se domnívají, že MAPK je u prasečích oocytů aktivována po GVBD, zatímco výsledky pozdějších studií ukazují na aktivaci MAPK již v průběhu GVBD (Motlík et al., 1998, Lee et al., 2000). Řada autorů studií však zastává názor, že k aktivaci MAPK u prasečích oocytů dochází již před GVBD či aktivací MPF (Inoue et al., 1998, Wehrend et Meinecke, 2001, Sugiura et al., 2002). Tyto odlišnosti mohou být dány výraznou heterogenitou populace prasečích oocytů. Ye et al. (2003) proto použili pro experimenty cykloheximid, nespecifický inhibitor syntézy proteinů, který může reverzibilně inhibovat znovuzahájení meiozy u prasečích oocytů (Fulka et al., 1986) a dospěli k závěru, podobně jako Lee et al., (2000) a Sun et al., (2001), že MAPK je aktivována simultánně s aktivací MPF a GVBD. Částečná aktivace MAPK je dostačující pro vyvolání GVBD (Inoue et al., 1998), dokonce i když je aktivace MPF inhibována (Kubelka et al., 1996, Motlík et al., 1998). Na druhou stranu, aktivace MAPK není nezbytná pro aktivaci MPF ani znovuzahájení I. meiotického dělení u oocytů prasat (Ye et al. 2003), podobně jako u myší (Sun et al., 1999, Yamashita et al., 2000), viz Obrázek č. 3. Studie, ve kterých byly použity specifické inhibitory cdc25 kinázy naznačují, že MPF může vyvolat aktivaci MAPK (Kubelka et al, 2002).

U nezralých prasečích oocytů je MAPK neaktivní, lokalizovaná výlučně v cytoplazmě. Před zahájením GVBD se část MAPK přesune do zárodečného váčku (Stojkovic et al., 1999),

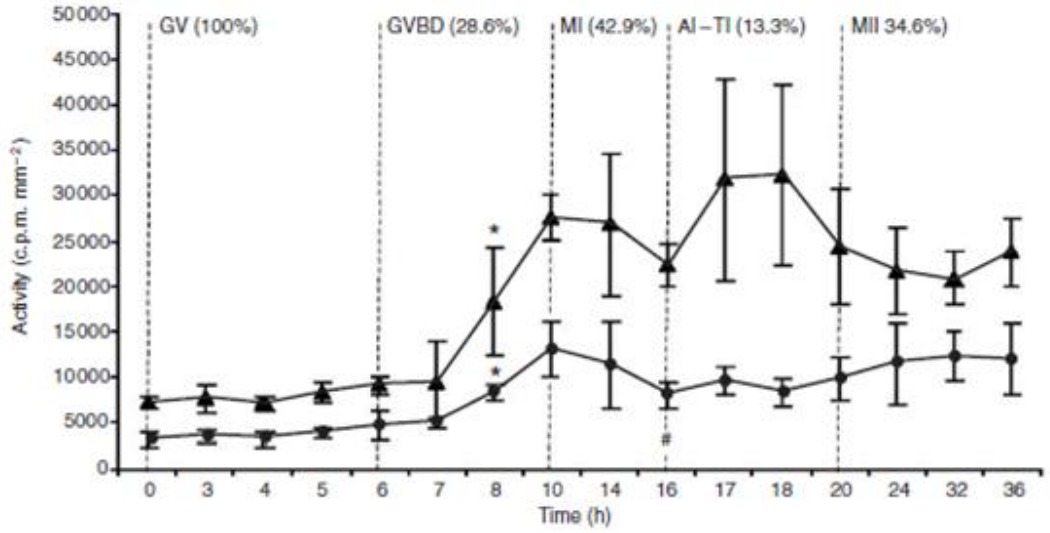
kde je aktivována. Aktivace MAPK v zárodečném váčku výrazně urychluje GVBD a pravděpodobně tak přenáší signály, které navozují znovuzahájení meiózy (Inoue et al., 1998).

Na rozdíl od MPF, kde dochází k přechodnému poklesu aktivity během anafáze I a telofáze I, zůstává aktivita MAPK vysoká po celou dobu meiotického zrání až do stadia metafáze II v době vydělení II. pólového tělíska (Hunter, 2000). Tímto mechanismem je zabráněno přechodu oocytu do interfáze (Dekel et al., 1995). K poklesu aktivity dochází až při vzniku prvojader po partenogenetické aktivaci či oplození (Sun et al., 2001, Zhang et al., 2012).

MAP kinázy regulují tvorbu a dynamiku organizace mikrotubulů, udržují kondenzaci chromatinu (Dekel et al., 1995, Li et al., 2002, Verlhac et al., 1994, Stojkovic et al., 1999). Fosforylací proteinů cytoskeletu a jaderné laminy zabraňují jejich předčasnému spojení a tvorbě jaderné membrány (Peter et al., 1990, Murray et Hunt, 1993, Wehrend et Meinecke, 2001). MAP kinázy se podílejí také na tvorbě dělícího vřeténka (Sun et Nagai, 2003) a vyloučení prvního pólového tělíska (Choi et al., 1996), stejně jako na zastavení meiózy v metafázi II (Villa-Diaz et Miyano, 2004).

MAPK hraje spolu s MPF, důležitou úlohu v cytoplazmatickém zrání oocytů prasete, protože se podílí na regulaci exprese klíčových maternálních genů a částečně i změnou v polyadenylaci/deadenylaci mRNA (Zhang et al., 2012).

Obrázek č. 3. Aktivita MPF a MAPK během meiotického zrání prasečích oocytů.



Převzato z Ye et al. (2003).

Vývoj aktivity MAPK a MPF v jednotlivých fázích meiotického zrání oocytů byl zjišťován pomocí „double-kinase assay" a procentuálně vyčíslen.

● *aktivita MPF,* ▲ *aktivita MAPK, GV – zárodečný váček, GVBD – rozpad zárodečného váčku, MI – metafáze I, AI-TI - anafáze I-telofáze I, MII - metafáze II*

CSF (cytostatický faktor)

Cytostatický faktor (CSF) je komplex proteinů podílející se na udržení II. meiotického bloku. CSF je obsažen v cytoplazmě ovulovaných oocytů, kde brání degradaci cyklinu B a tím stabilizuje aktivitu MPF (Haccard et al., 1993; Masui et Markert, 1971; Murray et Kirschner, 1989; Fan et Sun, 2004). Katalytickou součástí CSF je serin/threonin kináza, Mos, která je produktem proto-onkogenu c-mos a ve zrajícím oocytu je exprimována ve značném množství (Hunt, 1992). Mos je nezbytný pro stimulaci aktivity MAP kinázy a jeho syntéza umožňuje přechod oocytu do M-fáze buněčného cyklu. Mos/MAPK kaskáda pravděpodobně slouží k aktivaci a stabilizaci MPF a MAPK a v průběhu meiotického zrání (Stojkovic et al., 1999; Hunt, 1992; Choi et l., 1996) a účastní se kontroly formace mikrotubulů a chromatinu (Verlhac et al., 1996), regulace velikosti pólového tělíska i jeho degenerace (Choi et al., 1996). K inaktivaci MPF a CSF v metafázi II dochází pod vlivem kalmodulin dependentní protein kinázy II (CaMKII), která je aktivována v průběhu oplození uvolněním vápníkových kationtů (Lorca et al, 1993). Jestliže oocyty nemají dostatek Mos, prochází druhým

meiotickým blokem a je u nich navozena partenogenetická aktivace (Choi et al, 1996). CSF se na uvolnění z meiotického bloku podílí také inhibicí anafázi podporujícího komplexu (APC) (Stojkovic et al., 1999). APC totiž blokuje přesun ubikvitin ligázy označující cyklin pro proteasomální degradaci a tím reguluje hladinu MPF (shrnuto v Nader et al., 2013).

Cyklický nukleotid cAMP

Cyklický adenosin 3´5´monofosfát (cAMP) patří také mezi molekuly zapojené do regulace meiotického zrání. V organismu působí cAMP jako druhý posel a jeho koncentrace hraje zásadní roli při rozpadu zárodečného váčku (GVBD), jako počátečního ukazatele meiotického zrání oocytů v *in vivo* i *in vitro* podmínkách. Pro udržení I. meiotického bloku v profázi I je nezbytná syntéza cAMP, který blokuje inhibici MPF a aktivaci MAPK (Fan et al., 2002). Následný výstup oocytu z meiotického bloku je závislý mimo jiné na snížení hladiny cAMP a v průběhu meiotického zrání zůstává hladina cAMP v oocytu již nízká. Hladina cAMP je regulována 2 enzymy – adenylát cyklázou (AC) a fosfodiesterázou (PDE). AC je lokalizovaná v cytoplazmatické membráně oocytu, kde katalyzuje tvorbu cAMP z ATP, zatímco PDE hydrolýzou cAMP na AMP snižuje hladinu cAMP (Dekel et al., 1988).

cAMP je syntetizován jak oocytem, tak i folikulárními buňkami (Mehlmann et al., 1995). Hromadění cAMP je zahájeno v časném antrálním folikulu prostřednictvím vazby folikulostimulujícího hormonu (FSH) na receptory na povrchu kumulárních a granulózních buněk oocytu. FSH působí na hladinu cAMP v těchto buňkách stimulačně, zatímco v oocytech jeho množství klesá a umožňuje opětovně zahájit meiotické zrání (Fan et al., 2002).

Cílovou molekulou v signální dráze cAMP v oocytech je cAMP dependentní proteinkináza A (PKA). Vazbou cAMP na regulační podjednotku PKA je enzym aktivován a může fosforylovat proteiny nutné k udržení meiotického bloku. Jestliže je hladina cAMP nízká, dojde k defosforylaci proteinů a znovuzahájení meiózy v meiotickém bloku (Bornslaeger et al., 1986, Wassarman, 1988). PKA je schopna fosforylovat cdc25c. Tato vazba negativně reguluje cdc25c, která z tohoto důvodu nemůže aktivovat CDK1. Těsně před rozpadem zárodečného váčku dochází k poklesu hladiny cAMP a tím i k poklesu aktivity PKA. Tímto snížením aktivity PKA je umožněna aktivace CDK1/cyklinu B. Aktivovaná PKA má tedy na meiotické zrání inhibiční vliv (Lazar et al., 2002).

Protein kináza C (PKC)

Protein kináza C (PKC) patří mezi serin/threonin kinázy, které mohou být aktivovány pomocí kofaktorů Ca^{2+} a diacylglycerolu DAG (Newton, 1995). Na základě struktury regulační domény na NH_2 konci a způsobu aktivace jsou rozděleny do tří skupin – konvenční, nové a atypické (Newton, 1995, Hug et Sarre, 1993). Konvenční izoformy (PKC-α, -βI, -βII, -γ) jsou aktivovatelné volnými vápníkovými ionty, diacylglyceroly (DAG) a membránovým fosfolipidem fosfatidylserinem (PS). Tzv. nové PKC (PKC-δ, -ε, -μ, -ζ) neobsahují ve své molekule vazebné místo pro Ca^{2+}, ale pouze pro DAG. Mohou být aktivovány i fosfatidylserinem a nenasycenými mastnými kyselinami. Poslední skupinu PKC tvoří atypické izoformy (PKC-δ, -λ, -τ), jejichž aktivace není závislá na iontech vápníku ani na DAG (Newton, 1995, Liu et Heckman, 1998), přesto jsou na základě homologie s předchozími skupinami řazeny mezi PKC.

PKC se účastní mnohých signálních kaskád spojených s receptory a G-proteiny a dalších buněčných odpovědí (Dempsey et al., 2000), přechodu mezi jednotlivými fázemi buněčného cyklu (Newton, 1995), vstupu a výstupu oocytu z meiózy i překonání meiotického bloku (Viveiros et al., 2001). Vliv PKC na meiotické zrání se ovšem liší podle místa jeho aktivace. Pokud je PKC aktivována v kumulárních buňkách, meióza je znovuzahájena, zatímco aktivace v oocytech další průběh zrání inhibuje. Rozdílné působení PKC v kumulárních buňkách a oocytem může být dáno odlišnou expresí jednotlivých izoforem v těchto typech buněk (Downs et al., 2001).

I u prasete bylo potvrzeno zapojení PKC do regulace znovuzahájení meiotického zrání oocytů (Su et al., 1999; Shimada et al., 2001) a nutnost poklesu aktivity PKC pro přechod z metafáze I do metafáze II. (Fan et al., 2002a). Aktivita PKC v průběhu vývoje oocytu roste a nejvyšší je právě v pozdní MI fázi (Viveiros et al., 2001). Pokles aktivity PKC udržuje oocyt v II. meiotickém bloku a brání jeho vstupu do interfáze (Viveiros et al., 2001, 2004). Aktivita PKC je tedy nezbytná pro přerušení II. meiotického bloku a zároveň degradace MPF vyvolaná zvyšujícími se koncentracemi vápníku je závislá na aktivitě PKC (Su et Eppig, 2002; Fan et al., 2003). Aktivace PKC po GVBD zastavuje vývoj myšího oocytu v metafázi I. (Viveiros et al., 2001).

PKC je zapojena také v procesu aktivace oocytů u mnohých živočišných druhů, nicméně způsob jakým ovlivňují aktivaci a exocytózu kortikálních granul není zcela znám. Mnozí autoři prokázali zapojení kalcium dependentních izoforem PKC (Eliyahu et Shalgi,

2002; Fan et al., 2002a), zatímco např. Sedmíková et al. (2006) uvádí, že inhibice na vápníku nezávislé izoformy PKC-δ potlačuje aktivaci oocytu prasete pomocí kalcium ionoforu. Na druhou stranu Green et al. (1999) uvádějí, že inhibice PKC vede k aktivaci prasečích oocytů.

Oxid dusnatý (NO)

Další ze signálních molekul regulující buněčný cyklus je oxid dusnatý (NO), který je spolu s oxidem uhelnatým a sirovodíkem řazen mezi tzv. gasotransmitery, endogenně produkované plynné molekuly schopné volně difundovat skrz membrány (Wang, 2002). V signální kaskádě živočišných buněk slouží jako druhý posel, který je uvolňován ve stopovém množství a zapojen do regulace funkce buněk v řadě intracelulárních a intercelulárních pochodů, včetně reprodukčních. Doba působení NO je velmi krátká a pohybuje se v rozmezí 3-5 sekund (Ding et al., 2000; Calabrese, 2001; Dixit et Parvizi, 2001; Bu et al., 2003).

Syntéza NO je katalyzována enzymem syntázou oxidu dusnatého (NO-syntázou, NOS). NOS se vyskytuje ve třech izoformách - neuronová (nNOS), endoteliální (eNOS) a indukovatelná (iNOS) (Alderton et al., 2001). Pro enzymovou aktivitu všech tří izoforem je nezbytný kalmodulin, protože jeho vazba na NOS vyvolává konformační změny, které vedou k aktivaci (Nathan et Xie, 1994). Jednotlivé izoformy se navzájem liší katalytickými vlastnostmi, způsobem aktivace i regulace, lokalizací a celkovou funkcí v organismu (Pae et al., 2009). Všechny izoformy NOS byly prokázány mimo jiné i v oocytech prasete, kde se mohou podílet na zisku meiotické kompetence (Chmelíková et al., 2009) i na průběhu meiotického zrání (Chmelíková et al., 2010). NO zasahuje také do procesů spojených s aktivací oocytů (Kuo et al., 2000; Petr et al., 2005a). Není však schopen navodit exocytózu kortikálních granul a pomocí regulace vápníkových kanálů a pump ovlivňuje pouze množství vápníkových iontů v oocytech (Petr et al., 2005b).

NO je v oocytech syntetizován v průběhu celého procesu oogeneze až po časný embryonální vývoj (Jablonka-Shariff et Olson, 1998). Zasahuje rovněž do regulace meiotického zrání (Van Voorhis et al., 1995; Yamauchi et al., 1997; Jablonka Shariff et Olson, 1998; Olson et al., 2000), pravděpodobně prostřednictvím několika mechanismů. Významnou úlohu zde hraje regulace syntézy cyklických nukleotidů (Törnell et al., 1984; Törnell et al., 1990; Törnell et al., 1991; Jablonka-Shariff et Olson, 2000). NO aktivuje solubilní guanylát cyklázu, čímž dojde ke zvýšení hladiny cGMP (cyklický guanosin

monofosfát) v cílových buňkách (Schmidt et al., 1993). U myší stimuluje NO meiotické zrání oocytů prostřednictvím cAMP, zatímco mechanismus inhibice zrání probíhá prostřednictvím cGMP kaskády (Nakamura et al., 2002). cGMP snižuje aktivací cAMP-fosfodiesterázy (cAMP-PDE) hladinu cAMP v oocytu a tím umožňuje oocytu pokračovat v procesu zrání (Hubbard et Price, 1988). NO reguluje hladinu cAMP buď zvýšením syntézy cGMP nebo stimulací aktivity cAMP-PDE během přechodu oocytu z metafáze I do metafáze II (Jablonka-Shariff et Olson, 1998).

Účinky NO na meiotické zrání oocytů jsou závislé na jeho koncentraci, jak bylo potvzeno např. u myší či skotu. Zatímco v nízkých koncentracích působí stimulačně, vyšší koncentrace mohou mít naopak inhibiční efekt (Sengoku et al., 2001; Bilodeau-Goeseels, 2007; Bu et al., 2003; Viana et al., 2007). Vysoká množství NO jednoznačně inhibovala znovuzahájení meiózy oocytů prasat i skotu (Tao et al. 2005; Bilodeau-Goeseels, 2007). Nicméně, inhibice iNOS v oocytech skotu neovlivnila GVBD, ale zabránila expanzi kumulu a přechodu z metafáze I do metafáze II (Matta et al., 2009).

NO je nezbytný pro meiotické zrání oocytů myší, jak bylo prokázáno na NO produkovaném iNOS. Uplatňuje se především pro při rozpadu zárodečného váčku, přechodu z anafáze do telofáze, vydělení prvního pólového tělíska a fosforylaci MAPK (Huo et al., 2005). Zároveň neschopnost syntetizovat NO vede u myší s vyblokovaným genem pro eNOS k narušení zrání oocytů *in vitro* i *in vivo,* které se projevilo zpomalením procesu GVBD, snížením počtu oocytů schopných dosáhnout metafáze II či patologickými změnami na oocytech (Jablonka-Shariff et Olson, 1998; 2000). Izforma iNOS v organismu produkuje velké množství NO, zatímco zbylé izoformy nNOS a eNOS, jsou schopny jeho pouze nízké produkce této molekuly (Rosselli et al., 2000).

Vápník (Ca)

Vápník patří mezi významné intracelulární druhé posly uplatňující se v celé řadě fyziologických procesů v organismu, mj. jako růstový faktor, v hormonální signalizaci, genové expresi, apoptóze, regulaci buněčného cyklu, ale i oogenezi a meiotickém zrání (Homa et al., 1993) či oplození oocytů (Yanagimachi, 1981, Miyazaki, 1991).

U oocytů prasat bylo nejvíce vápníku nalezeno v karyoplazmě, vakuolách mitochondriích a na povrchu lipidových granul (Petr et al., 2001), vyšší množství kalciových depozit bylo zaznamenáno v jádru a cytoplazmě ve srovnání s mitochondriemi (Rozinek et al.,

2006). Za hlavní vápníkové depozitum je však považováno endoplazmatické retikulum (Mehlmann et al., 1995).

K vzestupu hladiny vápníku v oocytu během meiotického zrání a oplození dochází zejména prostřednictvím dvou signálních kaskád. Jedná se o dráhy využívající iontové kanály na membránách organel - ryanodinové receptory (RyR) a inositol 1,4,5-trifosfátovými receptory (IP_3R) lokalizované v endoplazmatickém retikulu. Množství vápníku v oocytu se může zvýšit také vstupem vápenatých iontů iontovými kanály v plazmatické membráně (Petr et al., 2002). IP_3R hrají významnou roli v regulaci meiózy oocytů mnohých živočišných druhů (Carrol et al., 1994; Yue et al., 1995). Vyplavení vápníku zprostředkované dráhou využívající RyR bylo zaznamenáno v oocytech skotu (Yue et al., 1995), člověka (Sousa et al., 1996), myši (Carroll et Swann, 1992; Ayabe et al., 1995). U oocytů prasat byly detekovány oba typy těchto receptorů (Machaty et al., 1997) a intracelulární zásoby vápníku mohou být mobilizovány prostřednictvím obou typů receptorů (Clapham, 1995) a prostřednictvím kamodulin-dependentní dráhy aktivují jejich *in vitro* zrání i aktivaci prasečích oocytů (Petr et al., 2002).

Periodické oscilace volných intracelulárních vápenatých iontů v savčích oocytech je spojováno s oplozením a aktivací oocytu vyvolané spermií či jiným stimulem (Swann et Ozil, 1994; Miyazaki et al., 1992), které umožňuje přechod z metafáze II (Petr et al., 2002, Miyazaki et al., 1993) prostřednictvím kalcium dependentní inaktivace CSF (Zernicka-Goetz et al., 1995). Dochází k tomu pravděpodobně destrukcí proto-onko genu c-mos a následné inaktivace cyklin B/p34cdc2 komplexu (Collas et al., 1993). Vyplavení vápenatých iontů vyvolané průnikem spermie během oplození způsobí pokles aktivity MAP kinázy, což je důležité pro dokončení meiózy (Lorca et al., 1993).

Vápenaté ionty se však výrazně uplatňují také při znovuzahájení meiotického zrání, časném výstupu z I. meiotického bloku (Carroll et al., 1994) ale i v průběhu zrání oocytů (Yanagimachi, 1994). Intracelulární oscilace vápníku jsou nezbytné pro spontánní meiotické zrání myších (De Felici et al., 1991) i prasečích (Kaufman et Homa, 1993) oocytů. Zapojení vápníku do průběhu GVBD a následného pokračování meiózy bylo potvrzeno přidáním chelátorů vápníku, které zablokovaly znovuzahájení meiózy u oocytů skotu (Homa, 1988) a prasete (Kaufman et Homa, 1993). Nicméně, pro dokončení GVBD nejsou u myší Ca^{2+} ionty potřebné (Carrol et Swann, 1992).

Přítomnost vápníku byla potvrzena již u nezralých oocytů, ale citlivost vápníkových receptorů je nižší. V průběhu meiotického zrání se jejich senzitivita zvyšuje, stejně jako schopnost uvolnit vápník z intracelulárních zásob dosahující maxima v oocytu ve stadiu metafáze II (Carroll et al., 1994; Mehlmann et Kline, 1994).

Kalmodulin je znám jako hlavní receptor pro vápníkové ionty a hraje významnou roli v buněčném cyklu (Means, 1994). Tento malý protein s molekulovou hmotností 17 kDa je přítomný ve všech eukaryotických buňkách a jeho úloha byla potvrzena při výstupu z metafáze II u žáby drápatky, *Xenopus laevis* (Lorca et al., 1991), nikoliv však myši (Xu et al., 1996). Konformace kalmodulinu je změněna po navázání vápníku a vzniklý komplex Ca^{2+} - kalmodulin je schopen odlišné interakce s cílovými proteiny (Slavov et al., 2013).

K proteinům tvořícím funkčně změněný komplex patří mj. i kalmodulin depedentní proteinkinázy (CaMK). Klíčovým přenašečem vápníku v průběhu meiotického zrání a aktivace oocytů je kalmodulin dependentní kináza CaMK II aktivovaná vápenatými ionty, která se účastní degradace cyklinu B a tím reguluje aktivitu MPF i MAPK a výstup oocytu z II. meiotického bloku (Fan et al., 2003, Lorca et al., 1993). Významně tak zasahuje např. do znovuzahájení meiotického zrání, vydělení pólového tělíska, výstupu z II. meiotického bloku či formace prvojader, jak bylo prokázáno i u prasete (Fan et al., 2003).

2. 7. Aktivace oocytu

Zralé oocyty savců zastavené v metafázi II čekají na aktivační stimul, který vyvolá degradaci či inaktivaci molekul zodpovědných za udržení oocytů ve II. meiotickém bloku a umožní dokončit II. meiotické dělení. Během aktivace oocytu dochází k velkému množství přesně definovaných morfologických a biochemických dějů, které nastávají po interakci spermie se *zona pellucida* a plazmatickou membránou oocytu a postupně přeměňují oocyt v totipotentní zygotu. Tyto změny vedou k plné aktivaci oocytu charakterizované znovuzahájením meiózy, exocytózou kortikálních granul, formací samčího a samičího prvojádra a zahájením embryonální genové exprese (Jones, 2005; Ramadan et al., 2012; Longo, 1997; Williams, 2002; Abbott et Ducibella, 2001; Williams, 2002; Ben Yosef et Shalgi, 1998; Yanagimachi, 1994).

Za fyziologických podmínek přináší stimul vyvolávající tyto změny do oocytu spermie v době oplození, kdy se váže na plazmatickou membránu oocytu (Yanagimachi, 1988).

Pomocí faktoru spermie - fosfolipázy C (PLC)-δ je penetrující spermie schopna vyvolat nárůst hladiny intracelulárního vápníku, který šíří od místa průniku spermie ve vlnách po celém oocytu (Saunders et al., 2002, Swann et Ozil, 1994) vedoucí k aktivaci oocytu. Vzestup vápníku a jeho následné oscilace jsou nezbytné pro znovuzahájení a dokončení meiózy oocytů savců (Sun et al., 1994; Alberio et al., 2001) a několik hodin po fúzi spermie s oocytem ustávají (Jones et al., 1995). Zdroj vápníku pro tyto oscilace pochází tedy z vnějšího prostředí i vnitrobuněčných zásob (Swan et al., 2006). V důsledku změn vyvolaných oscilací Ca^{2+} dochází k exocytóze kortikálních granul v kortikální oblasti oocytu pod oolemou (Abbott et Ducibella, 2001). Enzymy uvolněné z kortikálních granul do periviteliního prostoru způsobí změny na *zona pellucida* a zabrání dalším spermiím v navázání a proniknutí *zona pellucia* (Bleil et al., 1981).

Pro plnohodnotnou aktivaci oocytu je nezbytná přesná frekvence i amplituda jednotlivých oscilací vápníkových iontů (Vitullo et Ozil, 1992). Příliš vysoké či nízké amplitudy oscilací vápníkových iontů nejsou schopné navodit tvorbu prvojádra a příliš krátká doba oscilací vápníku v oocytu má za následek neschopnost oocytu dokončit druhé meiotické dělení. Zároveň bylo prokázáno, že i vysoká četnost a dlouhá doba trvání jednotlivých oscilací má na aktivaci oocytů negativní vliv a může vést k jejich zániku (Gordo et al., 2000). Ve frekvenci a délce trvání oscilací vápníku existují značné mezidruhové rozdíly a mohou se pohybovat v rozmezí 2 minut až několika hodin (Kleine et al., 1992; Fissore et al., 1992).

Klíčovým momentem aktivace oocytu je znovuzahájení meiózy, ke kterému dochází v době dekondenzace chromatinu spermie v cytoplazmě oocytu. Dekondenzace chromatinu je zahájena v kaudální části hlavičky a postupuje kraniálním směrem, kolem dekondenzovaného chromatinu se tvoří nová jaderná membrána a několik hodin po fúzi spermie s oocytem se začíná formovat samčí a samičí prvojádro (Yanagimachi, 2005). V průběhu znovuzahájení meiózy dochází také k rotaci meiotického vřeténka, rekruitmentu maternální RNA, vstupu do anafáze II a vyloučení 2. polového tělíska (Williams, 2002). U prasat celý proces trvá 8 hod. od inseminace (Ding et al., 1992). Obě prvojádra migrují prostřednictvím mikrotubulární sítě do centra oocytu. Následným zánikem jaderné membrány a splynutím prvojader je zahájeno první rýhovací dělení (Williams, 2002; Longo, 1997).

Před aktivací oocytu je buněčný cyklus zastaven a oocyt je díky MPF udržován v metafázi II (Verlhac et al., 1993). Po znovuzahájení meiózy se oocyty vrací opět do buněčného cyklu řízeného rovnováhou aktivit kináz a fosfatáz ovlivňujících činnost

buněčných proteinů (Williams, 2002). Meiotický blok je udržován MPF, která zůstává aktivní díky přítomnosti cytostatického faktoru bránícího degradaci cyklinu B1. Vzestup intracelulární hladiny vápníku po fúzi spermie s oocytem vyvolá degradaci cyklinu, která se projeví ztrátou aktivního cytostatického faktoru a inaktivací MPF. Tyto změny umožní pokračování meiózy oocytů do anafáze II (Lorca et al., 1993). Krátce po poklesu aktivity MPF, začíná klesat aktivita MAP kinázy (Moos et al., 1995), která je patrně nezbytná pro zformování prvojader (Miyano et al., 2000). Zatímco degradace cyklinu B v oocytu omezuje oscilace vápníku, MPF aktivita působí jako pozitivní regulátor (Lavasseur et McDougall, 2000).

V souvislosti se signálními drahami aktivace oocytu spermií a následnou fúzi gamet byla vyslovena řada teorií a přesný mechanismus regulace není dosud znám. Vápník se může dostat do oocytu prostřednictvím spermie při akrosomální reakci a v momentě, kdy dojde k fúzi oocytu a spermie. Vápník je pumpován do endoplazmatického retikula oocytu a to vede k vyvolání vápníkových vln v oocytu (Jaffe, 1983; Creton et Jaffe, 1995). Zároveň může docházet ke stimulaci rozpustného cytosolického faktoru spermie, který je do oocytu uvolněn po fúzi gamet a následně společně s kompomenty v ooplazmě vede ke zvyšování hladiny vápníku (Swan, 1990; Ramadan et al., 2012). Takto vyvolané oscilace vápníku jsou závislé na CDK aktivitě oocytu (McDougall et al., 2000) a signální molekuly spemie jsou vysoce konzervativní mezi jednotlivými živočišnými druhy (Stricker et al., 2000).

