

**Česká zemědělská univerzita v Praze**

**Fakulta agrobiologie, potravinových a přírodních zdrojů**

**Katedra veterinárních disciplín**



**Vliv inhibice kalcineurinu na meiotické zrání oocytu  
prasete**

**Diplomová práce**

**Vedoucí práce: doc. Ing. Eva Chmelíková, Ph.D.**

**Autor práce: Bc. Šárka Půbalová**

© 2015 ČZU v Praze

### **Čestné prohlášení**

Prohlašuji, že svou diplomovou práci: „Vliv inhibice kalcineurinu na meiotické zrání oocytu 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

---

### **Poděkování**

Ráda bych touto cestou poděkovala doc. Ing. Evě Chmelíkové, Ph.D. především za odborné vedení a za poskytnutí cenných rad při zpracování této práce.

# Vliv inhibice kalcineurinu na meiotické zrání oocytu prasete

## Souhrn

Meiotické zrání je řízeno celou řadou signálních molekul, mezi které patří také fosfatáza 2B, kalcineurin. O kalcineurinu je známo, že reguluje meiotické zrání oocytů mouchy rodu *Drosophila* a žáby rodu *Xenopus*. Naše práce poprvé prokázala expresi kalcineurinu v oocytu prasete, kde jsme detekovali obě známé podjednotky kalcineurinu, katalytickou podjednotku A a regulační podjednotku B. Dále byla sledována úloha kalcineurinu v oocytu prasete pomocí jeho inhibice pyretroidy a nepyretroidy. Byl zkoumán vliv pyretroidu fenvalerátu a nepyretroidu hymenistatinu na meiotické zrání prasečích oocytů *in vitro*. Testovanými látkami inhibujícími kalcineurin bylo ovlivněno meiotické zrání oocytů. Pozorovaný efekt byl závislý na stupni meiotické kompetence oocytů. U rostoucích oocytů s částečnou meiotickou kompetencí bylo meiotické zrání stimulováno. U plně dorostlých oocytů s úplnou meiotickou kompetencí došlo naopak ke zpoždění zrání.

**Klíčová slova:** prase, oogeneze, oocyt, meiotické zrání, fosfatáza 2B, kalcineurin

# The effect of calcineurin inhibition on meiotic maturation of porcine oocyte

## Summary

Meiotic maturation is regulated by many signal molecules, including phosphatase 2B, calcineurin. Calcineurin regulates meiotic maturation of *Drosophila* fly oocytes and *Xenopus* frog oocytes. Our work has shown for the first time the expression of calcineurin in pig's oocyte, in porcine oocytes we detected both calcineurin protein subunits; catalytic A subunit and regulatory B subunit. Also we examined the role of calcineurin in pig's oocyte through inhibition of pyrethroid and non-pyrethroid. We examined the effect of pyrethroid fenvalerate and non - pyrethroid hymenistatin on meiotic maturation of pigs' oocytes *in vitro*. Meiotic maturation of oocytes was influenced by the tested substances inhibiting calcineurin. The observed effect depended on the level of meiotic competence of oocytes. The meiotic maturation was stimulated at growing oocytes with partial meiotic competence. On the other hand there was delayed maturation at fully grown oocytes with full meiotic competence.

**Keywords:** pig, oogenesis, oocyte, meiotic maturation, phosphatase 2B, calcineurin

# OBSAH

1	ÚVOD.....	1
2	HYPOTÉZA A CÍLE PRÁCE .....	2
3	LITERÁRNÍ REŠERŠE .....	3
3.1	Oogeneze a folikulogeneze .....	3
3.1.1	Primordiální zárodečné buňky .....	3
3.1.2	Růstová fáze oocyty.....	5
3.1.3	Získání meiotické kompetence .....	8
3.1.4	Meiotické zrání .....	8
3.2	Faktory regulující meiotické zrání .....	11
3.2.1	MPF (Maturation Promoting Factor) .....	11
3.2.2	MAPK (Mitogen-Activated Protein Kinase) .....	13
3.2.3	Cytostatický faktor.....	14
3.2.4	Cyklické nukleotidy.....	15
3.2.5	Vápník.....	16
3.2.6	Oxid dusnatý (NO).....	17
3.2.7	Sirovodík (H <sub>2</sub> S).....	18
3.3	Kalcineurin.....	18
3.3.1	Struktura kalcineurinu.....	18
3.3.2	Výskyt kalcineurinu v tkáních a jeho izoformy.....	19
3.3.3	Aktivace kalcineurinu a jeho regulace.....	20
3.3.4	Inhibitory kalcineurinu .....	20
3.3.5	Funkce kalcineurinu.....	21
4	MATERIÁL A METODY .....	23
4.1	Odběr vaječníků a izolace oocytů .....	23
4.2	Kultivace oocytů .....	23
4.3	Stanovení kalcineurinu v oocyty metodou Western blot .....	24
4.4	Ošetření oocytů inhibitory kalcineurinu.....	25
4.5	Hodnocení oocytů .....	25
4.6	Experimentální schéma .....	26
4.7	Statistická analýza výsledků .....	26
5	VÝSLEDKY.....	28
5.1	Ověření meiotické kompetence oocytů .....	28

5.2	Detekce proteinu kalcineurinu v prasečím oocytu .....	29
5.3	Vliv inhibitorů kalcineurinu na oocyty ve fázi růstu s částečnou meiotickou kompetencí .....	30
5.4	Vliv inhibitorů kalcineurinu na oocyty s ukončeným růstem .....	32
6	DISKUZE .....	35
7	ZÁVĚR .....	37
8	SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY .....	38
9	SEZNAM POUŽITÝCH ZKRATEK .....	51

# 1 ÚVOD

Prase je vývojově blízké člověku a představuje vhodný modelový organismus. Proto je často využíváno jako biomedicínský model v mnoha oblastech výzkumu. Využívání a výzkum reprodukčních biotechnologií se neustále usilovně rozvíjí, což se odráží i v chovu hospodářských zvířat. U prasat se však využití biotechnologií setkává častěji s některými komplikacemi než u jiných hospodářských zvířat. V oblasti reprodukčních biotechnologií k tomuto faktu může přispívat i nedostatečná znalost přesných mechanismů, které se podílí na řízení procesu zrání oocytů. Meiotické zrání je složitý proces, ve kterém je zapojeno mnoho důležitých faktorů, a ne všechny oocyty mají schopnost meiózu opět zahájit. Vznikají složité signální dráhy, ve kterých mají, mimo jiné, podstatnou roli mnohé kinázy a fosfatázy. V procesu meiotického zrání u savců by mohla mít důležitou roli i fosfatáza 2B, kalcineurin, k jejíž aktivaci jsou nezbytné vápenaté ionty. Bylo prokázáno, že kalcineurin se podílí na řízení meiotického zrání oocytu u žáby rodu *Xenopus* a také u mouchy rodu *Drosophila*. Prozkoumání úlohy kalcineurinu v savčích oocytech by mohlo přispět k lepšímu pochopení procesu jejich zrání. Cílem této diplomové práce je zjistit, jestli se na řízení meiotického zrání oocytu prasete podílí kalcineurin.



## **2 HYPOTÉZA A CÍLE PRÁCE**

Cílem diplomové práce je ověření hypotézy, podle které se na regulaci meiotického zrání oocytu prasete podílí protein s fosfatázovou aktivitou, kalcineurin.

## 3 LITERÁRNÍ REŠERŠE

### 3.1 Oogeneze a folikulogeneze

Oogeneze je proces, během kterého vznikají vajíčka, samičí pohlavní buňky. Vývoj vajíčka začíná v neonatálním vývoji samice a je dokončen až v dospělosti. V průběhu tohoto procesu musí dojít k redukci počtu chromozomů, z diploidního počtu na haploidní. To umožňuje redukční dělení neboli meióza, která je během oogeneze dvakrát přerušena prvním a druhým meiotickým blokem. Během oogeneze dokončí svůj vývoj jen některá vajíčka a v průběhu tohoto procesu jich mnoho zaniká. Oogeneze je obvykle členěna do tří fází – fáze množení, růstu a zrání.

