

Česká zemědělská univerzita v Praze

Fakulta agrobiologie, potravinových a přírodních zdrojů

Katedra veterinárních disciplín

Vliv inhibice kalcineurinu na exocytózu kortikálních granul během aktivace oocyту prasete

Diplomová práce

Autor práce: Bc. Lucie Svobodová

Vedoucí práce: Ing. Lenka Tůmová, Ph.D.

© 2014 ČZU v Praze

Čestné prohlášení

Prohlašuji, že svou diplomovou práci "Vliv inhibice kalcineurinu na exocytózu kortikálních granul během aktivace oocyту prasete" jsem vypracovala samostatně pod vedením vedoucího diplomové práce a s použitím odborné literatury a dalších informačních zdrojů, které jsou citovány v práci a uvedeny v seznamu literatury na konci práce. Jako autorka uvedené diplomové práce dále prohlašuji, že jsem v souvislosti s jejím vytvořením neporušila autorská práva třetích osob.

V Praze dne 10. 4. 2014

Bc. Lucie Svobodová

Poděkování

Ráda bych touto cestou poděkovala Ing. Lence Tůmové, Ph.D. za cenné rady a pomoc při vzniku této práce a také své rodině a příteli za podporu během celého studia.

Vliv inhibice kalcineurinu na exocytózu kortikálních granul během aktivace oocyty prasete

Souhrn

Aktivace savčích oocytů je složitý a zatím ne zcela objasněný děj, který zahrnuje kortikální reakci a dokončení meiózy. Kortikální reakce, při níž dochází k exocytóze kortikálních granul, je společně s nízkým počtem spermií ve vejcovodu mechanismem, který brání polyspermii při oplození savčích oocytů. Obsah kortikálních granul (CG) způsobí modifikaci *zona pellucida*, čímž se znemožní proniknutí další spermie do oocyty.

Kortikální reakce je kalcium dependentní děj. Zvýšení hladiny cytoplazmatického vápníku je zprostředkováno přes fosfatidylinositol-4,5-bisfosfátovou (PIP_2) kaskádu, která je aktivována specifickou fosfolipázou C zeta ze spermie nebo umělými stimuly, kterými mohou být například kalcium ionofor či donory oxidu dusnatého. Inositol-1,4,5-trifosfát (IP_3), který vzniká štěpením PIP_2 , se váže na IP_3 receptory endoplazmatického retikula, což uvolní zásoby Ca^{2+} do cytoplazmy oocyty. Vápník se váže na protein kalmodulin, který zprostředkovává jeho regulační působení. Mezi Ca^{2+} /kalmodulin dependentní proteiny patří i serin/treonin protein fosfatáza 2B, kalcineurin. Role kalcineurinu při aktivaci oocyty, konkrétně při výstupu oocyty z druhého meiotického bloku, byla prokázána u mouchy rodu *Drosophila* a žáby rodu *Xenopus*. Jeho přítomnost byla prokázána i v oocytech prasete během růstu a zrání, a to s nejvyšším výskytem v kůře a cytoplazmě. Lze proto usuzovat na možnou roli kalcineurinu v regulaci procesů spojených s aktivací savčího oocyty.

Cílem této práce bylo zjistit, zda je kalcineurin zapojen do procesu exocytózy CG v oocyty prasete. Hypotéza byla ověřována na základě použití inhibitoru kalcineurinu během aktivace oocyty prasete a následné lokalizaci CG v oocyty. Zatímco u většiny partenogeneticky aktivovaných oocytů nebyla CG zaznamenána, u oocytů ošetřených před partenogenetickou aktivací cyklosporinem A (CsA) byla CG pozorována. Na základě sumy jasů CG byla stanovena míra kortikální reakce. U 83,9 % aktivovaných oocytů nastala kompletní exocytóza CG, narozdíl od oocytů ošetřených před aktivací CsA, u nichž došlo ke kompletní kortikální reakci pouze u 2,6 %. Inhibice kalcineurinu během aktivace oocyty tedy prokazatelně vede ke snížení úrovně kortikální reakce. Lze se tedy domnívat, že je kalcineurin zapojen do procesu exocytózy CG během aktivace savčího oocyty.

Klíčová slova: kalcineurin, oocyt, exocytóza kortikálních granul, aktivace, prase

The effect of calcineurin inhibition on the cortical granule exocytosis during pig oocyte activation

Summary

Activation of mammalian oocytes is complicated and not yet fully understood process involving cortical reaction and completion of meiosis. Cortical reaction or cortical granule exocytosis (CGE) cause modification of *zona pellucida* and prevents the further sperm penetration into the oocyte. Together with low sperm concentration in the oviduct is a mechanism, which prevents polyspermy during fertilization of mammalian oocytes.

The cortical reaction is a calcium-dependent process. Elevation of intracellular calcium is mediated through phosphatidylinositol-4,5-bisphosphate (PIP₂) cascade activated by specific phospholipase C zeta of sperm or artificial stimuli as a calcium ionophore or nitric oxide donors. Inositol-1,4,5-triphosphate (IP₃), which is generated by fission of PIP₂, binds to IP₃ receptors of the endoplasmic reticulum and reserve of intracellular Ca²⁺ is released into the cytoplasm of the oocyte. Calcium binds to calmodulin, which mediates the regulatory effects of calcium. The serine/threonine protein phosphatase 2B, calcineurin, belongs to the Ca²⁺/calmodulin-dependent proteins. The role of calcineurin in the oocyte activation, namely, the exit from metaphase II, has been demonstrated in *Drosophila* fly and *Xenopus* frog. Its presence has been also demonstrated in porcine oocytes during growth and maturation with the highest incidence in the cortex and cytoplasm.

The aim of this study was to determine the calcineurin involvement into CGE during porcine oocyte activation. The hypothesis was verified based on the use of calcineurin inhibitor during porcine oocyte activation and subsequent CG localization in the oocyte. Whereas the CGs had not been recorded in the most parthenogenetic activated oocytes; in the oocytes treated by cyclosporine A (CsA) before activation, the CGs had been observed. The degree of CGE was evaluated based on suma of CG brightness. In the CsA-treated and parthenogenetic activated oocytes, complete exocytosis had been occurred at 2.6 %, while in the oocytes without CsA treatment at 83.9 %. During the oocyte activation, the calcineurin inhibition leads to decrease a level of cortical reaction. Therefore, it can be assumed that calcineurin is involved into the process of CGE during mammalian oocyte activation.

Keywords: calcineurin, oocyte, cortical granule exocytosis, activation, pig

Obsah

1	Úvod	1
2	Cíl práce.....	2
3	Literární rešerše	3
3.1	Oogeneze.....	3
3.1.1	Oogeneze a folikulogeneze	3
3.1.2.	Růst oocyty.....	6
3.1.3	Zrání oocytů	8
3.1.4	Aktivace oocyty.....	12
3.1.5	Kortikální reakce	16
3.2	Kalcineurin	19
3.2.1	Struktura kalcineurinu	19
3.2.2	Substrátová specifita kalcineurinu.....	21
3.2.3	Regulace a inhibice kalcineurinu	22
3.2.4	Fyziologické funkce kalcineurinu	24
4	Materiál a metody.....	29
4.1	Materiál	29
4.1.1	Získávání vaječníků.....	29
4.1.2	Získávání oocytů s ukončeným růstem	29
4.1.3	Kultivační médium pro <i>in vitro</i> zrání prasečích oocytů	29
4.2	Metody	30
4.2.1	<i>In vitro</i> kultivace oocytů.....	30
4.2.2	Kultivace oocytů s cyklosporinem A.....	31
4.2.3	Partenogenetická aktivace oocytů	31
4.2.4	Vizualizace kortikálních granul.....	31
4.2.5	Vyhodnocení experimentu.....	31
4.2.6	Experimentální schéma	32
5	Výsledky.....	34
6	Diskuze	37
7	Závěr	40

8	Seznam literatury	41
9	Seznam zkratek a symbolů	47
10	Seznam obrázků	49
11	Seznam tabulek	50

1 Úvod

V chovech hospodářských zvířat zásadně vzrostl význam reprodukčních biotechnologií, které jsou nutností pro další pokrok v této oblasti. Biotechnologie mají mezioborový charakter a nezbytné k jejich zvládnutí je dokonale porozumět teorii na každé úrovni. Tyto programy se rovněž uplatňují v chovech prasat za účelem optimalizace genetického základu, zisku specifických vlastností, pro biomedicínské účely nebo tvorby klonů s vysokou plemennou hodnotou či zachování genetické diverzity. Navíc pohlavní buňky prasat jsou vhodným materiálem pro studium základní biologie gamet.

Pro využití oocytů v biotechnologiích je klíčová znalost mechanismů regulujících meiotické zrání a aktivaci oocytů na molekulární úrovni. Tyto děje jsou mimo jiné charakteristické výskytem změn fosforylace proteinů, na nichž se podílejí různé kinázy a fosfatázy. Jednou z fosfatáz podílejících se na regulaci oogeneze savců je pravděpodobně i fosfatáza 2B neboli kalcineurin.

Přítomnost fosfatázy kalcineurinu v oocytech se podařilo prokázat u mouchy rodu *Drosophila* a žáby rodu *Xenopus*, u nichž byl doložen význam kalcineurinu při výstupu oocytů z metafáze II. U savců byla prokázána exprese tohoto proteinu v oocytech prasete. Lze tedy předpokládat zapojení této fosfatázy do regulace procesů během aktivace savčích oocytů. Cílem této práce je zjistit, zda se kalcineurin podílí během aktivace oocytu prasete na exocytóze kortikálních granul.

2 Cíl práce

Fosfatáza 2B, kalcineurin, je zapojena do exocytózy kortikálních granul během aktivace prasečího oocyty. Cílem této práce je ověřit tuto hypotézu na základě použití inhibitoru kalcineurinu během aktivace oocyty prasete a následné lokalizaci kortikálních granul v oocyty.

3 Literární rešerše

3.1 Oogeneze

3.1.1 Oogeneze a folikulogeneze

Oogeneze a folikulogeneze jsou druhově specifické procesy, ačkoli některé děje jsou společné pro všechny savce. Podobně mechanismy, kterými se reguluje proces oplození má řadu vlastností, které jsou společné pro všechny druhy savců (Kempisty *et al.*, 2011). U savců obecně oogeneze začíná poměrně brzy a končí o několik měsíců až let později u pohlavně dospělých jedinců (Wassarman a Albertini, 1994). U prasat jsou například podle Bielanska-Osuchowska (2006) první primordiální zárodečné buňky zřetelné již 24. den po koitu a 56. den se formují první folikuly.

Vajíčka tedy pocházejí z malého počtu kmenových buněk, které se nazývají primordiální zárodečné buňky (PGC, primordial germ cells) a jsou prvními buňkami budoucího vaječníku. PGC mají původ mimo vaječníky. Jejich tvorba začíná v presomitovém embryonálním období. Například u 8 denních myších embryí se čtyřmi páry somitů lze pozorovat 15 – 100 PGC. Jsou dobře rozpoznatelné díky jejich velikosti, výrazné morfologii a charakteristické barvitelnosti (Wassarman a Albertini, 1994). Mají jádro excentricky uložené a obsahují jemný granulovitý chromatin rozptýlený v nukleoplazmě, kde se objevuje jedno nebo dvě velká jádérka (Guraya, 2008). Podle řady důkazů se lze domnívat, že PGC mají svůj původ v embryonálním základu allantois a v kaudální oblasti primitivního proužku (Wassarman a Albertini, 1994). Ginsburg *et al.* (1990) dokázali přítomnost PGC ještě před vznikem allantois ve spodní části žloutkového váčku. Z této oblasti poté PGC migrují nejprve pasivním přenosem do entodermálního epitelu prvostřeva a poté améboidním pohybem do genitální lišty. Poté co se PGC ustálí ve vyvíjejícím se vaječníku, ztrácejí svou schopnost migrace a jsou označovány jako oogonie (Picton *et al.*, 1998). Hlavními vnějšími faktory pro rozvoj prekurzorů PGC jsou zřejmě členové proteinové rodiny kostních morfogenetických proteinů (BMP, bone morphogenetic proteins) (Edson *et al.*, 2009). Zdá se, že migrace PGC funguje na základě chemotaxe. Celý tento proces je shodný u samic i samců až do doby než se diferencují gonády na vaječníky či varlata (Wassarman a Albertini, 1994).

Poté co se PGC diferencují v samičí zárodečné buňky, začnou se tyto mitoticky dělit a označují se jako oogonie. Už od 13. dne embryonálního života prasete lze na zárodečných buňkách pozorovat hojné mitotické dělení až do 7 dní po porodu. Počet buněk se zvyšuje z

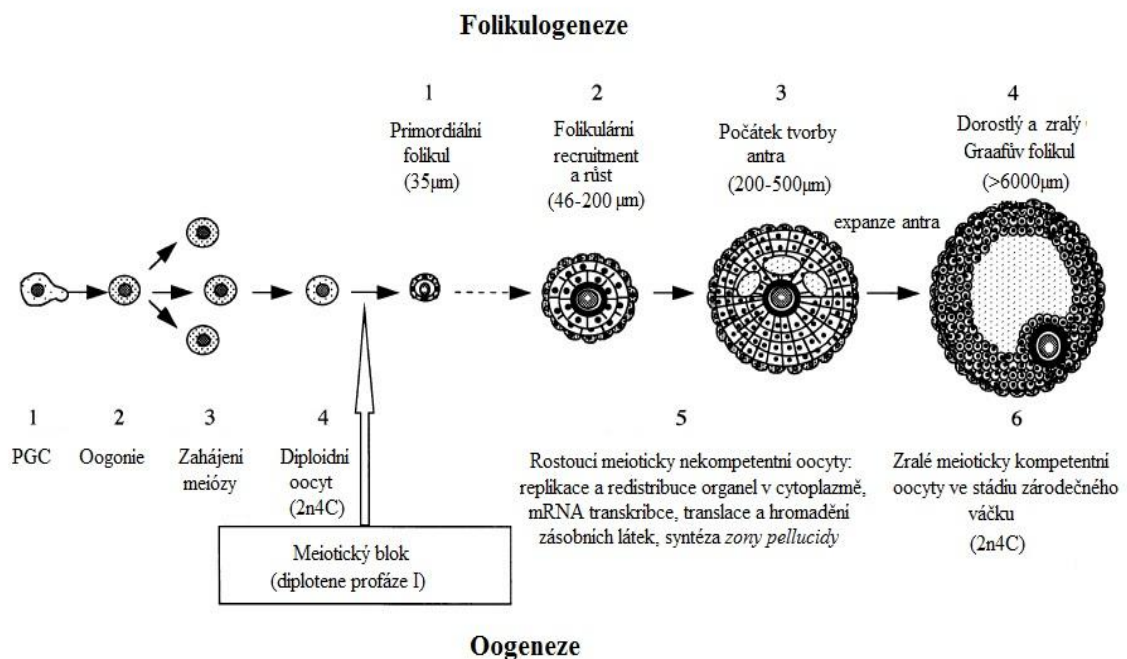
5000 ve 20. dni po spáření na 1 100 000 v 50 dnech po spáření. Aktivně mitoticky se dělicí oogonie vykazují charakteristické morfologické znaky, především intracelulární mosty, které spojují sousední zárodečné buňky (Wassarman a Albertini, 1994). Intracelulární můstky mezi buňkami vznikají nedokonalou cytokinezí při mitózách, takže dceřiné buňky zůstávají částečně spojené s mateřskými a vytvářejí spolu shluky (Edson *et al.*, 2009). Každá skupinka sousedních buněk vzniká z jediné oogonie (Vacek, 2006). Když mitotická aktivita ustává, některé z buněk nekrotizují a jiné vstoupí do meiózy (Black a Erickson, 1968). Buňky, které již do meiózy vstoupily, se označují jako oocyty (Edson *et al.*, 2009).

Pro zahájení folikulogeneze jsou nezbytné autokrinní, parakrinní, juxtakrinní i endokrinní podněty. Folikuly obsahují kromě oocytu i somatické buňky, které se derivují z buněk coelomového epitelu. Tyto buňky se označují jako folikulární nebo také granulózní, mají podpůrnou funkci a produkují pohlavní hormony steroidní povahy. Další typ somatických buněk folikulu jsou thekální buňky. Ty zásobují granulózní buňky prekurzory hormonů a přímo či nepřímo se podílejí na vývoji a fyziologii oocytů (Edson *et al.*, 2009). V prvním kroku folikulogeneze začnou pregranulózní buňky obklopotovat oogonie, které jsou ve shlucích propojeny intracelulárními můstky. Jakmile jsou obklopeny první vrstvou těchto dlaždicových buněk, cytoplazmatické můstky zanikají, oogonie zahajují replikaci a vstupují do meiózy. Tímto vzniká folikul, který se označuje jako primordiální a z oogonií se stává primární oocyt (Bielanska-Osuchowska, 2006). Somatické buňky nejsou v primordiálním folikulu endokrinně aktivní a ani FSH receptory nejsou exprimovány až do doby zahájení růstu folikulů (Oktay *et al.*, 1997). První primordiální folikuly jsou utvořeny shodně se zastavením meiozy v diplotene profáze I (Smitz a Cortvrindt, 2002). Folikuly zůstanou v primordiálním stádiu až do doby než tato konkrétní skupina folikulů začne růst, což může být u člověka o 1 – 5 desetiletí později (Picton *et al.*, 1998).