Na oscilacích vápníku v savčích oocytech se podílejí inositol trifosfátové (IP_3) dráhy, které umožňují přenos Ca^{2+} uvolněného z intracelulárních zásob, zejména endoplazmatického retikula (shrnuto v Ramadan et al., 2012). Klíčovou roli v tomto procesu hraje již zmíněný PLC δ, protein o velikosti 70 kDa, který se vyskytuje specificky ve varletní tkáni (Saunders et al, 2002). PLC δ je fyziologický faktor zodpovědný za přesun Ca^{2+} iontů zprostředkovaný IP_3 po fúzi oocytu se spermií (shrnuto v Ramadan et al., 2012). PLC δ po uvolnění do cytoplazmy oocytu vyvolává hydrolýzu na membráně vázaného fosfotidyl inositolu (PIP_2), díky které vzniká diacylglycerol (DAG) a IP_3. IP_3 se následně naváže na IP_3 receptory na endoplazmatickém retikulu a umožní uvolnit intracelulární zásoby Ca^{2+}. Výsledkem je zvýšení hladin vápníku a aktivace. Nynější poznatky odhalily vazbu PIP_2 na organelách oocytu (Malcuit et al., 2006; Cooney at el., 2010, Ramadan et al., 2012), viz. Obrázek 3.

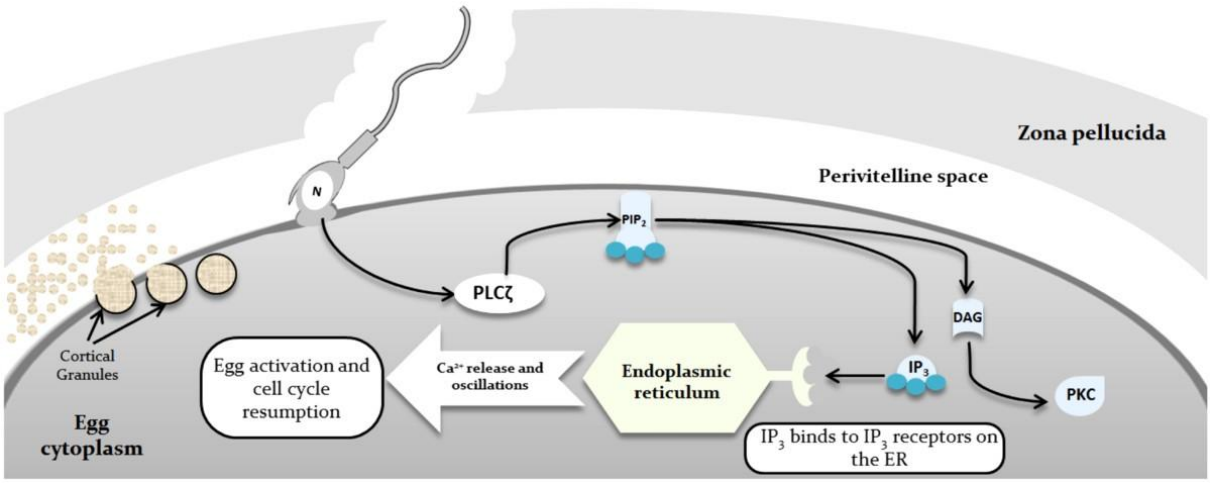
Do aktivace oocytů jsou zapojeny také na vápníku závislé molekuly. Jednou z nich je kalcium dependentní izoforma protein kinázy C (PKC), (Gallicano et al., 1997), zasahující rovněž do meiotického zrání oocytů. PKC je zahrnuta v signální kaskádě aktivované PLC δ a

podporuje exocytózu kortikálních granul (Abboott et Ducibella, 2001), vydělení II. pólového tělíska (Gallicano et al., 1997) a remodelaci cytoskeletonu oocytu (Gallicano et al., 1995). Při oplození je v oocytech přechodně aktivována také kalcium/kalmodulin dependentní kináza II (CaMKII), která se vyvolá aktivaci APC/C (Lorca et al., 1993). APC/C je E3 ligáza, která ubiquitinem značí cyklin B1 pro degradaci 26S proteasomem (Fang et al., 1999). Degradace cyklinu B má za následek pokles aktivity MPF a nástup anafáze druhého meiotického dělení. Aktivita CaMKII kolísá s Ca^{2+} u oocytů myši (Markoulaki et al., 2004).

CaMKII je zároveň zapojena do exocytózy kortikálních granul (Abbot et Ducibella, 2001). V oocytech drápatky bylo popsáno zapojení kalmodulínu do regulace aktivity CAMKII při vzestupu vápníku vyvolanou IP3 (Matifat et al., 2001). CAMKII reguluje výstup z MII bloku u partenogeneticky aktivovaných myších oocyt (Johnson et al., 1998) a spouští začátek vývoje myši (Knot tet al., 2006).

Rovněž některé gasotransmitery jsou zapojeny do sledu událostí odehrávajících se při aktivaci oocytů, například oxid dusnatý (Kuo et al., 2000; Petr et al., 2005a). Pomocí regulace vápníkových kanálů a pump regulujících příjem a výdej vápníku pro buňku, ovlivňuje NO množství vápníkových iontů v oplozeném oocytu (Berridge et al., 2000; Petr et al., 2005b). NO-dependentní aktivace oocytů prasat je závislá na mobilizaci zásob vápníku pomocí ryadinových receptorů (RyR), ale nezávisí na inositoltrifosfátových receptorech (IP_3R). Ale pro správnou aktivaci savčích oocytů jsou IP_3R důležité (Petr et al., 2005b). Pro partenogenetickou aktivaci oocytů NO donory je zřejmě specifická role cGMP-dependentní signální kaskády (Petr et al., 2006).

Obrázek 3. **Schéma mechanismu aktivace oocytu prostřednictvím PLCζ**



Převzato z Ramadan et al. (2012).

Po fúzi spermie s oocytem je PLCζ uvolněn do cytoplazmy oocytu, kde napomáhá hydrolýze na membránu navázaného PIP_2 na DAG a IP_3. Uvolnění Ca^{2+} z intracelulárních vápníkových depozit vyvolává vzestup hladiny Ca^{2+} a aktivaci oocytu.
N – jádro; PIP_2 - fosfotidylinositol 4,5-bisfosfát; IP_3- inositol trifosfát; DAG- diacylglycerol; PKC- proteinkináza C; ER – endoplazmatické retikulum.

Partenogenetická aktivace oocytu

Celý proces aktivace oocytu však nemusí být navozen pouze penetrací spermie do oocytu, ale byla popsána celá řada umělých stimulů, které umožní v podmínkách *in vitro* navodit v meioticky kompetentním oocytu obdobné procesy jako spermie. Jedná se o tzv. partenogenetickou aktivaci, která je vhodným nástrojem k určení cytoplazmatického zrání a celkové kvality oocytů (Kharche et Birade, 2013). Většina umělých stimulů používaných pro partenogenetickou aktivaci vyvolá v oocytu, podobně jako při aktivaci spermií, zvýšení intracelulární hladiny vápenatých iontů (Procházka et al., 1992; Sun et al., 1992; Jílek et al., 2000, 2001; Che et al., 2007; Im et al., 2007; Koo et al., 2008). Nicméně, sled událostí odehrávající se v oocytu při fyziologické aktivaci spermií se může po partenogenetické aktivaci lišit a některé z umělých stimulů nejsou schopny navodit plnohodnotnou aktivaci oocytu, tedy na sobě nezávislého znovuzahájení meiotického dělení a exocytózu kortikálních granul současně (Moore et al., 1995; Sun et al., 1997; Petr et al., 2005).

Výsledky experimentů řady výzkumných týmů zmiňují vhodné umělé aktivační stimuly a protokoly k navození partenogenetické aktivace oocytů. Jedná se např. o elektrickou stimulaci (Procházka et al., 1992; Sun et al., 1992; Koo et al., 2008) či chemické látky - např. stroncium (Kline et Kline, 1992), ethanol (Petr et al., 1996), kalcium ionofor (Jílek et al.,

2000, 2001; Che et al., 2007), cycloheximid (Saeki et al., 1997), 1,4,5-inositol trifosfát (Ahn et al., 2001), 6-dimethylaminopurin (6-DMAP; Im et al., 2007) či donory oxidu dusnatého (Petr et al., 2005). Nicméně vzhledem k vysoké variabilitě mezi jednotlivými živočišnými druhy a intenzitě účinku jednotlivých partenogenetických stimulů neexistuje univerzální metoda partenogenetické aktivace, která by se dala použít jednoznačně pro všechny živočišné druhy (Kharche et Birade, 2013).

Narozdíl od oocytů aktivovaných spermií, které obsahují paternální i maternální DNA, partenogeneticky aktivované oocyty obsahují pouze maternální DNA. Z toho důvodu mohou partenogenticky aktivované oocyty a následná embrya podstoupit několik buněčných dělení, ale nikdy svůj vývoj nedokončí a zastaví se v různých stádiích vývoje, v závislosti na konkrétním živočišném druhu. Prasečí partenogenetická embrya se mohou vyvíjet až 29 dní po aktivaci (shrnuto v Kharche et Birade, 2013).

Účinky jednotlivých inhibitorů syntézy/fosforylace proteinů používaných pro partenogenetickou aktivaci oocytů mají rozdílné účinky na organizaci cytoskeletu oocytu a projevují se rozdíly v migraci prvojader, vydělení polového tělíska i fragmentaci oocytů (Suzuki et al., 2002). Přestože u oocytů, kde je aktivace dosaženo pomocí elektrických stimulů, dochází k exocytóze kortikálních granul a syntéze proteinů, podobně jako při aktivaci spermií. Průběh oscilací vápníku charakterictických během aktivace je však odlišný, jak bylo popsáno u prasečích oocytů (Sun et al., 1992).

Za univerzální spouštěč aktivace oocytu je považován také oxid dusnatý (Petr et al., 2005) a produkovaný spermií nebo syntéza oxidu dusnatého (NOS) pocházející z oocytu. Obě tyto molekuly zvyšují intracelulární hladinu vápníku (Kuo et al., 2000) Vzestup vápníku zprostředkovaný oxidem dusnatým zahrnuje také aktivaci Src kinázy a částečně i PLC δ (Hyslop et al., 2001). Také uvolnění vápníku z ryanidových receptorů vyvolává oscilace intracelulárního vápníku, jak bylo prokázáno u myších oocytů (Swann, 1992) a účastní se také oplození oocytů skotu (Yue et al., 1998). NO-dependentní aktivace prasečích oocytů je závislá na mobilizaci intracelulárních vápníkových zásob pomocí ryanodinových receptorů (RyR) a nezávisí na inositoltrifosfátových receptorech (IP_3R). Nicméně, IP_3R jsou důležité pro správnou aktivaci savčích oocytů (Petr et al., 2005b). Partenogenetická aktivace oocytů však není plnohodnotná, protože sice může dojít k dokončení meiózy, nicméně kortikální reakce nenastane (Petr et al., 1995). Řada umělých aktivačních stimulů je naopak schopna vyvolat samotnou kortikální reakci (Sun et al., 1992; Machaty et al., 1996, 1997b), i když

někdy v poněkud slabší míře než po penetraci spermie (Wang et al., 1998). Jednou z cest regulace NO-syntázy a produkce NO v buňce je fosforylace protein kinázami (Salh et al., 1998).

Oocyty mohou podstoupit také spontánní aktivaci. Jednou z příčin spontánní aktivace při prodloužené kultivaci myších oocytů je zřejmě částečný pokles aktivity MPF a MAPK (Xu et al., 1997a). Neoplozené oocyty, které vydělily druhé pólové tělísko, mohou vstoupit do tzv. třetího meiotického bloku (MIII). Chromozómy takových oocytů zůstávají kondenzovány a rozprostírají se v cytoplazmě oocytů (Ross et al., 2006). Zároveň u nich nedochází ke vzniku prvojader, což může být vyvoláno nedostatečným poklesem aktivity MAPK. Tyto skutečnosti naznačují, že spontánní aktivace nevede k dokončení všech biochemických a buněčných změn, které jsou spojovány s oplozením. U spontánně aktivovaných oocytů se objevuje rovněž částečná exocytóza kortikálních granul a změny *zona pellucida* (Xu et al., 1997a). MIII blok je zřejmě výsledkem vysoké aktivity MPF po spontánní aktivaci (Ross et al., 2006). Oocyty, které vstoupily do MIII, nelze partenogeneticky aktivovat (Zernicka-Goetz, 1991). Spontánní aktivace oocytů může vyvolávat prodloužená doba manipulace (Keefer a Schuetz, 1982), změny teploty v průběhu manipulace (Zernicka-Goetz, 1991) nebo přítomnost vápníku v kultivačním médiu (Hayes et al., 2001).

2. 8. Kalcineurin

Kalcineurin je proteinem s enzymovou aktivitou patřícím do velké rodiny protein fosfatáz (PP). Podle svého zařazení je znám též pod názvem fosfatáza 2B (PP2B) či protein fosfazáza 3 (PP3) (Cohen et al., 1989; Hogan et Li, 2005). Kalcineurin byl poprvé identifikován a popsán jako látka inhibující kalmodulin dependentní cyklický nukleotid fosfodiesterázy Wang et Desai (1976). Nezávisle na tomto objevu byl extrakcí pomocí kalmodulin-afinitní chromatografie získán z mozku skotu (Watterson et Vanaman, 1976), ale podjednotky kalcineurinu z této extrakce byly chybně identifikovány (Rusnak et Mertz, 2000). Jako první purifikovali kalcineurin Klee et Krinks (1978), kteří předpokládali, že by mohl být regulační podjednotkou fosfodiesterázy. Na základě jeho schopnosti vázat Ca^{2+} a lokalizaci v nervové tkáni byl odvozen jeho název – kalcineurin (Klee et al., 1979).

2. 8. 1. Struktura kalcineurinu

Kalcineurin je jedinou serin/threoninovou protein fosfatázou pod kontrolou Ca^{2+} a kalmodulinu (Klee et al., 1998; Kingsbury et Cunningham, 2000). Přednostně defosforyluje

peptidy s bázemi aminokyselin na dusíkatém konci (Yamashita et al., 2000). Svou chemickou strukturou je kalcineurin heterodimer, skládající se z dvou pojednotek - katalytické podjednotky A (CnA) obsahující autoinhibiční doménu blízko C-konce (Klee et al., 1988) a podjednotky B (CnB) s regulační funkcí (Chan et al., 2005; Liu et al., 2010). Tyto dvě podjednotky jsou evolučně velmi konzervativní a zachovávají si svou strukturu a obsahují homologní sekvence napříč živočišnými druhy, od kvasinek až po člověka (Klee et al., 1998).

U savců jsou přítomny tři izoformy CnA - Aα, Aβ, Aγ, které jsou kódované více geny - PPP3CA, PPP3CB a PPP3CC (Kincaid, 1993) s vysoce konzervativními aminokyselinovými sekvencemi (Klee et al., 1988, Kuno et al., 1992). Izoformy kalcineurin Aα (Ito et al., 1989) a Aβ (Kuno et al., 1989) byly popsány jako první v 80. letech, později v roce 1992 byla identifikována i izoforma Aγ (Kincaid et al., 1990). Rozsah molekulové hmotnosti kalcineurinu A se pohybuje v rozmezí 57 – 59 kDa, v závisloti na konkrétní izoformě (Chan et al., 2005; Liu et al., 2010; Rusnak et Mertz, 2000). Velikost CnA může být u nižších eukaryotů vyšší (např. *Saccharomyces cerevisiae* – 63-69kDa, *Drosophila melanogaster* – 62-65 kDa) (Rusnak et Mertz, 2000; Liu et al., 2010). I přes strukturální podobnost jednotlivých izoforem je jejich zapojení a působení v jednotlivých buněčných procesech v organismu odlišné (shrnutov Williams et Gooch, 2012).

Podjednotka B se vykytuje ve 2 izoformách, B1 a B2, s molekulovou hmotností 18 – 19 kDa (Chan et al, 2005), které jsou produkty samostatných genů PPP3R1 a PPP3R2 (Hogan et Li, 2005). Výskyt kalcineurinu B1 byl potvrzen ve spojení s izoformami kalcineurinu Aα a Aβ, zatímco podjednotka B1 s izoformou kalcineurinu Aγ (Kincaid, 1995).

Strukturálně má katalytické podjednotka CnA tvar elipsy obsahující α-šroubovici a β-listy, kde je obsaženo vazebné místo pro podjednotku CnB (Rusnak et Mertz, 2000). CnB má strukturu s typickým motivem (EF-hand) polypeptidového řetězce a jeho sekvence se z 35% shoduje s kalmodulinem. Na tyto EF hand doménách jsou 4 vazebná místa s odlišnou afinitou pro ionty Ca^{2+}. Na N- konci je afinita pro Ca^{2+} nižší (v řádech μM) než na C konci (v řádech nM) (Kakalis et al., 1995, Gallagher et al., 2001). Vazebné místo s vysokou afinitou k vápníku slouží ke stabilizaci heterodimerické struktury a je nazýváno strukturálním místem kalcineurinu (Gallagher et al., 2001). Zbylá tři místa s nižší afinitou slouží jako vápníkové senzory a obsazení těchto míst je závislé na zvýšení intracelulárního vápníku a zastává tedy regulační funkci a to především stimulací aktivity kalcineurinu a možností vazby kalmodulinu do cílové oblasti kalcineurinu (Klee et al., 1998; Yang et al., 2000). A a B podjednotky kalcineurinu jsou pevně spojeny a mohou být odděleny použitím denaturačních činidel (Rusnak et Mertz, 2000).

2. 8. 2. Distribuce kalcineurinu v organismu

Jako modelový organismus při studiu role kalcineurinu byla jako první eukaryotický mikroorganismus použita kvasinka *S. cerevisiae* (Rusnak a Mertz, 2000).

Nejvyšší zastoupení kalcineurinu je v nervové tkáni (Wallace et al., 1980), kde je jeho množství 20 - 30x vyšší než v ostatních tkáních (Klee et al., 1998) a tvoří více než 1% z celkového množství proteinů (Yakel et al., 1997). Většina (50 – 70%) kalcineurinu je vázáno na membráně nebo částech cytoskeletu mozku (Klee et al., 1998; Yakel et al., 1997). Obě podjednotky kalcineurinu byly pozorovány také např. v osteoklastech kostí (Awumey et al., 1999), srdci (Ding et al., 1999), zadním mozku a míše, buňkách ledvin (Aperia et al., 1992) i jater (Farghali et Masek, 1998), placentě (Pallen et al., 1985), B a T lymfocytech (Chantler et al., 1985), v tukové tkáni, buňkách nadledvin, krevních destičkách, sítnici, svalech, plicích a dalších tkáních savců (Li et al., 2011, shrnuto v Rusnak et Mertz, 2000). I při nízkých hladinách hraje kalcineurin roli při nitrobuněčné signalizaci, jak bylo potvrzeno u T-lymfocytů a kosterních svalů (Hogan et Li, 2005). Zároveň se podílí na programované buněčné smrti i aktivaci T a B lymfocytů (Rusnak et Mertz, 2000). U prasete byl kalcineurin poprvé prokázán na plazmatické membráně lymfocytů (Chantler et al., 1985), dále také v cévách, kosterní i hladké svalovině a v řadě jiných somatických buněk (Hamada et al., 2010; Depreux et al., 2010). Obě podjednotky kalcineurinu byly identifikovány také ve spermiích kanců (Tash et al., 1988)

Každá z izoforem obou podjednotek má v tkáních odlišnou distribuci. Izoforma CnAα, CnAβ a CnB1 se v hojném množství vyskytují téměř ve všech tkáních. Výskyt zbylých izoforem CnAγ a CnB2 je omezený převážně na tkáň mozku a varlete (Molkentin, 2004). Vzhledem k tomu, že exprese vlastního proteinu kalcineurinu A-γ byla poprvé prokázána ve tkáni varlete je označována také jako izoforma, jejíž výskyt je specifický pro varlata - *testis specific isoform* (Muramatsu et Kincaid, 1992; Muramatsu et al., 1992).

Exprese kalcineurinu byla potvrzena také v oocytech, ale pouze u zástupců bezobratlých, mouchy *Drosophila* (Takeo et al., 2006, 2010) a nižších obratlovců, žáby rodu *Xenopus* (Nishyama et al., 2007; Mochida et Hunt, 2007). O přítomnosti kalcineurinu v oocytech savců není jednoznačný důkaz, a jeho výskyt v oocytech prasat můžeme jen předpokládat.

2. 8. 3. Aktivace a regulace kalcineurinu

Fosfátová aktivita kalcineurinu je kalcium dependentní a je regulována dvěmi strukturálně podobnými, ale funkčně odlišnými látkami, kalmodulinem a vápníkem (Klee et

al., 1988). Aktivace zahrnuje sérii po sobě následujících konformačních změn katalytické podjednotky A (Milan et atl., 1994), které jsou závislé na hladině intracelulárního Ca^{2+}.

Pokud je hladina vápníku nízká, kalcineurin není schopen navázat kalmodulin a enzym je v neaktivní formě. Hladina intracelulárního vápníku rozhoduje o místě vazby Ca^{2+} iontů na vazebná místa regulační podjednotky B (Klee et al., 1998). Pokud hladina vápníku klesne pod 10^{-7}M, dochází k vazbě Ca^{2+} pouze v místě vysoké afinity. Podjednotky CnA i CnB pak sice zůstávají spojeny, ale enzym není aktivní (Klee et al., 1998). Zvýšením intracelulárního vápníku však dochází k obsazení vazebných míst Ca^{2+} na podjednotce B (Klee et al., 1998), které vede k disociaci kalmodulinu z vazebné oblasti na kalcineurinu B s vazebnou oblastí kalcineurinu A. Tato konformační změna umožňuje navázání kalmodulinu a vytlačení autoinhibičního peptidu z aktivního místa. Výsledkem je nástup fosfatázové aktivity kalcineurinu (Kissinger et al., 1995). Autoinhibiční mechanismus kalcineurinu je zapříčiněn autoinhibičními částicemi, které se formují na α-helixu, spojují se s povrchovými aminokyselinami fosfatázové domény a blokují tak přístup ke katalytickému centru kalcineurinu (Griffith et al., 1995). K pevnému spojení kalmodulinu s kalcineurinem dochází tedy jen při zvýšené, ale stále fyziologické hodnotě Ca^{2+}, díky které dochází k defosforylaci vybraných substrátů (Hogan et Li, 2005).

Aktivace kalcineurinu je ovlivněna také fosfolipidy, které buď inhibují či aktivují kalcineurin, v závislosti na dávce a substrátu. Aktivita kalcineurinu může být ovlivněna také extracelulárními oxidanty, především H_2O_2 (Rusnak et Mertz, 2000) či ionty železa (Fe^{2+}) a zinku (Zn^{2+}) (Klee et al., 1998). Pokud dojde k oxidaci Fe^{2+} na Fe^{3+}, může dojít k inaktivaci enzymu (Aramburu et al., 2004). Množství volných iontů Mn^{2+}, Mg^{2+} nebo Ni^{2+} a kalmodulinu jsou dalšími faktory, které mají vliv na aktivitu fosfatáz kalcineurinu (Li et al., 2011).

Mezi klasické cesty regulace kalcineurinu *in vivo* patří výše popisované intracelulární koncentrace Ca^{2+} (Rusnak et Mertz, 2000). Existují však i další látky, které zasahují do řízení aktivity kalcineurinu. Jednou z nich jsou tzv. RCAN (regulators of calcineurin) proteiny tvořící rodinu endogenních regulátorů kalcineurinu, označovaných také jako MCIP (Modulatory calcineurin-intercting proteins), DSCR1 (Downs syndrome critical region) či kalcipresiny (Takeo et al., 2006). Regulátory rodiny RCAN proteinů jsou ve své primární struktuře konzervovány od hub až po člověka a v buňkách uplatňují řadu efektů, které pozitivně či negativně ovlivňují kalcineurinovou signalizaci (Li et al., 2011). Tyto endogenní regulátory mohou nejen stimulovat, ale i inhibovat aktivitu kalcineurin svou vazbou na

katalytickou podjednotku CnA (Fuentes et al., 2000, Ejima et al., 2004) řízenou protein kinázami.

Jako regulátor kalcineurinu působí také protein Sarah (*Sra*), jehož úloha byla odhalena u oocytů octomilek (*Drosophila melanogaster)*, kde působí prostřednictvím fosforylačního mechanismu (Takeo et al., 2006, 2010). *Sra* je ve velké míře exprimován v průběhu oogeneze v samičích zárodečných buňkách (Ejima et al., 2004) a časných embryích a ztráta *Sra* v zárodečných buňkách se tedy může projevit poruchami průběhu meiozy (Takeo et al., 2006).

2. 8. 4. Cílové substráty kalcineurinu

Kalcineurin komunikuje s velkým množstvím substrátů a cílových proteinů, v některých případech na omezeném místě uvnitř buňky (Li et al., 2011). Mnoho z těchto substrátů je obsaženo v řadě signálních transdukčních drah. Zahrnují potenciální fyziologické substráty s jasně vymezenými charakteristikami jako NO syntázu, dynamin (a GTPázu účastnící se endocytózy) či heat-shock protein hsp25 (shrnuto v Shibasaki et al., 2002). Kalcineurin je zapojen také v aktivaci a regulaci vápníkových kanálů - inositol 1,4,5-trifosfatázovém receptoru (IP_3R) a ryanidovém receptoru (RyR) (Bultynck et al., 2003).

NFAT (Nuclear Factor of Activated T-cells)

NFAT je nejvýznamnějším transkripčním faktorem, kterým je regulován kalcineurinem. Touto cestou je regulována exprese genů pro prozánětlivé cytokiny - interleukiny (IL-2, IL-3, IL-4, IL-13) a další faktory (INF-γ, GM-CSF, TNF-α) (Sobotková et Bartůňková, 2008). Hlavním impulzem pro studium kalcineurinu bylo zjištění, že je cílem imunosupresantů, cyklosporinu a takrolimu (FK506), které jsou široce používané v transplantační medicíně a inhibují fosfatázovou aktivitu kalcineurinu (Liu et al., 1991). Imunosupresivní účinky těchto látek spočívají v prevenci defosforylace právě transkripčních faktorů NFAT (Nuclear Factor of Activated T-cells) v T-lymfocytech a dalších buňkách imunitního sytému (Li et al., 2010).

Signální dráha Ca^{2+} iontů v T-lymfocytech, která vede k imunitní odpovědi, je detailně popsána. Na základě signálů z T-buněčného antigenového receptoru je uvolněn vápník z endoplazmatického retikula a dochází k aktivaci CRAC (calcium release activated calcium)

kanálů v plazmatické membráně. Prostřednictvím CRAC kanálů je udržován influx Ca^{2+} a dochází k aktivaci kalmodulinu a kalcineurinu. Aktivace kalcineurinu vyvolá sled buněčných událostí zahrnující defosforylaci konzervovaných fosfoserinových reziduí na regulační doméně NFAT. Konformační změny způsobí přemístění NFAT z cytosolu do jádra, které zde fungují jako transkripční faktory. Tento proces je reverzibilní a je řízen řadou kináz, např. CK1 (casein kinase) či GSK3 (gylocogen synthase kinase) (Gwack et al., 2006, Arron et al., 2006).

Zapojení NFAT v signální dráze kalcineurinu a vápníku ovlivňuje i signální dráhy řady patologických procesů v organismu, v závislosti na typu buňky. Poruchy v této dráze se mohou projevit srdeční hypertrofií, autoimunitními nemocemi, osteoporozou a potenciálně také schizofrenií, Alzheimerovou chorobou, Downovým syndromem či rakovinou (shrnuto v Li et al., 2011).

Dalším substrátem kalcineurinu je oblast draselného kanálu označovaná jako TRESK. Exprese TRESK a zapojení kalcineurinu v jeho aktivaci po zvýšení hladiny vápníku byla prokázána v oocytech žáby (*Xenopus leavis*) a předpokládá se, že stejné regulaci podléhá i v nervových buňkách (Li et al., 2011).

2. 8. 5. Inhibitory kalcineurinu

Pro detailní poznání biologické úlohy fosfatáz v organismu, včetně kalcineurinu, jsou vhodným nástrojem inhibitory, které se odlišují svou chemickou strukturou, místem výskytu i využitím.

V roce 1996 byl popsán endogenní inhibitor CHP (calcineurin homologous protein), který je homologní s B regulační podjednotkou a přímo inhibuje aktivitu kalcineurinu (Lin et al., 1999). Dále byly identifikovány 2 proteiny inhibující aktivitu kalcineurinu – Cabin1/cain a CBP1/kalcipresin. CBP1/calsipresin je u člověka kódován na 21 chromozomu a pravděpodobně hraje důležitou úlohu v patofyziologii Downova syndromu (Kingsbury et al., 2000). Nedávná studie (Grigoriu et al., 2013) odhalila, že protein inhibitor A238L, který sice nepatří mezi endogenní inhibitory kalcineurinu, ale je kódován genem vysoce virulentního viru napadající prasata v Africe i Evropě „African swine fever virus“, potlačuje imunitní

odpověď hostitele prostřednictvím inhibice kalcineurinu a vazbou na stejné místo jako NFAT (Miskin et al., 1998, Grigoriu et al., 2013).