Vajíčko se vyvíjí uvnitř folikulu, který je složen z jedné nebo více vrstev somatických buněk. Folikul je základní funkční jednotkou vaječníku a zajišťuje vajíčku vhodné prostředí pro jeho správný vývoj. Somatické buňky obklopující vajíčko se postupně dělí a tvoří více vrstev, zatímco oocyt roste. Zrání ovariálních folikulů je proces, který se nazývá folikulogeneze (Cheon, 2012).

#### 3.1.1 Primordiální zárodečné buňky

Oogeneze začíná vývojem primordiálních zárodečných buněk (PGCs – Primordial Germ Cells), což je populace buněk, které se objevují během rané embryogeneze. Zárodečné buňky se opakovaně mitoticky dělí a výsledkem je vznik buněk označovaných jako oogonie. Úsek oogeneze, ve kterém dochází k mitotickému dělení, se označuje jako fáze množení (Bielańska-Osuchowska, 2006).

PGCs jsou extraembryonálního původu, zakládají se ve stěně žloutkového váčku, v blízkosti základu allantoisu (Pelosi *et al.*, 2011). Zde se množí a poté odtud migrují dorzálním mezenteriem zadního střeva do stále nediferenciovanych, ale vyvíjejících se gonád. Zatím není zcela jasné, jak dochází k jejich migraci. Zda je tato migrace řízena samotnými PGCs, jejich vlastním pohybem pomocí cytoskeletu nebo je následkem tlaku způsobeného pohybem sousedních tkání, je zatím stále předmětem zkoumání. PGCs mění během svého vývoje své morfologické a biochemické vlastnosti. Při procesu migrace, ale také během počátku osidlování gonád se PGCs značně množí (Palma *et al.*, 2012). Mitotická dělení zárodečných buněk jsou pozorovatelná již od 13. dne embryonálního vývoje asi do 7. dne po narození (Hunter, 2000).

PGCs vstoupí do genitální lišty a tam se v závislosti na pohlavních chromozomech diferencují buď v oogonie, nebo spermatogonie (Edson *et al.*, 2009). Zárodečné buňky se ve vaječnicích mitoticky dělí a později se začínají obklopotovat somatickými buňkami, pravděpodobně odvozených z povrchového epitelu vyvíjejících se gonád nebo z buněk pronikajících z mesonephros.

PGCs se transformují v oogonie. Oogonie vstupují do prvního meiotického dělení pod vlivem různých faktorů, které ještě nebyly zcela objasněny (Palma *et al.*, 2012). Meióza je zahájena profází, která je rozdělena do pěti fází: *leptotene*, *zygotene*, *pachytene*, *diplotene* a *diakineze*. Během profáze dochází k několika klíčovým událostem, zahrnujícím párování homologních chromozomů a jejich rekombinaci neboli „crossing over“. Následně oocyty postoupí do fáze *diplotene* a v tomto okamžiku je meióza poprvé přerušena (Sánchez *et al.*, 2012). V této fázi jsou jednotlivé oocyty (nyní primární oocyty) obklopeny pregranulózními buňkami a společně tak tvoří primordiální folikul (Edson *et al.*, 2009). Oocyty v profázi I setrvávají, dokud nejsou meioticky kompetentní a mohou tedy meiózu dokončit (Sánchez *et al.*, 2012). Během raných fází meiózy, kdy jsou nutné různé transkripční faktory pro správné uspořádání chromozomů a rekombinaci, jsou oocyty velice zranitelné, a proto řada z nich v tuto dobu degeneruje (van den Hurk *et al.*, 2005).

Ke specifickým faktorům, které regulují tvorbu PGCs patří zástupci skupiny TGF $\beta$  (transforming growth factor  $\beta$ ) jako jsou: bone morphogenetic proteins (BMPs), BMP4, BMP8b (ektodermálního původu) a BMP2 (endodermálního původu). Migrace a proliferace PGCs a jejich osídlování vyvíjejících se gonád jsou kontrolovány mnoha faktory a také jsou závislé na interakci PGCs a jejich obklopujících somatických buňkách. *In vitro* studie ukázaly, že BMP2 a BMP4 zvyšují počet PGCs u myši. Activin zas zvyšoval počet PGCs u lidí, zatímco u myši inhiboval jejich množení (Sánchez *et al.*, 2012).

Všeobecně uznávané dogma savčí reprodukční biologie uvádí, že většina savčích samic se rodí s konečnou a neobnovitelnou zásobou zárodečných buněk. Podle tohoto dogmatu se zárodečné buňky mohou množit pouze během prenatalního období a po narození tuto schopnost ztrácí (Greenfeld *et al.*, 2004). Johnson *et al.* (2004) svou prací tuto myšlenku zpochybnili. Ve svých experimentech popisují, že ve vaječnicích myši se nacházejí buňky, které svými vlastnostmi připomínají zárodečné buňky, které by mohly sloužit jako zdroj nových oocytů v dospělosti a mohly by tak nahradit přirozeně zanikající oocyty během oogeneze. Zdůvodňují to faktem, že oocyty zanikají v takové míře, že pokud by nebyla posílena populace zárodečných buněk, tak by zásoba oocytů byla velmi brzy vyčerpána.

- **Primordiální folikuly**

Primordiální folikuly se zakládají během fetálního vývoje a populace těchto folikulů čítá při narození přibližně 500 000. Dokonce už před narozením se mohou ze skupiny primordiálních folikulů začít vyvíjet primární folikuly (Hunter, 2000). U prasnic během porodu a po degeneraci mnoha oocytů během počáteční fáze meiózy se množství primordiálních folikulů sníží až o 60 % (Pelosi *et al.*, 2011).

Důležitou událostí folikulogeneze je aktivace primordiálních folikulů. Je to proces, ve kterém jsou zablokované primordiální folikuly aktivovány, aby opět zahájily svůj vývoj a vstoupily tak do zásob rostoucích folikulů (John *et al.*, 2009). Aktivace začíná brzy po vytvoření primordiálních folikulů v plodu a pokračuje po celou dobu života samice, dokud není zásoba těchto folikulů vyčerpána. Prvním viditelným znakem, že primordiální folikuly byly aktivovány, je začínající přeměna granulóznic buněk z dlaždicových na buňky kubické. Změna tvaru a také získání mitotické schopnosti granulóznic buněk je typickým znakem aktivace (Erickson, 2004).

Aktivace primordiálních folikulů je vysoce koordinovaný proces, na kterém se podílí autokrinní a parakrinní faktory. K těmto faktorům patří mimo jiné Kit ligand (KL), který pochází z pregranulóznic buněk a podporuje přechod z primordiálního folikulu na primární. Dalšími takovými faktory jsou například bFGF (basic fibroblast growth factor) a LIF (Leukemia Inhibitory Factor) (Comizzoli *et al.*, 2011).

### **3.1.2 Růstová fáze oocytu**

Období, kdy jsou primární oocyty zastaveny v profázi I, se také nazývá jako stádium diktyotene a oocyty v tomto stadiu vstupují do růstové fáze. Jejich jádro je označováno jako zárodečný váček (GV - Germinal Vesicle) (Wassarman *et al.*, 1994). Během své růstové fáze oocyt musí zvětšit svůj objem a velikost, syntetizovat důležité molekuly a připravit se tak na další svůj vývoj. Pouze plně dorostlý oocyt je schopný obnovit meiotické dělení.