Při meióze prochází oocyty stádiu leptotene, zygotene a pachytene a zastavují dělení až do puberty v diplotenne meiotické profáze I, jinak též v prvním meiotickém bloku (Picton *et al.*, 1998). Během této dlouhé profáze probíhá intenzivní syntéza všech typů RNA, proteinů a dalších látek nezbytných pro nejranější vývoj po oplození, které se hromadí v cytoplazmě oocytu (Vacek, 2006). Diplotenní oocyty jsou větší než oogonie, mají více organel a hlavně chromozómy již prošly genetickou rekombinací. Pokud jde o buněčný cyklus, rostoucí oocyt se nachází ve stavu ekvivalentnímu G2 fázi u mitózy, protože před zahájením meiózy došlo k replikaci DNA (Picton *et al.*, 1998). Wassarman a Albertini (1994) uvádějí, že meiózu pravděpodobně indukuje faktor pocházející z *rete ovarii*, nebo jednoduše kontakt s ním.

Meióza začíná u prasete 40. den embryogeneze s tím, že již 50. den jsou některé oocyty ve stádiu diplotene. Ve 20 dnech po porodu bylo v diplotenním stádiu již 99 % oocytů. Tato populace čítá přibližně 500 000 primordiálních folikulů při narození (Black a Erickson, 1968). Do nedávna byla u savců uznávána tzv. Zukermanova (1951) základní biologická doktrína o tom, že v průběhu života samice již nedochází ke zvýšení počtu primárních oocytů. Mají tedy jen ty, které byly vytvořeny při tvorbě vaječníku před narozením. Johnson *et al.* (2004) však provedli studii, která toto dogma popírá. Tým provedl kultivaci z povrchového epitelu dospělých myších vaječníků a objevil mitoticky aktivní zárodečné buňky, které jsou schopny se diferencovat v oocyty. Ty jsou zřejmě, vzhledem k množství zanikajících oocytů, nutné k obnově populace folikulů. Znamenalo by to tedy, že i dospělým samicím se ve vaječnicích tv-

Obrázek 1: Oogeneze a folikulogeneze.



Stádia savčí oogeneze a folikulogeneze od prvních PGC až ke zralým oocytům ve stádiu zárodečného váčku v Graafově folikulu. Na obrázku jsou uvedeny folikulární průměry a obsah chromozómů (n) a DNA (C) v oocytu. (Převzato z: Picton, H., Briggs, D., Gosden, R. 1998. The molecular basis of oocyte growth and development. Molecular and Cellular Endocrinology, 145, 27 – 37).

oří nové oocyty a jejich počet po narození není konečný (Johnson *et al.*, 2004). O rok později svou teorii podpořili pokusem, při kterém propojili krevní oběhy dvou myších samic. Jedna z nich nesla v buňkách gen pro produkci zeleně fluoreskujícího proteinu a druhá nikoliv. Po čase se u druhé myši objevily oocyty s expresí tohoto zeleně svítícího proteinu. Zdrojem zárodečných buněk myši může tedy zřejmě být i extragonadální tkáň jako je kostní dřeň a krevní buňky (Johnson *et al.*, 2005). Tato hypotéza vyvolala mnoho zájmu a diskuzí a našla si své obhájce i odpůrce. Podpořil ji například Kerr *et al.* (2006), kteří kvantifikovali všechny zdravé folikuly myši od prvního do dvoustého dne pomocí stereologické analýzy, imunocytochemického barvení a elektronové mikroskopie. V průběhu experimentu došlo k výraznému poklesu značených oocytů, ale byly postupně nahrazovány oocyty bez imunologického značení. Jejich výsledky ovšem ohodnotil Faddy a Gosden (2007) jako příklad společného nepochopení povahy statistického závěru.

3.1.2. Růst oocytu

Na zastavení meiózy v diplotenním stádiu navazují dva procesy, zaprvé shlukování primordiálních folikulů a zadruhé nábor vybrané populace primordiálních folikulů k růstu (Skinner, 2005). V průběhu reprodukčního života savců obsahují vaječníky zároveň skupiny nerostoucích i rostoucích oocytů, zastavených v diplotene první meiotické profáze, přičemž pouze plně dorostlé oocyty mohou pokračovat v meióze a ovulovat během každého estrálního cyklu (Wassarman a Albertini, 1994). V růstové fázi se prasečí oocyt zvětší v průměru asi z 30 μm na 120 μm a růst je téměř dokončen (115 μm) ve folikulu o průměru 1,8 mm (Motlík a Fulka, 1986). Oocyt je uzavřen ve folikulu, který z počátku představoval jednu vrstvu dlaždicových buněk, ty se začínají přeměňovat v kubické buňky a jejich počet narůstá. Když je vrstev granulózy více, začínají se u jejich bazální membrány objevovat první thekální buňky. Později velikost oocytu zůstává konstantní, zatímco folikulární buňky podstupují rychlé dělení, zvýší svůj počet na více než 50 000 buněk (u myši) a folikul vykazuje náznak počínajícího antra (Wassarman a Albertini, 1994). Antrální fáze je charakteristická vytvořením dutiny vyplněné folikulární tekutinou, která se začne tvořit, když folikul dosáhne určité velikosti a určitého počtu granulózních buněk (Boland *et al.*, 1994). Zvětšováním antra je oocyt vytlačen ze středu folikulu na periferii a je obklopen dvěma či více vrstvami granulózních buněk, které jsou označovány jako *corona radiata*. Tyto buňky tvoří specializované mezibuněčné spoje gap junctions s oolemou (Wassarman a Albertini, 1994). Interakce somatických buněk a oocytů přes gap junctions jsou nezbytné pro zajištění přenosu

látek a podmínek pro energetický metabolismus, a tím i pro růst oocyty. Somatické buňky kromě dodávání nukleosidů, aminokyselin a fosfolipidů udržují iontovou rovnováhu a stabilní množství mRNA ve zrajícím oocyty. Rychlost růstu oocytů je přímo úměrná počtu granulózních buněk (Herlands a Schultz, 1984). Granulózní buňky účinně zvětšují plochu oocyty, protože poměr povrchu k objemu vajíčka se zvyšuje a tím i rychlost vstřebávání malých molekul rozhodující pro růst a vývoj se rovněž zvýší. Kromě těchto interakcí zprostředkovaných pomocí gap junctions, regulují rozvoj oocytů parakrinní signály z buněk granulózy. Oocyty zbavené vrstvy granulózních buněk nemohou růst (Cecconi *et al.*, 1996).

Ve chvíli kdy začne folikul růst, se označuje jako primární, jakmile je obklopen více než jednou vrstvou granulózních buněk, říká se mu sekundární. Folikuly s antrem jsou někdy označovány jako terciální, dobře vyvinuté terciální mnohvrstevnaté folikuly s antrem a oocytem v *corona radiata* jsou označovány jako Graafovy či preovulační (Eppig, 2001).

Hlavní metabolickou aktivitou oocyty během růstové fáze je syntéza *zony pellucidy* (ZP), což je relativně silný extracelulární glykoproteinový obal, který obklopuje všechna savčí vajíčka. Vytvořením ZP zároveň vzniká mezi membránou oocyty a ZP prostor, který je označován jako perivitellinní. ZP obsahuje receptory pro navázání spermií, které zprostředkovávají interakci obou gamet při oplození a také se podílí na zabránění polyspermie (Wassarman a Albertini, 1994). ZP se skládá ze tří hlavních glykoproteinů, obvykle dvou opakujících se jednotek ZP2 a ZP3, které jsou zpevněny ZP1 (Wassarman, 1999). Heterodimery ZP2 a ZP3 fungují jako primární a sekundární receptory spermií (Sun a Nagai, 2003). Během růstu oocyty se rovněž tvoří kortikální granula, což jsou malé kulaté na membránu se vážající organely (Wassarman a Albertini, 1994). Vznikají v rané fázi růstu folikulu z Golgiho aparátu, po jeho hypertrofii a proliferaci (Liu, 2011). O jejich funkci se pojednává v kapitole 3.1.5.

Důležitým intraovariálním faktorem při regulaci folikulogeneze je kit ligand (KL), produkovaný granulózními buňkami a jeho receptor c-kit, produkovaný thekálními buňkami. KL má přímou úlohu ve zprostředkování přechodu z primordiálního do primárního folikulu. V reakci na stimulaci KL oocyty produkují růstový diferenciační faktor 9 (GDF-9, growth differentiation factor 9), (Blanco *et al.*, 2011), který je produkován oocyty všech savců. Pokud nedochází k jeho expresi, selhává vývoj somatických buněk folikulu a oocyt roste zvýšenou rychlostí a jeho morfologie je abnormální (Eppig, 2001). Mimo GDF-9 produkují oocyty po stimulaci KL základní růstový faktor fibroblastů (bFGF, basic fibroblast growth factor), kostní morfogenetický protein 15 (BMP-15, bone morphogenetic protein 15) a thekální buňky

produkují keratinocytový růstový faktor (KGF, keratinocyte growth factor) a hepatocytový růstový faktor (HGF, hepatocyte growth factor), které mají řadu regulačních vlivů v rámci rostoucího folikulu (Blanco *et al.*, 2011). Dalším regulátorem růstu je anti-Mülleriánský hormon (AMH, anti-Müllerian hormone). AMH je tvořen granulózními buňkami folikulů, nejvíce preantrálními a malými antrálními folikuly do velikosti 4 mm. Vysoká koncentrace AMH inhibuje stimulaci růstu těchto folikulů folikulostimulačním hormonem a dále inhibuje na FSH nezávislý výběr primordiálního folikulu. Pokud by AMH během folikulogeneze chyběl, docházelo by k neustálé přeměně folikulů na zralé a množství folikulů by se předčasně vyčerpalo (Visser *et al.*, 2006).

3.1.3 Zrání oocytů

Zrání oocytů zahrnuje změnu plně dorostlého oocytu, nacházejícího se v diplotene profáze prvního meiotického dělení, na preovulační oocyt, který je v metafázi druhého meiotického dělení a prodělal řadu metabolických změn, nezbytných pro aktivaci oocytu při oplození (Wassarman a Albertini, 1994). Prasečí folikuly menší než 0,7 mm v průměru obsahují oocyty neschopné znovuzahájit meiózu a jen některé oocyty z folikulů mezi 0,8 a 1,6 mm jsou schopny zrání *in vitro*. Meioticky kompetentní folikuly dosahují velikosti kolem 3 mm (Motlík *et al.*, 1984). Během puberty samic získávají plně dorostlé folikuly uvnitř ovárií schopnost reagovat na stimulaci hypofyzárními gonadotropiny, které jsou podnětem pro zahájení zrání. Díky tomu se každý estrální cyklus může vyvinout před ovulací, podle druhu, jedno či několik zralých vajíček. Preovulační nárůst luteinizačního hormonu (LH) iniciuje znovuzahájení meiozy z prvního meiotického bloku (Brackett, 1985). LH vlna způsobí inhibici látek označovaných jako inhibitory zrání oocytů (OMI, oocyte maturation inhibitors) a aktivují se cykliny, fosfatázy a kinázy, které umožní znovuzahájení jaderného zrání (Hunter, 2000). Jelikož však nebyly u oocytů detekovány žádné LH receptory, je pravděpodobné, že signál vedoucí ke zrání oocytu přechází do oocytu z okolních folikulárních buněk, které tyto receptory mají. Přestup molekul LH je možný přes gap junction spoje mezi buňkami. Je dobře známo, že folikuly reagují na LH posunem produkce steroidů z převážně estrogenového do progesteronového prostředí a tvorbou hyaluronanu buňkami *cumulus oophorus*, což má za následek jeho rozvolňování, zvětšování objemu a přerušení gap junction spojů mezi oocytem a kumulem, což znamená vymizení vysoce koordinované obousměrné komunikace mezi

oocytem a okolními somatickými buňkami, tento jev je označován jako kumulární expanze (Hurk a Zhao, 2005).

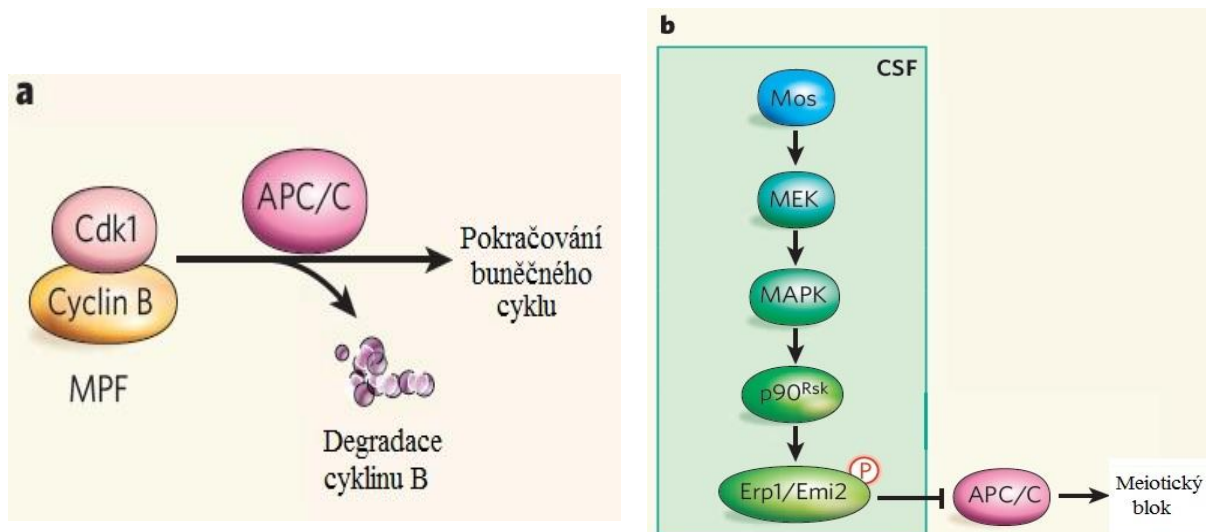
Proces zrání oocyty je obvykle popisován změnami morfologie chromozómů. Před znovuzahájením zrání obsahuje oocyt velké jádro, označované jako zárodečný váček (GV, germinal vesicle) s velkým jadérkem. Chromozómy jsou v GV dekonzenzovány a transkripčně aktivní. Se zráním chromozómy kondenzují, transkripční aktivita ustává, GV se začíná rozpadat (GVBD, germinal vesicle break down) a jaderná membrána i jadérko se rozptýlí. Tato fáze zrání se nazývá diakineze. S pokračujícím zráním se spárované homologní chromozómy seřadí v ekvatoriální rovině v první metafázi meiotického dělení (MI), projdou anafází I, telofází I a následuje vydělení prvního pólóvého tělíska. Prasečí oocyty v MI nemohou pokračovat ve zrání do druhé metafáze meiotického dělení (MII) dokud nedosáhnou vnitřního průměru okolo 110 μm . Tůmová *et al.* (2013) ověřili, že meiotická kompetence prasečích oocytů se liší na základě vnitřního průměru oocytů. Skupiny oocytů s vnitřním průměrem od 80 do 89 μm a 90 – 99 μm byly zcela meioticky nekompetentní. Skupiny oocytů s vnitřním průměrem 100 až 110 μm obsahovaly oocyty s pouze částečně vyvinutou meiotickou kompetencí. Tyto oocyty jsou schopny podstoupit GVBD a dosáhnout MI, nicméně nejsou schopny fázi MI opustit, dostat se do MII a dokončit tak meiotické zrání. Oocyty s vnitřním průměrem 120 μm byly plně meioticky kompetentní a po 48 hodinách *in vitro* inkubace většina dosáhla stádia MII (Tůmová *et al.*, 2013). V MII se chromozómy, které zůstaly v oocyty, podruhé seřadí v ekvatoriální rovině v metafázní figuře a meióza se opět zastaví až do doby penetrace vajíčka spermií, po které se i tentokrát vydělí polovina genetické informace do druhého pólóvého tělíska (Sedmíková *et al.*, 2003; Voronina a Wessel, 2003), ovšem bez předchozí replikace DNA. Jaderné zrání trvá u prasete 44 hodin, tato doba je druhově odlišná. Oocyt podstupuje řadu výrazných změn nejen v jádře, ale také ve své cytoplazmě. Ooplazmatické zrání je nutné k získání vlastností oocyty, které blokují polyspermii, které jsou nutné k dekonzenzaci penetrované spermie a k vytvoření prvojádra po oplození a zahrnuje redistribuci buněčných organel, migraci mitochondrií do perinukleární oblasti a akumulaci kortikálních granul podél oolemy (Hurk a Zhao, 2005). Chromozómy v postavení metafáze II se nacházejí v kortikální oblasti cytoplazmy. Cytoplazma oocyty obsahuje rozptýlené mitochondrie a komplexy váček hladkého endoplazmatického retikula, jiné typy buněčných organel jsou přítomny jen v malém množství. Lysozomy se vyskytují v podobě složených agregátů, Golgiho aparát a granula endoplazmatického retikula a jsou přítomny také jen omezeně. V korové oblasti cytoplazmy jsou rozložena kortikální granula.

Mezi buněčnou membránou oocyty a vnitřním povrchem *zona pellucida* se vytvoří zřetelný periviteliní prostor, který dosahuje šířky 3 – 5 μm a obsahuje vločkovitý materiál. Na povrchu oocyty jsou početné mikrokly. Kontakty oocyty s výběžky buněk *corona radiata* pronikajícími skrze *zona pellucida*, charakteristické pro nezralé oocyty ve stadiu zárodečného vajíčku v důsledku kumulární expanze zcela vymizely (Sathananthan *et al.*, 1986).