Velkou skupinou zahrnující inhibitory kalcineurinu jsou pyretroidy**.** Tyto vysoce aktivní syntetické deriváty přírodních toxinů pocházející z rostliny *Crysanthemum cinerariaefolium.* Od 70. let se začaly ve velké míře používat jako insekticidy. Na základě odlišné chemické struktury, různých cílových substrátů i toxických účinků jsou pyretroidy rozdělovány na 2 skupiny. Pyretroidní pesticidy typu I ve své molekule obsahují základní cyklopropanovou karboxyestreovou strukturu. Do této skupiny jsou řazeny například allethrin, phenothrin a permethrin. Pyretroidy II. typu vykazují vyšší insekticidní aktivitu, protože obsahují ve své molekule α kyanovou skupinu (Anadón et al., 2008) a patří mezi ně mimojiné cypermethrin, deltamethrin a fenvalerát. Tyto pyrethroidy jsou široce používány při ochraně plodin, ale i zvířat před hmyzem (Soderlund et al., 2002) a některé jsou zároveň velmi účinnými inhibitory kalcineurinu (Enan et Matsumura, 1992). Vzhledem k širokému použití těchto insekticidů se vyskytují nejen v životním prostředí, ale v menší míře i v organismu zvířat (Soderlund et al., 2002). Toxické efekty pyretroidů jsou obvykle spojovány s jejich účinky na iontové kanály nervových a svalových buněk. Negativní účinky pyretroidů se projevují narušením jejich funkcí spíše než poškozením struktury buněk (Soderlund et al., 2002).

V humánní medicíně jsou hojně využívány imunosupresanty z řad nepyretroidních inhibitorů kalcineurinu jako prevence odmítnutí transplantátů (Liu et al., 1991). Nepyretroidní inhibitory kalcineurinu představují významnou skupinu látek vykazujících specifické inhibiční účinky. Mezi významné inhibitory kalcineurinu nepyretroidní povahy patří cyklosporin, takrolimus a hymenistatin, které inhibují kalcineurin po vytvoření komplexu s jejich příslušnými cytoplazmatickými receptory (Rusnak et Mertz, 2000).

Cyklosporin A (CsA)

Cyklosporin je cyklický lipofilní peptid s molekulovou hmotností 120 kDa obsahující ve své struktuře 11 aminokyselin. N-methylace některých z těchto aminokyselin je pravděpodobně důvodem jejich rezistence k inaktivaci v trávicím traktu (Borel et al., 1994). Cyklosporin nemá volné amino ani karboxy skupiny, proto se nerozpouští ve vodě, nicméně je rozpustný v tucích. Chemicky se jedná o velmi stálou sloučeninu, která se rozpadá až za působení silných kyselin a zvýšené teploty (Taylor et al., 2006). Cyklosporin byl izolován z houby *Tolypocladium inflatum* a v roce 1976 byly detailně popsány biologické vlastnosti

tohoto prvního imunosupresivního faktoru se specifickou anti T- lymfatickou aktivitou (Borel et al., 1976), což vedlo k jeho pozdějšímu využití v transplantační medicíně a cyklosporin je tak prvním lékem selektivně působícím na T-buňky. Cyklosporin je vysoce lipofilní látka, díky čemuž je snadno distribuován přes membrány a do tkání. V současné době je cyklosporin využíván jako prevence rejekce transplantátů kostní dřeně, ledvin, jater, srdce a plic. Cyklosporin se váže na cyklofilin a vzniklý komplex inhibuje kalcineurinovou aktivitu a tím předchází translokaci NFAT do jádra a transktipci genů cytokinů. Výsledekem je inhibice produkce cytokinů a inhibice aktivace T-buněk a jejich proliferace (Boss et l., 1998, Taylor et al., 2006).

Takrolimus – FK506

Takrolimus je 23 členný makrocyklický lakton o molekulové hmotnosti 804 kDa. Vzhledem ke svému lipofilnímu charakteru je prakticky nerozpustný ve vodě, nicméně se snadno rozpouští v tucích a jiných organických rozpouštědlech. Takrolimus je imunosupresant produkovaný houbou *Streptomyces tskubaensis* a od roku 1994 představuje další inhibitor kalcineurinu, který je používán zejména při transplantaci jater (Kapturczak et al., 2004). Své inhibiční účinky takrolismus vyvolává prostřednictvím vazby na skupinu intracelulárních proteinů nazývaných FKBD12 (FK binding protein 12), který je zodpovědný za buněčnou a tkáňovou distribuci takrolimu. Vzniklý komplex zabraňuje přenosu aktivačního signálu v aktivovaných lymfocytech. Imunosupresivní účinky takrolimu jsou přibližně 100 krát vyšší ve srovnání s cyklosporinem a s nižšími nefrotoxickými účinky (Jordan et al., 1991), nicméně mechanismus účinku je podobný jako u cyklosporinu.

Oba výše zmíněné inhibitory kalcineurinu, cyklosporin i FK506, inhibují produkci NO a expresi iNOS u mafrogágů a fibroblastů v závislosti na dávce. Účinky cyklosporinu jsou vyšší než účinky FK506. Kalcineurin tedy hraje roli v regulaci exprese iNOS (Hämäläinen et al., 2009).

Hymenistatin I

Hymenistatin I je cyklický oktapeptid izolovaný z mořských hub druhu *Hymeniacidon.* Podobně jako u cyklosporinu, i u hymenistatinu I jsou popsány imunosupresivní efekty, nicméně mechanismus působení těchto dvou inhibitorů kalcineurinu je odlišný. Hymenistatin I potlačuje humorální i buněčnou imunitní odpověď. Na rozdíl od cyklosporinu, hymenistatin I zvyšuje produkci cytokinu interleukinu – 1, jednu z klíčových

molekul imunitního systému (Cebrat et al., 1996). Účinky tohoto inhibitoru kalcineurinu na oocyty nejsou popsány.

2. 8. 6. Funkce a účinky kalcineurinu v reprodukci

Úlohu kalcineurinu v mnohých biochemických a fyziologických procesech v organizmu zvířat i lidí popisuje řada vědeckých prací. V mozku hraje roli v oblasti paměti, uplatňuje se v hormonální kontrole, genové regulaci a regulaci iontových kanálů, stejně jako při vývoji kardiovaskulárního a kosterního svalstva, buněčné apoptóze a mnoha dalších procesech v organismu (Chan et al., 2005; Klee et al., 1998). Jeho úloha v reprodukci však není stále zcela objasněna.

Funkce kalcineurinu v časném embryonálním vývoji byla popsána u transgenních myší, u kterých neschopnost navázání exprimované mutované formy kalcineurinu B na podjednotku kalcineurin A způsobila smrt embryí (Graef et al., 2001). Studie z roku 2002 (Bandyopadhyay et al., 2002) potvrdila expresi kalcineurinu ve svalech vulvy, spermatéce a spermiích hlístice (*Ceanorhabditis elegans*). Ztráta funkcí kalcineurinu se zde projevila prasknutím oocytů vycházejícím z defektů ve spermatéce a morfologii spermií. V samčích gametách kalcineurin řídí motilitu spermií a interakci integrinu a fibronektinu (Chan et al., 2005; Klee et al., 1998).

Kalcineurin je zapojen také do regulačních mechanismů meiotického zrání oocytů i následném vývoji u nižších živočišných druhů. Je nezbytný pro výstup z I. a II. meiotického bloku oocytů mouchy rodu *Drosophila* a žáby rodu *Xenopus* (Mochida et Hunt, 2007; Nishiyama et al., 2007; Takeo et al., 2010). Vliv kalcineurinu na přechod z jednoho meiotického bloku do druhého může být způsoben schopností kalcineurinu inhibovat katalytickou aktivitu MPF bez ovlivnění cyklinu B (Jessus et Haccard, 2007). Na druhou stranu, myší oocyty pravděpodobně kalcineurin pro výstup z II. meiotického bloku nevyžadují (Suzuki et al., 2010).

Na regulaci aktivity kalcineurinu po prolomení I. meiotického bloku oocytů *Drosophila* se podílí gen Sarah (*Sra*), člen regulátorů kalcineurinu. *Sra* se váže na podjednotku A kalcineurinu a fosforylačním mechanismem působí jako pozitivní regulátor kalcineurinu a zastavuje meiozu v anafázi I (Takeo et al., 2006, 2010). Samice octomilek, u kterých byl genovým knockoutem vyblokován gen *Sra*, jsou sterilní s abnormálním průběhem

ovulace. Vyblokování genu *Sra* se negativně projevuje také na průběhu meiotického zrání oocytů octomilek, většina oocytů těchto samic není schopných dokončit meiózu a zastavují se v anafázi I. meiotického dělení, krátce po prolomení II. meiotického bloku a nejsou tedy schopné hatchingu. Meiotické defekty *Sra* oocytů můžeme přičítat ztrátě funkce *Sra* u samičích zárodečných buněk (Takeo et al., 2006). *Sra* je tedy nezbytný pro prolomení meiotického bloku oocytů octomilek v metafázi I. Dokončení meiózy genu *Sra* prostřednictvím aktivace kalcineurinu pozitivně reguluje ubikvitinovou ligázu APC/C (Anaphase Promoting Complex/Cyclosome) zodpovědnou za degradaci mnoha maternálních proteinů při přechodu z oocytu v embryo (Pesin et Orr-Weaver, 2008) v době aktivace oocytů octomilek. Tato regulace vede k fosforylaci mnohých proteinů (Krauchunas et al., 2013).

Zapojení kalcineurinu do regulace meiózy oocytů bylo potvrzeno také u *Xenopus leavis*. Kalcineurin je nezbytný pro výstup ooocytů *Xenopus leavis* z metafáze II (Mochida et Hunt, 2007; Nishiyama et al., 2007) a hraje úlohu také při aktivaci oocytů sumky (Levasseur et al., 2013). Přechodné zvýšení koncentrace Ca^{2+} při oplození umožňuje prolomení II. meiotického bloku, ale zároveň dochází k přechodnému zvýšení aktvity kalcineurinu (Mochida et Hunt, 2007). Aktivace i následná inaktivace kalcineurinu v oplozených oocytech je nezbytná také pro zahájení embryonálního vývoje (Nishiyama et al., 2007). V ranném embryonálním vývoji se podílí na dekondenzaci chromatinu a změnách v cytoskeletu související s následnou migrací prvojader (Jessus et Haccard, 2007). Při oplození oocytů je zasahuje kalcineurin do vyvolávání přestavby kortikálních granul (Nishiyama et al., 2007).

V přítomnosti cyklosporinu, inhibitoru kalcineurinu, je inhibována defosforylace klíčového regulátoru APC dráhy (Fizzy/Cdc20) a je tak zabráněno degradci cyklinu B. cyklosporin A zároveň zpožďuje celkovou defosforylaci specifických proteinů M-fáze cyklu a přetvoření plně funkčního jaderného obalu oocytů (Mochida et Hunt, 2007). Druhá vlna fosfatázové aktivity nasměrovaná na mitotické fosfoproteiny se objevuje po nárůstu kalcineurinové aktivity a mizí v době vstupu oocytu do M-fáze a opět se objevuje na konci mitózy. Inhibice kalcineurinu umožňuje vstup do M-fáze buněčného cyklu a aktivace včasný návrat do interfáze. Kalcineurin je zodpovědný za přerušení II. meiotického bloku, udržovaného pomocí Mos/MAPK kaskády (Mochida et Hunt, 2007).

Přítomnost kalcineurinu v savčích oocytech nebyla dosud potvrzena. Ale vzhledem k vysoké homologii kalcineurinu mezi jednotlivými živočišnými druhy a potvrzení jeho zapojení v meiotickém zrání u rodů *Drosophila* i *Xenopus*, stejně jako v dalším vývoji oocytů

těchto druhů, lze předpokládat, že kalcineurin zasahuje také do meiotického zrání a vývojové kompetence oocytů u prasat.

3. Hypotézy a cíle

Na základě výše uvedených poznatků z vědecké literatury byla stanovena hypotéza, podle které:

- je kalcineurin přítomen v oocytech prasete v průběhu meiotického zrání a po partenogenetické aktivaci
- je kalcineurin zapojen do regulace meiotického zrání a partenogenetické aktivace prasečích oocytů.

K ověření hypotéz byly stanoveny dílčí cíle:

1) prokázat expresi podjednotek kalcineurinu A a B v oocytech prasete metodou Western blot
2) lokalizovat podjednotky kalcineurinu A a B v oocytu během meiotického zrání a partenogenetické aktivace pomocí imunocytochemických metod
3) určit, jak ovlivňuje inhibice aktivity kalcineurinu meiotické zrání oocytů
4) určit, jak ovlivňuje inhibice aktivity kalcineurinu schopnost oocytů podstoupit partenogenetickou aktivaci
5) zjistit vliv kalcineurinu na aktivitu významných regulačních kináz oocytů MPF a MAPK.

4. Materiál a metody

4. 1. Materiál

4.1.1. Odběr vaječníků

Ovária byla získávána z mladých prasniček poražených na jatkách. Ihned po odběru byly vaječníky uchovávány ve fyziologickém roztoku (0,9 % NaCl) při konstantní teplotě 39°C a co nejrychleji transportovány do laboratoře.

4.1.2. Získávání oocytů

Oocyty byly získávány aspirací ovariálních folikulů o velikosti 2 – 5 mm jehlou 20G. Ze získané folikulární tekutiny byly následně pod binokulární lupou pomocí skleněné pipety vybírány oocyty, resp. komplexy oocytů a kumulárních buněk. Pro experiment byly vybírány pouze oocyty s ukončeným růstem (cca 120 μm), obalené kompaktní vrstvou kumulárních buněk, jejichž cytoplazma byla neporušená a celistvě vyplňovala celý oocyt. Oocyty v jednotlivých stadiích meiotického zrání byly připravovány kultivací *in vitro* dle níže uvedeného schématu:

- GV 0 (ihned po izolaci z folikulu – 0 hodin kultivace *in vitro*)
- GV I – GV II (8 hodin kultivace *in vitro*)
- GV III – GV IV (18 hodin kultivace *in vitro*)
- MI (24 hodin kultivace *in vitro*)
- MII (48 hodin kultivace *in vitro*)

.

4.1.3. Kultivační systém

Meiotické zrání oocytů

Oocyty byly kultivovány v modifikovaném médiu M199 (složení viz Tabulka č. 1). Před samotnou kultivací bylo medium obohaceno o 13.4 IU eCG : 6.6 IU hCG/ml (P.G. 600 Intervet Boxmeer, Holandsko) a 10% fetálního séra (GibcoBRL, Life Sciences, Karlsruhe, Německo). Kultivace probíhala v miskách NUNC se 4 jamkami v objemu 1ml (Nunc, Roskilde, Dánsko) v termostatu při konstantních podmínkách - teplotě 39°C a směsi 5% CO_2 se vzduchem. Délka kultivace odpovídala požadovanému stádiu meiotického zrání analyzovaných oocytů nebo schématu příslušného experimentu.

Tabulka č. 1 Složení modifikovaného media M199 používaného pro kultivaci oocytů

Chemikálie	**dávka na 100 ml média M199**
Laktát sodný (Sigma-Aldrich, Německo)	60 mg
Pyruvát sodný (Sigma-Aldrich, Německo)	25 mg
HEPES (Sigma-Aldrich, Německo)	150 mg
Gentamicin (Sigma-Aldrich, Německo)	2,5 mg
10% fetální sérum (Gibco BRL, Life Technologies, Německo) - *před použitím média*	10% (w/v)
eCG : hCG (PG 600, Intervet Boxmeer, Holandsko)	13,4 : 6,6 IU/ml

Partenogenetická aktivace zralých oocytů

In vitro zralé oocyty s vyděleným pólovým tělískem byly pomocí tenkostěnné kapiláry zbaveny kumulárních buněk a ošetřeny 25 μM kalcium ionoforem (Ca-Io) A 23187 (Sigma-Aldrich, Německo) po dobu 5 minut při teplotě 39°C ve směsi 5% CO_2. Poté byly oocyty krátce opláchnuty v modifikovaném médiu M199 (složení viz. Tabulka č. 2) bez Ca-Io a kultivovány in vitro při teplotě 39°C ve směsi 5% CO_2 maximálně 24 hodin do stádia prvojader (Jílek et al., 2001).

Tabulka č. 2 Složení modifikovaného media M199 používaného pro kultivaci oocytů po partenogenetické aktivaci

Chemikálie	**dávka na 100 ml média M199**
Laktát sodný (Sigma-Aldrich, Německo)	60 mg
Pyruvát sodný (Sigma-Aldrich, Německo)	25 mg
HEPES (Sigma-Aldrich, Německo)	150 mg
Gentamicin (Sigma-Aldrich, Německo)	2,5 mg
Růstové proteiny (Gibco BRL, Life Technologies, Německo) - *před použitím média*	10% (w/v)

4.1.4. Inhibitory

V experimetech byly použity nepyretroidové inhibitory kalcineurinu - cyklosporin A (CsA) a hymenistatin I (HS-I) rozpuštěné v dimethylsulfoxidu - DMSO (koncentrace zásobního roztoku 8 mM). Koncentrace inhibitorů byla zvolena na základě předchozích experimentů - 0, 0.1, 1, 4 a 8 μM (Petr et al., 2013). Vliv DMSO na průběh meiotického zrání oocytů byl vyloučen předchozími experimenty *in vitro*.

4. 2. Metody

4.2.1. Hodnocení jaderného zrání a podílu aktivovaných oocytů

Po kultivaci byly oocyty zbaveny kumulárních buněk, namontovány na podložní sklíčko a fixovány v roztoku kyseliny octové a etanolu (1:3) nejméně 24 hodin. Následně byly oocyty obarveny 1% orceinem a mikroskopicky vyhodnoceny objektivem s fázovým kontrastem. Stádia jaderného zrání: zárodečný váček – germinal vesicle (GV), pozdní diakineze (LD), metafáze I (MI), anafáze I (AI), telofáze I (TI) a metafáze II (MII) byly hodnoceny dle kritérií publikovaných Motlíkem a Fulkou (1986). Oocyty s abnormální chromozomální konfigurací byly klasifikovány jako degenerované. Jednotlivá stadia GV byla klasifikována dle morfologických kritérií publikovaných kolektivem Romar et Funahashi (2006) charakterizované následovně:

- GV I – zřetelná jaderná membrána, jadérko a chromatin obarvený pouze okolo jadérka oocytu koncentrované do kruhu ve tvaru podkovy
- GV II – první fáze rozpadu zárodečného váčku, ve které je chromatin stále formován jako podkova kolem jadérka, ale s několika obarvenými ložisky chromatinu v jádře oocytu
- GV III – chromatin se objevuje v nepravidelné síti filament a membrána jadérka a jádra v oocytu jsou stále patrné
- GV IV – v oocytu jsou klastry chromatinu s méně zřetelnou jadernou membránou a bez přítomnosti jadérka.

Za partenogeneticky aktivované oocyty byly považovány pouze oocyty s vytvořenými prvojádry.

4.2.2. Průkaz přítomnosti kalcineurinu metodou Western Blot

Oocyty s plnou meiotickou kompetencí, které byly kultivovány do stádia GV, MI, MII, byly mechanicky zbaveny kumulárních buněk, povařeny v 7 μl koncentrovaného SDS vzorkového pufru po dobu 3 min. ve vodní lázni a poté zamraženy. Kumulární buňky odstraněné z oocytů byly centrifugovány v 1ml PBS po dobu 3 min při 5000 otáčkách a následně vloženy do 7 μl koncentrovaného SDS vzorkového pufru a povařeny po dobu 3 min a zamraženy. Vzorky byly skladovány nejdéle 14 dní při teplotě -20°C. Před elektroforetickou separací byly vzorky naředěny 13 μl redestilované vody. Separace proteinů proběhla nejdříve v zaostřovacím 4% polyakrylamidovém gelu s přídavkem dodecylsulfátu sodného (SDS-PAGE) a poté v 12,5% separačním SDS-PAGE gelu. Jako pozitivní kontrola byl použit čistý protein kalcineurin (Sigma Aldrich Chemie GmbH, Mnichov, Německo, katalog. Č. C-1907) v množství 1 ng. Po rozdělení proteinů v gelu podle molekulové hmotnosti byly proteiny přetištěny na nitrocelulózovou membránu (Hybond, Amersham Pharmacia Biotech, USA). Pro ověření přetištění proteinů na membránu a jejich následnou identifikaci byl použit hmotnostní marker pre-stained molecular weight bovine standard (Bio-Rad, Montreal, Kanada, 161-0318). Membrána byla přes noc blokována ve 2% roztoku odtučněného mléka v PBS s přídavkem 0,1% Tween 20 a dále inkubována 2 hodiny s primární protilátkou anti kalcineurin (Sigma Aldrich chemie GmbH, Mnichov, Sigma-Aldrich, Německo, katalogové č. C-1956 a C-0581). Použity byly primární protilátky v koncentraci 1 : 10 000 (anti-A) nebo 1 : 3000 (anti-B). Následně byla membrána promyta a inkubována se sekundární myší anti-IgG protilátkou (Amersham GE Healthcare, Life Sciences, UK, Katalogové č. NIF825) v koncentraci 1 : 30 000. Obě protilátky byly rozpuštěny ve 2% odtučněném mléce. Přenesené proteiny s navázanou protilátkou byly vizualizovány pomocí ECL Advance Western Blotting Detection Kit (Amersham Pharmacia Biotech, UK) a snímány a kvantifikovány pomocí digitálního blot skeneru (C-DiGit Blot Scanner, LI-COR Biosciences, USA).

4.2.3. Imunocytochemická lokalizace kalcineurinu

Oocyty zbavené kumulárních buněk pomocí skleněné tenkostěnné mikropipety a následně zbaveny *zony pellucidy* v 0,1% roztoku pronázy (Sigma-Aldrich, MO, USA), opláchnuty ve třech kapkách 0,1% PBS v BSA a fixovány ve 2,5% paraformaldehydu s PBS (phosphate buffer saline) po dobu 60 min. Roztok paraformaldehydu byl po 30 minutách vyměněn. Pokud nebyly vzorky imunocytochemicky zpracovány byly oocyty opláchnuty v 0,1% PBS po dobu 5 min. a uskladněny v 1% paraformaldehydu s PBS, kde byly skladovány maximálně po dobu 1 týdne. Následně byly oocyty permeabilizovány v 0,5%

roztoku TritonX -100 v PBS po dobu 2 hodin, opláchnuty v roztoku 0,1% Tween20 ředěný PBS a přes noc inkubovány při teplotě 4°C v mediu (0,1% BSA + 0,1% Tween20 v PBS) s myší primární protilátkou anti-kalcineurin (Sigma Aldrich Chemie GmbH, Mnichov, Německo, katalogové č. C1956 a C0581) ředěnou 1:100 v PBS. Po trojím omytí nenavázané protilátky v roztoku 0,1% Tween 20 v PBS při pokojové teplotě byly oocyty inkubovány se sekundární protilátkou konjugovanou s fluorescein-5-isothiocyanatem (FITC, Sigma Aldrich Chemie GmbH, Mnichov, Německo, katalogové č. FO257) v koncentraci 1 : 100 ve tmě při laboratorní teplotě po dobu 60 minut. Poté byly oocyty opět třikrát propláchnuty v roztoku 0,1% Tween20 v PBS. Pro vizualizaci DNA byly oocyty obarveny 4,6-diamidino-2-phenylidole (DAPI, Sigma Aldrich Chemie GmbH, Mnichov, Německo, katalogové č. D8417). Po opláchnutí ve 3 kapkách ekvilibračního pufru, byly oocyty namontovány v kapce glycerolu v PBS (Slowfade kit, Invitrogen/Molecular Probes, Praha, ČR) na podložní sklo pro imunofluorescenci (Dispolab spol., s. r. o.).

Pro vyhodnocení nespecifické reakce byla vždy část oocytů inkubována pouze se sekundární protilátkou.

Vzorky byly analyzovány pomocí 1 fotonového laserového konfokálního mikroskopu (Leica SPE, Německo). Fluorescence FITC byly stanovována při emisní délce 520 nm, fluorescenece DAPI při 461 nm. Úroveň laserů byla nastavena u všech experimentálních skupin na stejnou hodnotu.

Vyhodnocení výsledků konfokální mikroskopie

Hodnocení dat získaných z konfokálního mikroskopu bylo prováděno pomocí programu NiIS Elements (verze 3.1, Laboratory Imaging, Česká republika). Ve spolupráci s firmou Laboratory Imaging s.r.o. (Česká republika) bylo vytvořeno makro pro stanovení průměrné intenzity signálu fluorescece FITC v oblasti jádra, cytoplazmy a korové oblasti oocytu. V oocytech ve stadiu I. a II. meiotické metafáze byla intenzita flourescence měřena v oblasti metafázní figury, tj. perichromozomální oblasti. Korová oblast a cytoplazma byly hodnoceny v ekvatoriální rovině oocytu (místo, kde průměr oocytu dosahuje maxima). V případě, že jádro bylo lokalizováno na okraji oocytu, byla fluorescence měřená v této oblasti považována za signál v oblasti jádra a nikoliv signál korové oblasti. Získaná data z jednotlivých oblastí oocytu byla vztažena k průměrné intenzitě fluorescence FITC v celém oocytu a vyjádřena jako relativní hodnoty fluorescence v konkrétních oblastech oocytu (jádro/perichromozomální oblast, korová oblast a cytoplazma).

4.2.4. Hodnocení aktivity MPF a MAPK

Pro vyhodnocení kinázové aktivity byly oocyty zbaveny kumulárních buněk. Analýza kinázové aktivity byla provedena dle Kubelka et al. (2000). Oocyty byly čtyřikrát propláchnuty v 0,01% polyvinyl alkoholu (PVA) v PBS, přeneseny do 5 μl extrakčního pufru (40 mM 3-[n-morpholino] propansulfonová kyselina pH 7,2, 20 mM para-nitrofenylfosfát, 40 mM β-glycerolfosfát, 10 mM EGTA, 0,2 mM EDTA, 2 mM dithiotreitol, 0,2 Na3VO4, 2 mM benzamidin, 40 μg/ml leupeptin, 40 μg/ml aprotinin). Připravené vzorky byly skladovány v - 70 °C do použití. Po rozmražení byly vzorky homogenizovány a kultivovány 30 min. při laboratorní teplotě s 5 μl reakční směsi (100 mM 3-[n-morpholino] propansulfonová kyselina pH 7,2, 20 mM para-nitrofenylfosfát, 40 mM β-glycerolfosfát, 20 mM MgCl2, 10 mM EGTA, 0,2 mM EDTA, 5 μM inhibitor PKA, 2 mM benzamidin, 40 μg/ml leupeptin, 40 μg/ml aprotinin, 600 μM ATP, 2 mg H1/ml, 3 mg MBP/ml) a 500 μCi/ml [γ-32P]ATP (Amersham). Histon H1 a MBP byly separovány pomocí SDS-polyakryamidové elektroforézy pomocí 10% separačního gelu. Gel byl po separaci obarven modří Comassie Blue R250 a vysušen. Pomocí vizualizačního zařízení MultiGauge 2.0 byla odečtena denzita signálu fosforylovaných substrátů. Pro vyhodnocení byly hodnoty aktivity MPF a MAPK ve vzorku vztaženy ke kontrolní skupině kultivované 48 hodin a vyjádřeny relativně jako % poměr denzity signálu vzorků pokusných skupin, k denzitě signálu vzorků kontrolní skupiny.

Statistická analýza

Pro celkové hodnocení všech získaných dat byl použit program Statistica, CZ 12.0, není – li uvedeno jinak. Hladina statistické významnosti byla stanovena $p < 0,05$.

Pro vyhodnocení dat intenzity fluorescence kalcineurinu v programu Nis Elements byla použita jednofaktorová analýza rozptylu ANOVA s následným Tukeyho HSD testem.

Korelace mezi koncentrací inhibitorů a vlivem na meiotické zrání oocytů byla hodnocena pomocí Spearmanova korelačního koeficientu. Úroveň jaderného zrání, resp. partenogenetické aktivace oocytů byla vyjádřena jako procento oocytů dosahujících příslušnou fázi jaderného zrání, resp. procento aktivovaných oocytů. Významnost odchylky od kontrolní skupiny byla hodnocena χ^2 testem.

Pro vyhodnocení dat aktivity MPF a MAPK byl použit obecný lineární model v programu SAS 9.1 (Institut Inc., USA). Statistická významnost rozdílů mezi jednotlivými skupinami byla ověřována pomocí t-testu.

4. 3. Experimentální schéma

Experiment 1

Cílem tohoto experimentu bylo ověřit specifitu použitých protilátek a prokázat přítomnost dvou podjednotek kalcineurinu, katalytické podjednotky A (CnA) a regulační podjednotky B (CnB), ve vybraných stádiích meiotického zrání (GV, MI, MII) metodou Western blot. Oocyty byly analyzovány po 0, 24 a 48 hodinách kultivace *in vitro* a každý vzorek obsahoval 150 oocytů. Kumulární buňky z těchto oocytů byly odděleny a analyzovány jako samostatné vzorky. Analýza byla provedena nejméně čtyřikrát pro každou podjednotku kalcineurinu.

Experiment 2

Cílem tohoto experimentu bylo lokalizovat obě podjednotky kalcineurinu v průběhu meiotického zrání oocytů a po partenogenetické aktivaci oocytů.