Růst oocytu u savců je doprovázen souběžným růstem folikulů. Oocyt roste během vývoje primárního a hlavně během růstu sekundárního folikulu a navzdory pokračujícímu růstu folikulu (v ovulační folikul), oocyt zůstává nadále téměř stejně velký. Během růstové fáze průměr prasečího oocytu vzroste přibližně z 30  $\mu\text{m}$  na 120  $\mu\text{m}$  a růst je téměř dokončen. Pro růst oocytu jsou nezbytné interakce mezi somatickými buňkami a samotným oocytem, které jsou zprostředkované pomocí buněčného spoje typu gap junction (Hunter, 2000). Gap

junction jsou kanály, které umožňují výměnu iontů a malých molekul ( $\leq 1$  kDa) mezi sousedními buňkami a složené z proteinů, konexinů. (Santiquet *et al.*, 2013). Tyto spoje zajišťují substrát pro energetický metabolismus oocyty. Zásobují oocyt nukleosidy, aminokyselinami, fosfolipidy a udržují iontovou rovnováhu (Hunter, 2000).

Růst oocyty je doprovázen syntézou RNA a proteinů. U myši se oproti somatickým buňkám zvyšuje syntéza RNA až 200x a když oocyt dosáhne asi 3/4 svého konečného objemu, obsahuje skoro tolik RNA jako plně dorostlý oocyt (Wassarman *et al.*, 1994).

V období růstu je aktivována řada důležitých genů nezbytných pro další vývoj oocyty, například geny, které kódují syntézu proteinů vrstvy *zona pellucida*. *Zona pellucida* obklopuje membránu vajíčka a je zodpovědná za navázání spermie na vajíčko a také za vyvolání akrozomální reakce. Skládá se ze tří nebo ze čtyř ZP glykoproteinů (ZPGs). U mnoha savčích druhů jsou přítomny čtyři ZPGs (ZP1, ZP2, ZP3 a ZP4). U prasečích oocytů ve vrstvě *zona pellucida* jsou obsaženy pouze tři ZPGs a to: ZP2, ZP3 a ZP4. Za navázání spermie je zodpovědný heterokomplex ZP3 a ZP4 (Takahashi *et al.*, 2013). K dalším důležitým proteinům, které oocyt během svého růstu syntetizuje, patří například ribozomální a mitochondriální proteiny a histony (Wassarman *et al.*, 1994).

Během fáze růstu oocyty dochází ke změnám na úrovni organel. Jádro neboli zárodečný váček (GV) se v rostoucím oocyty začíná zvětšovat. Když dojde k dokončení jaderného růstu, chromatin se více kondenzuje, především v blízkosti jadérka. Jádro v rostoucím oocyty obsahuje samostatné velké jadérko a také je obvyklé, že obsahuje jedno nebo dvě menší jadérka. Jadérka se postupně s růstem oocyty také zvětšují a u plně dorostlých oocytů mají fibrilární jednotnou strukturu. Růst oocyty je také doprovázen zvýšením počtu mitochondrií, které mění i svůj tvar postupně z protáhlých na kulaté a oválné (Wassarman *et al.*, 1994). Změnami také prochází Golgiho aparát (GA). GA se rapidně zvětšuje a začínají se z něho tvořit malé váčky, ze kterých se později vyvíjejí kortikální granula (Liu, 2011). Kortikální granula jsou specializované skupiny sekrečních váčků a jsou nezbytné pro zabránění polyspermickému oplození (Tsai *et al.*, 2011).

- **Primární a sekundární folikul**

Pokud dojde k aktivaci primordiálních folikulů, nastartuje se další folikulární růst a s folikuly souběžně roste i oocyt, který je stále v diktyotenním stavu. Po aktivaci primordiálních folikulů se granulózní buňky mění z plochých na kubické a tak vzniká primární folikul. Oocyt nadále pokračuje v růstu a granulózní buňky se množí a začínají tak obklopuvat oocyt ve více vrstvách. Vytvoření více vrstev je považováno za první znak, který

signalizuje vznik sekundárního folikulu (West *et al.*, 2009). Sekundární folikul může také být označován jako multilaminární folikul (MUFs – multilaminar follicles). U prasnic sekundární folikuly dosahují velikosti 300  $\mu\text{m}$ , zatímco oocyty v nich obsažené dosahují asi 90  $\mu\text{m}$ . V této fázi oocyt značně roste, granulózní buňky proliferují a další významnou změnou je získání vrstvy *theca*. Ta obklopuje granulózu a diferencuje se na vrstvy *theca folliculi externa* a *interna* (van den Hurk *et Zhao*, 2005). Vývoj vrstvy *theca* je doprovázen vytvořením početných malých cév pomocí angiogeneze. To je klíčový děj, protože krev tak může cirkulovat kolem folikulu a přinášet živiny a hormony (LH, FSH) a naopak odnášet metabolity a sekreční produkty. *Theca externa* je složena z hustě uspořádaného vaziva s převažujícími kolagenními vlákny. *Theca interna* je silně vaskularizována a slouží tak k přívodu hormonů (LH, FSH), živin, vitaminů a kofaktorů potřebných pro růst a diferenciaci oocytu a granulózních buněk (Erickson, 2004).

- **Terciární folikul**

Zatímco předchozí vývoj folikulů (primordiálních, primárních, sekundárních) probíhal nezávisle na gonadotropinech, terciární folikuly pro svůj vývoj tyto hormony vyžadují. FSH a LH jsou klíčové pro růst a vývoj postsekundárních fází stejně jako pro následnou ovulaci a luteinizaci (Nagaraja *et al.*, 2010). Terciární folikul bývá také označován jako antrální folikul a velmi dobře vyvinutý antrální folikul jako Graafův folikul. Nicméně po preovulačním nárůstu gonadotropinů jsou tyto folikuly nazývány jako preovulační (Eppig, 2001).

Na konci vývoje sekundárního folikulu můžeme rozlišit pět různých strukturních jednotek: oocyt obklopený vrstvou *zona pellucida*, několik vrstev granulózních buněk, bazální laminu, vrstvy *theca interna* a *externa*. První známkou počátku vývoje terciárního folikulu je objevení se dutinky v granulózních buňkách, která se pak postupně zvětšuje a formuje se tak antrum (Erickson, 2004). Vytvoření antra způsobí rozdělení granulózních buněk do dvou typů: na kumulární buňky, které jsou propojené s oocytem a na murální granulózní buňky, které vystylají folikulární stěnu (Eppig *et al.*, 1997). Okolo přechodu z preantrálního do antrálního folikulu dochází k významným vývojovým změnám v oocytu. V tomto období oocyty dokončují svůj růst a získávají meiotickou kompetenci (Eppig, 2001). V reakci na hormonální stimulaci nastanou dva důležité děje v kumulo-oocytárním komplexu (COC). Plně dorostlý oocyt dokončí první meiotické dělení a posléze je opět zablokovan v metafázi II a kumulární buňky expandují (Buccione *et al.*, 1990). Oocyt, který je stále uzavřený v expandovaných kumulárních buňkách je nakonec ovulován do vejcovodu připravený na oplození (Buccione *et al.*, 1990).

### 3.1.3 Získání meiotické kompetence

Jen plně dorostlé oocyty jsou schopné reagovat na preovulační vlnu gonadotropinů a zahájit meiózu, dokončit první meiotické dělení a následně být ovulovány. Ačkoli je ve vaječnicích přítomno velké množství oocytů, pouze malá část z nich je schopna ovulace. Velká část oocytů podléhá degeneraci už v průběhu růstové fáze (Hirao *et al.*, 1994). Během růstové fáze, zatímco jsou oocyty zablokovány v profázi I, dochází k syntéze a shromažďování důležitých makromolekul a organel. Oocyty tak postupně získávají schopnost pokračovat v meióze (Kanatsu-Shinohara *et al.*, 2000).