Přes rozdíly mezi jednotlivými druhy jsou základní molekulární mechanismy upravující proces zrání oocyty v reakci na LH shodné, např. některé regulační dráhy, jako jsou změny fosforylace proteinů, cyklického adenosin monofosfátu (cAMP) a hladiny vápníku. Je známo, že na komplexní kaskádě fosforylací a defosforylací podílejících se na regulaci obnovení meiózy a tedy zahájení zrání je zodpovědný protein zvaný metafázi podporující faktor (MPF, metaphase promoting factor), (Hurk a Zhao, 2005) nebo též cyclin B-p34cdc2. MPF je serin-treoninová protein kináza (Hunter, 2000), heterodimer skládající se z katalytické podjednotky p34cdc2 kinázy a regulační podjednotky cyklinu B1 (Ito a Kashiwazaki, 2012). Kináza p34cdc2 je přítomna v buňce během celého buněčného cyklu, mění se pouze výskyt cyklinu, ten po navázání na kinázu spouští její aktivitu. Fosforylací příslušných proteinů způsobuje tento komplex kondenzaci chromozómů, rozpad jaderné membrány a reorganizaci mikrotubulů cytoskeletu při tvorbě meiotického vřeténka (Alberts *et al.*, 1998). Aktivita MPF je udržována takzvaným cytostatickým faktorem (CSF, cytostatic factor), který se skládá z proteinů Mos a Emi1. Tyto proteiny brání degradaci cyklinu B1 a rozpadu komplexu cyklinu a MPF (Williams, 2002). Aktivita MPF je konstantně nízká ve fázi GV, narůstá během GVBD a vysoká aktivita se udržuje během obou metafází. Dalším regulátorem zrání oocyty je cAMP. Je produkován oocytem i kumulárními buňkami a při ztrátě intercelulární komunikace po kumulární expanzi se jeho přísun k oocyty sníží. Snížení koncentrace cAMP v oocyty vede k deaktivaci na cAMP závislé protein kinázy A (PKA) a tím jsou redukovány inhibitory ovlivňující puriny udržující meiózu v meiotickém bloku (Picton *et al.*, 1998). Mechanismu potřebnému pro snížení cAMP napomáhají i enzymy fosfodiesterázy. Ty hydrolyzují cAMP na AMP, čímž klesá hladina cAMP a může dojít ke znovuzahájení meiózy. Cyklický guanosinmonofosfát (cGMP) dokáže inhibovat tyto fosfodiesterázy a způsobuje tedy naopak zvýšení hladiny cAMP a blokuje zrání oocyty (Edson *et al.*, 2009). Jiné protein kinázy důležité pro regulaci meiotického buněčného cyklu jsou mitogeny aktivované protein kinázy (MAPK). MAPK fosforylují serin a treonin na proteinech, které udržují chromozómy v kondenzovaném stavu během přechodu z první meiózy do druhé a také brání tvorbě buněčného jádra díky fosforylaci jaderné laminy (Williams, 2002). V savcích oocytech se

vyskytují dvě izoformy MAPK, ERK1 (P44) a ERK2 (P42). MAPK jsou aktivovány MEK, specifickou MAP kinázou a ta je řízena Mos specifickou kinázou zárodečných buněk (Whitaker a Larman, 2001). Enzym Mos se vyskytuje pouze během meiózy. Jeho cíly v signální kaskádě jsou MEK, MAPK a p90RSK. Poslední člen kaskády fosforyluje inhibitor anafáze podporujícího komplexu (APC, Anaphase promoting complex), Erp1 (také známý jako Emi2) a tím stabilizují MPF. Celá tato signální kaskáda se souhrnně označuje jako CSF (Jesus a Haccard, 2007). Samotná MAPK má mnoho molekulárních cílů, které jsou umístěny buď v jádře, nebo v cytoplasmě, včetně proteinů cytoskeletu. V průběhu zrání oocytů je MAPK aktivita potřebná pro udržení činnosti MPF, meiotického vřetenka a zastavení oocytu v MII. U žáby *Xenopus laevis* jsou MAPK a MPF aktivovány progesteronem indukovaným poklesem cAMP/PKA. Univerzální signální molekulou účastníci se mnoha důležitých procesů, jako jsou svalové kontrakce, synaptický přenos a oplození je vápníkový iont. Nedávné studie napovídají, že se vápník podílí také na řízení určitých pochodů v cyklu buněčného dělení, jako je rozpad jaderné membrány a separace chromozómů při přechodu od metafáze k anafázi (Whitaker a Larman, 2001). Na uvolněný Ca^{2+} je oocyt maximálně vnímavý v konečné fázi zrání (Guraya, 2008).

Obrázek 2: Události vedoucí k meiotickému bloku.



a) Pro pokračování buněčného cyklu musí APC komplex zprostředkovat degradaci cyklinu B. Cyklin B je udržující součást MPF, jehož trvalá aktivita je zodpovědná za meiotický blok b) U vajíček obratlovců brání předčasnému vývoji buněčného cyklu signální kaskáda Mos-MEK-MAPK-p90Rsk-Erp1/Emi2, která je souhrnně nazývána jako CSF. Konkrétně fosforylovaný

Erp1/Emi2 inhibuje APC, což vede k blokádě meiózy. (Převzato z: Jesus, C., Haccard, O. 2007. Calcium's double punch. Nature, 449 (20), 297 – 298.)

3.1.4 Aktivace oocytu

Po splnutí spermie a oocytu spouští spermie savců řadu událostí, které se dají shrnout pod pojem aktivace oocytu, která zahrnuje i kortikální reakci, inaktivaci cytotatického faktoru, dokončení druhého meiotického dělení, vydělení druhého pólového tělíska a formaci prvojádra (Ito a Kashiwazaki, 2012).

K oplození dochází obvykle v ampuli vejcovodu a spermie na něm se účastníci má již dokončenou kapacitaci. Vajíčko je uzavřeno uvnitř ZP a je obklopeno vrstvami buněk *cumulus oophorus*. Těmito obaly musí spermie proniknout do vajíčka. Kumulus, skládající se z několika tisíc kumulárních buněk spojených komplexem extracelulární matrix, není nezbytný pro interakci gamet, nicméně zřejmě určitým způsobem řídí spermii při pronikání k ZP a také působí jako selektivní bariéra pro morfologicky abnormální spermie a pro ty, u kterých neproběhla řádná akrosomální reakce (Florman a Ducibella, 2006.). ZP je porézní extracelulární matrix vylučovaný rostoucím oocytem. U myši ZP obsahuje tři hlavní sulfátové glykoproteiny: ZP1 (185 – 200 kDa), ZP2 (12 – 140 kDa) a ZP3 (83 kDa). Glykoprotein ZP3 funguje jako primární vazebný receptor pro spermii a vazbou spermie na tento receptor je spuštěna akrosomální reakce. ZP2 funguje jako sekundární receptor spermie a ZP1 funguje jako propojovací článek ZP2 a ZP3 (Nixon *et al.*, 2007). Akrosomální reakce zahrnuje mnohočetné fúze buněčné a zevní membrány akrosomu spermie, při nichž se odhalí vnitřní akrosomální membrána s navázaným obsahem, který tvoří hlavně proteáza akrosin. Když spermie projde přes ZP, splyne buněčná membrána postakrosomálního oddílu hlavičky s buněčnou membránou oocytu a hlavička s krčkem a spojovací částí vejdu do cytoplazmy oocytu. Po průniku spermie proběhne v oocytu kortikální reakce (CR), která zabrání penetraci dalších spermii a téměř shodně s CR oocyt dokončí druhé zrací dělení, při kterém se vydělí druhé pólové tělíska a vznikne vajíčko s haploidním počtem chromozómů. Proces oplození je završen vytvořením samčího prvojádra z hlavičky spermie a samičího prvojádra z mateřské sady chromozómů. Oplozené vajíčko s prvojádry se nazývá zygota a prvojádra jsou přítomna v oplozených vajíčkách až do prvního dělení. V prvojádrech dochází k dekonduzaci chromozómů a jejich replikaci. Zahájení prvního mitotického dělení předchází kondenzace

chromozómů v obou prvojádrech, jejich obaly se rozpadnou a dojde k promíchání chromozómů maternálního a paternálního původu (Čech *et al.*, 2009).

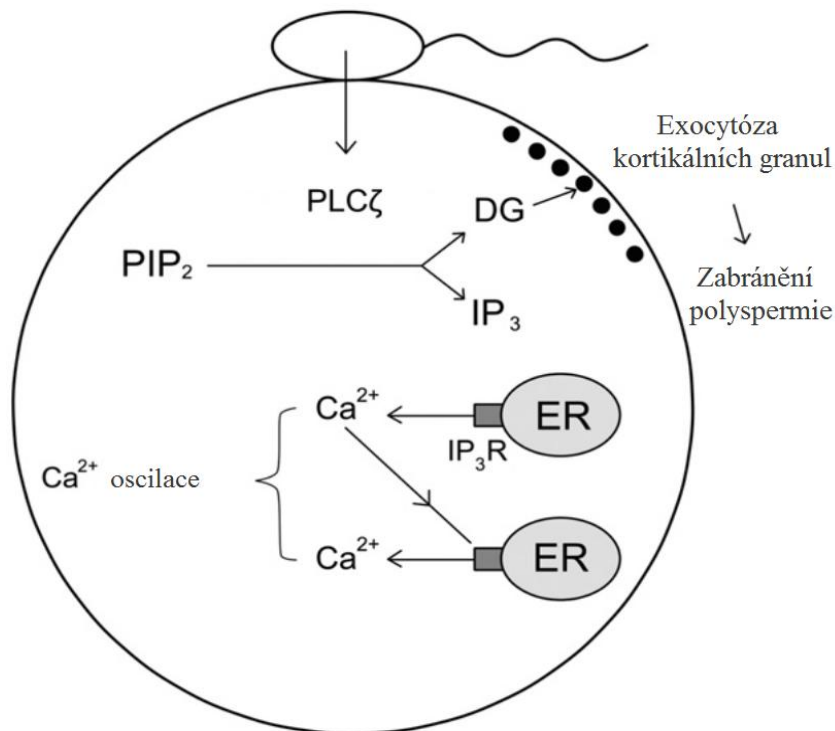
Oocyty získávají plnou schopnost aktivace ještě před ovulací. Kompetenci oocyt získává během meiotického zrání vyvolaného LH, které v cytoplazmě oocytu způsobí řadu důležitých změn. Zrání oocytu asociuje nárůst specifických molekul nezbytných pro aktivaci, jako jsou inositol 1,4,5 – trifosfátové receptoty (IP₃R), glutation, kalmodulin – dependentní protein kináza II, několik typů cyklických kináz a dochází k expresi genů, díky nimž vznikají proteiny důležité jak pro aktivaci, tak pro normální vývoj nového jedince (Florman a Ducibella, 2006). U většiny savčích druhů jsou ovulované oocyty před oplozením zastaveny ve stádiu MII. V metafázi II musí být sesterské chromatidy oddělené a při segregaci musí být udržena správná ploidie. Když jsou sesterské chromatidy seřazeny v metafázní figuře a všechny kinetochory jsou spojeny s mikrotubuly, tažné napětí působí jako signál pro zahájení anafáze a dochází k degradaci klíčových proteinů, které udržovaly metafázi. Toho je dosaženo díky APC, který má schopnost označit substráty ubikvitinem. Polyubikvitinace substrátů vede k okamžité proteolýze v proteasomech. Dvěma zásadními substráty pro ubikvitinaci jsou cyklin B1 a protein sekurin. Cyklin B1 je regulační součástí MPF a jeho proteolýza způsobí rozklad celé jednotky, která udržuje buňku v metafázi. Sesterské chromatidy jsou drženy pohromadě kohesinovými komplexy. V anafázi jsou podjednotky kohesinu štěpeny enzymem separázou, který je během metafáze držen v inaktivní formě právě díky sekurinu. Po ubikvitinaci sekurinu tedy dojde k uvolnění separázy a sesterské chromatidy jsou od sebe odděleny (Jones, 2005).

U všech druhů studovaných do dnešní doby vyžaduje aktivace oocytů zvýšení intracelulární koncentrace vápníku. Při oplození se hladina intracelulárního Ca²⁺ opakovaně zvyšuje, což je známo pod pojmem oscilace Ca²⁺ (Ito a Kashiwazaki, 2012). Hladina cytoplazmatického Ca²⁺ osciluje v oocytu až do doby vytvoření prvojader. Vlna Ca²⁺ se šíří z místa vstupu spermie dále přes celý oocyt (Williams, 2002). U Prasete se oscilace vyznačuje řadou Ca²⁺ píků, které trvají po dobu nejméně 3 hodin po fúzi spermie s vajíčkem (Sun *et al.*, 1992). Oscilaci Ca²⁺ způsobuje specifická fosfolipáza C zeta (PLC ζ), která je obsažena v perinukleární thece spermii. U mužů s globozoospermii (hlavička spermii je menší a kulatější v důsledku chybní akrozomu) jsou časté problémy s reprodukcí. I po intracytoplazmatické injekci spermie do ooplazmy byla úspěšnost oplození nízká. Problém byl přisuzován chybějícímu akrozómu, ovšem některé studie naznačují (Heytens *et al.*, 2008a), že spermie globozoospermiků obsahují méně PLC ζ , než spermie zdravých mužů. Zřejmě se dají

poruchou syntézy PLC ζ zdůvodnit i další typy neplodnosti (Heytens *et al.*, 2008b). PLC ζ štěpí v oocytu fosfatidylinositol-4,5-bisfosfát (PIP₂) na diacylglycerol (DAG) a inositol-1,4,5-trifosfát (IP₃). IP₃ se váže na IP₃ receptory endoplazmatického retikula (ER), což uvolní zásoby Ca²⁺ do cytoplazmy oocyty (Heytens *et al.*, 2008b; Ito a Kashiwazaki, 2012). Zatímco první vlna vápníkových iontů se uvolní z ER po IP₃ signalizaci vyvolanou spermií, další signalizace závisí na řadě kalciových kanálů a iontových pumpách. Jsou-li zásoby Ca²⁺ v ER vyčerpány musí endoplazmatické retikulum Ca²⁺ - ATPázové (SERCA) pumpy na na membráně ER aktivně transportovat Ca²⁺ z cytosolu zpět do ER. Kromě toho Ca²⁺-ATPázové pumpy na cytoplazmatické membráně (PMCA) odčerpávají Ca²⁺ z buňky a obnovují normální hladiny Ca²⁺ v cytoplazmě. U organismů, které podstupují při oplození oscilaci několika Ca²⁺ vln, nemohou spoléhat jen na zásoby ER, ale i na influx vápníku z okolního prostředí (Sartain a Wolfner, 2013). Uvolněný vápník se váže na protein kalmodulin, který reguluje aktivitu mnoha dalších proteinů, včetně kalmodulin dependentní kinázy (CaMKII - calmodulin dependent kinase II) a fosfatáz (Williams, 2002). CaMKII, která je prostřednictvím kalmodulinu citlivá na frekvence kmitů Ca²⁺, přímo aktivuje APC a podporuje degradaci CSF. CSF tedy dále neinhibuje APC a může dojít ke snížení aktivity MPF a v důsledku toho je ukončena MII fáze a meióza může být dokončena. Oscilace Ca²⁺ zabraňují návratu MPF do aktivního stavu (Heytens *et al.*, 2008b). CaMKII se mimo jiné zřejmě podílí na exocytóze kortikálních granul (Williams, 2002).

Po expozici spermie vaječné cytoplazmě se odehraje i ve spermii řada událostí. Již ve varletech samce jsou v chromatinu nahrazeny histonové proteiny za protaminy a genetická informace je vysoce kondenzovaná. Jádro spermie je obaleno strukturou z šesti malých proteinů, které jsou označovány jako perinukleární théka. Po vstupu spermie do vajíčka se jádro spermie začne rozpadat a perinukleární théka se s aktivní výpomocí vaječných mikrovilíí ovíjí kolem chromatinu spermie, který také postupně dekonduzuje a protaminy jsou nahrazovány histony pocházejícími z vajíčka. Do vajíčka vstupuje kromě hlavičky spermie také její bičík, který do vajíčka mimo jiné vnese hlavně mitochondrie a centriol. Zatímco otcovské mitochondrie jsou ve vaječné cytoplazmě degradovány v proteasomech, otcovské centrioly jsou nezbytné při migraci prvojader (Williams, 2002).

Obrázek 3: Aktivace oocyty.



Model aktivace oocyty vyvolané fosfolipázou C zeta (PLCζ). PLCζ po průniku do ooplazmy hydrolyzuje fosfatidylinositol-(4,5)-bisfosfát (PIP₂) na IP₃ a DAG. IP₃ způsobí uvolnění Ca²⁺ endoplazmatického retikula (ER), což má za následek indukci oscilace Ca²⁺. (Převzato z: Ito, J., Kashiwazaki, N. 2012. Molecular mechanism of fertilization in the pig. Animal Science Journal, 83, 669 – 682).