- Pro lokalizaci CnA a CnB během meiotického zrání byly oocyty kultivovány 8, 18, 24, 48 hodin *in vitro.* Pro lokalizaci CnA a CnB během partenogenetické aktivace byly po 48 hodinách *in vitro* kultivace oocyty aktivovány dle protokolu a dalších 18 hodin kultivovány *in vitro*. K lokalizaci CnA a CnB byla použita imunocytochemická analýza a výsledky byly zobrazeny pomocí konfokální mikroskopie. Hodnoceny byly stadia oocytů GV 0 – IV, MI a MII. V každé skupině bylo připraveno k analýze vždy nejméně 11 oocytů. Všechny experimenty byly zopakovány nejméně čtyřikrát.

Experiment 3

Cílem tohoto experimentu bylo posoudit vliv nepyrethroidních inhibitorů kalcineurinu na průběh meiotického zrání oocytů *in vitro*.

Jako inhibitory byly použity cyklosporin A a hymenistatin I v těchto koncentracích:

- Cyklosporin A (CsA) – 0, 0.1, 1, 4 a 8μM
- Hymenistatin I (HS-I) – 0, 0.5, 2, 4 a 8 μM.

Koncentrace 0 μM sloužila jako kontrolní skupina meiotického zrání *in vitro.*

Oocyty byly kultivovány ve výše uvedeném kultivačním systému pro meiotické zrání *in vitro* po dobu 48 hodin s přídavkem příslušné dávky inhibitoru. Účinky nejvyšší koncentrace inhibitorů (8 μM) byly ověřeny navíc i v kultivaci prodloužené o 24 hodin

(celkový čas kultivace 72 hodin). Koncentrace byly zvoleny na základě předběžných experimentů. Hodnocen byl stav chromatinu a dosažená fáze jaderného zrání po kultivaci oocytů. V každé experimentální skupině bylo 40 oocytů a všechny experimenty byly zopakovány třikrát.

Experiment 4

Cílem tohoto experimentu bylo zjistit vliv inhibice kalcineurinu na partenogenetickou aktivaci oocytů. Oocyty byly po 46 hodinách kultivace in vitro (IVM) zbaveny kumulárních buněk a náhodně rozděleny do experimentálních skupin a dále ošetřeny a kultivovány dle následujících schémat. Celková doba in vitro kultivace oocytů byla ve všech skupinách stejná.

a) Inhibice cyklosporinem A

V tomto dílčím experimentu bylo testováno 5 variant ošetření, viz. Obrázek č. 4.

Ca-Io (pozitivní kontrola) – Oocyty byly kultivovány 2 hodiny v kultivačním médiu bez přídavku inhibitoru a poté partenogeneticky aktivovány kalcium ionoforem A23187. Poté byly opláchnuty a kultivovány dalších 24 hodin.

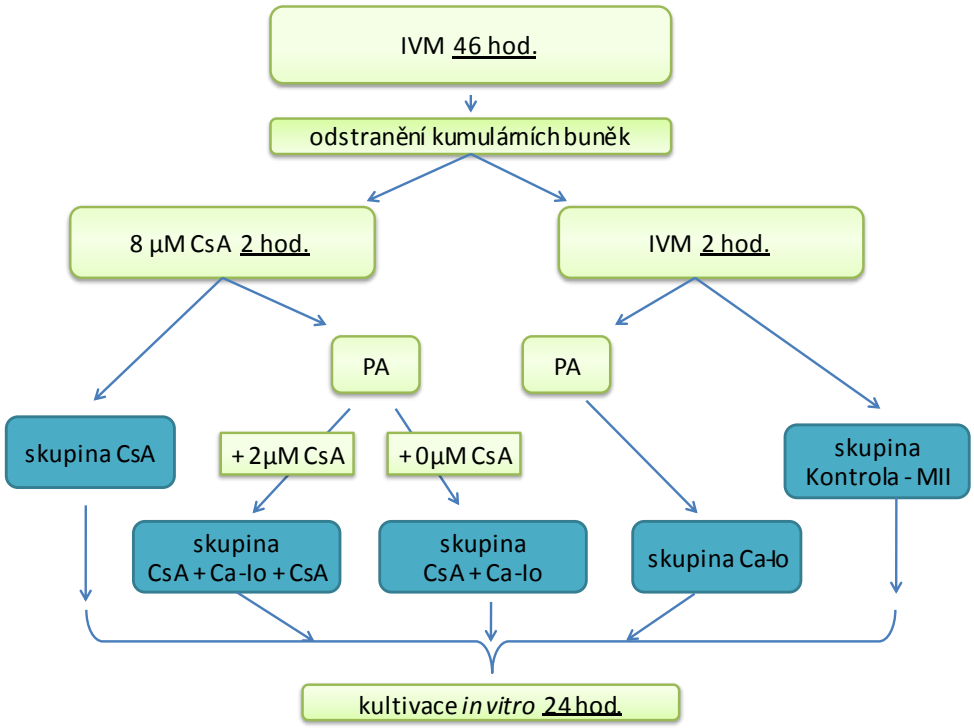
Kontrola – MII (negativní kontrola) – oocyty byly kultivovány *in vitro* dalších 26 hodin v modifikovaném médiu M199 bez přidání inhibitoru či kalcium ionoforu A23187 (celkem 72 hodin kultivace *in vitro*).

CsA (kontrola inhibitoru) – oocyty byly 2 hodiny kultivovány v přítomnosti cyklosporinu A v koncentraci 8 μM. Poté byly opláchnuty a kultivovány dalších 24 hodin *in vitro***.**

CsA + Ca-I + CsA – oocyty byly 2 hodiny kultivovány v přítomnosti cyklosporinu A (CsA) v koncentraci 8 μM. Následně byly opláchnuty a partenogeneticky aktivovány (PA) kalcium ionoforem A23187 (Ca-Io) po dobu 5 minut. Poté byly oocyty kultivovány *in vitro* s cyklosporinem A v koncentraci 2 μM dalších 24 hodin.

CsA + Ca-I oocyty byly 2 hodiny kultivovány v přítomnosti cyklosporinu A v koncentraci 8 μM. Následně byly opláchnuty a partenogeneticky aktivovány kalcium ionoforem A23187 (Ca-Io) po dobu 5 minut. Poté byly oocyty kultivovány *in vitro* dalších 24 hodin.

Obrázek č. 4: Schéma experimentu 4 – cyklosporin A



IVM – in vitro kultivace, PA – partenogenetická aktivace, CsA – cyklosporin A, Ca – Io – kalcium ionofor A23187

b) Inhibice hymenistatinem I

Pro ověření inhibičního účinku na kalcineurin byl použit hymenistatin I (HS-I). Oocyty byly po 46 hodinách kultivace in vitro (IVM) zbaveny kumulárních buněk a náhodně rozděleny do 4 skupin a dále ošetřeny a kultivovány, viz obr.č.):

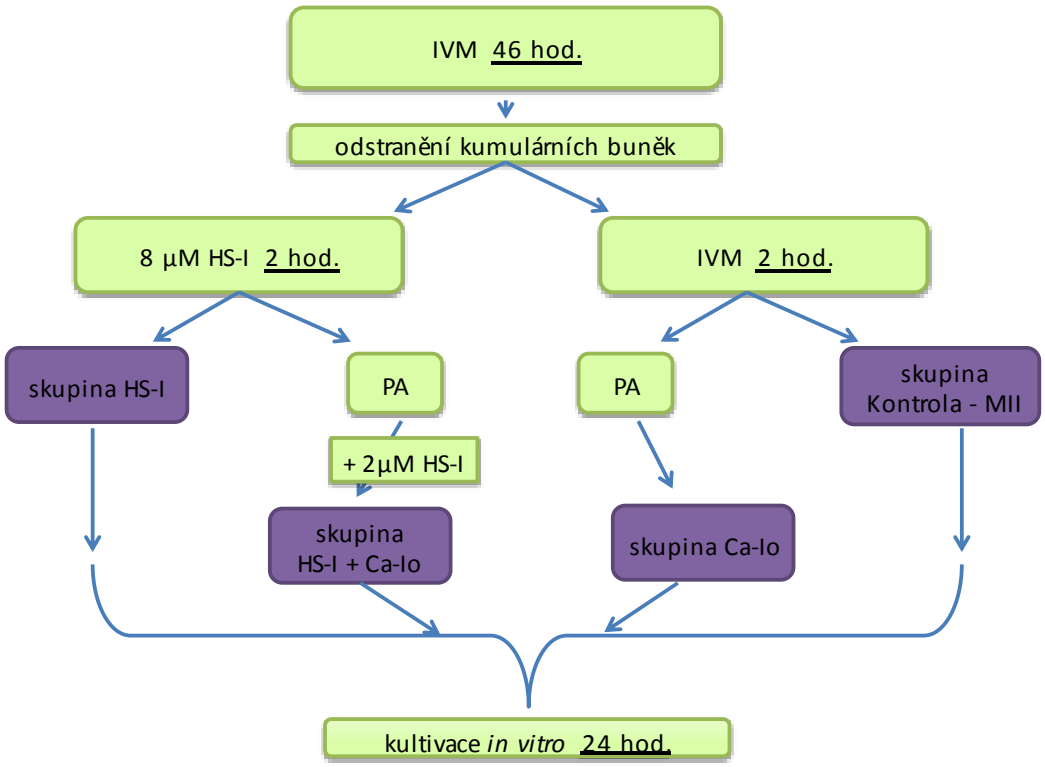
Kontrola – MII (negativní kontrola) – Oocyty byly kultivovány *in vitro* dalších 26 hodin v modifikovaném médiu M199 bez přidání inhibitoru či kalcium ionoforu A23187 (celkem 72 hodin kultivace).

Ca-Io (pozitivní kontrola) – Oocyty byly kultivovány 2 hodiny v modifikovaném médiu M199 bez přídavku inhibitoru a poté partenogeneticky aktivovány kalcium ionoforem A23187 (Ca-Io) po dobu 5 minut. Poté byly opláchnuty a kultivovány dalších 24 hodin v modifikovaném médiu M199.

HS-I (kontrola inhibitoru) – Oocyty Oocyty byly 2 hodiny kultivovány v přítomnosti hymenistatinu I v koncentraci 8 µM. Poté byly opláchnuty a kultivovány dalších 24 hodin v čistém kultivačním médiu.

HS-I + Ca-Io – Oocyty byly 2 hodiny kultivovány v přítomnosti hymenistatinu I (HS-I) v koncentraci 8 µM. Následně byly opláchnuty a partenogeneticky aktivovány (PA) kalcium ionoforem A23187 (Ca-Io) po dobu 5 minut. Poté byly oocyty kultivovány *in vitro* v kultivačním médiu s hymenistatinem I v koncentraci 2 µM dalších 24 hodin.

Obrázek č. 5: Schéma experimentu 4 – hymenistatin-I



IVM – in vitro kultivace, PA – partenogenetická aktivace, HS – I – hymenistatin I, Ca – Io – kalcium ionofor A23187

U oocytů byl hodnocen stav chromatinu, za partenogeneticky aktivované byly považovány oocyty s vytvořeným prvojádrem. Experiment proběhl nejméně ve 4 opakováních.

Experiment 5

Cílem tohoto experimentu bylo zjistit účinek inhibice kalcineurinu cyklosporinem A v průběhu meiotického zrání. Posuzován byl vliv na aktivitu významných kináz, MPF a MAPK, během aktivace prasečích oocytů.

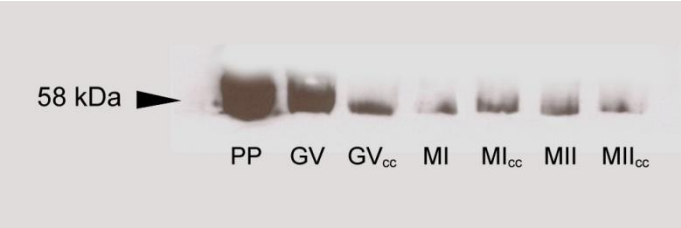
Oocyty kultivované 46 hodin *in vitro* byly zbaveny kumulárních buněk a inkubovány po dobu 2 hodin v modifikovaném médiu M199 v přítomnosti cyklosporinu A v koncentraci 8 μM. Poté byly oocyty opláchnuty a partenogeneticky aktivovány kalcium ionoforem A23187 dle výše uvedeného protokolu. Oocyty byly následně kultivovány *in vitro* dalších 12 a 24 hodin v modifikovaném médiu M199. Po uplynutí této doby byly zpracovány vzorky obsahující 10 oocytů a byla provedena analýza kinázové aktivity. Tento experiment byl opakován nejméně čtyřikrát.

5. Výsledky

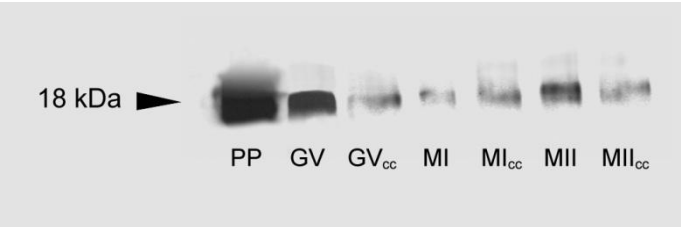
5. 1. Detekce podjednotek A a B kalcineurinu

Pomocí metody western blot byla ověřena specifita použitých protilátek - protilátka anti kalcineurin A reagovala s proteinem o molekulové hmotnosti 58 kDa a anti kalcineurin B s proteinem o molekulové hmotnosti 18 kDa. Zároveň byla pomocí této metody prokázána přítomnost katalytické podjednotky A (CnA) i regulační podjednotky B (CnB). Exprese obou sledovaných podjednotek byla zaznamenána v oocytech ve stádiu zárodečného váčku (GV), metafáze I (MI) a metafáze II (MII) a také přilehlých kumulárních buňkách (Obrázek č. 6 a obrázek č. 7).

Obrázek č. 6: **Detekce CnA v oocytech a kumulárních buňkách v různé fázi zrání pomocí metody Western blot**



Obrázek č. 7: Detekce CnB v oocytech a kumulárních buňkách v různé fázi zrání pomocí metody Western blot



PP – čistý protein kalcineurin z hovězího mozku (5 ng), GV – oocyty ve stádiu zárodečného váčku, MI – oocyty kultivované 24 hodin do stádia I.meiotické metafáze, MII – oocyty kultivované 48 hodin do stádia II.meiotické metafáze. GVcc – kumulární buňky získané z oocytů ve stádiu GV, MIcc – kumulární buňky získané z oocytů kultivovaných 24 hodin do stádia I.meiotické metafáze, MIIcc – kumulární buňky získané z oocytů kultivovaných 48 hodin do stádia II.meiotické metafáze. Každý vzorek obsahoval 150 oocytů nebo kumulární buňky z nich získané.

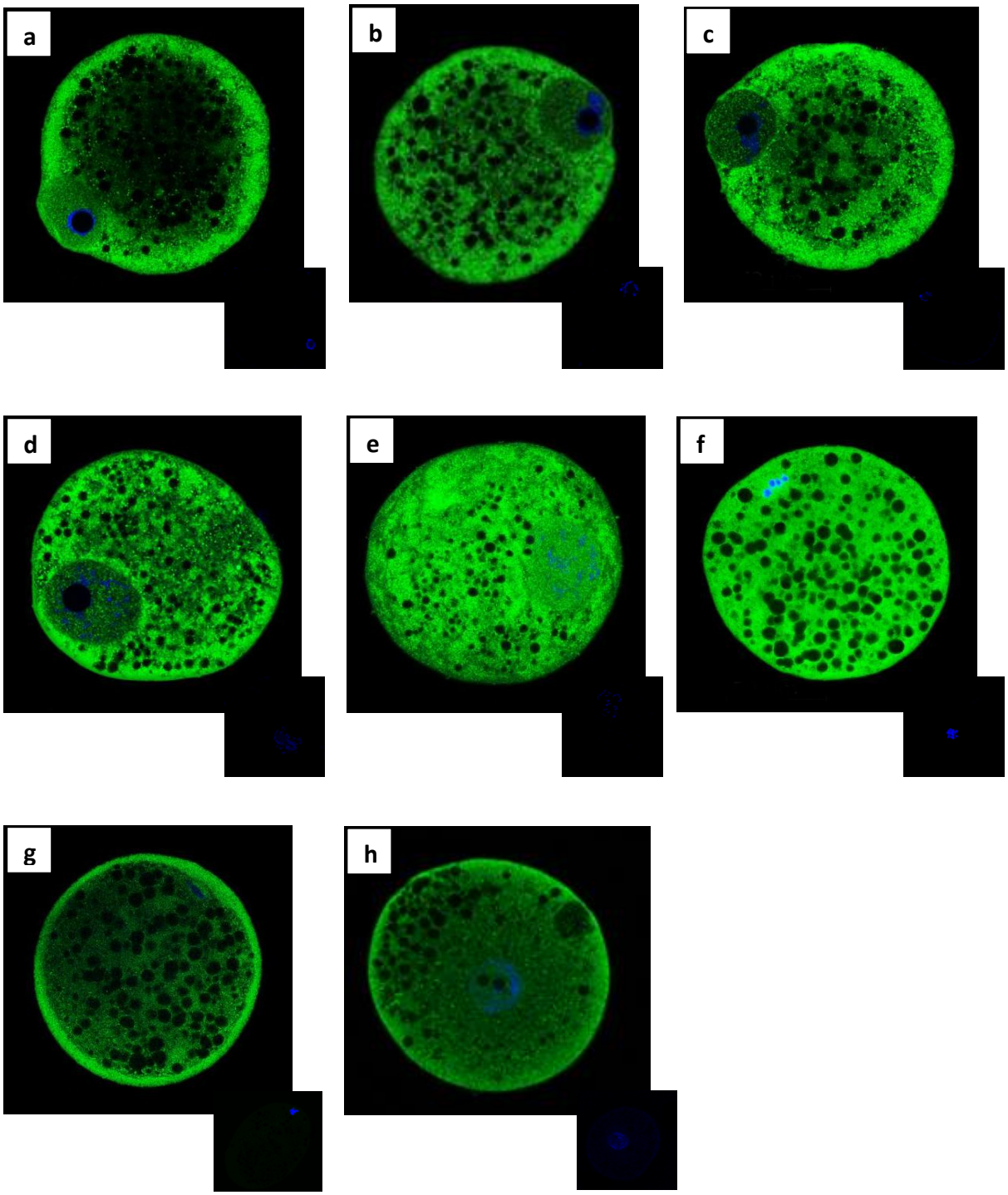
5.2. Lokalizace podjednotek A a B kalcineurinu v průběhu meiotického zrání a partenogenetické aktivace oocytů

Imunocytochemická analýza prokázala přítomnost obou podjednotek kalcineurinu v oocytech v průběhu meiotického zrání i u oocytů partenogeneticky aktivovaných. Intenzita fluorescence byla měřena ve třech oblastech oocytů – v jádře, resp. perichromozomální oblasti oocytů, korové oblasti a cytoplazmě. Během meiotického zrání se intenzita fluorescence obou podjednotek statisticky významně měnila. Celkové nejvyšší intenzity dosahovaly obě podjednotky u oocytů ve stadiu MII a v oocytech partenogeneticky aktivovaných. V průběhu zrání docházelo rovněž ke statisticky průkazným změnám v lokalizaci obou podjednotek kalcineurinu uvnitř oocytu. V rámci intraoocytární lokalizace bylo ve všech sledovaných stádiích meiotického zrání naměřeny nejvyšší hodnot fluorescenčního signálu obou podjednotek v korové oblasti oocytů

U kalcineurinu A byly nejnižší hodnoty intenzity fluorescence naměřeny v oocytech ve stádiu GV0 a MI. Ve stádiu MII a u oocytů po partenogenetické aktivaci byly hodnoty naopak nejvyšší. Distribuce kalcineurinu A v oocytu se měnila během rozpadu zárodečného váčku z původní rozptýlené na homogenní (Obrázek č. 7). Rozdíly v intenzitě fluorescence mezi jednotlivými oblastmi oocytu se v průběhu meiotického zrání zmenšovaly a ve stadiu metafáze I již nebyly patrné. V partenogeneticky aktivovaných oocytech byl protein zaznamenán rovněž v oblasti prvojader a to zejména u podjednotky A. Po aktivaci oocytů byl též zaznamenán pokles intenzity fluorescence kalcineurinu A v cytoplazmě (Tabulka č. 3 a tabulka č. 4).

Intenzita fluorescence kalcineurinu B byla ve srovnání s kalcineurinem A v průběhu zrání nižší, nicméně redistribuce obou podjednotek v průběhu zrání byla s vyjímkou stadia MII obdobná jako u kalcineurinu A. Po znovuzahájení meiozy se intenzita fluorescence kalcineurinu B zvyšovala v jádře oocytů ve stadiu GV II – IV a svého minima dosahovala ve stadiu metafáze I. (Obrázek č. 8). Celkově největší depozitum obou podjednotek kalcineurinu bylo lokalizováno v korové oblasti oocytů v metafázi II a po partenogenetické aktivaci, v dalších sledovaných oddílech oocytu byly však mezi podjednotkami rozdíly. Zatímco u kalcineurinu A signál v perichromozomální oblasti dosahoval vyšších hodnot než v cytoplazmě, u kalcineurinu B byla situace opačná. Aktivované oocyty vykazovaly v oblasti prvojádra významně vyšší intenzitu fluorescence kalcineurinu A, zatímco intenzita fluorescence podjednotky B se v prvojádře po aktivaci snížila (Tabulka č. 5 a Tabulka č. 6).

Obrázek č. 7: Lokalizace kalcineurinu A v průběhu meiotického zrání a partenogenetické aktivace oocytů



Kalcineurin A (CnA) byl lokalizován v oocytech ve stádiu GV 0 (a), GV II (b), GV III (c), GV IV (d), ve stádiu metafáze I (e), ve stádiu metafáze II (f) a v oocytech partenogeneticky aktivovaných (g). Zelenou barvou je značen kalcineurin A pomocí FITC, modře chromatin pomocí DAPI. Zmenšené fotografie v pravém rohu slouží k dokumentaci negativních kontrol příslušných stádií meiotického zrání. Oocyty jsou snímány v ekvatoriální rovině při zvětšení 400x.

Tabulka č. 3: Relativní intenzita fluorescence kalcineurinu A v průběhu meiotického zrání oocytů

Stádium jaderného zrání	počet oocytů ve skupině	Oblasti oocytu		
		jádro/perichromozomální oblast	korová oblast	Cytoplasma
GV 0	16	0,26 ± 0,06 ^{aA}	0,43 ± 0,07 ^{aB}	0,31 ± 0,03 ^{aC}
GV I	11	0,37 ± 0,03 ^{acA}	0,63 ± 0,03 ^{bB}	0,50 ± 0,02 ^{bC}
GV II	26	0,40 ± 0,03 ^{bcA}	0,60 ± 0,04 ^{bcB}	0,50 ± 0,02 ^{bC}
GV III	31	0,41 ± 0,03 ^{bcA}	0,61 ± 0,03 ^{bcB}	0,49 ± 0,02 ^{bC}
GV IV	17	0,45 ± 0,04 ^{bA}	0,55 ± 0,07 ^{acB}	0,50 ± 0,04 ^{bC}
MI	15	0,31 ± 0,05 ^{aA}	0,39 ± 0,06 ^{aB}	0,30 ± 0,04 ^{aA}
MII	17	0,67 ± 0,26 ^{bcA}	1,18 ± 0,38 ^{bcB}	0,75 ± 0,23 ^{bA}

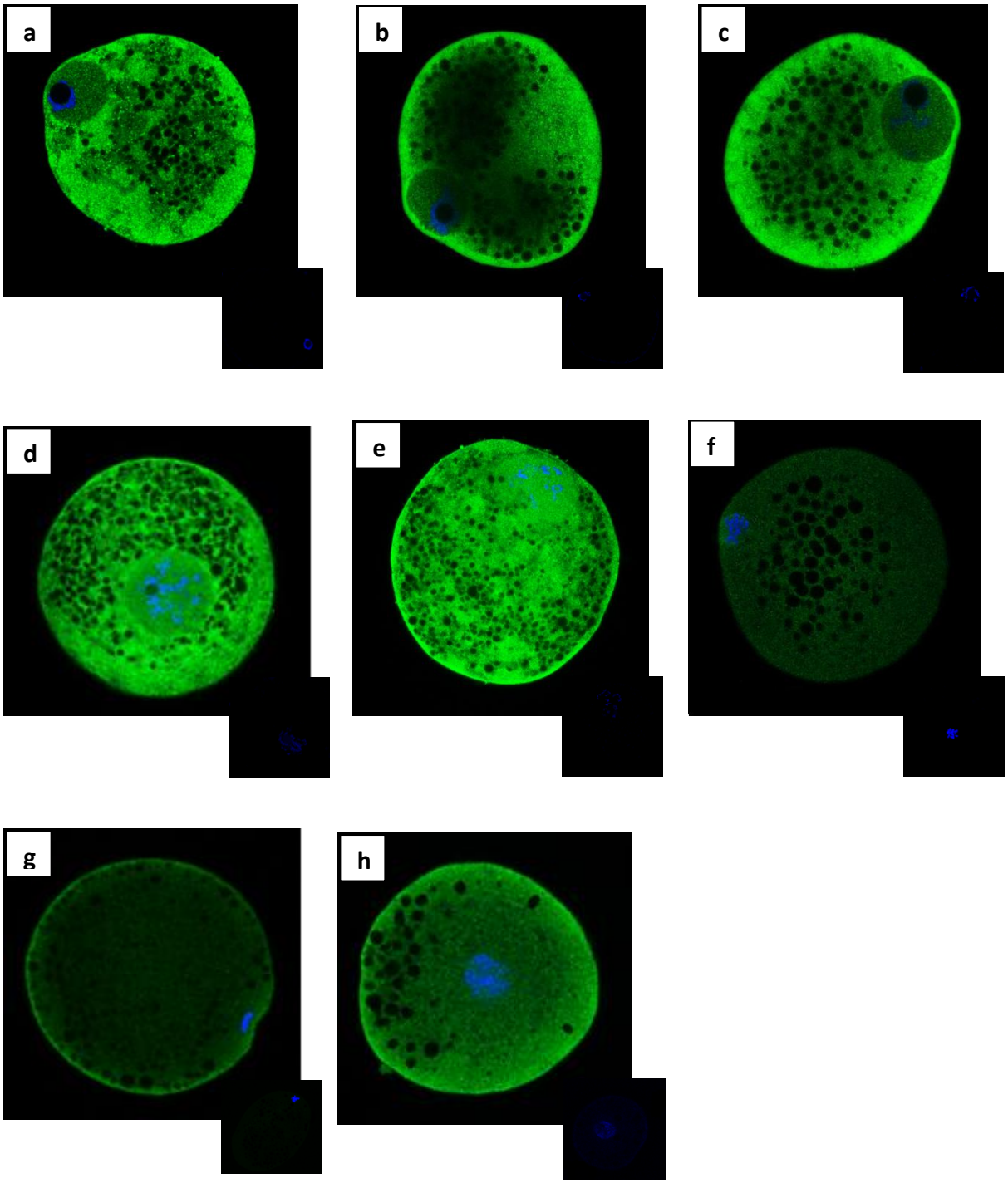
Výsledky jsou uvedené jako průměr ± směrodatná odchylka. GV – stádium zárodečného váčku, MI – metafáze I, MII – metafáze II. ^{a,b,c} hodnoty ve sloupci s různými superskripty jsou rozdílné ($P < 0.05$). ^{A,B,C} hodnoty v řádku s různými superskripty jsou rozdílné ($P < 0.05$). Metafázní figura byla pozorována v oocytech ve stádiu první a druhé metafáze.

Tabulka č. 4: Relativní intenzita fluorescence kalcineurinu A partenogeneticky aktivovaných oocytů

Stádium jaderného zrání	počet oocytů ve skupině	Oblasti oocytu		
		jádro/perichromozomální oblast	korová oblast	Cytoplasma
M II	20	0,78 ± 0,12 ^{aA}	1,13 ± 0,12 ^{aB}	1,09 ± 0,10 ^{aB}
PA	20	0,91 ± 0,18 ^{aA}	1,12 ± 0,16 ^{aB}	0,96 ± 0,06 ^{bA}

Výsledky jsou uvedené jako průměr ± směrodatná odchylka. MII – metafáze II. PA – partenogeneticky aktivované oocyty. ^{a,b} hodnoty ve sloupci s různými superskripty jsou rozdílné ($P < 0.05$). ^{A,B} hodnoty v řádku s různými superskripty jsou rozdílné ($P < 0.05$). Metafázní figura byla pozorována v oocytech ve stádiu druhé metafáze.

Obrázek č. 8: Lokalizace kalcineurinu B v průběhu meiotického zrání a partenogenetické aktivace oocytů



Kalcineurin B (CnB) byl lokalizován v oocytech ve stádiu GV 0 (a), GV II (b), GV III (c), GV IV (d), ve stádiu metafáze I (e), ve stádiu metafáze II (f) a v oocytech partenogeneticky aktivovaných (g). Zelenou barvou je značen kalcineurin B pomocí FITC, modře chromatin pomocí DAPI. Zmenšené fotografie v pravém rohu slouží k dokumentaci negativních kontrol příslušných stádií meiotického zrání. Oocyty jsou snímány v ekvatoriální rovině při zvětšení 400x.