Získání meiotické kompetence souvisí s velikostí oocytu a jeho folikulu (Blanco *et al.*, 2011). V době přeměny preantrálního folikulu na antrální folikul probíhají v oocytu důležité vývojové změny. Před vytvořením antra se oocyty nejsou schopné vyvíjet dále z diplotenní fáze prvního meiotického dělení. Tyto oocyty jsou označovány jako meioticky nekompetentní. Nicméně většina oocytů v antrálních folikulech je plně dorostlá a meioticky kompetentní. Tyto oocyty mohou pokračovat v meióze. Oocyty, které jsou schopné obnovit meiózu, nemusí vždy projít kompletním jaderným zráním a pokračovat do metafáze II. Oocyty izolované z malých antrálních folikulů jsou schopné prodělat germinal vesicle breakdown (GVBD, rozpad zárodečného váčku) a pokračovat do metafáze I, ale meióza většinou v této fázi skončí. Takové oocyty se označují jako částečně kompetentní (Eppig, 2001). Většina prasečích oocytů získaných z folikulů větších než 1 mm je schopna zahájit meiotické zrání *in vitro*, ale pouze ty které pocházejí z folikulů větších než 2 mm dokončí první meiotické dělení *in vitro* (Motlík *et al.*, 1984).

Pro meioticky kompetentní oocyty je charakteristický kondenzovaný chromatin obklopující jadérko (Kanatsu-Shinohara *et al.*, 2000).

### 3.1.4 Meiotické zrání

Savčí oocyty jsou zablokovány v profázi I, dokud nejsou vystaveny preovulační vlně gonadotropinů. Pouze plně dorostlý oocyt je schopný znovuzahájit meiózu. Přechod oocytu z diplotene I do metafáze II je nazýván meiotické zrání (Wassarman *et al.*, 1994).

Plně dorostlý oocyt je těsně obklopen kompaktní vrstvou specializovaných granulóznicích buněk (kumulárních buněk), dohromady s těmito buňkami oocyty tvoří kumulo-oocytární komplex (COC). Proces znovuzahájení meiózy vyžaduje endokrinní, parakrinní a autokrinní signální dráhy, které vyžadují úzkou spolupráci oocytu a obklopujících granulóznicích buněk a kumulárních buněk (Sun *et al.*, 2009). Pokud oocyt zahájí opět meiózu,

dokončí první meiotické dělení a rozdělí se na dvě dceřiné buňky – na sekundární oocyt a na vydělené nefunkční polární tělísko (Virant-Klun *et al.*, 2013). Následně oocyt vstupuje do druhého meiotického dělení, to však není dokončeno a oocyty jsou opět pozastaveny druhým meiotickým blokem v metafázi II. (Wassarman *et al.*, 1994). Druhý meiotický blok přetrvává, dokud vajíčko není aktivováno průnikem spermie při procesu oplození. Vajíčko tak dokončí druhé meiotické dělení a vydělí druhé pólové tělísko (Hunter, 2000).

Meióza pokračuje v reakci na preovulační LH vlnu (Mehlmann, 2005). LH vlna vyvolá expresi genů potřebných pro prasknutí folikulu a ovulaci oocytu a aktivuje mnohonásobnou signální kaskádu, která vede ke zrání oocytu (Conti *et al.*, 2012). Během tohoto procesu v oocytu dochází k mnoha změnám, které probíhají jak v jádře, tak v cytoplazmě oocytu. Tyto změny označujeme jako jaderné a cytoplazmatické zrání. Jaderné zrání se skládá z mnoha kroků zahrnující změny v chromatinu (van den Hurk *et al.*, 2005). Cytoplazmatické zrání zahrnuje mnoho změn v cytoplazmě, jako je například redistribuce organel (Marteil *et al.*, 2009).

První událostí znovuzahájení meiózy je rozpad zárodečného váčku. Po GVBD se difuzní chromatin kondenzuje do chromozomů, mikrotubuly se uspořádají do meiotického vřetena a homologní chromozomy jsou odděleny a vytvoří se první pólové tělísko (Wassarman *et al.*, 1976).

- **Jaderné zrání**

Jaderné zrání zahrnuje změny chromatinu během období zrání oocytu (Marteil *et al.*, 2009). V prasečím oocytu jaderné zrání trvá okolo 44 – 48 hodin (van den Hurk *et al.*, 2005).

Na počátku procesu GVBD dochází k nepatrnému vlnění jaderné membrány a současně s počáteční fází kondenzace chromozomů dochází ke zmizení jaderných pórů (Calarco *et al.*, 1972). Během GVBD byla pozorována různá stádia – GV0 – GV4. V GV0 je chromatin rozprostřen po celé ploše GV a je stále viditelné jádro. Později je chromatin uspořádán ve tvaru koňské podkovy, v GV2 se již tvoří shluky chromatinu a nakonec jaderná membrána není rozpoznatelná vůbec a jádro zmizí (Lucas *et al.*, 2002).

Pro jaderné zrání jsou typické změny v konfiguraci chromozomů. Ve fázi zárodečného váčku - germinal vesicle (GV), je přítomné sférické jádro s neporušeným obalem a vláknitým chromatinem. V důsledku stimulace gonadotropiny dochází k procesu rozpadu zárodečného váčku – GVBD, charakteristickému přítomností kondenzovaného chromatinu a absencí viditelné jaderné membrány. V metafázi I jsou chromozomy uspořádané v metafázní destičce



umístěné na periferii v ooplazmě. Poslední fází jaderného zrání je metafáze II, typická přítomností metafázní destičky na periferii a vydělením prvního pólového tělíska (Landim-Alvarenga *et* Maziero, 2014).

- **Cytoplazmatické zrání**

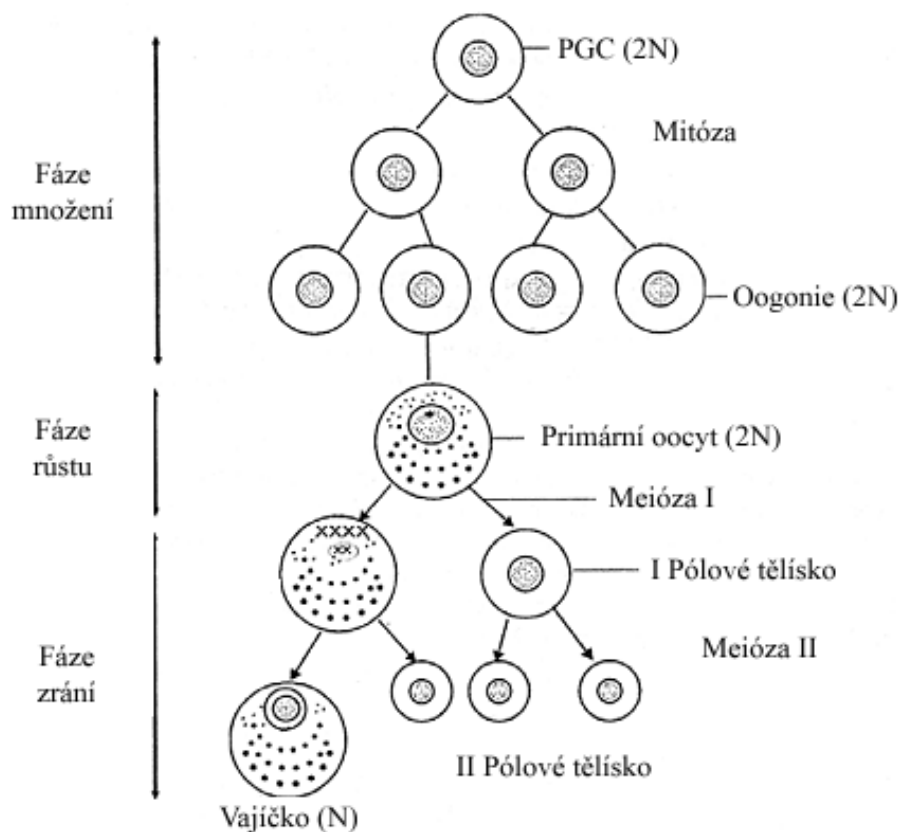
Cytoplazmatické zrání zahrnuje změny v cytoplazmě oocyty, jako je shromažďování mRNA a proteinů, přeuspořádání cytoskeletu a organel a také změny v buněčném metabolismu. Ačkoli jaderné a cytoplazmatické zrání je často popisováno odděleně, mnoho procesů spolu souvisí a jejich koordinace je klíčová pro úspěšný embryonální vývoj (Herrick *et al.*, 2006).