Partenogenetická aktivace oocyty

Partenogenetická aktivace savčích oocytů pomocí umělých podnětů se běžně používá v různých reprodukčních biotechnologiích, např. při klonování pomocí přenosu jader. Proto se mnohé studie zaměřují na aktivaci vajíček *in vitro*. Zrající savčí oocyty spontánně zastavují své zrání ve stádiu MII. Další vývoj meiózy je závislý na aktivačním stimulu, který v přirozených podmínkách zajišťuje spermie. Bez tohoto stimulu by oocyt zestárnul a podlehl apoptóze (Petr *et al.*, 2007). Jako příklad stimulů pro partenogenetickou aktivaci se dá jmenovat kalcium ionofor, který se může použít jak pro aktivaci, tak i pro předchozí stimulaci dokončení zrání oocyty do MII. Vývojová schopnost takto aktivovaných oocytů je však velmi omezená a embrya se po aplikaci vyvíjela maximálně do stádia blastocysty (Sedmíková *et al.*, 2003). Dalším příkladem aktivace oocytů je aktivace pomocí donorů oxidu dusného. Aktivace

je závislá na mobilizaci vápníku ryanodinovými receptory a je tedy kalcium dependentní. Prasečí oocyty ošetřené donory oxidu dusného jsou aktivovány, ale po aktivaci nedochází k exocytóze kortikálních granul a jejich vývoj je omezený (Petr *et al.*, 2005). Jako mimořádně efektivní při aktivaci oocytů prasat se ukázal jeden puls stejnosměrného proudu. Vhodné nastavení parametrů pulzu může znamenat až 90 % úspěšnost (Procházka *et al.*, 1992).

3.1.5 Kortikální reakce

Polyspermie, neboli penetrace vajíčka více než jednou spermii je fyziologická u mnoha druhů hmyzu, plazů a ptáků, zatímco u savců je považována za abnormální jev, který má za následek vývojové poruchy zygoty (Sun a Nagai, 2003). Nedávné studie na prasatech, u kterých je výskyt polyspermie *in vivo* velmi vysoký (30 – 40 %), ukazují, že tento druh může být v tomto ohledu mimořádný. Zdá se, že cytoplazma prasečího vajíčka umí odstranit některé součásti nadbytečné spermie a u hlavičky této spermie nedochází k dekonenzaci. Tato pozorování naznačují, že polyspermie může být u prasat do určité míry fyziologická a že se embrya po oplození více spermii mohou normálně vyvíjet, pokud nadbytečná spermie nezasahuje do embryonálního genomu (Xia *et al.*, 2001). Ale u většiny savců, včetně prasat, brání polyspermii kombinace mechanismu kortikální reakce a nízký počet spermií ve vejcovodu (Ducibella, 1996).

Primárně dochází k zabránění polyspermie na ZP po exocytóze kortikálních granul (CG). CG jsou deriváty Golgiho aparátu a vznikají v rané fázi růstu folikulů. V závislosti na druhu existují odchylky mezi přesnou dobou zahájení jejich vzniku. V této druhově specifické fázi dochází k hypertrofii a proliferaci Golgiho aparátu. Malé váčky formující se z hypertrofovaného Golgiho aparátu se začnou spojovat a vytvoří tak zralá CG, která se nakonec oddělí od Golgiho aparátu a migrují do subkortikální oblasti oocytu. Vznik CG v savčích oocytech je kontinuální proces a nově syntetizovaná granula jsou translokována do kůry oocytu až do doby ovulace (Liu, 2011). V prasečích oocytech ve fázi zárodečného váčku jsou CG různě rozptýlena. Při přechodu od GVBD k MI zahájí CG masovou migraci k periférii oocytu a během zrání oocytu jsou seřazeny kolem plazmatické membrány v jedné vrstvě. Dle studie Galeatiho *et al.* (1991) nedochází během kultivace *in vitro* u prasat k dostatečné migraci CG. Po 46 hodinách *in vitro* kultivace oocytů ve stadiu GV bylo 90 % z nich po GVBD, ale nebyla patrná žádná změna v rozmístění CG. Klíč k tomuto procesu může

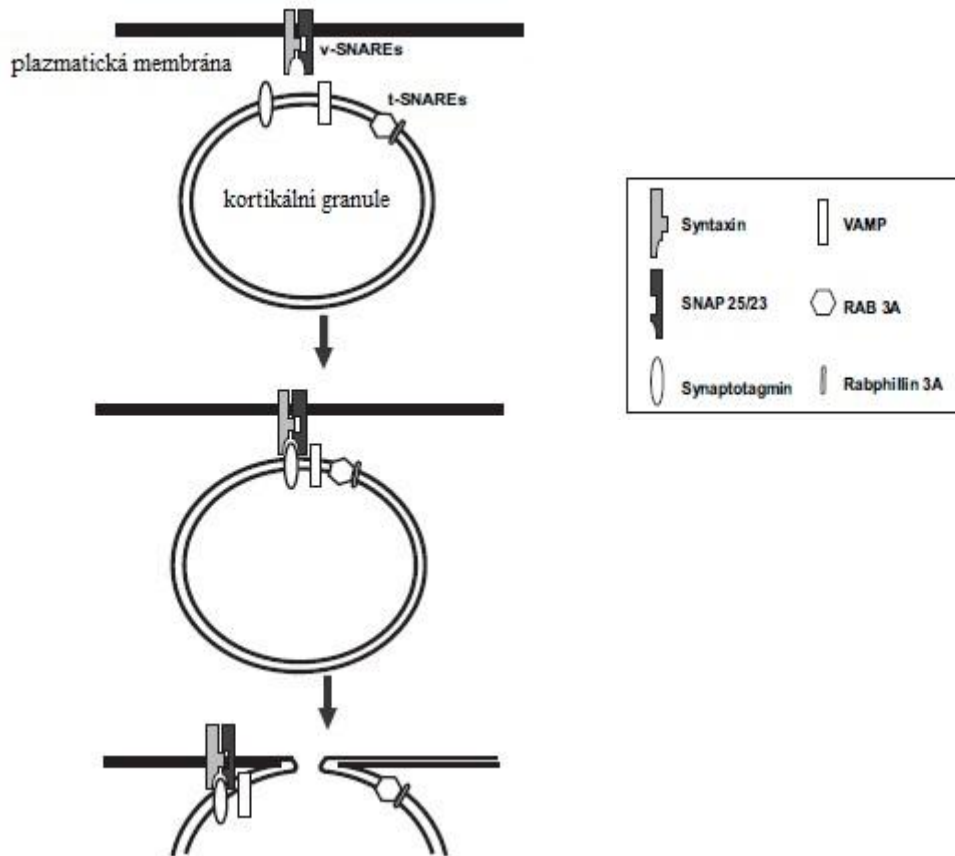
spočívat v kontaktu oocyty s kumulárními buňkami. Jestliže byly oocyty denudovány (zbaveny kumulárních buněk) 5 – 20 h po kultivaci a dále kultivovány bez kumulárních buněk, bylo 75 % v kontaktu s plazmatickou membránou a 25 % bylo v její blízkosti. Jestliže byly denudovány až po 30 h kultivace nebo denudovány vůbec nebyly, byl poměr mezi CG v kontaktu nebo v blízkosti plazmatické membrány 50 : 50. Výsledky naznačují, že dlouhodobé vystavení signálním faktorům kumulárních buněk je zásadní pro finální pochody při zrání oocytů (Galeati *et al.*, 1991). Obsah CG působí na ZP a vyvolá biochemické a strukturální změny, díky nimž ZP ztratí svou schopnost vázat spermie a nedovolí jim proniknout do vajíčka. ZP2 a ZP3 jsou přítomny jako heterodimetry a slouží jako primární a sekundární receptory spermií. Jsou upraveny tak, aby mohli být po kontaktu s proteázami CG rozštěpeny na menší glykoproteiny ZP2_f a ZP3_f, čímž se zamezí navázání další spermie. Proteázy CG katalyzují proteolýzu ZP2 a snižují rozpustnost ZP (Sun a Nagai, 2003). Celkový počet proteinů v CG savců není znám. Odhaduje se 4 – 14 proteinů. Kromě několika typů proteáz by to mohli být glykosilované komponenty, chaperonový protein kalretikulin nebo lektin, ovoperoxidáza, N-acetylglukosaminidáza, protein p32 a peptidylarginin deimináza (PAD/ABL antigen/p75), (Liu, 2011).

Exocytóza začíná ve chvíli fúze gamet a šíří se po obvodu vajíčka. U myši jsou granula 1-2 μm od plazmatické membrány a trvá proto až 10 min než dojde ke kompletní CR, na rozdíl od některých nižších živočichů (mořský ježek, hvězdice, žába), u kterých leží granula přímo na oolemě. Exocytóza CG je kalcium dependentní děj a vyžaduje proto intracelulární zvýšení volného vápníku (Wessel *et al.*, 2001). Fúze spermie s oocytem aktivuje řadu intracelulárních signálních drah. Kromě G-proteinů, u kterých několik studií potvrdilo, že se účastní CR zprostředkovaně přes PIP₂ kaskádu, se u savců uplatňuje specifická fosfolipáza C zeta spermií, která se rovněž podílí na vzniku IP₃. Existuje i množství důkazů, jak druhá polovina G-proteinem zprostředkované PIP₂ kaskády, reguluje CR pomocí DAG aktivované protein kinázy C (PKC). Sama PKC, bez přítomnosti IP₃ a Ca²⁺, exocytózu vyvolat nedokáže, stejně jako CaMKII. Obě slouží jako modulační molekuly při CR (Liu, 2011).

Při spojování CG s oolemou a při jejich fúzi mají významnou roli dvě třídy proteinů, známé jako v- a t- SNAREs (soluble NSF- attachment protein receptors). v-SNARE proteiny (synaptotagmin, VAMP) jsou spojené s membránou CG, zatímco t-SNARE proteiny (syntaxin, SNAP-25) leží v oolemě. Před exocytózou se k v-SNARE přiloží malý GTP

vazebný protein Rab a společně se vážou k vhodným t-SNARE na cílové membráně a vytvoří se pevný proteinový komplex, nezbytný pro vyvolání fúze membrán (Liu, 2011).

Obrázek 4: Mechanismus exocytózy CG.



S membránou kortikálních granul spojené v-SNARE (VAMP a synaptotagmin) komunikují s příbuznými t-SNARE (syntaxin a SNAP-25/23) na plazmatické membráně. Vzájemné rozpoznání těchto molekul řídí membránovou fúzi a kortikální reakci. Kromě SNARE se podílí na fúzi i proteiny Rab 3A a Rabphilin 3A. (Převzato z: Liu, M. 2011. The biology and dynamics of mammalian cortical granules. Reproductive Biology and Endocrinology, 9, 149).

3.2 Kalcineurin

Kalcineurin je jediná známá, Ca^{2+} /kalmmodulin dependentní serin/treonin protein fosfatáza, známá též pod názvem protein fosfatáza 2B (PP2B), která hraje zásadní roli v mnoha buněčných a vývojových procesech a na Ca^{2+} dependentní signální transdukcii v buňkách (Jesses, 2007). Stimulace multifunkčním proteinem kalmmodulinem zajišťuje koordinovanou regulaci jeho fosfatázové činnosti a potažmo mnoha jiných enzymů, včetně velkého množství proteinových kináz řízených Ca^{2+} a kalmmodulinem (Klee *et al.*, 1998). Kalcineurin hraje, mimo jiné, významnou roli při řízení meiotického zrání. Toto bylo prokázáno u bezobratlých (*Drosophila melanogaster* – Takeo *et al.*, 2006; 2010), u nižších obratlovců (*Xenopus laevis* – Nishiyama *et al.*, 2007; Mochida and Hunt, 2007), kalcineurin byl lokalizován také v oocytech vyšších obratlovců (*Sus scrofa* – Tůmová *et al.*, 2013).

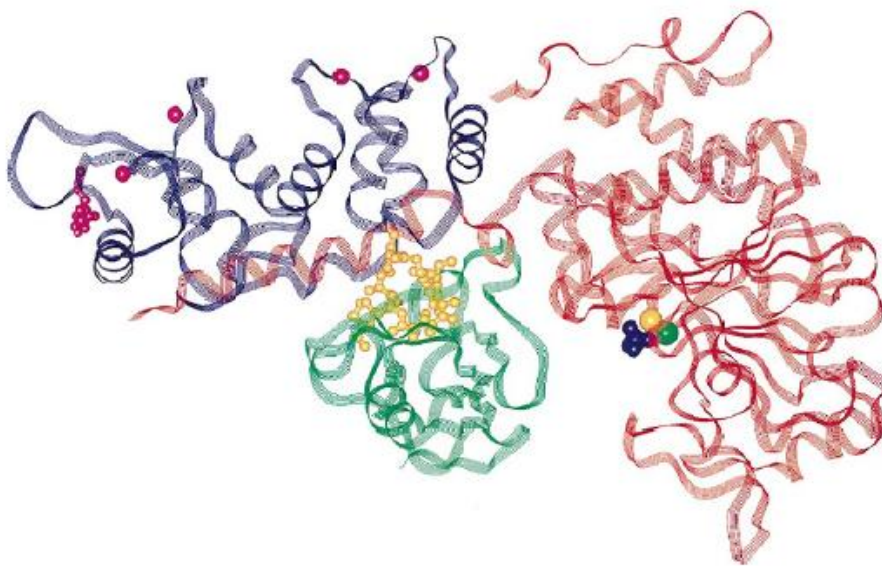
3.2.1 Struktura kalcineurinu

Kalcineurin patří do rodiny takzvaných PPP fosfatáz a spolu s rodinou PPM zahrnují serin/treoninové fosfatázy. Do PPP rodiny fosfatáz spadají enzymy PP1, PP2A, PP2B, označovaný někdy též jako PP3 (kalcineurin) a PP2C, které se od sebe dají rozlišit podle požadavku na kationt, substrátové specifity a senzitivity na odlišné inhibitory. V poslední době byly charakterizovány další podobné fosfatázy (PP4, PP5, PP6 a PP7), (Wang *et al.*, 2008). V rámci aktivní oblasti sdílí PP1 49 % aminokyselinovou identitu s PP2A a 39 % identitu s kalcineurinem. Díky sekvenování byla vyhodnocena řada reziduí, která jsou zachována u všech členů této fosfatázové rodiny. Také byl identifikován fosfoesterázový motiv, který je udržován nejen v PP1, PP2A a kalcineurinu, ale i u mnoha jiných enzymů, které se podílejí na štěpení fosfoesterové vazby, včetně kyselých a alkalických fosfatáz, bakteriálních exonukleáz, diadenosinových tetrafosfatáz a dalších. PP2B je heterodimerní protein skládající se z 57 – 71 kDa katalytické podjednotky kalcineurin A (CnA), která obsahuje dvě aktivní metalická centra a z regulační, pevně připojené, myristylované, vápník vážící, 18 – 20 kDa podjednotky kalcineurinu B (CnB). Jako serin – treoninová fosfatáza se kalcineurin účastní řady buněčných procesů, jejichž přenos signálu je závislý na Ca^{2+} (Rusnak a Mertz, 2000). Obě podjednotky jsou k sobě pevně vázány i v přítomnosti pouze nanomolárních koncentrací Ca^{2+} . Tato dvoupodjednotková struktura, jedinečná mezi fosfatázami je zachována od kvasinek k člověku a je nezbytná pro jeho aktivitu.

Aminokyselinové sekvence katalytické a regulační oblasti kalcineurinu jsou rovněž vysoce konzervativní (Klee *et al.*, 1998).

CnA obsahuje čtyři funkční oblasti: katalytickou doménu, CnB vazebnou doménu (BBH), kalmodulin vazebnou doménu (CBD) a autoinhibiční doménu (AI), které jsou lokalizovány u karboxylového konce. CnB se skládá ze dvou globulárních Ca^{2+} vazebných domén, které jsou uspořádány lineárně podél BBH, což je amfipatická pětkrát stočená α -helix struktura, vyčnívající z katalytické domény, která z jedné strany komunikuje s CnB. Důležitá je hydrofobní rýha, která se kromě Ca^{2+} interakčního místa váže i k CnB vazebné doméně. Podjednotky B a A interagují zejména prostřednictvím této rýhy, která napomáhá vytvoření dimeru (Wang *et al.*, 2008). CnB a CBD spolu s autoregulačními mechanismy koordinují aktivitu fosfatázy v závislosti na modulaci homeostázy intracelulárního vápníku, která souvisí

Obrázek 5: Krystalická struktura kalcineurinu v komplexu s FKBP12-FK506.