Tabulka č. 5: Relativní intenzita fluorescence kalcineurinu B v průběhu meiotického zrání oocytů

Stádium jaderného zrání	počet oocytů ve skupině	Oblasti oocytu		
		jádro/perichromozomální oblast	korová oblast	Cytoplasma
GV 0	19	$0,27 \pm 0,05^{aA}$	$0,42 \pm 0,08^{adB}$	$0,32 \pm 0,03^{acAB}$
GV I	13	$0,39 \pm 0,04^{acA}$	$0,64 \pm 0,05^{bcB}$	$0,48 \pm 0,03^{bC}$
GV II	18	$0,41 \pm 0,04^{acA}$	$0,63 \pm 0,05^{bcB}$	$0,47 \pm 0,03^{abC}$
GV III	20	$0,43 \pm 0,05^{bcA}$	$0,60 \pm 0,05^{acB}$	$0,47 \pm 0,03^{abC}$
GV IV	17	$0,45 \pm 0,04^{bcA}$	$0,58 \pm 0,05^{acdB}$	$0,47 \pm 0,03^{abA}$
MI	16	$0,28 \pm 0,03^{aA}$	$0,41 \pm 0,04^{dB}$	$0,31 \pm 0,02^{cA}$
MII	19	$1,04 \pm 0,02^{bcA}$	$1,16 \pm 0,04^{acB}$	$0,80 \pm 0,07^{abC}$

Výsledky jsou uvedené jako průměr ± směrodatná odchylka. GV – stádium zárodečného váčku, MI – metafáze I, MII – metafáze II. ^{a,b,c}hodnoty ve sloupci s různými superskripty jsou rozdílné ($P < 0.05$). ^{A,B,C}hodnoty v řádku s různými superskripty jsou rozdílné ($P < 0.05$). Metafázní figura byla pozorována v oocytech ve stádiu první a druhé metafáze.

Tabulka č. 6: Relativní intenzita fluorescence kalcineurinu B partenogeneticky aktivovaných oocytů

Stádium jaderného zrání	počet oocytů ve skupině	Oblasti oocytu		
		jádro/perichromozomální oblast	korová oblast	Cytoplasma
M II	23	$0,93 \pm 0,28^{aA}$	$1,36 \pm 0,22^{aB}$	$0,71 \pm 0,15^{aC}$
PA	13	$0,80 \pm 0,05^{abA}$	$1,34 \pm 0,10^{aB}$	$0,85 \pm 0,08^{bA}$

Výsledky jsou uvedené jako průměr ± směrodatná odchylka. MII – metafáze II. PA – partenogeneticky aktivované oocyty. ^{a,b}hodnoty ve sloupci s různými superskripty jsou rozdílné ($P < 0.05$). ^{A,B}hodnoty v řádku s různými superskripty jsou rozdílné ($P < 0.05$). Metafázní figura byla pozorována v oocytech ve stádiu druhé metafáze.

5. 3. Vliv inhibitorů kalcineurinu na meiotické zrání oocytů

Schopnost plně kompetentních oocytů dozrát za 48 hodin v *in vitro* podmínkách byla nepyretroidními inhibitory kalcineurinu narušena a tento efekt byl pozorován v závislosti na dávce inhibitoru (Tabulka č. 7 a Tabulka č. 8).

Zpomalení meotického zrání vlivem inhibitorů bylo prokázáno prodloužením kultivace na oocytů ze 48 na 72 hodin. V kultivačním mediu s přídavkem 8 μM cyklosporinu A, dosáhlo 91% stadia MII. Jestliže byl do kultivačního media za stejných podmínek přidán hymenistatin I v koncentraci 8 μM, do stadia MII dozrálo 88% oocytů. Zbytek oocytů v každé experimentální skupině dosáhl po 72 hodinové kultivaci stadia MI.

Výsledky prodloužené kultivace oocytů s nepyretroidními inhibitory kalcineurinu o 24 hodin (celkový čas kultivace 72 hodin) jsou obdobné jako po 48 hodinové kultivaci oocytů v kultivačním médiu bez přídavku těchto inhibitorů. V maximálních testovaných koncentracích 8μM cyklosporinu A (n = 50) a 8μM hymenistatinu I (n = 50) jsme nezaznamenali během 48 hodinové kultivace degenerované oocyty. Ani životaschopnost oocytů nebyla statisticky významně snížena. Účinky cyklosporinu A se projevily ve všech sledovaných koncentracích. Efekt hymenistatinu I na úroveň jaderného zrání oocytů se projevil od koncentrace 2μM. Mezi nejvyšší testovanou koncentrací (8μM) a koncentrací 4μM nebyly ani u jednoho z testovaných inhibitorů statisticky významné rozdíly v účinnosti na zrání oocytů.

Tabulka č. 7: Vliv cyklosporinu A na meiotické zrání oocytů

Fáze jaderného zrání (%)	**Koncentrace cyklosporinu A (□M)**				
	0	0,1	1	4	8
GV	0 ± 0^{a}	0 ± 0^{a}	0 ± 0^{a}	6 ± 1^{a}	10 ± 3^{a}
MI – TI	0 ± 0^{a}	21 ± 3^{b}	36 ± 4^{c}	49 ± 2^{cd}	58 ± 4^{d}
MII	100 ± 0^{a}	79 ± 3^{b}	64 ± 4^{b}	45 ± 2^{c}	32 ± 2^{c}

^{a,b,c,d} *odlišné superskripty značí statisticky průkazné rozdíly v řádcích mezi jednotlivými koncentracemi cyklosporinu A (P < 0,05). V každé experimentální skupině bylo vyhodnoceno celkem 120 oocytů.*

Tabulka č. 8: Vliv hymenistatinu I na meiotické zrání oocytů

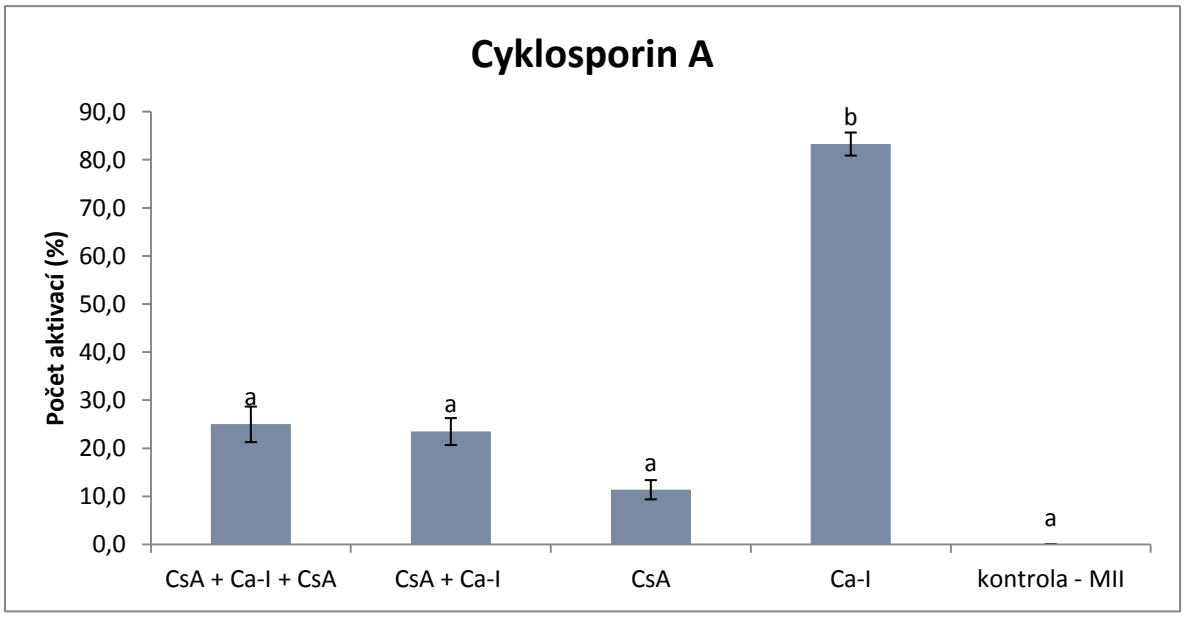
Fáze jaderného zrání (%)	**Koncentrace hymenistatinu I (□M)**				
	0	0,5	2	4	8
GV	0 ± 0^{a}	0 ± 0^{a}	0 ± 0^{a}	0 ± 0^{a}	7 ± 2^{a}
MI – TI	0 ± 0^{a}	9 ± 1^{ab}	20 ± 2^{b}	35 ± 3^{c}	38 ± 5^{c}
MII	100 ± 0^{a}	91 ± 1^{ab}	88 ± 2^{b}	65 ± 3^{c}	55 ± 4^{c}

^{a,b,c,d} *odlišné superskripty značí statisticky průkazn rozdíly v řádcích mezi jednotlivými koncentracemi hymenistatinu I (P < 0,05). V každé experimentální skupině bylo vyhodnoceno celkem 120 oocytů.*

5. 4. Vliv inhibitorů kalcineurinu na aktivaci oocytů

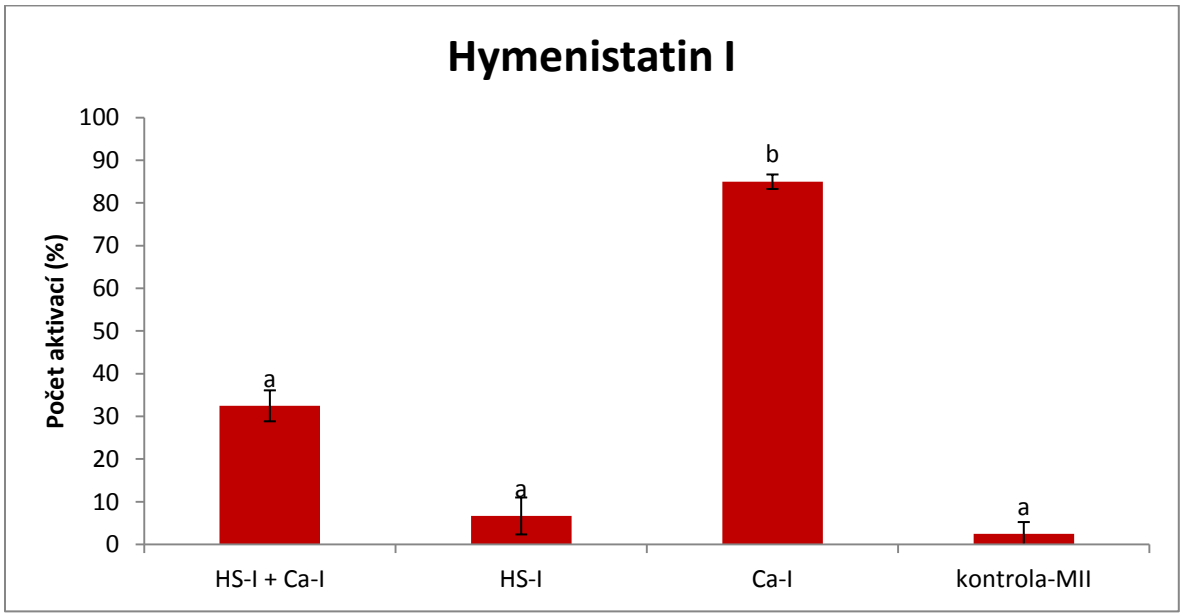
Předmětem tohoto experimentu bylo otestovat, zda inhibice kalcineurinu cyklosporinem A a hymenistatinem I zabrání zralým oocytům vystoupit z MII, dokončit meiozu a vytvořit prvojádra po partenogenetické aktivaci. U zralých oocytů partenogeneticky aktivovaných kalcium ionoforem a kultivovaných dalších 24 hodin *in vitro* se u více než 80% oocytů prvojádra vytvořila. Ošetření oocytů oběma inhibitory kalcineurinu během aktivace významně snížilo procento aktivovaných oocytů, jak je patrné z grafů č. 1 a 2.

Graf č. 1: Partenogeneticky aktivované oocyty po ošetření cyklosporinem A a kalcium ionoforem A23187



CsA – cyklosporin A, Ca-I – kalcium ionofor, MII – oocyty v metafázi II.
Oocyty byly ošetřeny cyklosporinem A ve výše uvedených koncentracích a/nebo kalcium ionoforem. Oocyty byly považovány za aktivované v případě, že bylo vytvořeno prvojádro. Data jsou uváděna jako průměr ± SD. Odlišné superskripty ^{a,b} znázorňují statisticky významné rozdíly mezi skupinami ($P < 0,05$).

Graf č. 2: Partenogeneticky aktivované oocyty po ošetření hymenistatinem I a kalcium ionoforem A23187

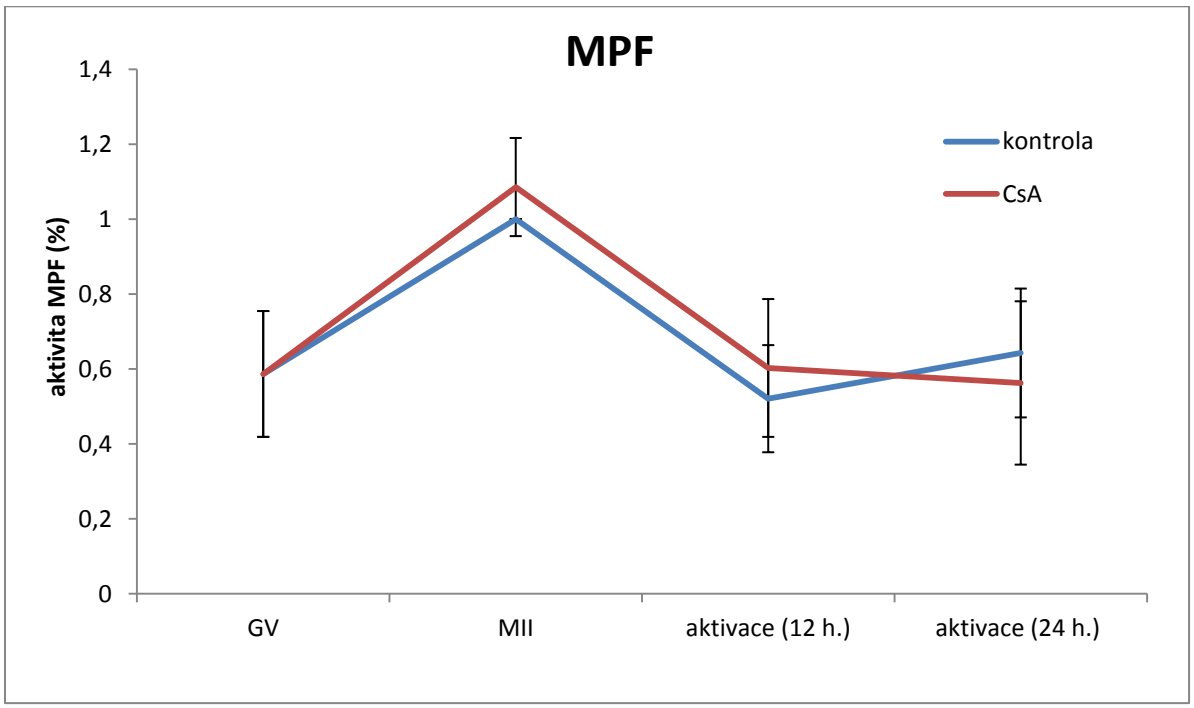


HS-I – hymenistatin I, Ca-I – kalcium ionofor, MII – oocyty v metafázi II.
Oocyty byly ošetřeny hymenistatinem I a/nebo kalcium ionoforem. Oocyty byly považovány za aktivované v případě, že bylo vytvořeno prvojádro. Data jsou uváděna jako průměr ± SD. Odlišné superskripty ^{a,b} *znázorňují statisticky významné rozdíly mezi skupinami (P < 0,05).*

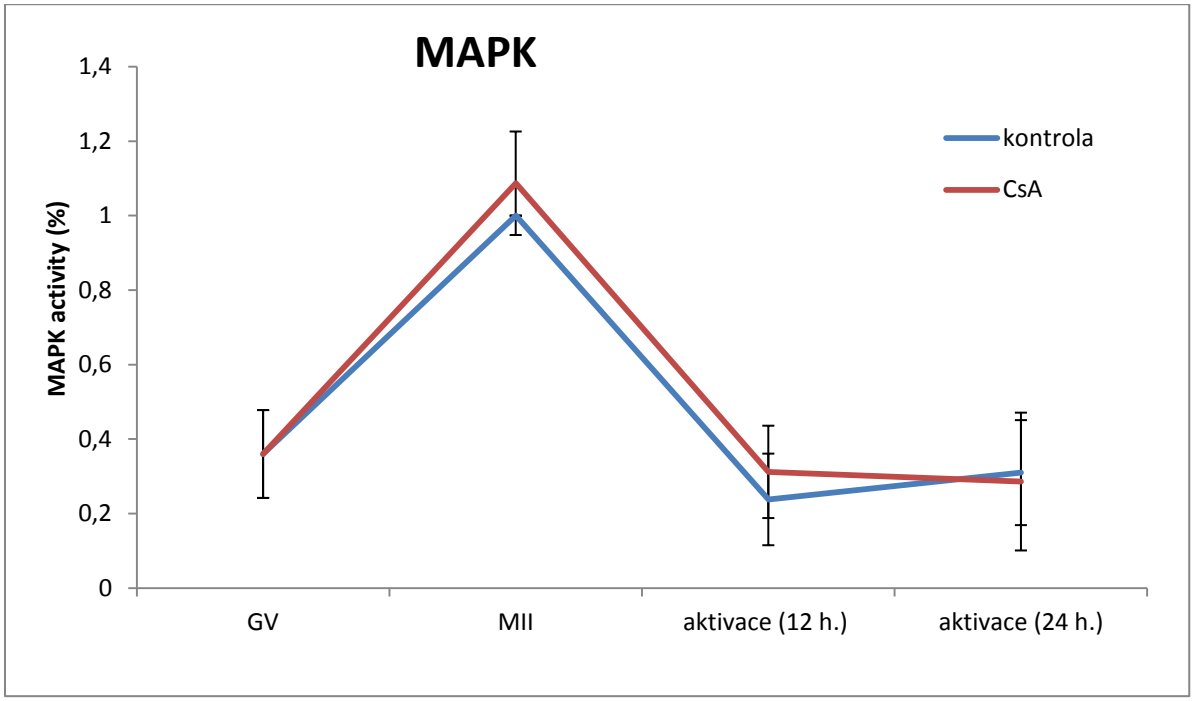
5. 5. Vliv inhibice kalcineurinu na úroveň aktivity MPF a MAPK během aktivace oocytů

Cílem tohoto experimentu bylo zjistit vliv inhibice kalcineurinu na hladiny MPF a MAPK v průběhu aktivace oocytů. Po 48 hodinové kultivaci *in vitro* byly oocyty ošetřeny cyklosporinem A a následně partenogeneticky aktivovány a kultivovány dalších 12 nebo 24 hodin. V průběhu aktivace oocytů došlo k poklesu aktivity MPF i MAPK. Tento pokles však nebyl statisticky významný v porovnání s kontrolní skupinou oocytů kultivovaných v čistém médiu bez přídavku cyklosporinu A (graf č. 3 a graf č. 4).

Graf č. 3: Vliv cyklosporinu A na aktivitu MPF partenogeneticky aktivovaných oocytů



Graf č. 4: Vliv cyklosporinu A na aktivitu MAPK partenogeneticky aktivovaných oocytů



CsA – cyklosporin A, kontrola – oocyty v čistém kultivačním mediu.

Grafy ukazují aktivitu MPF a MAPK oocytů kultivovaných s nebo bez přídavku cyklosporinu A v průběhu partenogenetické aktivace oocytů.

6. Diskuze

V této studii byla poprvé prokázána přítomnost kalcineurinu v oocytech prasete a také jeho významná role v meiotickém zrání a procesu aktivace prasečích oocytů.

Western blot analýzou byly detekovány A i B podjednotky kalcineurinu v plně meioticky kompetentních oocytech i přilehlých kumulárních buňkách v průběhu meiotického zrání, přičemž nejvyšších hodnot dosahovala exprese obou podjednotek kalcineurinu ve stádiu zárodečného váčku. Kalcineurin byl doposud v samičích pohlavních orgánech identifikován pouze v ováriích a raných embryí mouchy *Drosophila* (Takeo et al., 2006), v oocytech drápatky *Xenopus* (Mochida et Hunt, 2007, Nishiyama et al., 2007) a sumky (Levasseur et al., 2013). U prasete byl kalcineurin poprvé nalezen na plazmatické membráně lymfocytů, později i v různých typech somatických buněk, např. v bílých krvinkách (Chantler et al., 1985) nebo kosterní svalovině (de Jonge et al., 2006). Výskyt obou podjednotek kalcineurinu byl pozorován již v minulosti v prasečích spermiích (Tash et al., 1988). Tato studie jako první popisuje výskyt kalcineurinu také v samičích gametách prasete, oocytech

Pomocí imunocytochemické metody byly obě podjednotky kalcineurinu lokalizovány v oocytech během celého procesu zrání i aktivace. Jejich množství i distribuce v oocytu se však v jednotlivých stádiích meiotického zrání i po partenogenetické aktivaci oocytů lišily. Doposud nebyly publikovány žádné studie zaměřené na redistribuci a lokalizaci kalcineurinu v průběhu meiotického zrání oocytů. Naše výsledky poukazují na to, že kalcineurin je důležitý pro regulaci zrání i aktivace oocytů a zároveň je důležité, v jaké konkrétní části oocytu se nachází. Signifikantní zvýšení intenzity fluorescence kalcineurinu, které jsme zaznamenali v jádře oocytů ve stadiu GV II a GVII je spojeno s rozpadem jaderné membrány, v době kdy začíná být jaderná membrána značně zvlněná (Motlík et Fulka, 1986) a je tedy součástí přípravy oocytu na rozpad zárodečného váčku. Kalcineurin je znám jako regulátor transkripce v somatických buňkách (Crabtree, 2001), nicméně oocyty s ukončeným růstem jsou před znovuzahájením meiotického zrání již transkripčně neaktivní (Motlik et al., 1984). U prasat je oocyt ve stadiu GV dlouho dobu a během této doby se v něm odehrává mnoho biosyntetických a biochemických pochodů (Hunter, 2000). Kalcineurin se může účastnit řady z nich, včetně přípravy na GVBD a vstupu oocytu do metafáze I, čemuž nasvědčuje jeho vysoké množství v zárodečném váčku meioticky kompetentních oocytů. Zároveň jsme zaznamenali pokles intenzity fluorescence u obou podjednotek kalcineurinu v perichromozomální oblasti oocytů ve stádiu metafáze I. V té době je tvorba meiotického vřeténka oocytu téměř u konce (Hafez et Hafez, 2000). Tento fakt může naznačovat, že

kalcineurin je významný zejména na začátku formování vřeténka a v závěrečné fázi už není jeho fosfatázová aktivita nezbytná.

Obě podjednotky kalcineurinu byly ve velké míře lokalizovány v korové oblasti oocytů. Přítomnost kalcineurinu v této části oocytu není překvapivá, uvážíme-li spojení kalcineurinu s aktinovými vlákny cytoskeletu popsané u řady typů somatických buněk (Ferreira et al., 1993, Faul et al., 2008) a přítomnost značného množství vláken aktinu v korové oblasti oocytu prasat (Wang et al., 2000). O spojitosti mezi distribucí kalcineurinu a mikrotubulovými filamenty v samčích gametách svědčí práce Moreno et al. (2006), popisující lokalizaci kalcineurinu ve spermatidách myší pouze v jádře, v místě s hustou sítí mikrofilament (Alberts et al., 1998). Vysoká intenzita fluorescence byla naměřena taktéž u partenogeneticky aktivovaných oocytů v okolí prvojader, kde se rovněž nachází síť mikrotubulů, důležitá při migraci prvojader do středu oocytu (Schatten, 1994). Je známo, že kalcineurin má silný vliv na fosforylaci složek cytoskeletu buňky (Silverman-Gavrila et Charlton, 2009). Můžeme se proto domnívat, že by v savčích zygotách mohl být kalcineurin zapojen do organizace mikrotubulů při tvorbě mikrotubulární sítě důležité pro migraci prvojader.

V korové oblasti oocytu jsou lokalizována také kortikální granula (Thibault et al., 1987; Wassarman, 1988), která jsou zde uchycena pomocí vrstvy aktinových filament (Longo et Chen, 1985). Vysoká koncentrace kalcineurinu v korové oblasti oocytů ve stadiu metafáze II by nasvědčovala spojení kalcineurinu s exocytozou kortikálních granul v průběhu aktivace oocytů, protože se jedná o kalcium dependentní proces, do kterého je zapojeny aktivátory kalcineurinu, kalmodulin a vápník (Ducibella, 1996; Klee et al., 1988). Nicméně, vysokou intenzitu fluorescenčího signálu kalcineurinu jsme zaznamenali také v oocytech oocytů po partenogenetické aktivaci. Lze tedy spíše předpokládat, že kalcineurin není obsažen v kortikálních granulích, ale nachází se v jejich okolí pod oolemou, protože během exocytózy kortikálních granul dochází k jejich přesunu směrem k oolemě pomocí zkracování a depolymerizace aktinových filament (Ducibella, 1996), přičemž do defosforylace aktinu je zapojen pravděpodobně i kalcineurin. Zároveň se může promítnout zapojení kalcineurinu do kontroly transkripce (Crabtree, 2001) rovněž v transkripci genů v embryu.

Intenzita fluorescenčního signálu obou podjednotek kalcineurinu se během meiotického zrání oocytů zvyšovala a maxima dosahovala v oocytech v metafázi II a po jejich aktivaci. U mouchy *Drosophila* i drápatky *Xenopus* byl nárůst kalcineurinu prokázán po oplození oocytu (Krauchunas et al., 2013). Zvyšující se intenzita fluorescence kalcineurinu

v těchto fázích koresponduje se schopností oocytů uvolnit vápník, která se zvyšuje v průběhu meiotického zrání a svého maxima dosahuje ve stadiu metafáze II (Carroll et al., 1994; Mehlmann et Kline, 1994). Oscilace vápníku jsou nezbytné pro zrání oocytů (Kaufman et Homa, 1993) a zvýšení hladiny vápenatých iontů je u oocytů spojována s oplozením a jejich aktivací (Swann et Ozil, 1994). Nárůst námi zaznamenané intenzity signálu podjednotky A kalcineurinu v průběhu rozpadu zárodečného váčku koreluje s úlohou vápníku v oocytech při časném výstupu z I. meiotického bloku (Wassarmann, 1988). Navíc, v našich předešlých studiích (Petr et al., 2001, Rozinek et al., 2006) jsme v oocytech prasete lokalizovali vyšší množství kalciových depozit v jádru, karyoplazmě a cytoplazmě, podobně jako nyní u kalcineurinu. Vzhledem k faktu, že kalcineurin je aktivován po navázání vápenatých iontů, může být tato protein fosfatáza jedním z cílových systémů pro vápníkovou signalizaci spuštěnou spermií při oplození (Malcuit et al., 2006) či může reagovat na oscilace vápníku v oocytu během zrání oocytu i po jeho aktivaci. Intenzita fluorescence podjednotky B kalcineurinu byla v průběhu zrání i po partenogenetické aktivaci výrazně nižší ve srovnání s podjednotkou A. To by mohlo naznačovat významnější zapojení podjednotky A v meiotické i vývojové kompetenci oocytů prasat.

V dalších experimentech byly zjišťovány účinky kalcineurinu na průběh zrání a aktivaci oocytů prasat pomocí specifických inhibitorů kalcineurinu - cyklosporinu A a hymenistatinu I. Schopnost oocytů dosáhnout po 48 hodinové kultivaci *in vitro* stádia metafáze II byla vlivem inhibitorů zpomalena. Podobné inhibiční účinky na meiotické zrání oocytů prasat mají také pyretroidní inhibitory kalcineurinu (Petr et al., 2013). Přestože přesný mechanismus působení pyretroidů na zrání oocytů není znám, toxické účinky jsou často spojovány s vlivem na iontové kanály v nervových buňkách (Soderlund, 2010). Je známo, že iontové kanály hrají významnou úlohu v meiotickém zrání savčích oocytů (Tosti et Boni, 2004). Je tedy možné, že podobně jako pyretroidy, i u nepyretroidních inhibitorů kalcineurinu se v jejich celkovém působení uplatňují také iontové kanály. Navíc, o účincích cyklosporinu A na iontové kanály v oocytech *Xenopa* svědčí práce Choi et Soderlund (2004), kteří zaznamenali při použití srovnatelné koncentrace inhibitorů jako v naší studii, inhibici spontánní regulaci sodíkových kanálů v oocytech.

Kalcineurin je, vzhledem k výše zmíněné regulaci aktivity vazbou vápníku a kalmodulinu na svá vazebná místa, zahrnutý v regulaci vápníkových kanálů (Yakel, 1997). Inhibitory kalcineurinu, včetně cyklosporinu A, inhibují L-typ vápníkových kanálů v somatických buňkách, což naznačuje, že kalcineurin zvyšuje hladinu Ca^{2+} (Norris et al.,

2002). V naší předešlé studii (Rozinek et al., 2003) jsme pozorovali zpoždění meiotického zrání oocytů prasat po inhibici L-typu vápníkových kanálů. Obdobný vliv na zrání jsme pozorovali při použití inhibitorů kalcineurinu. Navíc, v prasečích oocytech byly detekovány oba typy receptorů, IP_3R i RyR (Macháty et al., 1997), které umožňují uvolnění vápníku při aktivaci oocytů (Stricker, 1999) a bylo popsáno, že kalcineurin reguluje funkci IP_3R pomocí defosforylace (Cameron et al., 1995). Intracelulární zásoby vápníku mohou být v oocytech prasat mobilizovány prostřednictvím těchto receptorů (Clapham, 1995, Macháty et al., 1997) a prostřednictvím kalmodulin-dependentní dráhy aktivovat jejich *in vitro* zrání i aktivaci (Petr et al., 2002). Tento fakt naznačuje, že jednou z možných cest regulačního mechanismu kalcineurinu v oocytech prasat by mohly být vápníkové kanály a IP_3R i RyR receptory v oocytech. Nelze vyloučit zapojení kalcineurinu, ale i dalších efektů jeho inhibitorů do tohoto mechanismu.