Cytoskelet se během zrání přeskupuje, je zodpovědný za vytvoření meiotického vřetena, rozchod chromozomů a za přeuspořádání organel během cytoplazmatického zrání (Marteil *et al.*, 2009).

Mitochondrie syntetizují ATP, molekulu nezbytnou pro správné dokončení zrání. Proto jejich rozmístění souvisí s dodáním energie do oblastí se zvýšenou spotřebou ATP, jako je například místo tvorby dělicího vřetena nebo pólového tělíska (Van Blerkom, 1991). U GV oocytů jsou mitochondrie nashromážděné v buněčném kortexu, ale během GVBD se většina nachází v perinukleární oblasti (Sun *et al.*, 2001). Po jaderném zrání jsou mitochondrie rozptýleny v celé cytoplazmě kromě centrální oblasti oocyty (Stojkovic *et al.*, 2001).

Další organelou, která prodělává zásadní změny během zrání oocyty je endoplazmatické retikulum (ER). ER prochází jak strukturálními tak biochemickými změnami, které jsou nezbytné pro správné intracelulární řízení vápenatých iontů (Stricker, 2006). Ve stadiu GV je ER rozptýleno v cytoplazmě. Poté se přetvoří v hustý kruh okolo vyvíjejícího se vřetena prvního meiotického dělení, které pak obklopí a následně ER migruje do kortikální oblasti (FitzHarris *et al.*, 2007). Důležité je také přemístění kortikálních granul. V GV oocyty jsou kortikální granula rozmístěna ve shlucích po celé cytoplazmě. Na konci zrání se nachází v blízkosti vnitřní strany cytoplazmatické membrány (Ferreira *et al.*, 2009).

V průběhu zrání oocyty transkripční aktivita je potlačena (Matova *et* Cooley, 2001). mRNA je syntetizována a shromažďována během růstové fáze oocyty (Wassarman *et* Albertini, 1994). Takto uskladněná mRNA má krátký poly (A) konec, čímž je její aktivita potlačena. Opět je aktivována cytoplazmatickou polyadenylací, prodlužováním poly (A) konce mRNA (Charlesworth *et al.*, 2013).



**Obrázek 1.** : Oogeneze savců

převzato z: <http://www.expertsmind.com/questions/oogenesis-30115797.aspx>

## 3.2 Faktory regulující meiotické zrání

Meiotické zrání je složitý proces, na jehož řízení se podílí mnoho důležitých faktorů. Vznikají tak složité signální kaskády, které regulují správný vývoj oocyty. V následující části budou uvedeny některé faktory, které se podílí na řízení meiotického zrání.

### 3.2.1 MPF (*Maturation Promoting Factor*)

MPF má velmi důležitou roli během procesu zrání oocyty. Přechod oocyty z G2 fáze (pozdní profáze I) do M - fáze buněčného cyklu nastává v době GVBD a tento přechod je závislý na aktivaci faktoru, který podporuje meiotické zrání a byl označen jako Maturation Promoting Factor (MPF) (Norbury *et Nurse*, 1992).

MPF se skládá ze dvou podjednotek: z katalytické podjednotky cyklin dependentní kinázy 1 (CDK1, známé také jako  $p34^{cdc2}$ ) a z regulační podjednotky zvané cyklin B (O'Connel *et al.*, 1992) a nově byla objevena další klíčová součást MPF, Greatwall kináza

(Gwl) (Hara *et al.*, 2012). Během meiózy činnost MPF značně kolísá, což může být způsobeno fosforylací její podjednotky CDK1 a degradací cyklinu B (Tanquist *et Maller*, 2003).

Cyklin B je syntetizován a shromažďován již během interfáze. Prvním krokem k aktivaci MPF je spojení jeho katalytické a regulační podjednotky (Solomon *et al.*, 1990). V plně dorostlých prasečích oocytech jsou obě podjednotky spojené (Sun *et Nagai*, 2003). V G2 oocytech je tento komplex CDK1 a cyklinu B udržován v inaktivní formě jako pre-MPF (Nebreda *et Hunt*, 1993), fosforylací CDK1 na threoninových a tyrosinových zbytcích (Mueller *et al.*, 1995; Palmer *et al.*, 1998). Tuto inhibici MPF způsobují kinázy Wee1 (pomocí fosforylace CDK1 na Tyr 15) a Myt1 (fosforylace na Thr 14 a Tyr15) (Mitra *et Schultz*, 1996). Proto aktivace pre-MPF během zrání oocyty vyžaduje defosforylací CDK1 na Thr 14 a Tyr 15, což je katalyzováno fosfatázou Cdc25 (Nebreda *et Hunt*, 1993). Gwl nepřímo inhibuje protein fosfatázu PP2A (Castilho *et al.*, 2009; Vigneron *et al.*, 2009), která byla popsána jako hlavní fosfatáza, která potlačuje aktivitu MPF (Castilho *et al.*, 2009; Mochida *et al.*, 2009).

Během zrání oocyty aktivita MPF značně kolísá. Nejvyšší aktivity dosahuje během metafáze I a metafáze II. Těsně před rozpadem jaderné membrány a kondenzací chromozomů MPF narůstá (Hashimoto *et Kishimoto*, 1988). MPF se podílí na procesu kondenzace chromozomů a vytvoření dělicího vřeténka (Lohka *et Maller*, 1985). Naopak pokles aktivity MPF je zaznamenán během postmetafázních událostí, které zahrnují například rozchod chromozomů na opačné póly dělicího vřeténka. Proto se zdá, že snížení aktivity MPF zahajuje přechod z metafáze I do anafáze I (Hashimoto *et Kishimoto*, 1988). Vysoká hladina aktivního MPF během metafáze II je udržována pomocí cytostatického faktoru (CSF) (Masui *et Markert*, 1971). CSF zabraňuje degradaci cyklinu B a tím udržuje vysokou hladinu aktivního MPF (Peters, 2002). Cyklin B je degradován pomocí ubikvitin-dependentní proteolýzy. Cyklin B obsahuje ve své N koncové části typickou sekvenci, na kterou se váže ubikvitin pomocí komplexu podporující anafázi (Anaphase Promoting Factor, APC). Připojení molekul ubikvitinu umožní jeho následnou degradaci v proteozómu (Fung *et Poon*, 2005). Po oplození nebo partenogenetické aktivaci vajíčko dokončí meiotické zrání a zahájí raný embryonální vývoj. V tomto období je cyklin B degradován a aktivita MPF klesá, dokud aktivované vajíčko nevstoupí do M fáze prvního mitotického buněčného cyklu (Tanquist *et Maller*, 2003).

MPF reguluje některé morfologické změny, ke kterým dochází v průběhu meiotického zrání oocyty. CDK1 fosforyluje laminy jaderné membrány. Dochází tak k rozložení jaderné laminy, což je nezbytné pro GVBD (Peter *et al.*, 1990).

### 3.2.2 MAPK (*Mitogen-Activated Protein Kinase*)

MAPK, také někdy označována jako extracelulárně-regulována kináza (ERK), patří do rodiny serin/threonin proteinkináz, které pro svou aktivaci vyžadují dvojí fosforylaci na threoninových a tyrozinových zbytcích. V savčích oocytech jsou exprimovány hlavní dvě izoformy MAPKs, které mají klíčovou roli v meióze. Jsou to ERK1 (také označována jako p44) a ERK2 (p42) (Sun *et al.*, 1999). Přímým aktivátorem MAPK je duálně-specifická proteinkináza, která se označuje jako MAPK kináza (známa také jako MEK1, MAPK-ERK kináza1). MEK1 aktivuje MAPK pomocí fosforylace na threoninu-183 a tyrosinu-185 uvnitř její aktivační smyčky (Crews *et Erikson*, 1992). MEK je také aktivována pomocí fosforylace, a to proteinkinázou Mos. Mos je produktem proto-onkogenu *c-mos* (Papkoff *et al.*, 1982). U nezralých vajíček obojživelníků, je *c-mos* mRNA uskladněna, ale není translatována. Po hormonální stimulaci mRNA proteinkinázy polyadenylována a translatována. V reakci na její aktivaci pomocí polyadenylace a syntézy proteinů se hladina Mos dramaticky zvýší, což vede k fosforylaci MEK1 a aktivaci MAPK (Russo *et al.*, 2009). Jedním z bezprostředních cílů MAPK je p90rsk (kináza ribozomálního proteinu S6) (Dalby *et al.*, 1998). U žáby rodu drápatka (*Xenopus*) se předpokládá, že p90rsk zprostředkovává mnoho funkcí MAPK v regulaci postupu meiotického buněčného cyklu (Bhatt *et Ferrel*, 1999; Gross *et al.*, 1999).