CnA je znázorněn červeně, CnB fialově s kovalentně s navázanou kyselinou myristovou na N-terminálním glycinu (růžová). Železo a zinek v aktivním místě jsou vyobrazeny jako žlutý a zelený bod s navázaným fosfátem (fialově). Čtyři Ca^{2+} na CnB jsou vyobrazeny jako růžové body. Žlutý korálkovitý motiv znázorňuje FK506 a zelené vlákno je FK506 vazebný protein FKBP12 (Protein Data Bank code 1TCO (28)). (Převzato z Klee, B. C., Ren, H., Wang, X. 1998. Regulation of the Calmodulin-stimulated Protein Phosphatase, Calcineurin. The Journal of Biological Chemistry, 273 (22), 13367-13370.

se změnami buněčné aktivace. CnB je nezbytný strukturální prvek pro stabilizaci CnA a pro Ca^{2+} /kalmodulin dependentní aktivaci kalcineurinu. Kalmodulin a CnB jsou strukturálně konzervované, jsou z 35 % identické v primární sekvenci, ale jsou funkčně odlišné. U obou je vazba Ca^{2+} zprostředkována přes čtyři EF – hand motivy, které jsou na úrovni terciální struktury uspořádán do podoby jakési činky, na které jsou na opačných koncích symetricky umístěny Ca^{2+} vazebné smyčky. Autoinhibiční doména blokuje v klidových stádiích buňky katalytické centrum a tím poskytuje vnitřní mechanismus pro koordinaci fosfatázové aktivity kalcineurinu při změnách, kdy buňka mění svou aktivitu (Site a Fox, 2008). AI je vysoce flexibilní struktura, která se pohybuje kolem aktivního místa CnA, kde se váže substrát a znesnadňuje jeho navázání. Předpokládá se, že po navázání kalmodulinu na CBD, která se těsně přikládá k AI, dojde ke konformační změně nebo posunu AI, tím se odstraní prostorová překážka k aktivnímu místu, substrát se může navázat a dochází k plné aktivaci fosfatázy. CBD se spolu s AI nachází v karboxylové terminální oblasti CnA a proto jsou snadno štěpeny proteázami (Ye *et al.*, 2013). Některá data ukazují, že dvoujaderné kovové centrum je klíčovou součástí aktivního místa kalcineurinu. U enzymů, které obsahují dvoujaderné Fe-Fe nebo Fe-Zn centra, bylo již dříve prokázáno, že jsou nezbytná pro katalytickou aktivitu (Rusnak a Mertz, 2000). Fe^{2+} - Zn^{2+} metalické centrum kalcineurinu katalyzuje hydrolyzu fosfoesterů dvoustupňovým procesem, který vyžaduje aktivaci redukováného železa, spojujícím funkční aktivaci kalcineurinu se změnami redoxní chemie buňky (Site a Fox, 2008).

CnA podjednotka existuje ve třech izoformách, CnA – α , β , γ a podjednotka CnB ve dvou izoformách, jako CnB1 a CnB2. Primární struktury α , β a γ izoform savčího kalcineurinu A jsou produktem tří různých genů. Tyto tři různé izoformy mají proměnné N a C – terminální oblasti, zbylých 90 % jejich struktury vykazuje 83 – 89 % identitu (Klee *et al.*, 1998). CnA α a CnA β jsou zastoupeny v široké škále různých tkání, zatímco CnA γ je výsledkem rozdílné genové exprese převážně jen ve varlatech a v mozku. Přítomnost mikroRNA, specificky cílené na CnA γ může přispívat vzoru její tkáňové exprese (Hudson a Price, 2013).

3.2.2 Substrátová specifita kalcineurinu

Kalcineurin má relativně úzkou substrátovou specifitu. Fosfoproteiny jako například inhibitor 1^a, neurogranin, neuromodulin, mikrotubuly-asociovaný protein či MAP-2 jsou

defosforylovány přednostně, zatímco jiné, jako je kasein, synapsin 1 a kalmodulin kináza II jsou defosforylovány mnohem pomaleji nebo vůbec ne. Další možné fyziologické substráty, jejichž kinetické vlastnosti nebyly zatím charakterizovány, jsou NO syntázy, GTPázy podílící se na endocytóze (dynamin, dříve tzv. defosfin), transkripční faktor Elk-1, heat shock protein nebo hsp25. Substrátová specifita kalcineurinu není ovlivněna pouze specifickou sekvencí, ale je dána jak primárními, tak i vyššími řády strukturálních rysů (Klee *et al.*, 1998).

3.2.3 Regulace a inhibice kalcineurinu

Klasický mechanismus regulující kalcineurin *in vivo* se uplatňuje pomocí změn intracelulární koncentrace Ca^{2+} . U signálních drah, které vedou ke zvýšení intracelulárního Ca^{2+} , způsobí Ca^{2+} vazba ke kalmodulinu jeho konformační změnu, která umožňuje vazbu na kalcineurin a nastartování jeho fosfatázové aktivity. V klidové fázi buňky, kdy je hladina Ca^{2+} nízká, nemůže kalcineurin vázat kalmodulin a enzym se nachází v inaktivní formě. Zdá se, že podstatná je i vazba Ca^{2+} přímo na kalcineurin. Vliv na aktivitu kalcineurinu mají i fosfolipidy a bylo prokázáno že kalcineurin dokázala aktivovat i kyselina arachidonová a nenasycené mastné kyseliny s dlouhým řetězcem. Tato skutečnost může mít fyziologický význam vzhledem k tomu, že kalcineurin je během frakcionace spojen s membránami. Další mechanismy pro regulaci kalcineurinu zahrnují redox reakce iontů (Rusnak a Mertz, 2000). Wang *et al.* (1996) identifikovali faktor, který zabraňuje inaktivaci kalcineurinu *in vitro* i *in vivo*. Tímto faktorem je superoxid dismutáza, což naznačuje, že inaktivace může být výsledkem oxidačního poškození Fe – Zn aktivního centra kalcineurinu. Činnost kalcineurinu zřejmě mohou ovlivňovat i jiné extracelulární oxidanty, například H_2O_2 .

Kvůli odolnosti vůči endogenním inhibitorům fosfatázy 1 a 2, inhibitorům protein fosfatázy 1 a 2A, kyselině okadaové, kalykulinu a mikrocystinu, bylo obtížné určit funkce kalcineurinu, dokud nebyl identifikován jako cíl imunosupresivních léků FK506 a cyklosporinu A (CsA), (Klee *et al.*, 1998). Cyklosporin A a FK506 inhibují kalcineurin, když je v komplexu s jejich příslušnými cytoplazmatickými receptory cyklofilinem A a FKBP (Rusnak a Mertz, 2000). CsA – cyklofilin A a FK506 – FKBP jsou strukturně nepříbuzné komplexy, které spolupracují na odlišných, ale překrývajících se místech na kalcineurinu. To má za následek vznik konkurenčních vazeb inhibičních komplexů, které když se naváží ke kalcineurinu, nepřímo inhibují funkci fosfatázy tím, že stericky narušuje vazbu substrátu na fosfoprotein (Site a Fox, 2008). Kyselina okadaová a mykrocystin jsou silnými přírodními

inhibitory PP1 a PP2A. Mají schopnost inhibovat i kalcineurin, ale v mnohem vyšších koncentracích než u ostatních fosfatáz. Dibefurin, metabolit hub, vykazuje rovněž mírnou inhibiční aktivitu proti kalcineurinu.

Účinnými specifickými inhibitory kalcineurinu jsou i pytertroidy cypermetrin, deltametrin a fenvalerát. Pyretroidy jsou široce používány jako insekticidy a jsou přítomny v životním prostředí i v organismech živočichů. Byl prokázán jejich vliv na meiózu savčích oocytů a mohly by ovlivňovat plodnost lidí nebo zvířat. Žádný z nich nemá významný účinek na životaschopnost oocytů ani nevyvolává degeneraci oocytů, nicméně významně ovlivňují jejich zrání. Jejich účinek je závislý na stupni meiotické kompetence oocytů. Zrání rostoucích oocytů prasete s částečnou meiotickou kompetencí, ošetřených pyretroidními inhibitory kalcineurinu, bylo indukováno, zatímco plně dorostlé oocyty s plnou meiotickou kompetencí dozrávaly opožděně. Prasečí oocyty daných skupin meiotické kompetence, ošetřené nepyretroidními inhibitory kalcineurinu, cyklosporinem nebo hymenistatinem I, vykazovali obdobné vlastnosti při zrání jako oocyty ošetřené pyretroidní inhibitory kalcineurinu. Pyrethroidy, které nejsou schopny inhibice kalcineurinu, allethrin nebo permethrin, nemají žádný vliv na zrání prasečích oocytů (Petr *et al.*, 2013).

Cyklosporin A

Cyklosporin A je cyklický polypeptid složený z 11 aminokyselinových jednotek. Byl objeven v roce 1970 jako produkt houby označené jako *Tolyocladium inflatum*. Původně byla izolována směs dvou složek CsA a CsB, z nichž CsA vykazoval imunosupresivní účinky a představoval tak převrat v transplantační medicíně. Postupem času se zjistilo, že cyklosporin je celkem běžným sekundárním metabolitem řady půdních vláknitých hub (*Acremonium*, *Aphanocladium*, *Beauveria*, *Fusarium*, *Tolyocladium*, *Trichoderma*), (Josef *et al.*, 2010). Principem působení CsA je navázání na výše zmíněné nitrobuněčné receptory, což jsou proteiny patřící do skupiny imunofilinů. Imunofiliny jsou původně charakterizovány schopností vázat imunosupresivní látky, ale hrají důležitou úlohu v celé řadě buněčných procesů, zejména při sestavování proteinů a regulaci vápníkových kanálů. Imunofilin po vazbě cyklosporinu inhibuje aktivitu kalcineurinu a zastaví expresi daných genů (Ferenčík *et al.*, 2005).

3.2.4 Fyziologické funkce kalcineurinu

Kalcineurin je fosfoprotein fyziologicky aktivován Ca^{2+} a kalmodulinem, který defosforyluje vybrané substráty. Biologické důsledky jsou rozmanité a závisí na buněčném kontextu (Hogan a Li, 2005).

Kalcineurin byl původně objeven jako kalmodulin vazebný protein v savčím mozku. Od té doby byl lokalizován v nejrůznějších tkáních, s nejvyšším výskytem v mozku. Obě podjednotky byly nalezeny v tukové tkáni, adrenálních buňkách, kostních osteoklastech, srdci, zadním mozku, míše, ledvinách, játrech, B i T lymfocytech, plicích, kostní dřeni, čichovém bulbu, slinivce, placentě, sítnici, kosterním i hladkém svalstvu, varlatech, spermiích, brzlíku, štítné žláze, slezině i trombocytech (Rusnak a Mertz, 2000). Již podle množství tkání, ve kterých je kalcineurin exprimován je zřejmé, že má ve fyziologii různých organismů nespočet funkcí a je významným hráčem při regulaci mnoha buněčných procesů. U savců se kalcineurin účastní regulace enzymů a iontových kanálů, chemotaxe a růstu neuronů, transportu membránových váčků, rozvoje srdečních chlopní a osteoklastů, aktivace lymfocytů nebo diferenciaci kosterních svalů (Hogan a Li, 2005).

V mozku jsou obzvláště bohaté na kalcineurin striatální a hipokampální neurony. Aktivace kalcineurinu v hipokampálních neuronech má za následek nejen inhibici uvolňování neurotransmiterů, glutamátu a γ -aminomáselné kyseliny, ale je také zapojen do znečitlivění postsynaptického N-methyl-D-asparagového (NMDA) receptoru spojeného s Ca^{2+} kanály. Komplex regulace NMDA receptorů může mít roli v dlouhodobé potenciaci a depresi dlouhodobé paměti. Kalcineurinem zprostředkovaná aktivace syntázy oxidu dusnatého může být také použita k vysvětlení glutamátové neurotoxicity. Kalcineurin je odpovědný i za opačné účinky glutamátu a cAMP na neuronální dráždivost (Klee *et al.*, 1998).

Nejlépe prostudovaná úloha kalcineurinu je Ca^{2+} dependentní, kalcineurinem zprostředkovaná regulace transkripce T – lymfocytárního transkripčního faktoru interleukinu 2. Vápník a kalcineurin jsou hlavními regulátory aktivity NFAT (nuclear factor of activated T cells). Signální dráha pro aktivaci NFAT je aktivována po přijetí signálu nejrůznějšími receptory. Například antigenními receptory u T a B buněk, Fc γ receptory u monocytů a NK buněk a Fc ϵ receptory u žírných buněk. Následuje kaskáda dějů, jejichž důsledkem je zvýšení intracelulární hladiny vápníku a zvýšená hladina intracelulárního vápníku aktivuje kalcineurin. Protein NFAT je touto fosfatázou defosforylován, což vede k jeho translokaci do jádra a k vyvolání transkripce určitých genů. Kalcineurin, jako hlavní aktivátor NFAT, musí být neustále aktivován. NFAT je totiž rychle z jádra exportován zpět do cytoplazmy, což je

spjato s fosforylací serinových míst. Do tohoto procesu zasahuje protein kináza A a glykogen syntáza kináza-3 (Zhou et al., 2002). Tato reakce byla prvním příkladem transdukce z plazmatické membrány do jádra (Klee *et al.*, 1998).

Kalcineurin rovněž zodpovídá za apoptózu. Apoptóza je proces, při kterém narůstají intracelulární hladiny Ca^{2+} a kalcineurin se účastní její signální dráhy. Způsobuje programovanou smrt T a B lymfocytů a také apoptózu neuronů prostřednictvím cytochrom c-kaspáza 3 signální dráhy. Apoptóza T-buněčných hybridomů může být stimulována ligací CD3 komplexu na T lymfocytární receptory. Tento biologický model poskytuje užitečné informace o signálních drahách zodpovědných za tento biologický jev. Jak CsA, tak FK506 inhibují apoptózu lymfocytů. Zajímavou hypotézou je, že by apoptóza mohla být spojena s redoxním stavem buněk a homeostázou. Inhibitory aktivity NADH-oxidoreduktázy na plazmatické membráně indukují apoptózu prostřednictvím signální dráhy zahrnující kalcineurin. Je možné, že NADH-oxidoreduktáza funguje jako redoxní činidlo, které může regulovat signály potřebné pro apoptózu. Zjištění, že je kalcineurin citlivý na změny redoxního stavu tuto hypotézu podporuje (Rusnak a Mertz, 2000).

Kalcineurin a NFAT jsou zapojeny do transdukce signálů zodpovědných za srdeční morfogenezi a vyvolání srdeční hypertrofie. Narušení NFAT genu u myši má za následek poruchu při vývoji chlopní a sept, a transgenní myši umírají na městnavé srdeční selhání již v děloze. Nadměrná exprese kalcineurinu také indukuje srdeční hypertrofii a srdeční selhání u transgenních myši, kterému by mohlo být zabráněno imunosupresivními léčivy jako je CsA. U transgenního myšího modelu pro hypertrofii se zvýšenou expresí tropomodulinu bylo potvrzeno, že před nástupem hypertrofického fenotypu vzrůstá hladina kalcineurinu. Podobné výsledky byly zjištěny u přetíženého kosterního svalu myši. Některé ze studie hovoří o imunosupresivech, CsA a FK506, jako o možných léčivech při hypertrofii.

Ačkoli NFAT proteiny byly poprvé objeveny pro jejich ústřední roli při aktivaci T lymfocytů, později bylo prokázáno, že organizují různé vývojové procesy, včetně vývoje nervů, kardiovaskulárního systému, kosterního svalstva, účastní se krvetvorby a také k udržení kožních kmenových buněk v klidovém stavu. Hrají také roli v signální dráze kalcineurin – NFAT při změně nediferenciovaných embryonálních kmenových buněk u myši v diferenciované. Transkripční faktor NFAT zvyšuje expresi genu *Src* přímou vazbou na jeho promotorové oblasti v průběhu diferenciaci embryonálních kmenových buněk a indukuje epitel – mezenchymální přechod, který je v reakci na diferenciaci indukující stimul nezbytný pro specifikaci dané buněčné linie. Inhibice této signální dráhy udržuje dlouhodobě kmenové

buňky v pluripotenci nezávisle na leukemickém inhibičním faktoru. Myši s porušenou expresí genu pro regulační podjednotku kalcineurinu, *Cnb1*, nebo genů pro NFAT, NFATc1, NFATc3 a NFATc4, umírají kolem 11. – 14. dne embryonálního vývoje (Li *et al.*, 2010).

Kalcineurin má patrně význam i během porodu savců. Tabata *et al.* (2009) zjistili, že ačkoli během porodu hraje významnou roli hormon oxytocin, myši s chybějícím receptorem pro oxytocin jsou plodné a rodí potomstvo bez vývojových vad a předpokládají existenci alternativní cesty vyvolávající porod. Zaměřili se proto na expresi a lokalizaci signální dráhy kalcineurin-NFAT během myšího porodu. Kalcineurin a NFATc1 byly detekovány v *decidua* březí dělohy a během březosti bylo objeveno vyšší množství mRNA pro kalcineurin A a NFATc1. U myši s chybějícím receptorem pro oxytocin byla ale nalezena nižší míra aktivace NFATc1 než u divokého typu. Po injekci FK506 březím myším došlo ke zpoždění porodu prvního plodu. Tato studie naznačuje, že kalcineurin-NFAT dráha by mohla hrát roli i během zahajování porodu.

Další význam kalcineurinu pro reprodukci savců naznačuje i jeho výskyt ve spermiích. Tash *et al.* (1988) potvrdil výskyt obou podjednotek kalcineurinu ve spermiích psa, prasete a mořského ježka. Kalcineurin byl lokalizován v bičíku a postakrozomálním oddílu hlavičky. Zdá se, že zde je podstatný pro regulaci motility bičíku.

Role kalcineurinu v oogenezi

Oplození způsobuje nárůst vápníku v cytoplazmě oocyty, který spustí různé aktivační děje. U obratlovců mezi tyto reakce patří výstup z meiotického bloku MII a exocytóza kortikálních granul. Na molekulární úrovni vápník aktivuje CaMKII, která fosforyluje Erp1, který se stane cílem pro ubikvitinující ligázy, což vede k jeho zničení v proteasomech. Tyto události uvolní vajíčka z meiotického bloku, protože Erp1 inhibuje faktor APF. Aktivovaný APF spustí ubikvitinaci cyklinu a sekurinu, což umožní oocyty pokračovat v meióze, sesterské chromatidy se oddělí, chromozómy dekondují, vajíčko vyloučí druhé pólóvé tělíčko a dojde k opětovné formaci jádra (Mochida a Hunt, 2007).