V oocytech drápatky a sumky zabránila inhibice kalcineurinu cyklosporinem degradaci cyklinu, u drápatky navíc zpozdila defosforylaci proteinů specifických proteinů M-fáze cyklu (Mochida et Hunt, 2007, Levausseur et al., 2013). Vzhledem k vysoké konzervovanosti kalcineurinu napříč živočišnými druhy je pravděpodobné, že stejným mechanismem působí kalcineurin i v oocytech obratlovců. Naše výsledky potvrzují zapojení kalcineurinu do meiotického zrání oocytů prasat, podobně jako je tomu u bezobratlých (Takeo et al., 2006, 2010) či nižších obratlovců (Nishiyama et al., 2007, Mochida et Hunt, 2007).

Dále bylo prokázáno, že inhibice kalcineurinu cyklosporinem A a hymenistatinem I zabraňuje zralým oocytům dokončit meiozu a vytvořit prvojádra po partenogenetické aktivaci. Úloha kalcineurinu během aktivace byla popsána pouze u oocytů *Drosophily* (Krauchunas et al., 2013), žáby rodu *Xenopus* (Mochida et Hunt, 2007, Nishiyama et al., 2007) a sumky (Levasseur et al., 2013). Kalcineurin má zásadní význam v meiotickém postupu za metafázi I a výstupu z meiotického bloku u *Drosophil* (Takeo et al., 2010) a je nezbytný pro plnou aktivaci oocytů sumky (Levasseur et al., 2013). U výše jmenovaných zástupců je kalcineurin přechodně aktivován ihned po vzestupu vápenatých iontů (Krauchunas et al., 2013, Nishiyama et al., 2007).

Zablokování aktivity kalcineurinu v oocytech žáby v metafázi II se projevuje sníženou míru aktivace oocytů, resp. neschopností oocytů prolomit meiotický blok (Nishiyama et al., 2007). Také v naší studii ošetření oocytů inhibitory kalcineurinu během aktivace významně snížilo procento aktivovaných oocytů. Naše výsledky potvrzují, že kalcineurin je i v prasečích

oocytech nezbytný pro výstup z druhého meiotického bloku. Bylo potvrzeno, že přechod z metafáze II do anafáze II je v oocytech Xenopa nezbytná aktivita APC/C komplexu (Taieb et al., 2001). U *Drosophil* je nezbytný pokles hladiny kalcineurinu po oplození pro migraci samičích a samčích prvojader a následnému zahájení embryonálního vývoje (Krauchunas et al., 2013). Je možné, že v oocytech prasat zastává kalcineurin podobnou úlohu.

Úloha kalcineurinu v regulaci oogeneze a meiózy savčích oocytů je stála nepopsána. Zrání všech savčích oocytů regulováno mnoha protein kinázami a fosfatázami. Hlavními faktory podílejícími se na regulaci meiozy a následné aktivace oocytů jsou komplex cyklin B s cyklin-dependentní kinázou Cdk2 - MPF (Nurse, 1990) a MAP kináza (Verlhac et al., 1994). Dozrálé savčí oocyty jsou spontánně zablokovány ve stádiu metafáze II pod vlivem cytostatického faktoru (CSF), který stabilizuje MPF. Výstup z metafáze II a dokončení meiózy závisí na aktivačním stimulu, který vnáší do oocytu při oplození spermie nebo jej lze vyvolat umělým zásahem imitujícím procesy provázející oplození. Tento aktivační stimul inaktivuje CSF a dovolí destabilizaci MPF. Pokles aktivity MPF pak vyvolá výstup aktivovaného oocytu z metafáze II (Masui, 2001). V této studii nebyl prokázán vliv inhibice kalcineurinu na aktivitu těchto kináz u oocytů po partenogenetické aktivaci. Pokles aktivity MPF a následný pokles aktivity MAPK je vyvolán destrukcí cyklinu B aktivním APC a inaktivací CSF (Moos et al., 1995, Yamamuro et al, 2008). V oocytech drápatky (Mochida et Hunt, 2007) i sumky (Levausseur et al., 2013) je v přítomnosti cyklosporinu inhibována APC dráha a čímž je zabráněno degradaci cyklinu B. Zároveň cyklosporin A zpožďuje celkovou defosforylaci specifických proteinů M-fáze cyklu a vytvoření plně funkčního jaderného obalu oocytů a znemožňuje prolomení II. meiotického bloku (Mochida et Hunt, 2007). Můžeme tedy předpokládat, že kalcineurin se účastní formování prvojader po aktivaci oocytů jiným signálním mechanismem než přímou regulací aktivity MPF a MAPK.

Vliv alternativních cílových proteinů kalcineurinu při aktivaci oocytů naznačuje také skutečnost, že v oocytech *Xenopa* inhibice kalcineurinu potlačuje většinu defosforylace součásti APC-cdc20, ale inaktivace MPF degradací cyklinu B je pouze zpožděná, nikoliv kompletně inhibovaná (Mochida et al., 2007). Na druhou stranu, v myších oocytech se kalcineurin nepodílí na uvolňování CSF (Suzuki et al., 2010). Nedávná studie Feine et al., (2014) ukázala, že kalcineurin při procesu oplození *Xenopa* aktivuje APC/C a způsobuje defosforylací THR52 degradaci kinázy *Aurora borealis*, Bora, což vede k následné inaktivaci CDK a PLK1. Výsledná aktivita a lokalizace cílových proteinů kalcineurinu může být regulována, podobně jako je tomu *Drosophily* (Krauchunas et al., 2013), mnoha fosforylacemi

během aktivace oocytu. Kalcineurin je tedy v oocytech prasate zahrnutý v signalizaci patrně jiným způsobem.

Naše výsledky prokázaly, že protein fosfatáza 2B je přítomna v plně dorostlých oocytech prasat po celou dobu meiotického zrání, i po následné aktivaci oocytů. Zapojení této fosfatázy do procesu zrání i tvorby prvojader po partenogenetické aktivaci oocytů je regulováno zřejmě nezávisle na aktivitě MPF a MAPK. Pro lepší pochopení úlohy kalcineurinu v jednotlivých fázích zrání i aktivace oocytů je třeba pokračovat v dalších experimentech.

7. Závěr

V našich experimentech jsme jako první prokázali expresi obou podjednotek kalcineurinu v oocytech i přilehlým kumulárních buňkách během meiotického zrání oocytů prasat. Doposud byla přítomnost kalcineurinu potvrzena pouze v oocytech bezobratlých a nižších obratlovců. U prasete byl kalcineurin nalezen pouze v samčích gametách.

Obě podjednotky kalcineurinu jsou přítomné po celou dobu meiotického zrání i během aktivace oocytu. Lokalizace kalcineurinu je však v různých fázích zrání oocytu odlišná. S postupující meiózou dochází k jeho redistribuci v rámci jednotlivých oocytárních kompartmentů. Akumulace kalcineurinu v oblasti jádra na počátku znovuzahájení meiózy svědčí o možné úloze kalcineurinu při rozpadu zárodečného váčku a vstupu oocytu do metafáze I.

Rovněž jsme zaznamenali nárůst intenzity fluorescenčního signálu kalcineurinu spolu s nahromaděním kalcineurinu v korové oblasti oocytů v době metafáze II. meiotického dělení i po jejich aktivaci. Tyto výsledky ukazují spojitost mezi kalcineurinem s vápníkem i mikrotubulovými filamenty. Kalcineurin může být tedy zapojen do procesů spojených s oplozením oocytů prasat a migrace prvojader pomocí mikrotubulární sítě.

Úloha kalcineurinu v regulaci oogeneze a meiózy savčích oocytů je stála nepopsána. V dalších experimentech bylo pomocí inhibitorů kalcineurinu potvrzeno zapojení této fosfatázy do regulace meiotického zrání oocytů, ale i prolomení II. meiotického bloku a tvorby prvojader u oocytů po partenogenetické aktivaci. Z našich výsledků také vyplývá, že regulace kalcineurinu během aktivace je nezávislá na aktivitě MAPK a MPF a je zřejmě regulována jiným signálním mechanismem než ovlivněním aktivity těchto faktorů.

V těchto experimentech jsme na modelu prasate jako první prokázali, že aktivita kalcineurinu v průběhu meiotického zrání i aktivace savčích oocytů je nezbytná a její deficit narušuje fyziologický průběh těchto dějů. Pro pochopení, jakým způsobem přesně se kalcineurin do těchto procesů zapojuje a jak ovlivňuje následný embryonální vývoj, je zapotřebí provést další experimenty.

8. Seznam literatury

Alberio, R., Zakhartchenko, V., Motlik, J., Wolf, E. 2001. Mammalian oocyte activation: lessons from the sperm and implications for nuclear transfer. International Journal of Developmental Biology. 45 (7). p. 797-809.

Alberts, B., Bray, D., Johnson, A., Lewis, J., Raff, M., Roberts, K., Walter, P. 1998. Základy buněčné biologie. Espero Publishing. Ústí nad Labem. p. 630. ISBN: 8090290620.

Alderton, K. W., Cooper, Ch. E., Knowles, G. R. 2001. Nitric oxide synhases: structure, function and inhibition. Biochemistry. 357. p. 593–61.

Anadón, A., Martínez-Larrañaga, M. R., Martínez, M. A. 2009. Use and abuse of pyrethrins and synthetic pyrethroids in veterinary medicine. The Veterinary Journal. 182 (1). p. 7–20.

Anger, M., Kues, W. A., Klima, J., Mielenz, M., Kubelka, M., Motlík, J., Esner, M., Dvořák, P., Carnwath, J. W., Niemannn, H. 2003. Cell Cycle Dependent Expression of Plk1 in Synchronized Porcine Fetal Fibroblasts. Molecular Reproduction and Development. 65. p. 245–253.

Aperia, A., Ibarra, F., Svensson, L. B., Klee, C., Greengard, P. 1992. Calcineurin mediates alpha-adrenergic stimulation of Na+, K (+)-ATPase activity in renal tubule cells. PNAS. 89 (16). p. 7394-7397.

Aramburu, J., Heitman, J., Crabtree, GR. 2004. Calcineurin: a central controller of signalling in eukaryotes - Workshop on the calcium/calcineurin/NFAT pathway: Regulation and function. EMBO REPORTS. 5(4). p. 343-348.

Arron, J. R., Winslow, M. M., Polleri, A., Chang, C. P., Wu, H., Gao, X., Crabtree, G. R. 2006. NFAT dysregulation by increased dosage of DSCR1 and DYRK1A on chromosome 21. Nature. 441 (7093). p. 595-600.

Awumey, E. M., Moonga, B. S., Sodam, B. R., Koval, A. P., Adebanjo, O. A., Kumegawa, M., Zaidi, M., Epstein, S. 1999. Molecular and functional evidence for calcineurin-A α and β isoforms in the osteoclast: novel insights into cyclosporin A action on bone resorption. Biochemical and biophysical research communications. 254 (1). p. 248-252.

Ayabe, T., Kopf, G. S., Schultz, R. M. 1995. Regulation of mouse egg activation: presence of ryanodine receptors and effects of microinjected ryanodine and cyclic ADP ribose on uninseminated and inseminated eggs. Development. 121 (7). p. 2233–2244.

Bachvarova, R., De Leon, V., Johnson, A., Kaplan, G., Paynton, B. V. 1985. Changes in total RNA, polyadenylated RNA, and actin mRNA during meiotic maturation of mouse

oocytes. Developmental biology. 108 (2). p. 325-331.

Bandyopadhyay, J., Lee, J., Lee, J., Lee, J. I., Yu, J. R., Jee, C., Ahnn, J. 2002. Calcineurin, a calcium/calmodulin-dependent protein phosphatase, is involved in movement, fertility, egg laying, and growth inCaenorhabditis elegans. Molecular biology of the cell, 13 (9). p. 3281-3293.

Berridge, M. J., Lipp, P., Bootman, M. D. 2000. The versatility and universatility of callcium signalling. Nature Reviews Molecular Cell Biology. 1. p. 11–21.

Berridge, M.J. 1993. Inositol trisphosphate and calcium signalling. Nature. 361. p. 315-325.

Bielanska-Osuchowska, Z. 2006. Oogenesis in pig ovaries during the prenatal period: ultrastructure and morphometry. Reproductive Biology. 6. p. 161–193.

Bilodeau-Goeseels, S. 2007. Effects of manipulating the nitric oxide/cyclic GMP pathway on bovine oocyte meiotic resumption . Theriogenology. 68 (5). p. 693–701.

Birraux, J., Kirby, J. A., Thomason, J. M., & Taylor, J. J. 2006. The effect of cyclosporin on cell division and apoptosis in human oral keratinocytes. Journal of periodontal research, 41(4), p. 297-302.

Black, J. L., Erickson, B. H., 1968. Oogenesis and ovarian development in the prenatal pig. Anatomical Record 161. p. 45–56.

Bleil, J. D., Beall, C. F., Wassarman, P. M. 1981. Mammalian sperm-egg interaction: fertilization of mouse eggs triggers modification of the major zona pellucida glycoprotein, ZP2. Developmental Biology. 86. p. 189–97.

Borel, J. F., Feurer, C., Gubler, H. U., & Stähelin, H. 1994. Biological effects of cyclosporin A: a new antilymphocytic agent. Agents and actions, 43(3-4), p. 179-186.

Borel, J. F., Feurer, C., Gubler, H. U., Stähelin, H. 1994. Biological effects of cyclosporin A: a new antilymphocytic agent. Agents and actions. 43 (3-4). p. 179-186.

Boss, V., Wang, X. F., & Murphy, T. J. 1998. Cyclosporin A blocks histamine-stimulated NFAT-mediated transcription and IL-8 mRNA in endothelial cells. In Faseb Journal. 12 (4). p. A84-A84.

Bu, S., Xia, G., Tao, Y., Lei, L., Zhou, B. 2003. Dual effects of nitric oxide on meiotic maturation of mouse cumulus cell-enclosed oocytes in vitro. Molecular And Cellular Endocrinology. 207. p. 21–30.

Bultynck, G., Ishii, K., Matsuo, T., Aigaki, T. 2003. Calcineurin and intracellular Ca2+ -release channels: regulation or association? Biochemical and biophysical research communications. 311 (4). p. 1181-1193.

Calabrese, E. J. 2001. Nitric oxide: biphasic dose response. Critical Reviews in Toxicology. 31 (4&5). p. 489-501.

Calarco, P. G. 1972. The kinetochore in oocyte maturation In: Oogenesis. Eds. Biggers J. D. a Scheultz A. W., Univ. Park., Pennsylvania. p. 65–89.

Cameron, A. M., Steiner, J. P., Roskams, A. J., Ali, S. M., Ronnettt, G. V., & Snyder, S. H. 1995. Calcineurin associated with the inositol 1, 4, 5-trisphosphate receptor-FKBP12 complex modulate Ca 2+ flux. Cell. 83(3). 463-472.

Carroll, J., Swann, K. 1992. Spontaneous cytosolic calcium oscillations driven by inositol trisphosphate occur during in vitro maturation of mouse oocytes. Journal of Biological Chemistry. 267 (16). p. 11196–11201.

Carroll, J., Swann, K., Whittingham, D., Whitake, M. 1994. Spatiotemporal dynamics of intracellular [Ca2+] oscillations during the growth and meiotic maturation of mouse oocytes. Development. 120. p. 3507–3517.

Carroll, J., Swann, K., Whittingham, D., Whitaker, M. 1994. Spatiotemporal dynamics of intracellular Ca2+ oscillations during the growth and meiotic maturation of mouse oocytes. Development. 120 (12), p. 3507–3517.

Cebrat, M., Wieczorek, Z., Siemion, I. Z. 1996. Immunosuppressive activity of hymenistatin I. Peptides. 17 (2). p. 191-196.

Clapham, D. E. 1995. Calcium signaling. Cell. 80. p. 259–268.

Cohen, P. 1989. The structure and regulation of protein phosphatases. Annual Review of Biochemistry. 58(1). p. 453-508.

Collas, P., Sullivan, E.J., Barnes, F.L. 1993. Histone H1 kinase activity in bovine oocytes following calcium stimulation. Mollecular Reproduction and Development. 34. p. 224-231.

Crabtree, G. R. 2001. Calcium, Calcineurin, and the Control of Transcription. The Journal of Biological Chemistry. 276. p. 2313-2316.

Creton, R., Jaffe, L. 1995. Role of calcium influx during the latent period in sea urchin fertilisation. Developmental, Growth & Differentiation. 37. p. 703-709.

cumulative risk assessment. Toxicology. 171. p. 3–59.

De Felici, M., Dolci, S., Siracusa, G. 1991. An increase of intracellular free Ca2+ is essential for spontaneous meiotic resumption by mouse oocytes**.** Journal of Experimental Zoology. 260. p. 401-405.

de Jonge, H. W., van der Wiel, C. W., Eizema, K., Weijs, W. A., Everts, M. E. 2006. Presence of SERCA and calcineurin during fetal development of porcine skeletal muscle. Journal of Histochemistry & Cytochemistry. 54 (6). p. 641-648.

Dekel, N., Ayalon, D., Lewysohn, O., Nevo, N., Kaplankraicer, R., Shalgi, R. 1995. Experimental extensit of the tim-interval between oocyte maturation and ovulation – effect on fertilization and first cleavage. Fertility and Sterility. 64 (5). p. 1023-1028.

Dekel, N., Galiani, D., Sherizly, I., 1988. Dissociation between the inhibitory and the stimulatory action of cAMP on maturation of rat oocytes. Molecular and Cellular Endocrinology. 56. p. 115–121.

Dempsey, E. C., Newton, A. C., Mochly-Rosen, D., Fields, A. P., Reyland, M. E., Insel, P. A., Messing, R. O. 2000. Protein kinase C isozymes and the regulation of diverse cell responses. American Journal of Physiology – Lung Cellular and Molecular Physiology. 279. p. 429-438.

Depreux, F. F. S., Scheffler, J. M., Grant, A. L., Bidwell, C. A., Gerrard, D. E. 2010. Molecular cloning and characterization of porcine calcineurin-α subunit expression in skeletal muscle. Journal of animal science. 88 (2). p. 562–571.

Ding, D. CH., Liou, S. M., Huang, L. Y., Liu, J. H., Wu, G. J. 2000. Effects of four methods of sperm preparation on motion characteristics and nitric oxide concentration in laboratory-prepared oligospermia. Chinese Medical Journal. 63. p. 822-827.

Dixit, V. D., Parvizi, N. 2001. Nitric oxide and the control of reproduction. Animal Reproduction Science. 65. p. 1-16.

Downs, S.M., Cottom, J., Hunzicker-Dunn, M. 2001. Protein kinase C and meiotic regulation in isolated mouse oocytes. Mollecular Reproduction and Development. 58. p. 101-115

Ducibella, T. 1996. The cortical reaction and development of activation competence in mammalian oocytes. Human Reproduction Update. 2 (1). p. 29-42.

Dunphy, W., Brizuela, L., Beach, D., Newport, J. 1988. The Xenopus cdc2 protein is a component of MPF, a cytoplasmic regulator of mitosis. Cell. 53. p. 423-431.

Eggan, K., Jurga, S., Gosden, R., Min, I. M., Wagers, A. J. 2006. Ovulated oocytes in adult mice derive from non-circulating germ cells. Nature. 441 (7097). p. 1109–1114.

Ejima, A., Tsuda, M., Takeo, S., Ishii, K., Matsuo, T., Aigaki, T. 2004. Expression level of sarah, a homolog of DSCR1, is critical for ovulation and female courtship behavior in Drosophila melanogaster. Genetics. 168. p. 2077–2087.

Eliyahu, E., Shalgi, R. 2002. A role for protein kinase C during rat egg activation. Biology of Reproduction. 67. p. 189-195.

Enan, E., Matsumura, F. 1992. Specific-inhibition of calcineurin by type-II synthetic pyrethroid insecticides. Biochemical Pharmacology. 43. p. 1777–1784.

Eppig, J. J. 1991. Maintenance of meiotic arrest and the inducation of oocyte maturation in mouse oocyte‐granulosa cell complexes developed in vitro from preanthral follicles. Biology of Reproduction. 45. p. 824–830.

Eppig, J. J. 2001. Oocyte control of ovarian follicular development and function in mammals. Reproduction. 122. p. 829–838.

Fair, T., Hulshof, S. C. J., Hyttel, P., Boland, M., Greve, T. 1997. Bovine oocyte ultrastructure in primordial to tertiary follicles. Anatomy and Embryology. 195. p. 327-336.

Fan, H. Y., Li, M. Y., Tong, C., Chen, D. Y., Xia, G. L., Song, X. F., Schatten, H., Sun, Q. Y. 2002a. Inhibitory effects of cAMP and protein kinase C on meiotic maturation and MAP kinase phosphorylation in porcine oocytes. Molecular Reproduction and Development. 63. p. 480-487.

Fan, H. Y., Sun, Q. Y. 2004. Involvement of Mitogen-Activated Protein Kinase Cascade During Oocyte Maturation and Fertilization in Mammals. Biology of Reproduction. 70. p. 535–547.

Fan, H. Y., Tong, C., Chen, D. Y., Xia, G. L., Song, X. F., Schatten, H., Sun, Q. Y. 2002b. Inhibitory effects of cAMP and protein kinase C on meiotic maturation and MAP kinase phosphorylation in porcine oocytes. Molecular Reproduction and Development. 63. p. 480–487.

Fan, H. Y., Tong, C., Chen, D. Y., Sun, Q. Y. 2003. Roles of protein kinase C in oocyte meiotic maturation and fertilization. Progress in Natural Science. 13. p. 401–406.

Fang G., Yu, H., Kirschner M. W. 1999. Control of mitotic transitions by the anaphase-promoting complex.Philosophical Transactions of the Royal Society of London. Series B: Biological Science. 354. p. 1583-1590.

Farghali, H., Masek, K. 1998 Immunopharmacologic agents in the amelioration of hepatic injuries. International Journal of Immunopharmacology. 20 (4-5). p. 125-139.

Faul, C., Donnelly, M., Merscher-Gomez, S., Chang, Y. H., Franz, S., Delfgaauw, J., Mundel, P. 2008. The actin cytoskeleton of kidney podocytes is a direct target of the antiproteinuric effect of cyclosporine A. Nature medicine. 14 (9). p. 931-938.

Feine, O., Hukasova, E., Bruinsma, W., Freire, R., Fainsod, A., Gannon, J., Brandeis, M. 2014. Phosphorylation-mediated stabilization of Bora in mitosis coordinates Plx1/Plk1 and Cdk1 oscillations. Cell Cycle. 13(11).p. 0-1

Ferreira, A., Kincaid, R., Kosik, K. S. 1993. Calcineurin is associated with the cytoskeleton of cultured neurons and has a role in the acquisition of polarity. Molecular Biology Cell. 4, p. 1225-1238.

Ferreira, E. M., Vireque, A. A., Adona, P. R., Meirelles, F. V., Ferriani, R. A., Navarro, P.A. 2009. Cytoplasmic maturation of bovine oocytes: structural and biochemical modifications and acquisition of developmental competence.Theriogenology. 71 (5). p. 836–48

Ferrell, J.E., Jr. 1996. MAP kinases in mitogenesis and development. Current Topics in Developmental Biology. 33. p. 1–60

Fissore, R. A., Dobrinsky, J. R., Balise, J. J., Duby, R. T., Robl, J. M. 1992. Patterns of intracellular Ca2+ concentrations in fertilized bovine egg. Biology of Reproduction. 47. p. 960-969.

Fuentes, J.J., Genesca, L., Kingsbury, T.J., Cunningham, K.W., Perez-Riba, M., Estivill, X., de la Luna, S. 2000. DSCR1, overexpressed in Down syndrome, is an inhibitor of calcineurin-mediated signaling pathways. Human Mollecular Genetics. 9. p. 1681–1690.

Fulka, J., Motlik, J., Fulka, J., Jilek, F. 1986. Effect of cyclohexamide on nuclear maturation of pig and mouse oocytes. Journal of Reproduction and Fertility. 77 (1). p. 281-285

Gallagher, S. C., Gao, Z. H., Li, S. P., Dyer, B., Trewhella, J., Klee, C. B. 2001. There is communication between all four Ca2+-bindings sites of calcineurin B. Biochemistry. 40 (40). p. 12094–12102.

Gallicano, G. I., McGaughey, R. W., Capco, D. G. 1995. Protein kinase M, the cytosolic counterpart of protein kinase C, remodels the internal cytoskeleton of the mammalian egg during activation. Developmental Biology. 167. p. 482-501.

Garagna, S., Merico, V., Sebastiano, V., Monti, M., Orlandini, G., Gatti, R., Scandroglio, R., Redi, C. A., Zuccotti, M. 2004. Three-dimensional localization and dynamics of centromeres in mouse oocytes during folliculogenesis. Journal of Molecular Histology. 35 (6). p. 631-638.

Gautier, J., Maller, J. 1988. Cyclin B in Xenopus oocytes:implecations for the mechanism of pre-MPF activation. The EMBO Journal. 10. p. 177–182.

Gautier, J., Solomon, M. J., Booher, R. N., Bazan, J. F., Kirschner, M. W. 1991. Cdc25 is a specific tyrosine phosphatase that directly activates p34cdc2. Cell. 67. p. 197–211.

Gilbert S. F. 2000. Developmental Biology, Sinauer Associates, Inc., 6th ed. Dostupný takézwww:<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/bv.fcgi?call=bv.View..ShowTOC&rid=dbio.TOC&depth=10 >

Gordo, A. C., Wu, H., He, C. L., Fissore, R. A. 2000. Injection of sperm cytosolic factor into mouse metaphase II oocytes induces different developmental fates according to the frequency of Ca2+ oscillations and oocyte age. Biology of reproduction. 62 (5). p. 1370–1379.

Gosden, R. G., Krapez, J., Briggs, D. 1997. Growth and development of the mammalian oocyte. Bioessays. 19 (10). p. 875–882.

Gosden, RG. 2002. Oogenesis as a foundation for embryogenesis. Mollecular Cell Endocrinology. 186(2). p. 149-53.

Gotoh, Y., Masuyama, N., Dell, K., Shirakabe, K., Nishida, E. 1995. Initiation of Xenopus oocyte maturation by activation of the mitogen activated protein kinase cascade. The Journal of Biological Chemistry. 270. p. 904-916.

Gottsch, M. L., Clifton, D. K., Steiner, R. A. 2009. From KISS1 to kisspeptins: an historical perspective and suggested nomenclature. Peptides. 30. p. 4-9.

Graef, I. A., Chen, F., Chen, L., Kuo, A., Crabtree, G. R. 2001. Signals Transduced by Ca2+Calcineurin and NFATc3/c4 Pattern the Developing Vasculature. Cell. 105 (7). p. 863-875.

Green, K. M., Kim, J. H., Wang, W. H., Day, B. N., Prather, R. S. 1999. Effect of myosin light chain kinase, protein kinase A, and protein kinase C inhibition on porcine oocyte activation. Biology of Reproduction. 61. p. 111-119.

Griffith, J.P., Kim, J.L., Kim, E.E., Sintchak, M.D., Thomson, J.A., Fitzgibbon, M.J., Fleming, M.A., Caron, P.R., Hsiao, K., Navia, M.A. 1995. X-ray structure of calcineurin inhibited by the immunophilin-immunosuppressant FKBP12-FK506 complex. Cell. 82. p. 507–522.

Grigoriu, S., Bond, R., Cossio, P., Chen, J. A., Ly, N., Hummer, G., Peti, W. 2013. The molecular mechanism of substrate engagement and immunosuppressant inhibition of calcineurin. PLoS biology, 11(2), e1001492.

Guthrie, H.D. 2004. The follicular phase in pigs: Follicle populations, circulating hormones, follicle factors and oocytes. Journal of Animal Science. 82. p. 85-85.

Gwack, Y., Sharma, S., Nardone, J., Tanasa, B., Iuga, A., Srikanth, S., Rao, A. 2006. A genome-wide Drosophila RNAi screen identifies DYRK-family kinases as regulators of NFAT. Nature. 441 (7093). p. 646-650.

Haccard, O., Sarcevic, B., Lewellyn, A., Hartley, R. S., Roy, L. M., Izumi, T., Erikson, E., Maller, J. L. 1993. Induction of metaphase arrest in cleaving Xenopus embryos by MAP kinase. Science. 262. p. 1262-1265.

Hafez, E. S. E., Hafez, B. 2000. Folliculogenesis, Egg Maturation, and Ovulation.

Reproduction in Farm Animals. Lippincott Williams and Wilkins. Philadelphia. Seventh. p. 509.

Hamada, N., Miyata, M., Eto H., Shirasawa, T., Akasaki, Y., Nagaki, A., Tei, C. 2010. Tacrolimus-eluting stent inhibits neointimal hyperplasia via calcineurin/NFAT signaling in porcine coronary artery model. Atherosclerosis. 208 (1). p. 97–103.