V oocytech žab rodu *Xenopus* je meiotické zrání spuštěno hormonální stimulací progesteronem, která vede k syntéze *c-mos* proteinu a následné aktivaci MAPK (Sagata *et al.*, 1988; Posada *et al.*, 1993). Tato kaskáda pravděpodobně vyvolá aktivaci MPF a následný rozpad zárodečného váčku. U savčích vajíček (mimo myších) je nezbytnost aktivity MAPK pro znovuzahájení meiózy stále kontroverzní. Některé studie naznačují, že u prasečích a bovinních oocytů může být ve znovuzahájení meiózy zapojena MAPK (Ohashi *et al.*, 2003). Na druhou stranu inhibice aktivity MAPK nepotlačila GVBD u bovinních oocytů (Kagii *et al.*, 2000).

U prasečích oocytů není zcela jasné, kdy přesně k aktivaci MAPK dochází, zda má tato aktivace přímou souvislost se znovuzahájením meiózy. Liang *et al.* (2005) ve své studii ukázali, že v prasečích oocytech dochází k aktivaci MAPK až po GVBD. Další výzkumy ovšem potvrdily, že mikroinjekce MAPK do prasečího oocyty významně urychluje nástup GVBD (Inoue *et al.*, 1998). Podle jiných studií se u domestikovaných zvířat aktivace MAPK

přímo neúčastní časných událostí znovuzahájení meiózy, ale uplatňuje se spíše v dějích následujících po GVBD (Liang *et al.*, 2007).

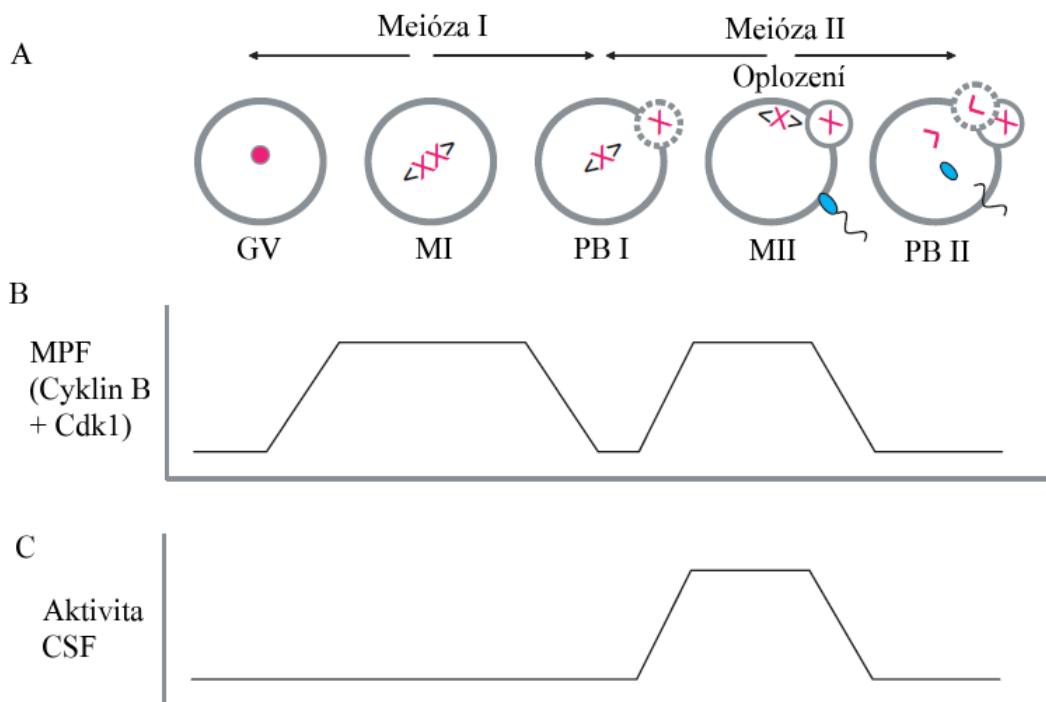
Existují důkazy, že MAPK je zapojena do řízení uspořádání mikrotubulů během meiózy savčích oocytů (Verlhac *et al.*, 1994). Aktivace Mos/MAPK kaskády v myších oocytech vede k částečné kondenzaci chromozomů. Dále se také MAPK podílí na vytvoření dělicího vřetena (Choi, *et al.*, 1996). Pokud je aktivace MAPK inhibována, vede to k selhání vydělení prvního pólového tělíska a stejně tak i k selhání vytvoření dělicího vřetena (Lee *et al.*, 2000).

### **3.2.3 Cytostatický faktor**

Cytostatický faktor (CSF) je komplex molekul, které se podílí na udržení druhého meiotického bloku. Cytostatický faktor během metafáze II udržuje aktivitu MPF na vysoké úrovni tím, že zabraňuje degradaci cyklinu B (Peters, 2002).

Za nezbytnou součást cytostatického faktoru je považována proteinkináza Mos, která je potřebná pro stimulaci aktivity MAPK (Sagata *et al.*, 1989). Systém Mos/MAPK nejspíše přispívá k aktivaci a stabilizaci MPF (Madwick *et Jones*, 2007). Přesný mechanismus účinku Mos však není zcela jasný. Bylo prokázáno, že Mos pomáhá udržet blok v metafázi II tím, že spouští signalizační dráhu, která vede k inhibici APC/C (Anaphase Promoting Factor/Cyclosome), který je zodpovědný za degradaci cyklinu B (Peters, 2002).

Oocyt může opustit MII blok až po aktivaci spermií. Průnik spermie do oocytu způsobuje oscilace hladin  $Ca^{2+}$  iontů a dokončení druhého meiotického dělení oocytu (Madwick *et Jones*, 2007).



**Obrázek 2.** : Průběh meiotického zrání oocyty. (A) Znázorněn je pouze jeden pár homologních chromozomů. Po S – fázi následují dvě buněčná dělení, vzniká tak haploidní gameta. Během meiózy I (MI) se homologní chromozomy rozdělí mezi oocyt a první pólové tělíčko (PB I). V metafázi II (MII) oocyt zastaví svůj buněčný cyklus. Druhý meiotický blok je udržován pomocí CSF, dokud tento blok nepřeruší spermie. Oocyt dokončí druhé meiotické dělení a vydělí druhé pólové tělíčko (PB II). (B) Během vstupu a výstupu oocyty z metafáze aktivita MPF osciluje. (C) Meiotický blok oocyty v MII je udržován pomocí CSF (Madwick *et al.*, 2007).

### 3.2.4 Cyklické nukleotidy

Cyklický adenosinmonofosfát (cAMP) patří mezi faktory regulující meiotické zrání. cAMP udržuje oocyty v prvním meiotickém bloku. Vysoká hladina cAMP zabraňuje spontánnímu zrání *in vitro*, zatímco pokles cAMP v oocyty je spojován s obnovením meiózy (Dekel *et al.*, 1984; Schultz *et al.*, 1983).

cAMP může být syntetizován endogenně samotným oocytem nebo je tvořen v kumulárních buňkách (Zhang *et al.*, 2007). Z kumulárních buněk cAMP difunduje do oocyty pomocí gap junction. Po LH stimulaci dochází k přerušování spojení mezi oocytem a

folikulárními buňkami, což vede k poklesu cAMP v oocytu a následnému obnovení meiózy (van den Hurk *et Zhao*, 2005). V oocytu je cAMP tvořen aktivitou G-proteinů, které stimulují aktivitu adenylát cyklázy a ta následně katalyzuje syntézu cAMP. Pokud je aktivita některých z těchto proteinů inhibována, oocyt uzavřený ve folikulu dále není schopný udržet meiotický blok (DiLuigi *et al.*, 2008).