Mochida a Hunt (2007) přidali k extraktu vajíček *Xenopus laevis* umělý konstrukt Erp1, který nepodléhá ubikvitinaci a který tedy nezpůsobí inaktivaci MPF. Po přidání Ca^{2+} k extraktu by tedy nemělo dojít k aktivaci APF, přesto však k přechodné aktivaci došlo. To odráží přechodné zvýšení aktivace Ca^{2+} dependentní protein fosfatázy. Nejpravděpodobnějším

kandidátem se zdál být pro tuto činnost kalcineurin, s ohledem na to, že je přímo regulován hladinou Ca^{2+} a calmodulinu a tato hypotéza byla i ověřena použitím inhibitorů kalcineurinu cyklosporinu A a FK506, které inhibují jeho fosfatázovou aktivitu (Mochida a Hunt, 2007). Nishiyama *et al.* (2007) zkoušeli, vzájemný vztah mezi kalcineurinem a CaMKII. Po inhibici jednoho z proteinů nebyla aktivita druhého nijak ovlivněna. Nishiyama *et al.* (2007) zkoumali také roli kalcineurinu během aktivace vajíček *Xenopus laevis*. Ve své práci ukazují, že kalcineurin je přechodně aktivován ihned po přidání Ca^{2+} v koncentraci, která vyvolává ukončení druhé metafáze. Když je kalcineurin inhibován, nedojde k prolomení meiotického bloku a ani u spermií, které byli kultivovány v extraktech z vajíček s inhibovaným kalcineurinem, nedojde k dekonenzaci chromatinu. Kromě toho, je potlačena tzv. kontrakce kůry vajíček *Xenopus laevis*, zatímco dochází k exocytóze kortikálních granul. Dále se ukazuje, že když je aktivita kalcineurinu během aktivace vysoká, je zabráněno růstu astry spermie a v oplodněném vajíčku nedochází k migraci samčího a samičího prvojádra. Pro zahájení embryonálního vývoje obratlovců je tedy rozhodující, aby došlo jen k přechodné aktivaci kalcineurinu (Nishiyama *et al.*, 2007).

Význam kalcineurinu během oogeneze byl popsán i u *Drosophila melanogaster*. U této ovocné mušky je, na rozdíl od obratlovců, zralý oocyt zadržen ve fázi MI a aktivace je spuštěna ovulací nezávisle na spermií. Navzdory těmto rozdílům, jsou Ca^{2+} zprostředkované signální dráhy také zapojeny do průběhu těchto procesů (Takeo *et al.*, 2010). Takeo *et al.* (2006) objevili funkci genu *sra*, který kóduje proteiny z rodiny MCIPs (Modulatory calcineurin-interacting proteins), také nazývaných jako regulátory kalcineurinu (RCNs), kalciressins nebo DSCR1 (Down's syndrome critical region, které jsou nezbytné pro výstup z metafáze I u *Drosophily*. Oocytům ze zárodečných klonů, kterým *sra* gen chyběl, se nepodařila po aktivaci dokončit meióza a vývoj vajíčka byl zastaven v anafázi I. Tato mutace byla pro homozygotní larvy a kukly obou pohlaví semiletální a u samic způsobila poruchy ovulace a sterilitu (Takeo *et al.*, 2006). Stejně tak u klonů s chybějící regulační podjednotkou kalcineurinu nemohou po aktivaci vajíčka dokončit meiózu, která se zastaví v anafázi I. Genetické analýzy naznačují, že činnost kalcineurinu je regulována proteinem Sarah (Sra), prostřednictvím mechanismu závislém na fosforylaci Sra. Savčí RCAN1 (regulator of calcineurin 1) rodina proteinů, byla u několika modelových organismů uznána jako endogenní regulátor kalcineurinu. Původně byly RCAN proteiny identifikovány jako inhibitory kalcineurinu. Sra se fyzicky pojí s katalytickou podjednotkou kalcineurinu a jeho nadměrná exprese inhibuje aktivovaný kalcineurin. Fosforylace Sra ale vede nejen ke zmírnění

inhibičních účinků Sra, ale také působí na aktivaci kalcineurinu, čímž se vysvětluje úloha RCAN proteinů jako pozitivních regulátorů kalcineurinu. RCAN mají vysoce konzervované domény s takzvaným serin-prolinovým motivem v centrálním regionu, který se vyskytuje také u jiných kalcineurinových substrátů, jako je NFAT protein u savců. Funkční analýzy RCAN u kvasinek zjistily, že fosforylace konzervativních sekvencí v serin-prolinovém motivu jsou potřebné pro stimulační funkce (Takeo *et al.*, 2010).

Petr *et al.* (2013) zkoumali vliv pyretroidů s inhibičním účinkem na kalcineurin, cypermetrin, deltametrin a fenvalerát, na vastnosti prasečích oocytů. Bylo prokázáno, že ačkoli se jejich účinky neodráží na životaschopnosti oocytů, ani nezpůsobují jejich degradaci, mají významný vliv na zrání oocytů. Účinek těchto pyretroidů je závislý na stupni meiotické kompetence oocytů. Zrání rostoucích oocytů prasete s částečnou meiotickou kompetencí, ošetřených pyretroidními inhibitory kalcineurinu, bylo indukováno, zatímco plně dorostlé oocyty s plnou meiotickou kompetencí dozrávaly opožděně. Nepyretroidní inhibitory kalcineurinu, cyklosporin nebo hymenistatin I, měly na prasečí oocyty podobné účinky jako pyretroidní inhibitory. Pyrethroidy, které nejsou schopny inhibice kalcineurinu, allethrin nebo permethrin, neměly vliv na zrání prasečích oocytů (Petr *et al.*, 2013).

Možná úloha kalcineurinu v regulaci meiózy savčích oocytů nebyla doposud objasněna. Tůmová *et al.* (2013) provedli ale studii exprese a lokalizace kalcineurinových podjednotek a exprese mRNA jednotlivých izoform v prasečích oocytech a jejich kumulárních buňkách během růstu a meiotického zrání. Našli mRNA pro obě kalcineurinové podjednotky s tím, že mRNA pro podjednotku A se vyskytovala v oocytech v izoformách β a γ a pro CnB pouze v izoformě CnB2. Také v kumulárních buňkách byla nalezena mRNA pro kalcineurin, konkrétně izoformy CnA β , CnA γ , CnB1 a CnB2. Imunocytochemické hodnocení prokázalo přítomnost obou kalcineurinových podjednotek ve všech zkoumaných kategoriích prasečích oocytů ve fázi růstu a zrání. Nejvyšší úroveň fluorescenčního signálu podjednotky A během fáze růstu byla v korové oblasti oocytu a naopak nejnižší intenzita byla pozorována v jádru a vůbec žádný signál nevykazovalo jádérko. Intenzita fluorescence kalcineurinu A se výrazně měnila během kultivace. Distribuce kalcineurinu začala být homogenní v průběhu GVBD a MI, tedy že intenzita fluorescence se v oblasti kolem meiotického vřeténka a cytoplasmě nelišila. Výrazný nárůst intenzity fluorescence CnA v cytoplasmě a zejména kůře byl vidět v MII. Intenzita fluorescence CnB se významně zvýšila v jádře oocytů v GV stádiu a během MI se snížila. V MII bylo pozorováno statisticky významné zvýšení fluorescence CnB v oblasti kůry a cytoplasmě (Tůmová *et al.*, 2013).

4 Materiál a metody

4.1 Materiál

4.1.1 Získávání vaječníků

Vaječníky byly získávány na jatkách od mladých prasniček v neznámé fázi estrálního cyklu. Do jedné hodiny od porážky byly vaječníky dopraveny do laboratoře ve vytemperované termolahvi naplněné fyziologickým roztokem (0,9 % NaCl) o teplotě 38 °C. V laboratoři byly vaječníky opláchnuty fyziologickým roztokem o stejné teplotě.

4.1.2 Získávání oocytů s ukončeným růstem

Oocyty s ukončeným růstem mají velikost vnitřního průměru 120 – 125 μm . Získávány byly z korové oblasti vaječníků aspirací folikulární tekutiny z folikulů o velikosti 2 – 5 mm pomocí 20 G jehly nasazené na 20 ml stříkačku. Oocyty byly vybírány z folikulární tekutiny pod stereomikroskopem pomocí úzkostěnné skleněné pipety a přenášeny do modifikovaného média M199. Pro experimenty byly vybírány pouze oocyty s neporušenou cytoplazmatickou membránou a kompaktním kumulem.

4.1.3 Kultivační médium pro *in vitro* zrání prasečích oocytů

Pro manipulaci a zrání oocytů bylo použito médium M199, obohacené o HEPES, laktát sodný, pyruvát sodný, gentamicin, fetální telecí sérum, (Gibco BRL, Life Technologies, Německo) a eCG : hCG (PG 600, Intervet Boxmeer, Holandsko). Poměr jednotlivých složek použitých v médiu je uveden v tabulce 1. Zásobní roztok média byl připravován každý týden čerstvý a sterilní uchováván při teplotě 4 °C v prostředí směsi 5 % CO₂ se vzduchem.

Tabulka 1: Složky obohacující médium M199 pro *in vitro* zrání oocytů prasete.

Složka	g/100 ml média M199
HEPES	0,15
laktát sodný	0,06
pyruvát sodný	0,025
gentamicin	0,0025
fetální telecí sérum	10 % (w/v)
eCG	13,4 IU/ml
hCG	6,6 IU/ml

4.2 Metody

4.2.1 *In vitro* kultivace oocytů

Vybrané oocyty byly kultivovány v 1 ml modifikovaného média M199 v miskách NUNC se 4 jamkami (NUNC, Roskilde, Dánsko) při teplotě 39 °C ve směsi 5 % CO₂ se vzduchem po dobu 46 hodin do metafáze druhého meiotického dělení (MII). Po kultivaci byla část oocytů použita pro kontrolu zrání. Oocyty byly mechanicky zbaveny kumulárních buněk a fixovány v roztoku kyseliny octové s metanolem v poměru 1 : 3 po dobu 48 hodin. Pro zjištění stádia jaderného zrání byly fixované oocyty barveny 1 % orceinem a hodnoceny pod fázovým mikroskopem. Pro zařazení do experimentu muselo minimálně 85 % oocytů dosáhnout stádia metafáze II.

4.2.2 Kultivace oocytů s cyklosporinem A

Pro tento experiment byl zvolen jako inhibitor kalcineurinu cyklosporin A. Zásobní roztok CsA o koncentraci 8 mM byl rozpuštěn v dimethylsulfoxidu (DMSO). V den experimentu byl inhibitor rozpuštěn dvě hodiny před použitím v kultivačním médiu. Konečná koncentrace cyklosporinu byla vybrána na základě výsledků Petr *et al.* (2013). Po 46 hodinách *in vitro* zrání byla část oocytů kultivována v přítomnosti 8 μ M CsA po dobu 2 hodin.

4.2.3 Partenogenetická aktivace oocytů

In vitro zralé oocyty byly nejprve zbaveny kumulárních buněk a poté ošetřeny 25 μ M kalcium ionoforem A 23187 (Sigma-Aldrich, Německo) po dobu 5 minut při teplotě 39 °C ve směsi 5 % CO₂ se vzduchem (Jílek *et al.*, 2001). Poté byly oocyty třikrát krátce opláchnuty v kultivačním médiu bez kalcia a kultivovány další dvě hodiny pro proběhnutí kortikální reakce.

4.2.4 Vizualizace kortikálních granul

Po uplynutí doby potřebné pro exocytózu kortikálních granul byly oocyty fixovány 30 minut v 3,7 % paraformaldehydu při laboratorní teplotě. Fixované oocyty byly třikrát opláchnuty v PBS a 5 minut permeabilizovány v 1 % Tritonu - X100 v PBS. Poté byly oocyty znovu opláchnuty v PBS a inkubovány s lektinem (PNA) konjugovaným s Alexa Fluor 568 (Invitrogen, Life Technologies, Německo) 30 minut ve tmě pro nabarvení kortikálních granul. Pro vizualizaci chromatinu byl použit 4,6-diamino-2-fenylindol (DAPI) po dobu 10 minut. Před montováním do kapky glycerolu v PBS na podložní sklíčko byly oocyty opláchnuty v ekvilibračním pufru (Romar *et al.*, 2005).

4.2.5 Vyhodnocení experimentu

Vzorky byly snímány pomocí laserového konfokálního mikroskopu (Leica SPE, Německo) na oodělení Biomatematiky Fyziologického ústavu Akademie věd ČR. Všechny oocyty byly snímány v ekvatoriální rovině oocytu a při stejném nastavení intenzity laseru.

Přítomnost kortikálních granul v korové oblasti oocyty byla hodnocena metodou analýzy obrazu (NIS Elements 4.2, Laboratory Imaging, Česká republika). V ekvatoriální rovině oocyty byla měřena suma jasů kortikálních granul značených pomocí PNA-Alexa Fluor 568. Dle výše jasů byla následně stanovena míra exocytózy CG: kompletní exocytóza CG (oocyty vykazují sumu jasů kortikálních granul od 0 do 25 000), účinná exocytóza CG (suma jasů CG od 25 000 do 40 000), začínající exocytóza CG (suma jasů CG od 40 000 do 75 000) a žádná exocytóza (suma jasů CG od 75 000 výše).

Data uvádějící sumu jasů CG byla hodnocena pomocí statistické metody jednofaktorová ANOVA v programu STATISTICA 12. Míra exocytózy CG byla hodnocena pomocí metody chí-kvadrát.

4.2.6 Experimentální schéma

Cílem tohoto experimentu bylo sledovat vliv inhibice kalcineurinu na exocytózu kortikálních granul v oocytech prasete.

Oocyty prasete byly po 46 hodinách *in vitro* zrání zbaveny kumulárních buněk a rozděleny do čtyř skupin, jedné experimentální a tří kontrolních:

Experimentální skupina:

CsA + CaIo – Oocyty byly kultivovány v přítomnosti cyklosporinu A dvě hodiny. Následně byly opláchnuty a partenogeneticky aktivovány kalcium ionoforem 5 minut a znovu opláchnuty. Poté byly kultivovány *in vitro* v kultivačním médiu další dvě hodiny.

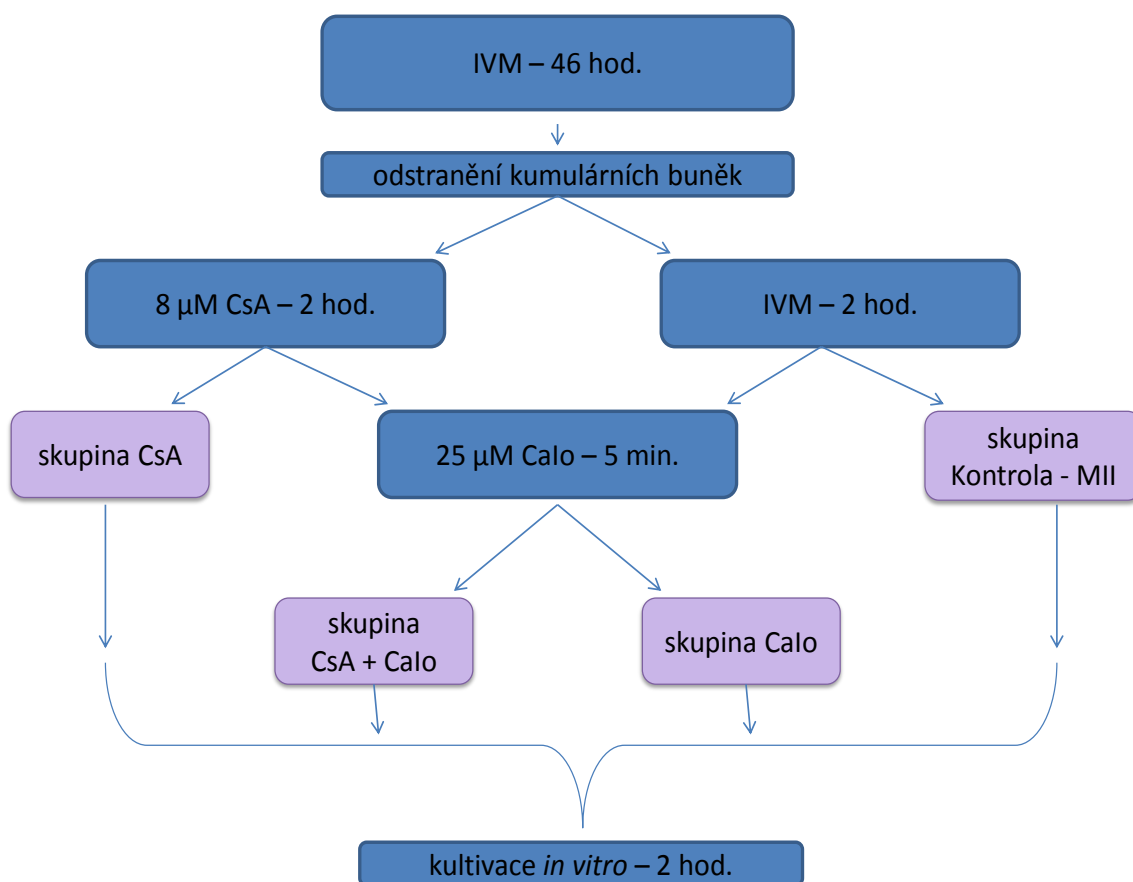
Kontrolní skupiny:

CsA – Oocyty byly ošetřeny cyklosporinem A po dobu dvou hodin, poté byly opláchnuty a kultivovány další dvě hodiny v kultivačním médiu

CaIo – Oocyty byly kultivovány další dvě hodiny v kultivačním médiu bez přídavku inhibitoru a poté byly partenogeneticky aktivovány kalcium ionoforem. Po opláchnutí oocytů následovala dvouhodinová kultivace *in vitro* v kultivačním médiu.