Hämäläinen, M., Korhonen, R., Moilanen, E. 2009. Calcineurin inhibitors down-regulate iNOS expression by destabilising mRNA. International immunopharmacology. 9 (2). p. 159-167.

Hara, M., Abe, Y., Tanaka, T., Yamamoto, T., Okumura, E., Kishimoto, T. 2012. Greatwall kinase and cyclin B-Cdk1 are both critical constituents of M-phase-promoting factor. Nature Communications. 3. p. 156-160.

Hashimoto, N., Kishimoto, T. 1988. Regulation of meiotic methaphase by a cytoplasmic maturation-promoting factor during mouse oocyte maturation. Developmental Biology 126. p. 242–252.

Hayes, E., Galea, S., Verkuylen, A., Pera, M., Morrison, J., Lacham-Kaplan, O., Trounson A. 2001. Nuclear transfer of adult and genetically modified fetal cells of the rat. Physiological Genomics. 5. p. 193–204.

Hogan, P. G., Li, H. M. 2005. Calcineurin. Current Biology. 15 (12). p. 442-443.

Homa, S. T. 1988. Effects of cyclic AMP on the spontaneous meiotic maturation of cumulus-free bovine oocytes cultured in chemically defined medium. Journal of Experimental Zoology. 248. p. 222-231.

Homa, S. T., Carroll, J., Swann, K. 1993. The role of calcium in mammalian oocyte maturation and egg activation. Human Reproduction. 8. p. 1274–1281.

Hubbard, C. J., Price, J. 1988. The Effects of Follicle-Stimulating Hormone and Cyclic Guanosine-3',5'-Monophosphate on Cyclic Adenosine-3',5'-Monophosphate Phosphodiesterase and Resumption of Meiosis in hamster cumulus-oocyte complexes. Biology of Reproduction. 39. p. 829–838.

Hug, H., Sarre, T. F. 1993. Protein kinase C isoenzymes: divergence in signal transduction? The Biochemical Journal. 291. p. 329-343.

Hunt, T. 1992. Cell cycle arrest and c‑mos. Nature. 355. p. 587–588.

Hunter, M. 2000. Oocyte maturation and ovum quality in pigs. Reviews of reproduction. 5 (2). p. 122–130.

Hunter, M.G., Paradis, F. 2009. Intra-follicular regulatory mechanisms in the porcine ovary. In: Rodriguez-Martinez, H., Vallet, J. L., Ziecik, A. J. (eds). Control of Pig

Reproduction VIII. Nottingham University Press. Canada. 345 p.

Huo, L. J., Liang, Ch. G.,Yu, L. Z., Zhong, Z. S., Yang, Z. M., Fan, H. Y, Chen, D. Y., Sun, Q. Y. 2005. Inducible nitric oxide synthase-derived nitric oxide regulates germinal vesicle breakdown and first polar body emission in the mouse oocyte. Reproduction. 129. p. 403‑409.

Hyslop, L. A., Carroll, M., Nixon, V. L., McDougall, A.,Jones, K. T. 2001. Simultaneous measurement of intracellular nitric oxide and free calcium levels in chordate eggs demonstrates that nitric oxide has no role at fertilization. Developmental Biology. 234(1). p. 216-230.

Hyttel, P., Fair, T., Callesen, H., Greve, T. 1997. Oocyte growth, capacitation and final maturation in cattle. Therionology. 47. p. 23-32.

Chan, B., Greenan, G., McKeon, F., Ellenberger, T. 2005. Identification of a peptide fragment of DSCR1 that competitively inhibits calcineurin activity in vitro and in vivo. Proceedings of the National of Sciences USA. 102 (37). p. 13075–13080.

Chantler, P. D. 1985. Calcium-dependent association of a protein complex with the lymphocyte plasma membrane: probable identity with calmodulin-calcineurin. The Journal of cell biology. 101 (1). p. 207–216.

Chmelíková, E., Ješeta, M., Sedmiková, M., Petr, J., Tůmová, L., Kott, T., Lipovová, P., Jílek, F. 2010. Nitric oxide synthase isoforms and the effect of their inhibition on meiotic maturation of porcine oocytes. Zygote. 18. p. 235–244.

Chmelíková, E., Sedmíková, M., Petr, J., Kott, T., Lánská, V., Tůmová, L., Tichovská, H., Ješeta, M. 2009. Expression and localization of nitric oxide synthase isoforms during porcine oocyte growth and acquisition of meiotic competence. Czech Journal Of Animal Science, 54. p. 137–149.

Choi, J. S., Soderlund, D. M. 2004. Cyclosporin A and deltamethrin block the downregulation of Na(v) 1.8 sodium channels expressed in Xenopus oocytes. Neuroscience letters. 367 (3). p. 389-393.

Choi, T., Fukusawa, K., Zhou, R., Tessarollo, L., Borror, K., Resau, J., Vande-Woude G. 1996. The Mos/mitogen proteinkinase (MAPK) pathway regulates the size and degradation of the first polar body in maturing mouse oocytes. Proceedings of the National Academy of Sciences USA. 93. p. 7032–7035.

Christmann, L., Jung, T., Moor, R. M. 1994. MPF components and meiotic competence in growing pig oocytes Molecular Reproduction and Development. 38. p. 85–90.

Im, G. S., Samuel, M., Lai, L., Hao, Y., Prather, R. S. 2007. Development and calcium level changes in pre-implantation porcine nuclear transfer embryos activated with 6-DMAP

after fusion. Molecular Reproduction and Development, 74 (9), p. 1158-1164.

Inoue, M., Naito, K., Aoki, F., Toyoda, Y., Sato, E. 1995. Activation of mitogen-activated protein kinase during meiotic maturation in porcine oocytes. Zygote. 3. p. 265-271.

Inoue, M., Naito, K., Nakazma, T., Sato, E. 1998. Mitogen-activated protein kinase translocates into the germinal vesicle and induces germinal vesicle break down in porcine oocytes. Biology of Reproduction. 58. p. 130–136.

Ito, A., Hashimoto, T., Hirai, M., Takeda, T., Shuntoh, H., Kuno, T., Tanaka, C. 1989. The complete primary structure of calcineurin-A, a calmodulin binding-protein homologous with protein phosphatase-1 and phosphatase-2A. Biochemical and Biophysical Research Communications. 163 (3). p. 1492-1497.

Jablonka-Shariff, A., Olson, L.M. 1998. The role of nitric oxide in oocyte meiotic maturation and ovulation: Meiotic abnormalities of endotelial nitric oxide synthase knock-out mouse oocytes. Endocrinology. 139. p. 2944–2954.

Jaffe, L. 1983. Sources of calcium in egg activation: a review and hypothesis. Developmental Biology. 99. p. 256-276.

Jessus, C., Haccard, O. 2007. Fertilization: Calcium's double punch. Nature. 449 (7160). p. 297-298.

Jílek, F., Hüttelová, R., Petr, J., Holubová, M., Rozinek, J. 2000. Activation of pig oocytes using calcium ionophore: Effect of protein synthesis inhibitor cycloheximide. Animal Reproduction Science. 63 (1-2). p. 101-111.

Jílek, F., Hüttelová, R., Petr, J., Holubová, M., Rozinek, J. 2001. Activation of pig oocytes using calcium ionophore: Effect of the protein kinase inhibitor 6-dimethyl aminopurine. Reproduction in Domestic Animals. 36 (3-4). p. 139-145.

Johnson, J., Bagley, J., Skaznik–Wikiel, M., Lee, H. J., Adams, G. B., Niikura, Y., Tschudy, K. S., Tilly, J. C., Cortes, M. L., Forkert, R., Spitzer, T., Iacomini, J., Scadden, D. T., Tilly, J. L. 2005. Oocyte generation in adult mammalian ovaries by putative germ cells in bone marrow and peripheral blood. Cell. 122. p. 303–315.

Johnson, J., Bierle, B. M., Gallicano, G. I., Capco, D. G. 1998. Calcium/calmodulin-dependent protein kinase II and calmodulin: regulators of the meiotic spindle in mouse eggs. Developmental Biology. 204 (2). p. 464-477.

Johnson, J., Canning, J., Kaneko, T., Pru, J. K., Tilly, J.L. 2004. Germline stem cells and follicular renewal in the postnatal mammalian ovary. Nature. 6979. p. 145–150.

Jones, K.T. 2004. Turning it on and off: M-phase promoting factor during meiotic maturation and fertilization. Molecular Human Reproduction. 10(1). p. 1-5.

Kakalis, L. T., Kennedy, M., Sikkink, R., Rusnak, F., Armitage, I. M. 1995. Characterization of the calcium-binding sites of calcineurin B. FEBS letters. 362(1). p. 55-58.

Kanayama, N, Miyano, T, Lee, J. 2002. Acquisition of meiotic competence in growing pig oocytes correlates with their ability to activate Cdc2 kinase and MAP kinase. Zygote. 10 (3). p. 261–270.

Kanitz, W., Brussow, K. P., 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-Archives of Animal Breeding 44, p. 9-23.

Kapturczak, M. H., Meier-Kriesche, H. U., & Kaplan, B. 2004. Pharmacology of calcineurin antagonists. In Transplantation proceedings. 36 (2). p. 25-32.

Kaufman, M. L., Homa, S. T. 1993. Defining role for calcium in the resumption of meiosis in the pig oocyte. The Journal of Experimental Zoology. 265. p. 69-76.

Keefer, C. L., Schuetz, A. W. 1982. Spontaneous activation of ovulated rat oocytes during in vitro culture. Journal of Experimental Zoology. 224. p. 371–377.

Kharche, S. D., Birade, H. S. 2013. Parthenogenesis and activation of mammalian oocytes for in vitro embryo production: A review. Advances in Bioscience and Biotechnology. 4. p. 170-182.

Kikuchi, K., Nagai, T., Ding, J., Yamauchi, N., Noguchi, J., Izaike, Y. 1999. Cytoplasmic maturation for activation of pig follicular oocytes cultured and arrested at metaphase I. Journal of Reproduction and Fertility. 116. p. 143–156.

Kincaid, R. 1992. Calmodulin-dependent protein phosphatases from microorganisms to man. A study in structural conservatism and biological diversity. Advances in Second Messenger and Phosphoprotein Research. 27. p. 1-23.

Kincaid, R. L. 1995. The role of calcineurin in immune system responses. Journal of allergy and clinical imunology. 96 (6). p. 1170–1177.

Kincaid, R. L., Giri, P. R., Higuchi, S., Tamura, J., Dixon, S. C., Marietta, C. A., Amorese, D. A., Martin, B. M. 1990. Cloning and characterization of molecular isoforms of the catalytic subunit of calcineurin using nonisotopic methods. Journal of Biological Chemistry. 265 (19). p. 11312-11319.

King, R., Deshaies, R., Peters, J., Kirschner, M., 1996. How proteolysis drives the cell cykle. Science 274. p. 1652–1658.

Kingsbury, T. J., Cunningham, K. W. 2000. A conserved family of calcineurin regulators. Genes & development. 14 (13). p. 1595–1604.

Kissinger, C. R., Parge, H. E., Knighton, D. R., Lewis, C. T., Pelletier, L. A., Tempczyk, A., Villafranca, J. E. 1995. Crystal structures of human calcineurin and the human FKBP12–FK506–calcineurin complex. Nature. 378. p. 641–644.

Klee, C. B., Crouch, T. H., Krinks, M. H. 1979. Calcineurin: a calcium- and calmodulin-binding protein of the nervous system. Proceedings of the National Academy of Science of the United States of America. 76. p. 6270-6273.

Klee, C. B., Krinks, M. H. 1978. Purification of cyclic 39, 59 - nucleotide phosphodiesterase inhibitory protein by affinity chromatogramy on activator protein coupled to Sepharose. Biochemistry. 17. p. 120 – 126.

Klee, C. B., Ren, H., Wang, X. 1998. Regulation of the calmodulin stimulated protein phosphatase, calcineurin. The Journal of Biological Chemismy. 273 (22). p. 13367 – 13370.

Kline J.T. a Kline D. 1994. Regulation of intracellular calcium in the mouse egg: evidence for inositol trisphosphate-induced calcium release, but not calcium-induced calcium release. Biology Reproduction. 50. p. 193–203

Kline, D., Kline, J. T. 1992. Repetitive calcium transients and the role of calcium in exocytosis and cell cycle activation in the mouse egg. Developmental biology. 149 (1). p. 80–89.

Knott, J. G., Gardner, A. J., Madgwick, S., Jones, K. T., Williams, C. J., Schultz, R. M. 2006. Calmodulin-dependent protein kinase II triggers mouse egg activation and embryo development in the absence of Ca2+ oscillations. Developmental Biology. 296. p. 388-395.

Knox, R.V. 2005. Recruitment and selection of ovarian follicles for determination of ovulation rate in the pig. Domestic Animal Endocrinology. 29 (2). p. 385-397.

Krauchunas, A. R., Sackton, K. L., Wolfner, M. F. 2013. Phospho-Regulation Pathways During Egg Activation in Drosophila melanogaster. Genetics. 195 (1). p. 171-180.

Krisher, R. L. 2004. The effect of oocyte quality on development. Journal of Animal Science. 82. p. 14-23.

Kubelka, M., Anger, M., Kalous, J., Schultz, R. M., Motlík, J. 2002. Chromosome condensation in pig oocytes: Lack of a requirement for either cdc2 kinase or MAP kinase activity. Molecular reproduction and development. 63 (1). p. 110–118.

Kubelka, M., Kalab, P., Kalous, J., Nagyova, E., Motlik, J. 1996. The effect of butyrolactone I, a specific inhibitor of cdk-kinases on GVBD and chromosome condensation during the first meiotic division of pig and cattle oocytes. Archiv fur Tierzucht-Archives of Animal Breeding. 39. p. 53-53.

Kubelka, M., Motlík, J., Schultz, R. M., Pavlok, A. 2000. Butyrolactone I reversibly inhibits meiotic maturation of bovine oocytes, without influencing chromosome condensation activity. Biology of Reproduction. 62. p. 292-302.

Kumagai, A., Dunphy, W.G. 1991. The cdc25 protein controls tyrosine dephosphorylation of the cdc2 protein in a cell-free system. Cell. 64. p. 903–914.

Kuno, T., Takeda, T., Hirai, M., Ito, A., Mukai, H., Tanaka, C. 1989. Evidence for a 2nd isoform of the catalytic subunit of calmodulin-dependent protein phosphatase (calcineurin-A). Biochemical and Biophysical Research Communications. 165 (3). p. 1352-1358.

Kuo, R. C., Baxter, G. T., Thompson, S. H., Stricker, S. A., Patton, C., Bonaventura, J., Epel, D. 2000. NO is necessary and sufficient for egg activation at fertilization. Nature. 406. p. 633–636

Lavasseur, M., McDougall, A. 2000. Sperm-induced calcium oscillations at fertilisation in ascidians are controlled by cyclin B1-dependent kinase activity. Development. 127. p. 631-641.

Lawrence, Y, Whiteker, M., Swann, K. 1997. Spermegg fusion is the prelude to the initial Ca2+ increase at fertilization in the mouse. Development. 124. p. 233–241.

Lazar, S., Galiani, D., Dekel, N. 2002. cAMP-Dependent PKA Negatively Regulates Polyadenylation of c-mos mRNA in Rat Oocytes. Molecular Endocrinology. 16 (2). p. 331–341.

Lee, J., Miyano, T., Moor, R.M. 2000. Localisation of phosphorylated MAP kinase during the transition from meiosis I to meiosis II in pig oocytes. Zygote. 8. p. 119–125.

Levasseur, M., Dumollard, R., Chambon, J. P., Hebras, C., Sinclair, M., Whitaker, M., McDougall, A. 2013. Release from meiotic arrest in ascidian eggs requires the activity of two phosphatases but not CaMKII. Development. 140 (22). p. 4583-4593.

Li, H. M., Rao, A., Hogan, P. G. 2011. Interaction of calcineurin with substrates and targeting proteins. Trends in Cell Biology. 21 (2). p. 91–103..

Li, M. Y., Fan, H. Y., Tong, C. Chen, D., Xia, G., Sun, Q. 2002. MAPK regulates cell cycle progression in pig oocytes and fertilized eggs. Chinese Science Bulletin, 47 (10). p. 843.

Li, Q., Niwa, K., Hunter, M. G. 2004. Effets of 17beta – estradiol on in vitro maturation of pig oocytes in protein-free medium. Journal of Reproduction and Development. 50 (3). p. 305 – 313.

Lin, X., Sikkink, R. A., Rusnak, F., Barber, D. L. 1999. Inhibition of calcineurin phosphatase activity by a calcineurin B homologous protein. Journal of Biological Chemistry. 274

(51). p. 36125-36131.

Liu, J., Farmer Jr, J. D., Lane, W. S., Friedman, J., Weissman, I., Schreiber, S. L. 1991. Calcineurin is a common target of cyclophilin-cyclosporin A and FKBP-FK506 complexes. Cell. 66 (4). p. 807-815.

Liu, W. S., Heckman, C. A. 1998. The sevenfold way of PKC regulation. Cellular Signalling. 10 (8). p. 529-542.

Longo, F. J., Chen, D. Y. 1985. Development of cortical polarity in mouse eggs: Involvement of the meiotic apparatus. Development Biology, 107 (2), p. 382-394.

Lorca, T., Bernis, C., Vigneron, S., Burgess, A., Brioudes, E., Labbe, J.C., Castro, A. 2010. Constant regulation of both the MPF amplification loop and the Greatwall–PP2A pathway is required for metaphase II arrest and correct entry into the first embryonic cell cycle. Journal of Cell Science. 123. p. 2281–2291.

Lorca, T., Cruzalegui, F., Fesquet, D., Cavadore, J., Mery, J., Means, A., Doree, M. 1993. Calmodulin dependant protein kinase II mediates inactivation of MPF and CSF upon fertilization of Xenopus eggs. Nature. 366. p. 270–273.

Lorca, T., Galas, S., Fesquet, D., Devault, A., Cavadore, J. C., Doreé, M. 1991. Degradation of proto-oncogene product p39 mos is not necessary for cyclin proteolysis and exit from meiotic metaphase: requirement for Ca2+-calmodulin dependent event. The EMBO Journal. 10. p. 2087-2093.

Lucy, M.C., Liu, J., Boyd, C.K. Bracken, C.J. 2001. Ovarian follicular growth in sows. Reproduction. Suppl. 58. p. 31-45.

Machaty, Z., Funahashi, H., Day, B. N., Prather, R. S. 1997. Developmental changes in the intracellular Ca2+ release mechanisms in porcine oocytes. Biology of reproduction. 56 (4). p. 921–930.

Machaty, Z., Funahashi, H., Mayes, M. A., Day, B. N., Prather, R. S. 1996. Effects of injecting calcium chloride into in vitro-matured porcine oocytes. Biology of Reproduction. 54(2). p. 316-322.

Machaty, Z., Wang, W. H., Day, B. N., Prather, R. S. 1997. Complete activation of porcine oocytes induced by the sulfhydryl reagent, thimerosal. Biology of Reproduction. 57(5). p. 1123-1127

Malcuit, C., Kurokawa, M., & Fissore, R. A. 2006. Calcium oscillations and mammalian egg activation. Journal of cellular fysiology. 206 (3). p. 565-573.

Mansour, S. J., Matten, W. T., Hermann, A. S., Candia, J. M., Rong, S., Fukasawa, K., Vande Woude, G. F., Ahn, N. G. 1994. Transformation of mammalian cells by constitutively active MAP kinase kinase. Science. 265. p. 966-970.

Markoulaki, S., Matson, S., Ducibella, T. 2004. Fertilization stimulates long-lasting oscillations of CaMKII activity in mouse eggs. Developmental Biology. 272 (1). p. 15-25.

Masui, Y. 2001. From oocyte maturation to the in vitro cell cycle: the history of discoveries of Maturation-Promoting Factor (MPF) and Cytostatic Factor (CSF). Differentiation. 69(1). p. 1-17.

Masui, Y., Markert, C. 1971. Cytoplasmic control of nuclear behaviour during meiotic maturation of frog oocytes. Journal of experimental zoology. 177. p. 129–146.

Matifat, F., Hague, F., Brule, G., Collin, T. 2001. Regulation of InsP3-mediated Ca2+ release by CaMKII inXenopus oocytes. Pflügers Archiv: European Journal of Physiology. 441. p. 796-801.

Matta, S.G., Caldas-Bussiere, M.C., Viana, K.S., Faes, M.R., Paes de Carvalho, C.S., Dias, B.L., Quirino, C.R. 2009. Effect of inhibition of synthesis of inducible nitric oxide synthase-derived nitric oxide by aminoguanidine on the in vitro maturation of oocyte-cumulus complexes of cattle. Animal Reproduction Science. 111. p. 189–201.

Matzuk, M.M., Lamb. D. J. 2002. Genetic dissection of mammalian fertility pathways. Nat Cell Biol. 4. p. 41–49.

McDougall, A., Lavasseur, M., O´Sullivan, A. J., Jones, K. 2000. Cell-cycle repetitive Ca2+ waves induced by a cytosolic sperm extract in mature ascidian eggs mimic those observed at fertilisation. Journal of Cell Science. 113. p. 3453-3462.

Means, A. R. 1994. Calcium, calmodulin and cell cycle regulation FEBS Letters. 347. p. 1-4.

Mehlmann, L. M., Kline, D. 1994. Regulation of intracellular calcium in the mouse egg: calcium release in response to sperm or inositol trisphosphate is enhanced after meiotic maturation. Biology of reproduction. 51 (6). p. 1088–1098.

Mehlmann, L. M., Terasaki, M., Jaffe, L. A., Kline, D. 1995. Reorganization of the endoplasmic reticulum during meiotic maturation of the mouse oocyte. Developmental Biology. 170. p. 607–615.

Milan, D., Griffith, J., Su, M., Price, E.R., McKeon, F. 1994. The latch region of calcineurin B is involved in both immunosuppressant-immunophilin complex docking and phosphatase activation. Cell. 79. p. 437-447.

Miskin, J. E., Abrams, C. C., Goatley, L. C., Dixon, L. K. 1998. A viral mechanism for inhibition of the cellular phosphatase calcineurin. Science. 281 (5376). p. 562-565.

Miyano, T., Day, Y. F., Lee, J., Kano, K., Moor, R. M. 2000. Degradation of pig cyclin B1 molecules precedes MAP kinase kinase dephosphorylation during fertilisation of the

oocytes. Zygote. 8 (2). p. 153-158.

Miyazaki, S. 1991. Repetitive calcium transients in hamster oocytes. Cell Calcium. 12. p. 205–216.

Miyazaki, S. I., Shirakawa, H., Nakada, K., Honda, Y., Yuzaki, M., Nakade, S., Mikoshiba, K. 1992. Antibody to the inositol trisphosphate receptor blocks thimerosalenhanced Ca 2+-induced Ca2+ release and Ca2+ oscillations in hamster eggs. FEBS letters. 309 (2). p. 180–184.

Miyazaki, S., Shirakawa, H., Nakada, K., Honda, Y. 1993. Essential role of the inositol 1,4,5-triphosphate receptors. Ca2+ release channel in Ca2+ waves and Ca2+ oscillations at fertilization of mammalian eggs. Developmental Biology. 158. p. 62–78.

Mochida, S., Hunt, T. 2007. Calcineurin is required to release Xenopus egg extracts from meiotic M phase. Nature. 449 (7160). p. 336–340.

Moore, G. 1978. RNA synthesis in fixed cells by endogenous RNA polymerase. Experimental Cell Research. 111. p. 317–326.

Moore, G. D., Kopf, G. S., Schultz, R. M. 1995. Differential effect of activators of protein kinase C on cytoskeletal changes in mouse and hamster eggs. Developmental Biology. 170 (2). p. 519-530.

Moos, J., Visconti, P. E., Moore, G. D., Schultz, R. M., Kopf, G. S. 1995. Potential role of mitogen-activated protein kinase in pronuclear envelope assembly and disassembly following fertilization of mouse eggs. Biology of Reproduction. 53 (3). p. 692-699.

Morbeck, D. E., Esbenshade, K. L., Flowers, W. L., Britt, J. H. 1992. Kinetics of follicle growth in the prepubertal gilt. Biology of Reproduction. 47. p. 485–491.

Moreno, R. D., Palomino, J., Schatten, G. 2006. Assembly of spermatid acrosome depends on microtubule organization during mammalian spermiogenesis. Developmental biology. 293 (1). p. 218-227.

Motlík, J., Crozet, N., Fulka, J. 1984. Meiotic competence in vitro of pig oocytes isolated from early antral follicles. Journal of Reproduction and Fertility. 72. p. 323–328.

Motlik, J., Fulka, J., Fléchon, J. E. 1986. Changes in intercellular coupling between pig oocytes and cumulus cells during maturation in vivo and in vitro. Journal of reproduction and fertility. 76 (1). p. 31-37.

Motlík, J., Kubelka, M. 1990. Cell-cycle aspects of growth and maturation of mammalian oocytes. Molecular Reproduction and Development. 27. p. 366–375.

Motlík, J., Pavlok, A., Kubelka, M., Kalous, J., Kaláb, P. 1998. Interplay between CDC2 kinase and MAP kinase pathway during maturation of mammalian oocytes.

Theriogenology. 49. p. 461-469.

Mueller, P.R., Coleman, T.R., Kumagai, A., Dunphy, W.G. 1995. Myt1: a membrane-associated inhibitory kinase that phosphorylates Cdc2 on both threonine-14 and tyrosine-15. Science. 270. p. 86–90.

Muramatsu, T., GiRi, P. R., Higuchi, S., Kincaid, R. L. 1992. Molecular cloning of a calmodulin-dependent phosphatase from murine testis: identification of a developmentally expressed nonneural isoenzyme. Proceedings of the National Academy of Sciences. 89 (2). p. 529–533.

Muramatsu, T., Kincaid, R. L. 1992. Molecular cloning of a full-length cDNA encoding the catalytic subunit of human calmodulin-dependent protein phosphatase (calcineurin Aα). Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Molecular Cell Research. 1178 (1). p. 1.

Murray, A. W., Kirschner, M. 1989. Cyclin synthesis drives the early embryonic cell cycle. Nature. 339. p. 275–280.

Nader, N., Kulkarni, R. P., Dib, M., Machaca, K. 2013. How to make a good egg!: The need for remodeling of oocyte Ca2+ signaling to mediate the egg-to-embryo transition. Cell calcium. 53. p. 41-54.

Nakamura, Y., Yamagat,a Y., Sugino, N., Takayama, H., Kato, H. 2002. Nitric oxide inhibits oocyte meiotic maturation. Biology of Reproduction. 67. p. 1588–1592.

Nathan, C., Xie, Q. W. 1994. Nitric oxide synthases: roles, tolls, and controls. Cell. 78 (6). p. 915–918.

Nebreda, A., Hunt, T. 1993. The c-mos proto-oncogene protein kinase turns on and maintains the activity of MAP kinase, but not MPF, in cell-free extract of Xenopus oocytes and eggs. The EMBO Journal. 12 (5). p. 1979-1986.

Newton, A. 1995. Protein kinase C: Structure, Function, and Regulation. The Journal of Biological Chemistry. 270 (48). p. 28495-28498.

Nigg, E. A. 2001. Mitotic kinases as regulators of cell division and its checkpoints. Molecular Cell Biology. 2. p. 21-32.

Nishiyama, T., Yoshizaki, N., Kishimoto, T., Ohsumi, K. 2007. Transient activation of calcineurin is essential to initiate embryonic development in Xenopus laevis. Nature. 449 (7160). p. 341.

Noakes, D.E., Arthur, G.H., Pearson H., Parkinson T.J. (eds.). 1996. Veterinary Reproduction and Obsterics London: W.B. Saunders, 7th edition, 726 p.

Noguchi, M., Yoshioka, K., Itoh, S., Suzuki, C., Arai, S., Wada, Y., Hasegawa, Y., Kaneko, H. 2010. Peripheral concentrations of inhibin a, ovarian steroids, and gonadotropins

associated with follicular development throughout the estrous cycle of the sow. Reproduction. 139 (1). p. 153-161

Norberg, H. S. 1972. The follicular oocyte and its granulosa cells in domestic pig. Zeitschrift für Zellforschung und Mikroskopische Anatomie (Vienna, Austria: 1948). 131. p. 497-517.

Norris, C. M., Blalock, E. M., Chen, K. C., Porter, N. M., & Landfield, P. W. 2002. Calcineurin enhances L-type Ca 2+ channel activity in hippocampal neurons: increased effect with age in culture. Neuroscience. 110(2). p. 213-225.

Nurse, P. 1990. Universal control mechanism regulating onset of M-phase. Nature. 344. p. 503–508.

Oktay, K., Briggs, D., Gosden, R. G. 1997. Ontogeny of follicle-stimulating hormone receptor gene expression in isolated human ovarian follicles. The Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism, 82 (11). p. 3748-3751.

Olson, L. M., Jablonka-Shariff, A. Beltsos, A. N. 2000. Ovarian nitric oxide: A modulator of ovulation and oocyte maturation. Reprinted from Ovulation-Evolving scientific and clinical concepts. ed Adashi E. Y. Springer-Verlag. New York.

Oxender, W. D., Colenbrander, B., Van de Wiel D. F. M., Wensing, C. J. G. 1979. Ovarian developmnet in fetal and prepubertal pigs. Biology of Reproduction. 21. p. 715–721.

Pae, H. O., Lee, Y. Ch., Jo, E. K., Chung, H. T. 2009. Subtle Interplay of Endogenous Bioactive Gases (NO, CO and H2S) in Inflammation. Archives of Pharmacal Research. 32 (8). p. 1155‑1162.