Po získání meiotické kompetence je buněčný blok v profázi I je udržován vysokou hladinou cAMP prostřednictvím cAMP – dependentní proteinkinázy, proteinkinázy A (PKA). PKA je enzym, který se skládá ze dvou podjednotek, z katalytické a regulační. Pokud se cAMP naváže na regulační podjednotku, aktivuje PKA. Aktivovaný enzym pak fosforyluje proteiny, které jsou nezbytné k udržení meiotického bloku (Wassarman *et Albertini*, 1994). Naopak k prolomení meiotického bloku je potřebná fosfodisteráza (PDE), která hydrolyticky degraduje cAMP, což způsobí jeho pokles a následné pokračování meiózy. U savčích oocytů se jedná především o fosfodiesterázu typu 3A (PDE3A). Dalším cyklickým nukleotidem, který se pravděpodobně podílí na udržení meiotického bloku je cyklický guanosinmonofosfát - cGMP. cGMP prochází z kumulárních buněk přes gap junction do oocytu, kde inhibuje hydrolýzu cAMP způsobenou PDE3A. Touto inhibicí je udržována vysoká hladina cAMP, což zamezuje další meiotický postup (Tripathi *et al.*, 2010).

### 3.2.5 Vápník

Vápník je velmi důležitou signální molekulou, která se uplatňuje v různých typech buněk. Také v savčích oocytech má velmi důležitou roli. Je nezbytný při meiotickém zrání a během fertilizace, kdy se uplatňuje při aktivaci oplozeného vajíčka. Důležitou zásobárnou vápenatých iontů je zejména endoplazmatické retikulum, ze kterého jsou  $\text{Ca}^{2+}$  uvolňovány do intracelulárního prostředí. V oocytech prasete vápenaté ionty byly především detekovány v karyoplazmě, vakuolách, mitochondriích a na povrchu lipidových granul (Petr *et al.*, 2001).

Různé extracelulární stimuly způsobují pohyb vápenatých iontů z vnějšího prostředí buňky (pomocí vápenatých kanálů) nebo z vnitřních zásob buňky do intracelulárního prostředí (Chin *et Means*, 2000). Uvolňování vápníku z intracelulárních zásob do cytosolu je řízeno pomocí dvou typů kanálů - ryanodinových receptorů – RyR a inositol 1,4,5 trifosfátových ( $\text{IP}_3$ ) receptorů ( $\text{IP}_3\text{R}$ ) (Bootman *et Berridge*, 1995). V signální kaskádě zahrnující  $\text{IP}_3\text{R}$  se uplatňuje enzym fosfolipáza C (PLC). Její aktivace je podporována receptory pro extracelulární signály. (Berridge, 1993). PLC katalyzuje rychlou hydrolýzu fosfolipidu fosfatidyl inositolu 4,5 – bisfosfátu ( $\text{PIP}_2$ ). Výsledkem této reakce jsou dva intracelulární buněční poslové – diacylglycerol (DAG) a  $\text{IP}_3$  (Rhee, 2001).  $\text{IP}_3$  se váže na své

receptory (IP<sub>3</sub>R), což vede k uvolňování Ca<sup>2+</sup> do cytoplasmy (Berridge, 1993). Ryanodinové receptory, které se nacházejí převážně ve svalových buňkách, byly nalezeny i v prasečích oocytech, kde řídí uvolňování vápenatých iontů do intracelulárního prostoru (Macháty *et al.*, 1997).

Kalmodulin (CaM) je protein schopný vázat vápenaté ionty. Navázáním vápenatých iontů změní svou konformaci, což mu umožňuje aktivovat nebo inhibovat některé cílové enzymy. Například takto vzniklý komplex vápník/kalmodulin aktivuje velmi významnou Ca<sup>2+</sup>/kalmodulin dependentní proteinkinázu (CaMK), především CaMKII (Chin *et Means*, 2000). Ta je potřebná pro vyvolání degradace cyklinu B, která je nutná pro inaktivaci MPF a výstup z MII bloku (Nishiyama *et al.*, 2007). Komplex Ca<sup>2+</sup>/kalmodulin aktivuje také fosfatázu 2B, které je věnována samostatná kapitola.

### 3.2.6 Oxid dusnatý (NO)

Oxid dusnatý patří mezi gasotransmitery, což jsou plynné látky, které jsou schopné přenášet buněčný signál. Jsou v buňkách syntetizovány pomocí specifických enzymů, které podléhají přísným regulačním mechanismům (Althaus *et Clauss*, 2013). NO je produkován různými druhy buněk v různých orgánech. Reguluje celou řadu důležitých fyziologických procesů včetně reprodukce (Rosseli *et al.*, 1998).

Oxid dusnatý je produkován enzymem NO-syntázou z L-argininu a molekulárního kyslíku, prostřednictvím procesu, při kterém vzniká L-citrulin. Byly identifikovány tři izoformy NO-syntázy, které jsou zodpovědné za tvorbu NO. Jedná se o nervovou NOS (nNOS, NOSI), endoteliální (eNOS, NOSIII) a indukovatelnou NOS (iNOS, NOSII) (Förstermann *et al.*, 1994). nNOS byla objevena v neuronech v mozku, eNOS v endoteliálních buňkách a tvorba iNOS může být indukována cytokiny a bakteriálními produkty (Huang, 2000). Izoformy nNOS a eNOS jsou také označovány jako konstitutivní NOS (cNOS), jsou zodpovědné za kontinuální tvorbu malého množství NO jen po krátkou dobu. K aktivaci těchto dvou izoform je nezbytný komplex vápník/kalmodulin. Naopak iNOS je na vápníku a kalmodulinu nezávislá a produkuje větší množství NO (Rosseli *et al.*, 1998). Všechny tři izoformy mohou být nalezeny v různých typech buněk a v daném typu buněk může být exprimována více než jedna izoforma NO-syntázy (Van Voorhis *et al.*, 1994).

Oxid dusnatý je důležitým regulátorem folikulogeneze, atrezie folikulů, steroidogeneze, biosyntézy prostaglandinu, ovulace, růstu oocyty a jeho zrání (Hattori *et Tabata*, 2006). Práce Kima *et al.* (2005) prokázala, že všechny typy izoform NOS byly



exprimovány v prasečích vaječnicích během folikulárního vývoje, což naznačuje, že oxid dusnatý je zapojen do folikulárního vývoje nebo procesu ovulace. Výskyt NOS ve vaječnicích byl závislý na stadiu vývoje folikulů. Jablonka-Shariff *et Olson*, (1998) zjistili, že NO má vliv na meiotické zrání oocyty. Ve svém experimentu použili myši s vyblokováným genem pro eNOS. Nedostatek eNOS způsobil, že většina oocytů nedozrála až do metafáze II a zůstala v metafázi I. Výrazně více oocytů vykazovaly atypické morfologické změny.

### **3.2.7 Sirovodík ( $H_2S$ )**

Sirovodík patří, stejně jako oxid dusnatý mezi gasotransmitery. Za většinu endogenní produkce sirovodíku v savčích tkáních jsou zodpovědné dva enzymy – cystathionin- $\beta$ -syntáza (CBS) a cystathionin- $\gamma$ -lyáza (CSE), které využívají L-cysteinu jako hlavního substrátu pro syntézu sirovodíku. Jejich exprese se liší v různých tkáních (Wang, 2002). Dalším enzymem, který zajišťuje tvorbu sirovodíku je 3-merkaptopyruvát sulfurtransferáza (Kolluru *et al.*, 2013). Liang *et al.* (2006) předpokládají, že CBS může mít určitou roli ve folikulogenezi. Zjistili, že u myši byl gen pro CBS exprimován všude ve vaječnicích a jeho nejsilnější exprese byla ve folikulárních buňkách ve všech stádiích. CBS se pravděpodobně podílí i na zrání oocyty a má vliv na pravidelnost estrálního cyklu (Zhu *et al.*, 2011).