Kontrola – MII – Oocyty zbavené kumulárních buněk byly kultivovány *in vitro* další 4 hodiny v kultivačním médiu bez přidání inhibitoru či kalcium ionoforu.

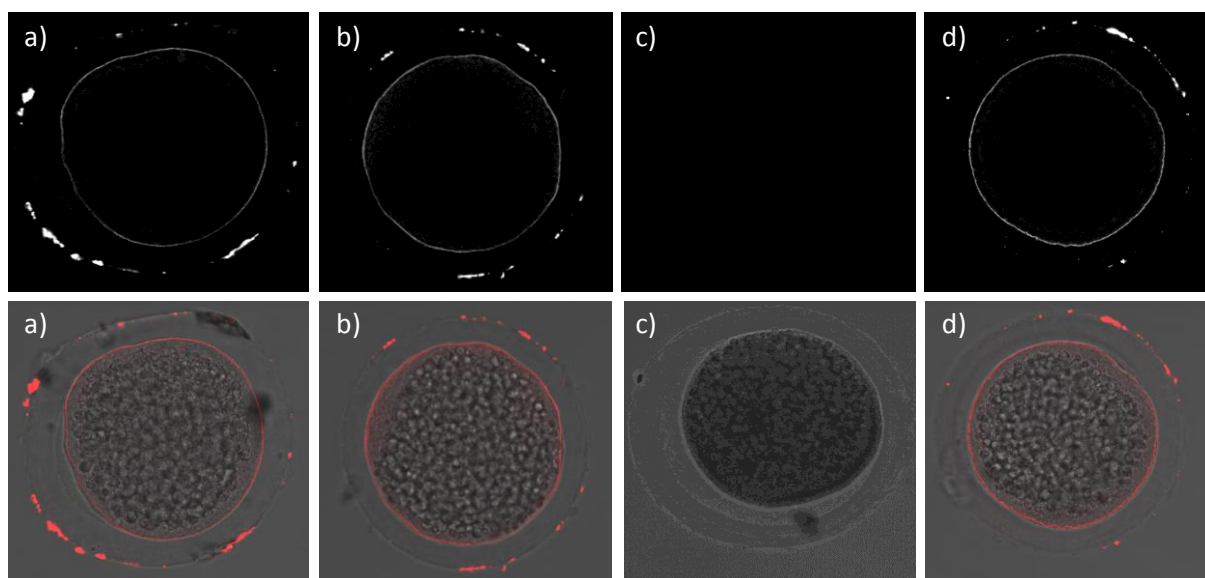
Obrázek 6: Schéma experimentu.



5 Výsledky

Cílem tohoto experimentu bylo zjistit, zda je protein kalcineurin zapojen do exocytózy kortikálních granul. Kortikální granula byla pozorována u oocytů nacházejících se v metafázi druhého meiotického dělení kontrolní skupiny (Obr. 7d), ale i v oocytech ošetřených inhibitorem kalcineurinu – cyklosporinem A (Obr. 7b). Pokud byly oocyty ošetřeny kalcium ionoforem (CaIo), došlo u nich k partenogenetické aktivaci a s ní související kortikální reakci, tudíž kortikální granula nebylo možné pod oolemou lokalizovat (Obr. 7c). Pokud však byly oocyty vystaveny před partenogenetickou aktivací účinkům cyklosporinu A, exocytóza kortikálních granul nenastala (Obr. 7a).

Obrázek 7: Distribuce kortikálních granul *in vitro* zralých prasečích oocytech po ošetření cyklosporinem A a kalcium ionoforem.



(a) Oocyty ošetřené cyklosporinem A aktivované kalcium ionoforem. (b) Oocyty ošetřené cyklosporinem A. (c) Oocyty aktivované kalcium ionoforem. (d) Kontrola – neošetřené oocyty ve stádiu MII. Červeně jsou značena kortikální granula pomocí PNA-Alexa Fluor 568. Oocyty byly snímány v ekvatoriální rovině. Zvětšení 400x.

Oocyty v MII z kontrolní skupiny vykazovaly podobné hodnoty jasů kortikálních granul jako oocyty, které byly ošetřeny cyklosporinem A a následně aktivované kalcium ionoforem nebo oocyty ošetřené pouze CsA. Naopak suma jasů kortikálních granul byla

signifikantě nižší u oocytů, které byly pouze aktivovány kalcium inoforem, to znamená, že u této skupiny oocytů se exocytóza CG vyskytovala v nejvyšší míře (Tab. 2).

Tabulka 2: Suma jasu kortikálních granul v *in vitro* zralých prasečích oocytech ošetřených cyklosporinem A a kalcium inoforem.

Skupina	N	Suma jasu CG
CsA + Ca-Io	43	69 510 ± 12 397 ^a
CsA	33	118 960 ± 26 672 ^b
Ca-Io	33	15 195 ± 7 170 ^c
Kontrola-MII	27	101 921 ± 38 111 ^{ab}

CG = kortikální granula; CsA = cyklosporin A; Ca-Io = kalcium ionofor A23187; M II = oocyty v metafázi druhého meiotického dělení; N = počet hodnocených oocytů.

Data jsou prezentována jako průměr ± směrodatná odchylka. Signifikantní rozdíly na hladině $P < 0,05$ mezi jednotlivými skupinami jsou označeny superskripty ^{a, b, c}.

Na základě sumy jasu kortikálních granul byla stanovena míra exocytózy kortikálních granul. U partenogeneticky aktivovaných oocytů, které nebyly ošetřeny CsA, byla zaznamenána kompletní exocytóza CG v 83,9 %. Zatímco u oocytů, jež byly před aktivací ošetřeny inhibítorem kalcineurinu, nastala kompletní exocytóza CG pouze u 2,6 %. U oocytů ošetřených pouze cyklosporinem A a u oocytů v metafázi druhého meiotického dělení bez jakéhokoli ošetření, nebyla kompletní exocytóza CG zaznamenána v žádném případě (Tab. 3). Za kompletní byla exocytóza považována, pokud vykazovala sumu jasu CG od 0 do 25 000. Žádná exocytóza byla definována sumou jasu CG od 75 000 výše a této definici odpovídalo 38,5 % oocytů ošetřených CsA a následně aktivovaných kalcium inoforem, 82,8 % oocytů ošetřených pouze CsA, 65,0 % oocytů v metafázi II kontrolní skupiny a 0 % oocytů aktivovaných kalcium inoforem bez předchozího ošetření CsA. Výsledky tedy ukazují, že ošetření oocytů cyklosporinem A před partenogenetickou aktivací, vede k signifikantnímu snížení úrovně kortikální reakce v porovnání s oocyty, které cyklosporinem ošetřeny nebyly.

Tabulka 3: Míra exocytózy kortikálních granul v *in vitro* zralých prasečích oocytech ošetřených cyklosporinem A a kalcium ionoforem.

Skupina	N	Kompletní exocytóza (%)	Účinná exocytóza (%)	Začínající exocytóza (%)	Žádná exocytóza (%)
CsA + Ca-Io	39	2.6 ^a	10.3	48.6 ^a	38.5 ^a
CsA	29	0.0 ^a	6.9	10.3 ^{ab}	82.8 ^b
Ca-Io	31	83.9 ^b	16.1	0.0 ^b	0.0 ^c
Kontrola-MII	20	0.0 ^a	0.0	35.0 ^a	65.0 ^{ab}

CG = kortikální granula; CsA = cyklosporin A; Ca-Io = kalcium ionofor A23187; M II = oocyty v metafázi druhého meiotického dělení; N = počet hodnocených oocytů.

Signifikantní rozdíly na hladině $P < 0,05$ mezi jednotlivými skupinami jsou označeny superskripty ^{a, b, c}.

6 Diskuze

Naše experimenty prokázaly, že se protein kalcineurin účastní exocytózy kortikálních granul během aktivace oocyty prasete.

Kortikální granula vznikají během oogeneze z Golgiho aparátu a jsou translokována do kortikální oblasti oocyty v průběhu jeho zrání (Longo a Chen, 1985). V kontrolní skupině našeho experimentu, byla kortikální granula ve zralých oocytech prasete pozorována též a to v oblasti pod oolemou, kde jsou uchycena pomocí vrstvy aktinových vláken (Longo a Chen, 1985). Během kortikální reakce dochází zkracováním aktinových vláken k fúzi kortikálních granul s oolemou oocyty (Williams, 2002). V přirozených podmínkách je kortikální reakce vyvolána penetrací spermie do oocyty. Spermie aktivuje sérii intracelulárních signálních drah, které vyvolají aktivaci oocyty včetně zmíněné exocytózy CG. Vzhledem k tomu, že kalcium ionofor indukují exocytózu CG, zatímco BAPTA (1,2-bis (o-aminofenoxy) ethan-N,N,N',N'-tetraoctová kyselina) a chelátory vážící vápník tento děj inhibují, dá se předpokládat, že zvýšení cytosolické hladiny vápníku je pro exocytózu CG nutné (Liu, 2011). I v našich experimentech byla u oocytů ošetřených kalcium ionoforem zaznamenána kompletní kortikální reakce a nebyla pozorována žádná kortikální granula uložená pod oolemou aktivovaných oocytů. Zvýšení hladiny intracelulárního vápníku je *in vivo* podmínkách vyvoláno penetrací spermie vnášejíci do oocyty specifickou fosfolipázu C zeta (PLC ζ ; Liu, 2011). PLC ζ štěpí v oocyty fosfatidylinositol-4,5-bisfosfát (PIP $_2$) na diacylglycerol (DAG) a inositol 1,4,5-trifosfát (IP $_3$). IP $_3$ se váže na IP $_3$ receptory endoplazmatického retikula, což uvolní zásoby Ca $^{2+}$ do cytoplazmy oocyty (Ito a Kashiwazaki, 2012). Uvolněný vápník se váže na protein kalmodulin, který reguluje aktivitu mnoha dalších proteinů, včetně kalmodulin dependentní kinázy (CaMKII) a různých fosfatáz (Williams, 2002). CaMKII, která je prostřednictvím kalmodulinu citlivá na frekvence oscilace Ca $^{2+}$, přímo aktivuje APC a podporuje degradaci CSF. CSF tedy dále neinhubuje APC a může dojít ke snížení aktivity MPF a v důsledku toho je ukončena MII fáze a meióza může být dokončena. Oscilace Ca $^{2+}$ zabraňuje návratu MPF do aktivního stavu (Heytens *et al.*, 2008b). CaMKII se mimo jiné zřejmě podílí i na exocytóze kortikálních granul (Williams, 2002).

Zatímco nutnost CaMKII pro dokončení meiózy je zdokumentována, úloha kalcineurinu při aktivaci oocytů zatím příliš studována nebyla. Nishiyama *et al.* (2007) provedli experiment, v němž přidali k bezbuněčnému extraktu z neoplodněných oocytů *Xenopus laevis* vápník a bezprostředně potom pozorovali přechodnou aktivaci kalcineurinu,

kteřá byla schopna indukovat prolomení bloku MII. Je-li aktivaci kalcineurinu zabráněno znemožněním degradace cyklinu B, zůstává chromatin spermií inkubovaných v extraktech oocytů kondenzovaný. Podobně, pokud je kalcineurin inhibován v neporušených oocytech *Xenopa*, výstup z MII se nepodaří. Nutné ovšem je, aby byl kalcineurin aktivován jen přechodně. Jestliže nedojde k jeho následné inaktivaci je zabráněno růstu astry spermie a samčí a samičí prvojádra se k sobě nepřiblíží (Nishiyama *et al.*, 2007). Inhibitory kalcineurinu, jako je cyklosporin A způsobí zpoždění ubikvitinace cyklinu, celkovou defosforylaci specifických fosfoproteinů metafáze a opětovnou tvorbu plně funkční jaderné membrány. Kalcineurin navíc reguluje funkci IP₃R změnou fosforylačního statusu (Cameron *et al.*, 1995), tedy by mohl mít roli i v regulaci oscilací vápníku typických pro aktivaci oocyty (Williams, 2002). U raka způsobí inhibice kalcineurinu zvýšení fosforylace aktinu a tubulinu v CNS (Silverman-Gavrila and Charlton, 2009), což naznačuje možný vliv kalcineurinu na fosforylaci cytoskeletu. Tudiž by kalcineurin mohl být zapojen do organizace mikrotubulů při tvorbě mikrotubulární sítě důležité pro migraci prvojader (Schatten, 1994) a též by mohl hrát roli v zkracování aktinových filament během exocytózy kortikálních granul. V našich experimentech jsme testovali vliv cyklosporinu A na exocytózu kortikálních granul a míru této reakce v oocytech prasete. U *in vitro* zralých oocytů, které byly cyklosporinem ošetřeny, neproběhla v 83 % žádná kortikální reakce. V případě, že byly oocyty po ošetření cyklosporinem aktivovány pomocí kalcium ionoforu, míra exocytózy kortikálních granul se zvýšila o 40 %. Přesto však zůstávala signifikantně nižší než u oocytů ošetřených pouze kalcium ionoforem, neboť zde prošlo kompletní kortikální reakcí 84 % oocytů.

V oocytech ošetřených cyklosporinem A a následně aktivovaných kalcium ionoforem byla měřena suma jasu kortikálních granul a následně porovnáována s oocyty kontrolních skupin. Oocyty ze skupiny, která byla pouze aktivována kalcium ionoforem bez předchozí kultivace s cyklosporinem A, vykazovaly velice nízkou úroveň jasu kortikálních granul a ve většině případů nebyla kortikální granula pozorována vůbec. Naopak v oocytech ošetřených cyklosporinem A, byla CG zaznamenána a jejich úroveň jasu byla prokazatelně vyšší. Tyto výsledky naznačují zapojení kalcineurinu do regulace exocytózy kortikálních granul. To by korespondovalo i s výsledky lokalizace kalcineurinu v oocytech prasete. Během zrání se významně zvýšila intenzita fluorescence obou podjednotek kalcineurinu v korové oblasti oocyty a to zejména u oocytů nacházejících se v metafázi II (Tůmová *et al.*, 2013).

Navíc je potvrzeno, že kalcineurin se účastní exocytózy i u jiných buněčných typů. Bennett *et al.* (2010) popisují jeho úlohu při akrozomální exocytóze u lidských spermií.

Použitím specifické protilátky, která rozpoznává defosorylovaný synaptotagmin VI, zjistili, že kalcium dependentní defosforylace tohoto proteinu nastala v raných fázích akrozomální exocytózy. Synaptotagmin je jedním z v-SNARE proteinů, které jsou lokalizovány na membráně sekrečního váčku a aby mohlo dojít k exocytóze, musí vytvořit pevný komplex s proteiny třídy t-SNARE, které leží v plazmatické membráně buňky (Liu, 2011). Fosfatázou zodpovědnou za defosforylaci synaptotagminu je kalcineurin a jeho aktivita je naprosto nezbytná během časných kroků sekrečního procesu (Bennett *et al.*, 2010). Tash *et al.* (1988) potvrdil výskyt obou podjednotek kalcineurinu ve spermiích psa, prasete a mořského ježka. Kalcineurin byl lokalizován v bičíku a postakrozomálním oddílu hlavičky. Ve své práci uváděli, že by mohl být podstatný pro regulaci motility bičíku.

Na základě výsledků lze říci, že se kalcineurin podílí na řízení exocytózy kortikálních granul, která je součástí složitého procesu aktivace oocyty. Přesný mechanismus jeho působení však není znám a pro jeho porozumění bude zapotřebí provést další experimenty.

7 Závěr

Cílem diplomové práce bylo zjistit, zda se protein kalcineurin, neboli fosfatáza 2B podílí na exocytóze kortikálních granul u partenogeneticky aktivovaných prasečích oocytů. Experiment byl vyhodnocován pomocí konfokálního mikroskopu, dle intenzity jasu imunofluorescenčně značených kortikálních granul prasečích oocytů.

Výsledky analýzy obrazu a následné statistické vyhodnocení ukazují, že oocyty ošetřené cyklosporinem A před partenogenetickou aktivací, vykazují signifikantně vyšší intenzitu jasu v porovnání s oocyty, které cyklosporinem A ošetřeny nebyly. Míra exocytózy kortikálních granul byla tedy u skupiny oocytů inhibovaných během aktivace významně nižší, neboť kompletní exocytóza CG nastala pouze u 2,6 %, zatímco u aktivovaných oocytů bez ošetření cyklosporinem A proběhla kortikální reakce u 83,9 %. Inhibice kalcineurinu před partenogenetickou aktivací oocytu tedy prokazatelně vede ke snížení úrovně kortikální reakce.

Na základě výsledků se dá předpokládat, že má kalcineurin svůj podíl na regulaci procesu exocytózy kortikálních granul v průběhu aktivace oocytu prasete. Přesný mechanismus jeho působení však není znám a pro jeho porozumění budou nutné další studie.