Pallen, C. J., Valentine, K. A., Wang, J. H., Hollenberg, M. D. 1985. Calcineurin-mediated dephophorylation of the human placental membrane receptor for epidermal growth factor urogastrone. Biochemistry. 24 (18). p. 4727-4730.

Payne, D., Rossomando, A. J., Martino, P., Erickson, A. K., Her, J. H., Shabanowitz, J., Hunt, D. F., Webber, M. J., Sturgill, T. W. 1991. Identification of the regulatory phosphorylation site in pp42/mitogen-activated protein kinase (MAP kinase). The EMBO Journal. 10. p. 885-892.

Pesin, J. A., Orr-Weaver, T. L. 2008. Regulation of APC/C activators in mitosis and meiosis. Annual review of cell and developmental biology. 24. p. 475-499.

Peter, M., Nakagawa, J., Dore´e, M. 1990. In vitro disassembly of the nuclear lamina and M phase-specific phosphorylation of lamins by cdc2 kinase. Cell. 61. p. 591–602.

Petr, J., Grocholová, R., Rozinek, J., Jílek, F. 1996. Activation of in vitro matured pig oocytes by combined treatment of ethanol and cycloheximide. Theriogenology. 45 (8). p.

1473-1478.

Petr, J., Chmelíková, E., Žalmanová, T., Tůmová, L., Kheilová, K., Kučerová-Chrpová, V., Jílek, F. 2013. Pyrethroids cypermethrin, deltamethrin and fenvalerate have different effects on in vitro maturation of pig oocytes at different stages of growth. Animal. 7 (01). p. 134-142.

Petr, J., Rajmon, R., Chmelíková, E., Tománek, M., Lánská, V., Přibáňová, M., Jílek, F. 2006. Nitric-oxide-dependent activation of pig oocytes: the role of the cGMP-signalling pathway. Zygote. 14. p. 9–16.

Petr, J., Rajmon, R., Lánská, V., Sedmíková, M. Jílek, F. 2005b. Nitric-oxide-dependent activation of pig oocytes: the role of calcium. Molecular and Cellular Endocrinology 242. p. 16–22.

Petr, J., Rajmon, R., Rozinek, J., Sedmíková, M., Ješeta, M., Chmelíková, E., Švestková, D. Jílek, F. 2005a. Activation of pig oocytes using nitric oxide donors. Molecular Reproduction and Development. 71. p. 115–122.

Petr, J., Rozinek, J., Hruban, V., Jílek, F., Sedmíková, M., Vaňourková, Z., Němeček, Z. 2001. Ultrastructural localization of calcium deposits during in vitro culture of pig oocytes. Molecular Reproduction and Development. 58. p. 196–204.

Petr, J., Urbánková, D., Tománek, M., Rozinek, J., Jílek, F. 2002. Activation of in vitro matured pig oocytes using activators of inositol triphosphate or ryanodine receptors. Animal reproduction science. 70 (3). p. 235–249.

Picton, H. M 2001. Activation of follicle development: the primordial follicle. Theriogenology. 55 (6). p. 1193-121.

Picton, H. M., Harris, S.E., Muruvi, W., Chambers, E. L. 2008. The in vitro growth and maturation of follicles. Reproduction 136. p. 703-715.

Picton, H., Briggs, D., Gosden, R. 1998. The molecular basis of oocyte growth and development. Molecular and Cellular Endocrinology. 145. p. 27–37.

Pines, J. 1999. Four-dimensional control of the cell cycle. Nature Cell Biology. 1 (3). E73-79.

Pozzan, T., Rizzuto, R., Volpe, P., Meldolesi, J. 1994. Molecular and cellular physiology of intracellular calcium stores. Physiological Reviews. 74. p. 595-636.

Presicce, G. A., Yang, X. 1994. Nuclear dynamics of parthenogenesis of bovine oocytes matured in vitro for 20 and 40 hours and activated with combined ethanol and cycloheximide treatment. Molecular Reproduction and Development. 37. p. 61-68.

Procházka, R., Kaňka, J., Sutovský, P., Fulka, J., Motlík, J. 1992. Development of pronuclei in pig oocytes activated by a single electric pulse. Journal of Reproduction and

Fertility. 96 (2). p. 725-734.

Ramadan W. M., Kashir J., Jones C., Coward K. 2012. Oocyte activation and phospholipase C zeta (PLCζ): diagnostic and therapeutic implications for assisted reproductive technology. Cell Communication and Signalling. 10(12). p.1-20.

Romanovský, A. (ed.). Obecná biologie. SPN, Praha 1985, 695 s.

Romanovský, A., Činčerová, A., Čížek, F., Dvořák, P., Kaprálek, F., Kubišta, V., Nedvídek, J., Opatrný, Z., Pazourek, J., Pikálek, P., Sefert, J., Slavíková, Z., Váňa, J., Závada, V. 1988. Obecná biologie. SPN Praha, 695 s.

Romar, R., Funahashi, H. 2006. In vitro maturation and fertilization of porcine oocytes after a 48h culture in roscovitine, an inhibitor of p34, cdc2 cyclin B kinase. Animal reproduction science. 92 (3). p. 321-333.

Ross P. J., Yabuuchi A., Cibelli J. B. 2006. Oocyte spontaneous activation in different rat strains. Cloning Stem Cells. 8. p. 275–282.

Rosselli, M., Reinhart, K., Imthurn, B., Keller, P.J., Bubey, R.K. 2000. Cellular and biochemical mechanisms by which environmental oestrogens influence reproductive fiction. Human Reproduction. 6 (4). p. 332-350.

Rozinek, J., Petr, J., Antalíková, L. 1991. Morphology of cortical parts in growing and fully-grown pig oocytes. XXXIIIrd Congres of Czechoslovak Anatomical Society.

Rozinek, J., Rajmon, R., Petr, J., Rohlik, J., Jeseta, M., Sedmikova, M., Rehak, D., Jilek, F. 2006. Ultrastructural localisation of calcium deposits in pig ovarian follicles. Animal Reproduction Science. 91(1-2). p. 123-132.

Rozinek, J., Vanourkova, Z., Sedmikova, M., Lanska, V., Petr, J., Rajmon, R., & Jilek, F. 2003. Ultrastructural localisation of calcium deposits in pig oocytes maturing in vitro: effects of verapamil. Zygote. 11(03). p. 253-260.

Rusnak, F, Mertz, P. 2000. Calcineurin: Form and function. Physiological Reviews. 80 (4). p.1483–1521.

Saeki, K., Nagao, Y., Kishi, M., Nagai, M. 1997. Developmental capacity of bovine oocytes following inhibition of meiotic resumption by cycloheximide or 6-dimethylaminopurine. Theriogenology. 48(7). p. 1161-1172.

Saunders, C. M., Larman, M. G., Parrington, J., Cox, L.J., Royse, J., Blayney, L.M., Swann, K., Lai, F.A. 2002. PLC zeta: a sperm-specific trigger of Ca(2+) oscillations in eggs and embryo development. Development.129 (15). p. 3533–3544.

Sedmíková, M., Rajmon, R., Petr, J., Švestková, D., Chmelíková, E., Akal, A. B., Rozinek, J., Jílek, F. 2006. Effect of protein kinase C inhibitors on porcine oocyte activation. Journal of Experimental Zoology. 305A. p. 376-382

Sengoku, K., Takuma, N., Horikawa, M.,Tsuchiya, K., Komori, H., Sharifa, D., Tamate, K., Ishikawa, M. 2001. Requirement of nitric oxide for murine oocyte maturation, embryo development, and trophoblast outgrowth in vitro. Molecular Reproduction and Development. 58. p. 262–268.

Shaw, K. T., Ho, A. M., Raghavan, A., Kim, J., Jain, J., Park, J., Hogan, P. G. 1995. Immunosuppressive drugs prevent a rapid dephosphorylation of transcription factor NFAT1 in stimulated immune cells. Proceedings of the National Academy of Sciences. 92 (24). p. 11205-11209.

Shibasaki, F., Hallin, U., Uchino, H. 2002. Calcineurin as a multifunctional regulator. Journal of biochemistry. 131 (1). p. 1-15.

Shimada, M., Maeda, T., Terada, T. 2001. Dynamic changes of connexin-43, gap junctional protein, in outer layers of cumulus cells are regulated by PKC and PI 3-kinase during meiotic resumption in porcine oocytes. Biology of Reproduction. 64. p. 1255-1263.

Schatten G., 1994. The centosome and its mode of inheritance: the reduction of the centrosome during gametogenesis and its restoration during fertilization, Developmental Biology. 165. p. 299–335.

Schmidt, K., Klatt, P., Mayer, B. 1993. Hypercholesterolemia is associated with a reduced response of smooth muscle guanylyl cyclase to nitrovasodilators. Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology. 13 (8). p. 1159-1163.

Silverman-Gavrila, L. B., Charlton, M. P. 2009. Calcineurin and cytoskeleton in low-frequency depression. Journal of Neurochemistry. 109 (3). p. 716-732.

Sirard, M. A., Dubuc, A., Bolamba, D., Zheng, Y., Coenen, K. 1993. Follicle‐oocyte‐sperm interactions in vitro and in vitro in pigs. Journal of reproduction and fertility. Supplement, 48. p. 3–16.

Sládeček, F. 1986. Rozmnožování a vývoj živočichů. Academia Praha. s. 112–118.

Slavov. N., Carey. J., Linse. S. 2013. Calmodulin transduces Ca2+ oscillations into differential regulation of its target proteins. ACS chemical neuroscience. 4 (4). p. 601–612.

Sobotková, M., Bartůňková, J. 2008. Antibiotická imunosupresiva. Remedia. 18(3). p.233-241.

Soderlund, D. M. 2010. State-dependent modification of voltage-gated sodium channels by pyrethroids. Pesticide Biochemistry and Physiology. 97 (2). p. 78–86.

Soderlund, D. M., Clark, J. M., Sheets, L. P., Mullin, L. S., Piccirillo, V. J., Sargent, D., Stevens, J. T., Weiner, M. L. 2002. Mechanisms of pyrethroid neurotoxicity: implications for cumulative risk assessment. Toxicology. 171 (1). p. 3-59

Soede, N.M., Hazeleger, W., Kemp, B. 1998. Follicle size and the process of ovulation in sows as studied with ultrasound. Reproduction in Domestic Animals. 33 (3-4). p. 239-244.

Soede, N.M., Langendijk, P., Kemp, B. 2011. Reproductive cycles in pigs. Animal Reproduction Science. 124 (3-4). p. 251-258.

Sousa, M., Barros, A., Tesarik, J. 1996. Preimplantation embrology The role of ryanodine-sensitive Ca2+ stores in the Ca2+ oscillation machine of human oocytes. Molecular Human Reproduction. 2 (4). p. 265–272.

Stemmer, P.M., Klee, C.B. 1994. Dual calcium ion regulation of calcineurin by calmodulin and calcineurin B. Biochemistry. 33. p. 6859–6866.

Stojkovic, M., Machado, S.A., Stojkovic, P., Zakhartchenko, V., Hutzler, P., Goncalves, P.B., Wolf, E. 2001. Mitochondrial distribution and adenosine triphosphate content of bovine oocytes before and after in vitro maturation: Correlation with morphological criteria and developmental capacity after in vitro fertilization and culture. Biology of Reproduction. 64 (3). p. 904-909.

Stojkovic, M., Motlík, J., Kölle S., Zakchartchenko, V., Alberio, R., Sinowatz, F., Wolf, E. 1999. Cell-cyclo control and oocyte maturation: Review of literature. Reproduction in Domestic Animals. 34. p. 335–342.

Stricker, S. A. 1999. Comparative biology of calcium signaling during fertilization and egg activation in animals. Developmental biology. 211(2). 157-176.

Su, Y. Q., Xia, G. L., Byskov, A. G., Fu, G.D., Yang, C.R. 1999. Protein kinase C and intracellular calcium are involved in follicle-stimulating hormone-mediated meiotic resumption of cumulus cell-enclosed porcine oocytes in hypoxanthine-supplemented medium. Molecular Reproduction and Development. 53 (1). p. 51-58.

Su, Y.Q., Eppig, J.J. 2002. Evidence that multifunctional calcium/kalmodulin - dependent protein kinase II (CaM KII) participates in the meiotic maturation of mouse oocytes. Mollecular Reproduction and Development. 61. p. 560-569

Sugiura, K., Naito, K., Iwamori, N., Kagii, H., Goto, S., Ohashi, S., Naruoka, H., Yada, E., Yamanouchi, K., Tojo, H. 2002. Activation of ribosomal S6 kinase (RSK) during porcine oocyte maturation. Zygote. 10. p. 31–36.

Sun, F. Z., Bradshaw, J. P., Galli, C., Moor, R. M. 1994. Changes in intracellular calcium-concentration in bovine oocytes following penetration by spermatozoa. Journal of Reproduction and Fertility. 101 (3). p. 713-719.

Sun, F. Z., Hoyland, J., Huang, X., Mason, W., Moor, R. M. 1992. A comparison of intracellular changes in porcine eggs after fertilization and electroactivation.

Development. 115 (4). p. 947-956.

Sun, Q. Y., Lai, L., Park, K. W., Kuhholzer, B., Prather, R. S., Schatten, H. 2001. Dynamic events are differently mediated by microfilaments, microtubules, and mitogen-activated protein kinase during porcine oocyte maturation and fertilization in vitro. Biology of Reproduction. 64. p. 871–889.

Sun, Q. Y., Nagai, T. 2003. Molecular mechanisms underlying pig oocyte maturation and fertilization. Journal of Reproduction and Development. 49. p. 347–359.

Sun, Q. Y., Rubinstein, S., Breitbart, H. 1999. MAP kinase activity is downregulated by phorbol ester during mouse oocyte maturation and egg fertilization. Molecular Reproduction and Development. 52. p. 380-386.

Sun, Q. Y., Wang, W. H., Hosoe, H., Taniguchi, T., Chen, D. Y., Shioya, Y. 1997. Activation of protein kinase C induces cortical granule exocytosis in a Ca2+-independent manner, but not the resumption of cell cycle in porcine eggs. Development, Growth & Differentiation. 39 (4). p. 523-529.

Susiarjo M. 2007. Identification and characterization of estrogen – mediated effects on female meiosis: studies of bisphenol A and estrogen receptors, Thesis, Case Western Reserve University, p. 129.

Suzuki H., Takashima Y., Toyokawa K. 2002. Cytoskeletal organization of porcine oocytes aged and activated electrically or by sperm. Journal of reproduction and Development. 48. p. 293–301.

Suzuki, T., Suzuki, E., Yoshida, N., Kubo, A., Li, H., Okuda, E.,Perry, A. C. 2010. Mouse Emi2 as a distinctive regulatory hub in second meiotic metaphase. Development. 137(19). p. 3281-3291.

Swann, K. 1993. The soluble sperm oscillogen hypothesis. Zygote. 1. p. 273–276.

Swann, K., Ozil, J. P. 1994. Dynamics of the calcium signal that triggers mammalian egg activation. International review of cytology. 152. p. 183–222.

Swann, K., Saunders, C. M., Rogers, N. T., Lai, F. A. 2006. PLCδ (zeta): A sperm protein that triggers Ca2+ oscillations and egg activation in mammals. Seminars in Cell and Developmental Biology. 17 (2). p. 264-273.

Szollosi, D., Calarco, P.G., Donahue, R.P. 1972. The nuclear envelop: Its breakdown and fate in mammalian oogonia and oocytes. Anatomical Record. 174. p. 325-340

Taieb, F. E., Gross, S. D., Lewellyn, A. L., & Maller, J. L. 2001. Activation of the anaphase-promoting complex and degradation of cyclin B is not required for progression from

Meiosis I to II in Xenopus oocytes. Current biology. 11(7). p. 508-513.

Takeo, S., Hawley, R. S., Aigaki, T. 2010. Calcineurin and its regulation by Sra/RCAN is required for completion of meiosis in Drosophila. Developmental Biology. 344 (2). p. 957–967.

Takeo, S., Swanson, S. K., Nandanan, K., Nakai, Y., Aigaki, T., Washburn, M. P., Hawley, R. S. 2012. Shaggy/glycogen synthase kinase 3β and phosphorylation of Sarah/regulator of calcineurin are essential for completion of Drosophila female meiosis. Proceedings of the National Academy of Sciences. 109 (17). p. 6382–6389.

Takeo, S., Tsuda, M., Akahori, S., Matsuo, T., Aigaki, T. 2006. The calcineurin regulator Sra plays an essential role in female meiosis in Drosophila. Current Biology. 16 (14). p. 1435–1440.

Tanghe, S., Van Soom, A., Nauwynck H., Coryn M., De Kruif, A. 2002. Minireview: Functions of the cumulus oophorus during oocyte maturation, ovulation, and fertilization. Molecular Reproduction and Development. 61 (3). p. 414-424.

Tao, J.Y., Fu, Z., Zhang, M.L., Xia, G., Lei, L., Wu, Z.L. 2005. Nitric oxide influences the meiotic maturation of porcine oocytes cultured in hypoxantine-supplemented medium. Journal of Animal Physiology and Animal Nutrition. 89. p. 38–44.

Tash, J. S., Krinks, M., Patel, J., Means, R. L., Klee, C. B., Means, A. R. 1988. Identification, characterization, and functional correlation of calmodulin-dependent protein phosphatase in sperm. The Journal of cell biology. 106 (5). p. 1625–1633.

Telfer, E. F., Binnie, J. P., Mc Caffery, F. H., Campbell, B. K. 2000. In vitro development of oocytes from porcine and bovine primary follicles. Molecular Cell Endocrinology 163. p. 117-123.

Telfer, E., Gosden, R. G. 1987. A quantitative cytological study of polyovular follicles in mammalian ovaries with particular reference to the domestic bitch (Canis familiaris). J Reprod Fertil. 81(1). p. 137-47.

Thibault, C., Szollosi, D., Gerard, M. 1987. Mammalian oocyte maturation. Reprod Nutr Dev. 27. p. 865–896.

Törnell, J., Billig, H., Hillensjo, T. 1990. Resumption of rat oocyte meiosis is paralleled by a decrease in guanosine 30,50-cyclic monophosphate (cGMP) and is inhibited by microinjection of cGMP. Acta Physiologica Scandinavica.139. p. 511–517.

Törnell, J., Billig, H., Hillensjö, T. 1991. REVIEW Regulation of oocyte maturation by changes in ovarian levels of cyclic nucleotides. Human reproduction. 6 (3). p. 411–422.

Törnell, J., Brannstrom, M., Hillensjo, T. 1984. Different effects of cyclic nucleotide derivatives upon the rat oocyte-cumulus complex in vitro. Acta Physiologica Scandinavia. 122. p. 507–13.

Tosti, E., Boni, R. 2004. Electrical events during gamete maturation and fertilization in animals and humans. Human Reproduction Update. 10 (1). p. 53-65.

Tsafriri, A., Channing, C. P. 1975. An inhibitory influence of granulosa cells and follicular fluid upon porcine oocyte meiosis in vitro. Endocrinology. 96. p. 922-927.

Tsafriri, A., Chun, S. Y., Zhang, R., Hsueh, A. J. W., Conti, M. 1996. Oocyte maturation involves compartmentalization and opposing changes of cAMP levels in follicular somatic and germ cells: studies using selective phosphodiesterase inhibitors. Developmental Biology. 178. p. 393-402.

Van Voorhis, B. J., Moore, K., Strijbod, P. J. L., Nelson, S., Baylis, S. A., Grzybicki, D., Weiner, C. P. 1995. Expression and localization of inducible and endothelial nitric oxide synthase in the rat ovary. European Journal of clinical Investigation. 96. p. 2719–2726.

Vanderhyden, B. C. 2002. Molecular basis of ovarian development and function. Frontiers in Bioscience. 7. p. 2006–2022.

Verlhac, M. H., Kubiak, J. Z., Weber, M., Géraud, G., Colledge, W. H., Evans, M. J., Maro, B. 1996. Mos is required for MAP kinase activation and is involved in microtubule organization during meiotic maturation in the mouse. Development. 122. p. 815-822.

Verlhac, M., Kubiak, J., Clarke, H., Maro, B. 1994. Microtubule and chromatin behavior follow MAP kinase activity but not MPF activity during meiosis in mouse oocytes. Development. 120. p. 1017–1025.

Viana, K. S., Caldas-Bussiere, M. C., Matta, S. G. C., Faes, M. R., Paes de Carvalho, C. S., Quirino, C. R. 2007. Effect of sodium nitroprusside, a nitric oxide donor, on the in vitro maturation of bovine oocytes. Animal Reproduction Science. 102. p. 217-227.

Villa-Diaz, L. G., Miyano, T. 2004. Activation of p38 MAPK During Porcine Oocyte Maturation. Biology of Reproduction. 71. p. 691–696.

Vitullo, A. D., Ozil, J. P. 1992. Repetitive calcium stimuli drive meiotic resumption and pronuclear development during mouse oocyte activation. Developmental biology. 151 (1). p. 128–136.

Viveiros, M. M., O`Brien, M., Eppig, J. J. 2004. Protein kinase C activity regulates the onset of anaphase I in mouse oocytes. Biology of Reproduction. 71. p. 1525-1532.

Viveiros, M.M., Hirao, Y., Eppig, J.J. 2001. Evidence that protein kinase C (PKC) participates in the meiosis I to meiosis II transition in mouse oocytes.

Developmental Biology. 235. p. 330-342.

Wallace, R.W., Tallant, E.A., Cheung, W.Y. 1980. High levels of a heat-labile calmodulin-binding protein (CaM-BP80) in bovine neostriatum. Biochemistry. 19. p. 1831-1837.

Wang R. U. I. 2002. Two's company, three'sa crowd: can H2S be the third endogenous gaseous transmitter? The FASEB Journal. 16 (13). p. 1792–1798.

Wang, J. H., Desai, R. 1976. Modulator binding protein. Bovine brain protein exhibiting the Ca2+-dependent association with the protein modulator of cyclic nucleotide phosphodiesterase. Journal of Biological Chemistry. 252 (12). p. 4175–4184

Wang, R. U. I. 2002. Two's company, three'sa crowd: can H2S be the third endogenous gaseous transmitter? The FASEB Journal. 16 (13). p. 1792–1798.

Wang, W. H., Abeydeera, L. R., Prather, R. S., Day, B. N. 1998. Functional analysis of activation of porcine oocytes by spermatozoa, calcium ionophore, and electrical pulse. Molecular Reproduction and Development. 51(3). p. 346-353.

Wang, Z. G., Kutschke, W., Hill, J. A. 2000. Calcineurin signalling modulates L-type calcium current in heart: A role in the electrical remodelling of pressure-overload hypertrophy. Biophys. J. 78, 390A-390A

Wassarman, P. M. 1988. The Mammalian Ovum In: The Physiology of Reproduction. eds. Knobil E. a Neill J., Raven Press Ltd., New York. p. 69–102.

Wassarman, P.M., Albertini, D.F. 1994. The mammaliam ovum, In: Knobil E., Neil J. et al. (ed): The physiology of reproduction, 2. vydání, Raven Press , New York, 79-114.

Watanabe, N., Vandeoude, G., Ikawa, Y., Sagata, N. 1989. Specific proteolysis of the c-mos protooncogene product by calpain on fertilization of Xenopus eggs. Nature. 342. p. 505–511.

Watterson, D. M., Vanaman, T. C. 1976. Affinity chromatrography purification of a cyclic nucleotide phosphodiesterase using immobilized modulator protein, a troponin C-like protein from brain. Biochemical and Biophysical Research Communications. 73. p. 40-46.

Wehrend, A., Meinecke, B. 2001. Kinetics of meiotic progression, M-phase promoting factor (MPF) and mitogen-activated protein kinase (MAP kinase) activities during in vitro maturation of porcine and bovine oocytes: species specific differences in the length of the meiotic stages. Animal reproduction science. 66 (3). p. 175–184.

Wheaton, J.E., Meyer, R.L., Jones, R.H., Kramer, A.J. 1998. Effects of passive immunization using antibody against an alpha-inhibin peptide on follicle-stimulating hormone concentrations and litter size in sows. Theriogenology. 49 (4). p. 813-822.

Whitaker, M. J., Patel, R. 1990. Calcium and cell cycle control. Development. 108. p. 525-542.

White, Y. A., Woods, D. C., Takai, Y., Ishihara, O., Seki, H., Tilly, J. L. 2012. Oocyte formation by mitotically active germ cells purified from ovaries of reproductive-age women. Nature medicine. 18 (3). p. 413–421.

Williams, C. J. 2002. Signalling machanism of mammalian oocyte activation. Human Reproduction Update. 8 (4). p. 313-321.

Williams, C. R., Gooch, J. L. 2012. Calcineurin inhibitors and immunosuppression – a tale of two isoforms. Expert Reviews in Molecular Medicine. 14 (e14). p. 1-10.

Wu, G. M., Sun, Q. Y., Mao, J. D., Lai, L., McCauley, T. C., Park, K. W., Prather, R.S., Didion, B. A., Day, B. N. 2002. High developmental competence of pig oocytes after meiotic inhibition with a specific M-phase promoting factor kinase inhibitor, butyrolactone I. Biology of Reproduction. 67. p. 170-177.

Xu, Z., Abbott, A., Kopf, G. S., Schultz, R. M., 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(4). p. 743-750.

Xu, Z., Lefeyre, L., Ducibella, T., Schultz, R. M., Kopf, G. S. 1996. Effects of calcium-BAPTA buffers and the calmodulin antagonist W7 on mouse egg activation. Developmental Biology. 180. p. 594-604.

Yakel, J. L. 1997. Calcineurin regulation of synaptic function: from ion channels to transmitter release and gene transcription. Trends in pharmacological sciences. 18 (4). p. 124-134.

Yamamoto, T.M., Blake-Hodek, K., Williams, B.C., Lewellyn, A.L., Goldberg, M.L., Maller, J.L. 2011. Regulation of Greatwall kinase during Xenopus oocyte maturation. Molecular Biology of the Cell. 22. p. 2157–2164.

Yamamuro, T., Kano, K., & Naito, K. 2008. Functions of FZR1 and CDC20, activators of the anaphase-promoting complex, during meiotic maturation of swine oocytes. Biology of reproduction. 79(6). p. 1202-1209.

Yamashita, M. 2000. Toward modeling of a general mechanism of MPF formation during oocyte maturation in vertebrates. Zoological Science. 17. p. 841-851.

Yamashita, M., Katsumata, M., Iwashima, M., Kimura, M., Shimizu, C., Kamata, T., Nakayama, T. 2000. T cell receptor–induced calcineurin activation regulates T helper type 2 cell development by modifying the interleukin 4 receptor signaling complex. The Journal of experimental medicine. 191 (11). p. 1869–1880.

Yamauchi, J., Miyazaki, T., Iwasaki, S., Kishi, I., Kuroshima, M., Tei C., Yoshimura, Y. 1997. Effects of nitric oxide on ovulation and ovarian steroidogenesis and prostaglandin production in the rabbit. Endocrinology. 138 (9). p. 3630–3637.

Yanagimachi, R. 1981. Mechanism of fertilisation in mammals In: Fertilisation and embryonic development in vitro. Eds. Mastroianni L. a Biggers J. D., Plenum Press. New York. p. 81–182.

Yanagimachi, R. 1994. Mammalian fertilisation. The Physiology of Reproduction, eds. Knobil E. et Neil J., second edition, Raven Press. New York. p. 189–280.

Yang, S.A., Klee, C.B. 2000. Low affinity Ca2+-binding sites of calcineurin B mediate conformational changes in calcineurin A. Biochemistry. 39. p. 16147–16154.

Ye, J., Flint, A. P. F., Luck, M. R., Campbell, K. H. S. 2003. Independent activation of MAP kinase and MPF during the initiation of meiotic maturation in pig oocytes. Reproduction. 2003. 125. p. 645–656.

Yue, C., White, K. L., Reed, W. A., Bunch, T. D. 1995. The existence of inositol 1, 4, 5-trisphosphate and ryanodine receptors in mature bovine oocytes. Development. 121 (8). p. 2645–2654.

Yue, C., White, K. L., Reed, W. A.,King, E. 1998. Localization and regulation of ryanodine receptor in bovine oocytes. Biology of Reproduction. 58(2). p. 608-614.

Yue, C.P., White, K.L., Reed, W.A., Bunch, T.D. 1995. The existence of inositol 1,4,5-triphosphate and ryanodine receptors in mature bovine oocytes. Development. 121. p. 2645–2654.

Zernicka-Goetz, M. 1991. Spontaneous and induced activation of rat oocytes. Molecular Reproduction and Development. 28. p. 169–176.

Zernicka-Goetz, M., Ciemerych, M.A., Kubiak, J.Z., Tarkowski, A.K., Maro, B. 1995. Cytostatic factor inactivation is induced by calcium-dependent mechanism present until the second cell cycle in fertilized but not in parthenogenetically activated mouse eggs. Journal of Cell Science. 108. p. 469–474.

Zhang, X., Khimji, I., Shao, L., Safaee, H., Desai, K., Keles, H. O., Demirci, U. 2012. Nanoliter droplet vitrification for oocyte cryopreservation. Nanomedicine. 7 (4). p. 553–564.

Zhao, Y., Haccard, O., Wang, R., Yu, J., Kuang, J., Jessus, C., Goldberg, M.L. 2008. Roles of Greatwall kinase in the regulation of cdc25 phosphatase. Molecular Biology of the Cell. 19. p. 1317–1327.