8 Seznam literatury

- Alberts, B., Bray, D., Johnson, A., Lewis, J., Raff, M., Roberts, K., Walter, P. 1998. *Základy buněčné biologie: Úvod do molekulární biologie buňky*. Espero Publishing. ISBN: 8090290620.
- Bennett, J. C., Roggero, C. M., Mancifesta, F. E., Mayorga, L. S. 2010. Calcineurin-mediate Dephosphorylation of Synapotagmin VI Is Necessary for Acrosomal Exocytosis. *Cell Biology*, 285 (34), 26269-26278.
- Bielañska-Osuchowska, Z. 2006. Oogenesis in pig ovaries during the prenatal period: ultrastructure and morphometry. *Reproductive biology*, 6 (2), 161–193.
- Black, J. L., Erickson, B. H. 1968. Oogenesis and ovarian development in the prenatal pig *Anatomical Record*, 161, 45– 56.
- Blanco, M. R., Demyda, S., Moreno Millán, M., Genero, E. 2011. Developmental competence of in vivo and in vitro matured oocytes: A review. *Biotechnology and Molecular Biology Review*, 6 (7), 155–165.
- Boland, N. I., Humpherson, P. G., Leese, H. J., Gosden, R. G. 1994. The effect of glucose metabolism on murine follicle development and steroidogenesis in vitro. *Human. Reproduction*, 9, 617–623.
- Brackett, B. G. 1985. In vitro oocyte maturation and fertilization. *Journal of animal science*, 61 (3), 14–24.
- Cameron, A. M., Steiner, J. P., Roskams, A. J., Ali, S. M., Ronnett, G. V., Snyder, S. H. 1995. Calcineurin associated with the inositol 1,4,5-trisphosphate receptor-FKBP12 complex modulates Ca²⁺ flux. *Cell*, 83 (3), 463-472.
- Cecconi S., D'Aurizio R., Colonna R. 1996. Role of antral follicle development and cumulus cells on in vitro fertilization of mouse oocytes. *Journal of Reproduction nad Fertility*, 107, 207–214.
- Čech, S., Horký, D., Sedláčková. 2009. *Přehled embryologie člověka. Učební text a atlas. Podpořeno FRVŠ České republiky. č. projektu 1014/2009 (F3/d)*
- Ducibella, T. 1996. The cortical reaction and development of activation competence in mammalian oocytes. *Human Reproduction Update*, 2 (1), 29–42.
- Edson, M. A., Nagaraja, A., K., Matzuk, M., M. 2009. The mammalian ovary from genesis to revelation. *Endocrine Reviews*, 30 (6), 624–712.
- Epigg, J. J. 2001. Oocyte control of ovarian follicular development and function in mammals. 2001. *Reproduction*, 122, 829–838.

- Faddy, M., Gosden, R. 2007. Numbers of Ovarian Follicles and Testing Germ Line Renewal in the Postnatal Ovary. *Cell Cycle*, 6(15), 1951-195.
- Ferenčík, M., Rovenský, J., Shoenfeld, Y., Mařha, V. 2005. Imunitní systém – Informace pro každého. Grada Publishing, a.s. Praha. 236 s. ISBN: 8024711966.
- Florman H. M., Ducibella, T. 2006. Knobil and Neill's Physiology of Reproduction. 3rd ed. Elsevier. ISBN: 0125154011.
- Galeati, G., Modina, S., Lauria, A., Mattioli, M. 1991. Follicle somatic cells influence pig oocyte penetrability and cortical granule distribution. *Molecular Reproduction and Development*, 29 (1), 40–46.
- Ginsburg, M., Snow, M. H., McLaren, A. 1990. Primordial germ cells in the mouse embryo during gastrulation. *Development*, 110, 521–528.
- Guraya, S. S. 2008. Cellular and molecular biology of human oogenesis, ovulation and early embryogenesis. New age publishers. New Delhi. ISBN: 8122422497.
- Herlands, R. L., Schultz, R. M. (1984). Regulation of mouse oocyte growth: probable nutritional role for intercellular communication between follicle cells and oocytes in oocyte growth. *Journal of Experimental Zoology*, 239, 317–325.
- Heytens, E., Parrington, J., Lambrecht, S., Young, C., Coward, K., Cuvelier C, et al. 2008a. First evidence of disturbed expression of the oocyte-activating factor PLCzeta in globozoospermic men. *Human Reproduction*, 23, 103.
- Heytens, E., Soleimani, R. D., De Sutter, P., 2008b. Oocyte activation: The impact of calcium signals on fertilization. *Iranian Journal of Reproductive Medicine*, 6 (4), 171-174.
- Hogan, P. G., Li, H. 2005. Calcineurin. *Current Biology*, 15 (12), R442 – R443.
- Hunter, M. G. 2000. Oocyte maturation and ovum quality in pigs. *Reviews of Reproduction*, 5, 122-130.
- Hudson, M. B., Price, S. R. 2013. Calcineurin: A poorly understood regulator of muscle mass. *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology*, 45, 2173–2178.
- Hurk, R., Zhao, J. 2005. Formation of mammalian oocytes and their growth, differentiation and maturation within ovarian follicles. *Theriogenology*, 63, 1717–1751.
- Ito, J., Kashiwazaki, N. 2012. Molecular mechanism of fertilization in the pig. *Animal Science Journal*, 83, 669–682.
- Jain, J., Mccaffrey, P. G., Miner, Z., Kerppola T. K., Lambert, J. N., Verdine, G. L., Curran, T., Rao, A. 1993. The T-cell transcription factor NFATp is a substrate for calcineurin and interacts with Fos and Jun. *Nature*, 365, 352-355.
- Jessus, C., Haccard, O. 2007. Fertilization: Calcium's double punch. *Nature*, 449, 297-298.

- 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), 139-145.
- 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, 145-150.
- 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 (2), 303-15.
- Jones, T. J. 2005. Mammalian egg activation: from Ca²⁺ spiking to cell cycle progression. *Reproduction*, 130, 813–823.
- Kempisty, B., Jackowska, M., Bukowska, D., Antosik, P., Wozna, M., Piotrowska, H., Swierczewska, M., Jaskowski, J. M. 2011. Mechanisms regulating oogenesis, folliculogenesis and fertilization in pigs. *Medycyna weterynaryjna*, 67 (5), 299–303
- Kerr, J. B., Duckett, R., Myers, M., Britt, K. L., Mladenovska, T., Findlay, J. K. 2006. Quantification of healthy follicles in the neonatal and adult mouse ovary: evidence for maintenance of primordial follicle supply. *Reproduction*, 132 (1), 95-109.
- Klee, C. B., Ren, H., Wang, X. 1998. Protein Phosphatase, Calcineurin Regulation of the Calmodulin-stimulated. *The journal of biological chemistry*, 73 (22), 13367–13370.
- Li, X., Zhu, L., Yang, A., Lin, J., Tang, F., Jin, S., Wei, Z., Li, J., Jin, Y. 2011. Calcineurin-NFAT Signaling Critically Regulates Early Lineage Specification in Mouse Embryonic Stem Cells and Embryos. *Cell Stem Cell*, 8, 46–58.
- Liu, M. 2011. The biology and dynamics of mammalian cortical granules. *Reproductive Biology and Endocrinology*, 9, 149.
- Longo, F. J., Chen, D. Y., 1985. Development of cortical polarity in mouse eggs: Involvement of the meiotic apparatus. *Development Biology*, 107 (2), 382-394.
- Marek, J., a kolektiv. 2010. *Farmakoterapie vnitřních nemocí*. 4. vyd. Grada Publishing, a.s. Praha. 808 s. ISBN: 9788024726397.
- Mochida, S., Hunt, T. 2007. Calcineurin is required to release *Xenopus* egg extracts from meiotic M phase. *Nature*, 449, 336-341.
- 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, 323-328.

- Motlík J., Fulka J. 1986. Factors affecting meiotic competence in pig oocytes. *Theriogenology*, 25, 87-96.
- Nishiyama, T., Yoshizaki, N., Kishimoto, N., Ohsumi, K. 2007. Transient activation of calcineurin is essential to initiate embryonic development in *Xenopus laevis*. *Nature*, 449, 341-345.
- Nixon, B., Aitken, J. R., McLaughlin, E. A. 2007. New insights into the molecular mechanisms of sperm-egg interaction. *Cellular and Molecular Life Sciences*, 64, 1805-1823.
- Oktaý, K., Nugent, D., Newton, H., Salha, O., Gosden, R. G. 1997. Isolation and characterization of primordial follicles from fresh and cryopreserved human ovarian tissue. *Fertility and Sterility*, 67, 481-486.
- Petr, J., Rajmon, R., Rozínek, J., Sedmíková, M., Jeřeta, M., Chmelíková, E., Švestková, D., Jílek, F. 2005. Activation of pig oocytes using nitric oxide donors. *Molecular Reproduction and Development*, 71 (1), 115-122.
- Petr, J., Chmelíková, E., Tůmová, L. 2007. The role of nitric oxide in parthenogenetic activation of pig oocytes: A review. *Czech Journal of Animal Science*, 52 (11), 363-377.
- 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(1), 134-142.
- Picton, H., Briggs, D., Gosden, R. 1998. The molecular basis of oocyte growth and development. *Molecular and Cellular Endocrinology*, 145, 27-37.
- 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), 725-734.
- Romar, R., Coy, P., Gadea, J., Rath, D., 2005. Effect of oviductal and cumulus cells on zona pellucida and cortical granules of porcine oocytes fertilized *in vitro* with epididymal spermatozoa. *Animal Reproduction Science*, 85, 287-300.
- Rusnak, F., Mertz, P. 2000. Calcineurin: Form and function. *Physiological Reviews*, 80 (4), 1483-1521.
- Sartain, C. V., Wolfner, M. F. 2013. Calcium and egg activation in *Drosophila*. *Cell Calcium*, 53, 10-15.

- Sathananthan, A. H., Trounson, A. O., Wood, C. 1986. Atlas of fine structure of human sperm penetration. Eggs and embryos cultured in vitro. Praeger Publisher. New York.
- Sedmíková, M., Burdová, J., Petr, J., Etrych, M., Rozinek, J., Jílek, F., 2003. Induction and activation of meiosis and subsequent parthenogenetic development of growing pig oocytes using calcium ionophore A23187. *Theriogenology*, 60, 1609-1620.
- Site, J., Fox, D. 2007. Calcineurin regulation in fungi and beyond. *Eukaryotic Cell*, 7(2), 177-186.
- Skinner, M. K. 2005. Regulation of primordial follicle assembly and development. *Human Reproduction Update*, 11 (5), 461–471.
- Smitz, J. E. J., Cortvrindt, R. G. 2002. The earliest stages of folliculogenesis *in vitro*. *Reproduction*, 123, 185–202.
- 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), 947&.
- Sun, Q. Y., Nagai, T. 2003. Molecular mechanisms underlying pig oocyte maturation and fertilization. *Journal of Reproduction and Development*, 49 (5), 347-359.
- Tabata, Ch., Ogita, K., Sato, K., Nakamura, H., Qing, Z., Negoro, H., Kumasawa, K., Temma-Asano, K., Tsutsui, T., Nishimori, K., Kimura, T. 2009. Calcineurin/NFAT Pathway: A Novel Regulator of Parturition. You have full text access to this content *American Journal of Reproductive Immunology*, 62, 44-50.
- 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, 1435-1440.
- 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, 957–967.
- 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, 1625-1633.
- Tůmová, L., Petr, J., Žalmanová, T., Chmeliková, E., Kott, T., Tichovska, H., Kučerová-Chrpová, V., Hošková, K., Jílek, F. 2013. Calcineurin expression and localisation during porcine oocyte growth and meiotic maturation. *Animal Reproduction Science*, 141, 154–163.
- Vacek, Z. 2006. Embryologie. Grada Publishing, a.s. Praha. 255 s. ISBN: 978-80-247-1267-3

- Veronina, E., Wessel, G. M. 2003. The Regulation of Oocyte Maturation. *Current Topics in Developmental Biology*, 58, 53-110.
- Visser, J. A., de Jong, F. H., Laven, J. S. E., Themmen, A. P. N. 2006. Anti-müllerian hormone: a new marker for ovarian function. *Reproduction*, 131, 1 – 9.
- Voronina, E., Wessel, G. M. 2003. The regulation of oocyte maturation. *Elsevier*, 58, 53-110.
- Wang, X. T., Culotta, V. C., Klee, C. B. 1996. Superoxide dismutase protect calcineurin from inactivation. *Nature*, 383, 434-437.
- Wang, B. J., Zhang, P., Wei, Q. 2008. Recent progress on the structure of Ser/Thr protein phosphatases. *Science in China Series C: Life Sciences*, 51 (6), 487-494.
- Wassarman, P. M. 1999. Mammalian fertilization: molecular aspects of gamete adhesion, exocytosis, and fusion. *Cell*, 96, 175-83.
- Wassarman, P. M., Albertini D. F. 1994. The mammalian ovum. The physiology of reproduction. 2nd. ed. Raven Press. New York.
- Wessel, G. M., Brooks, J. M., Green, E., Haley, S., Voronina, E., Wong, J., Zaydfudim, V., Conner, S. 2001. The biology of cortical granules. *International Review of Cytology*, 209, 117–206.
- Whitaker, M., Larman, M. G. 2001. Calcium and mitosis. *Semin. Cell Development Biology*, 122, 53–58.
- Williams, C. J. 2002. Signalling mechanisms of mammalian oocyte activation. *Human Reproduction Update*, 8 (4), 313–321.
- Xia, P., Wang, Z., Yang, Z., Tan, J., Qin, P. 2001. Ultrastructural study of polyspermy during early embryo development in pigs, observed by scanning electron microscope and transmission electron microscope. *Cell and Tissue Research*, 303, 271–275.
- Ye, Q., Feng, Y., Yinc, Y., Faucher, F., Currie, M. A., Rahman, M. N., Jin, J., Li, S., Wei Q., Jia Z. 2013. Structural basis of calcineurin activation by calmodulin. *Cellular Signalling*, 25, 2661–2667.
- Zhou B., Cron R. Q., Wu B., Genin A., Wang Z., Liu S., Robson P., Baldwin H. S. 2002. Regulation of the murine *Nfatc1* gene by NFATc2. *The Journal of Biological Chemistry*, 277 (12), 10704-11.
- Zukerman, S. 1951. The number of oocytes in the mature ovary. *Recent Progress Hormonal Research*, 6, 63.

9 Seznam zkratek a symbolů

- AI – autoinhibiční doména kalcineurinu
- AMH – antimülleriánský hormon (antimüllerian hormone)
- AMP – adenosin monofosfát APC – anafázi podporující komplex (anaphase promoting complex)
- BBH – CnB vazebná doména kalcineurinu
- CaMKII – kalmodulin dependentní kináza II
- cAMP – cyklický adenosin monofosfát
- CBD – kalmodulin vazebná doména kalcineurinu
- CG – kortikální granula (cortical granules)
- cGMP – cyklický guanosin monofosfát
- CnA – kalcineurinová podjednotka A
- CnB – kalcineurinová podjednotka B
- CR – kortikální reakce (cortical reaction)
- CsA – cyklosporin A
- CSF – cytostatický faktor (cytostatic factor)
- DAG – diacylglycerol
- DNA – deoxyribonukleová kyselina
- ER – endoplazmatické retikulum
- FK506 – takrolimus, imunosupresivum
- FKBP – FK506 vázající protein (FK506 binding protein)
- FSH – folikulostimulační hormon
- GV – zárodečný váček (germinal vesicle)
- GVBD – zánik zárodečného váčku (germinal vesicle breakdown)
- IP₃ – inositol trifosfát
- IP₃R – inositol trifosfátový receptor
- LH – luteinizační hormon
- MI – první meiotická metafáze
- MII – druhá meiotická metafáze
- MAP/MAPK – mitogenem aktivovaný protein/aktivovaná protein kináza (mitogen-activated protein/kinase)
- MPF – faktor podporující metafázi (metaphase promoting factor)
- NFAT – jaderný faktor aktivovaných T-buněk (nuclear factor of activated T-cell)

OMI – inhibitory zrání oocytů (oocyte maturation inhibitors)

p34cdc2 – katalytická podjednotka MPF

PGC – primordiální zárodečné buňky (primordial germ cells)

PIP₂ – fosfatidylinositol-4,5-bisfosfát (phosphatidylinositol-4,5-bisphosphate)

PKA – protein kináza A

PKC – protein kináza C

PLC ζ – fosfolipáza C zeta

PP2B – protein fosfatáza 2B (calcineurin)

RCAN – rodina proteinů regulující calcineurin (regulator of calcineurin)

RNA – ribonukleová kyselina (mRNA – mediátorová RNA)

Sra – protein Sarah kódující genem *sra*

ZP – *zona pellucida*

10 Seznam obrázků

Obrázek 1: Oogeneze a folikulogeneze (str. 5)

Obrázek 2: Události vedoucí k meiotickému bloku (str. 11)

Obrázek 3: Aktivace oocyty (str. 14)

Obrázek 4: Mechanismus exocytózy CG (str. 17)

Obrázek 5: Krystalická struktura kalcineurinu v komplexu s FKBP12-FK506 (str. 19)

Obrázek 6: Schéma experimentu (str. 32)

Obrázek 7: Distribuce kortikálních granul u jednotlivých skupin oocytů (str. 33)

11 Seznam tabulek

Tabulka 1: Složky obohacující médium M199 pro IVM oocytů prasete (str. 29)

Tabulka 2: Intenzita jasu CG *in vitro* zralých prasečích oocytů ošetřených cyklosporinem A a kalcium ionoforem. (str. 34)

Tabulka 3: Míra exocytózy CG *in vitro* zralých prasečích oocytů ošetřených cyklosporinem A a kalcium ionoforem. (str. 34)