## **3.3 Kalcineurin**

Reverzibilní fosforylace proteinů, kterou umožňují kinázy a fosfatázy, je velmi důležitou formou signalizace a nezbytným mechanismem regulace ve všech živých organizmech (Shi, 2009).

Kalcineurin patří mezi serin/threonin protein fosfatázy, což je rodina enzymů, které defosforylují proteiny na serinových a threoninových zbytcích. Kalcineurin se také označuje jako protein fosfatáza 2B (PP2B). K jeho aktivaci je potřebný kalmodulin a vápenaté ionty (Wera *et Hemmings*, 1995). Kalcineurin sehrává důležitou roli při mnoha  $Ca^{2+}$  dependentních biologických procesech (Li *et al.*, 2011).

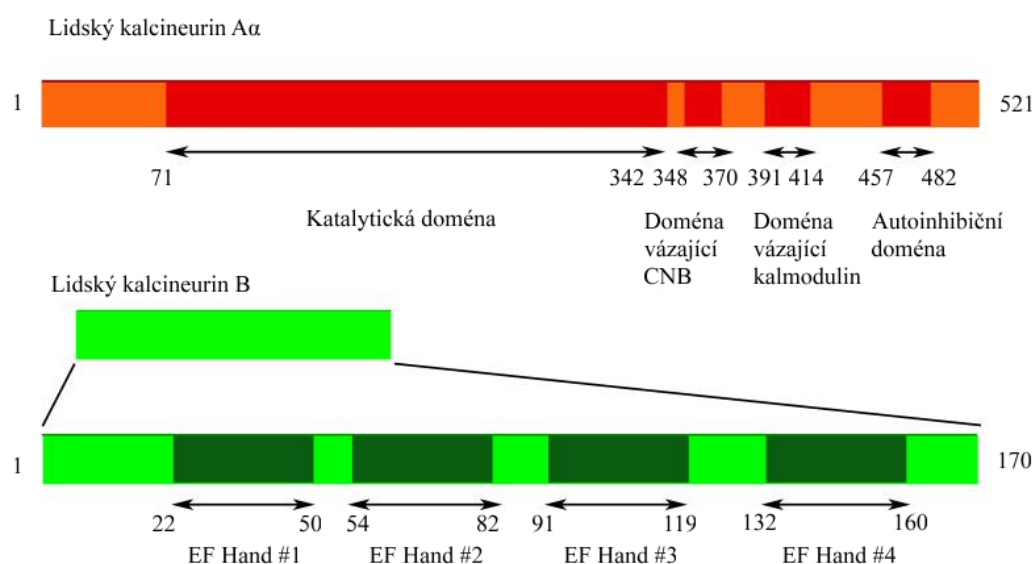
### **3.3.1 Struktura kalcineurinu**

Kalcineurin je heterodimer, který se skládá ze dvou podjednotek – z katalytické podjednotky A (kalcineurin A) a z regulační podjednotky B (kalcineurin B) (Li *et al.*, 2011).

Podjednotka A obsahuje katalytickou doménu, která vykazuje vysokou homologii s ostatními serin/threonin protein fosfatázami a další tři domény, které jsou typické pouze pro

kalcineurin. Jsou to doména vázající kalcineurin B, doména vázající kalmodulin a autoinhibiční doména. Tyto tři oblasti dohromady tvoří regulační doménu podjednotky A. Katalytická doména kalcineurinu A zprostředkovává interakci se substrátem a její důležitou součástí je binukleární kovové centrum, které váže zinek a železo. (Rusnak *et Mertz*, 2000).

Podjednotka B obsahuje čtyři typické motivy nazývané se EF – hands, které mají schopnost vázat vápenaté ionty. Některé z těchto míst mají afinitu k vápenatým iontům vyšší a slouží ke stabilizaci heterodimerní struktury kalcineurinu, nazývají se strukturální. Místa s nižší afinitou k  $\text{Ca}^{2+}$  slouží částečně ke stimulaci aktivity kalcineurinu a umožňují navázání kalmodulinu na jeho cílové místo na kalcineurinu A (Li *et al.*, 2011).



**Obrázek 3. :** Jednotlivé oblasti kalcineurinu. Kalcineurin A (katalytická podjednotka) je zobrazen v odstínech červené, kalcineurin B (regulační podjednotka) v odstínech zelené. Na kalcineurinu A se nachází katalytická doména a regulační doména. Regulační doména se skládá ze tří oblastí – z domény vázající kalcineurin B (CNB), domény vázající kalmodulin a autoinhibiční domény. Kalcineurin B obsahuje 4 typické motivy EF - hands (Li *et al.*, 2011).

### 3.3.2 Výskyt kalcineurinu v tkáních a jeho izoformy

Kalcineurin se vyskytuje v mnoha savčích tkáních, zejména v mozku. Kalcineurin A i B byl nalezen v placentě, srdci, varlatech T a B lymfocytech, v tukové tkáni a mnoha dalších tkáních (Rusnak *et Mertz*, 2000). U savců jsou známy tři izoformy kalcineurinu A, které jsou produkty různých genů. Jsou to kalcineurin A $\alpha$ , kalcineurin A $\beta$  a kalcineurin A $\gamma$  (Klee *et al.*, 1998). Isoformy kalcineurinu B u savců existují dvě a to izoforma B1 a B2. Isoforma B2 se nachází pouze ve varlatech a váže se na izoformu kalcineurinu A $\gamma$ . Isoforma B1 se váže na

izoformu kalcineurinu A $\alpha$ , ale i na A $\beta$  a vyskytuje se v mnoha buněčných typech (Ueki *et al.*, 1992).

### **3.3.3 Aktivace kalcineurinu a jeho regulace**

Aktivace kalcineurinu vyžaduje jeho konformační změnu, která je způsobena navázáním vápenatých iontů na místa s nízkou afinitou na kalcineurinu B. Navázání Ca<sup>2+</sup> způsobí, že na kalcineurinu A se doména vázající kalmodulin oddělí od domény vázající kalcineurin B. Toto oddělení umožní následující navázání kalmodulinu na kalcineurin, což vede k odsunutí autoinhibičního peptidu z aktivního místa a k plné aktivaci kalcineurinu (Li *et al.*, 2011). Autoinhibiční peptid v nepřítomnosti komplexu Ca<sup>2+</sup>/kalmodulinu se váže na aktivní místo kalcineurinu (místo, kde se váže substrát) a tím inhibuje enzym (Rusnak *et Mertz*, 2000).

Aktivita kalcineurinu je regulována pomocí změn hladin intracelulárního Ca<sup>2+</sup>. Pokud je v buňkách nízká hladina vápenatých iontů, kalcineurin není schopný vázat kalmodulin a zůstává tak v inaktivní formě. Pokud se ale hladina intracelulárního vápníku zvýší, Ca<sup>2+</sup> se váže na kalmodulin, který změní svou konformaci a může se následně vázat na kalcineurin a aktivuje tak jeho fosfatázovou aktivitu (Rusnak *et Mertz*, 2000).

Fosfatázová aktivita kalcineurinu je dále regulována oxidačními mechanismy. Aktivita kalcineurinu je pravděpodobně inhibována oxidanty peroxidem vodíku a superoxidem. Jak již bylo uvedeno, kalcineurin obsahuje ve svém aktivním místě zinek a železo. Podle Sommer *et al.* (2000) kalcineurin v aktivní formě obsahuje dvojmocné železo (Fe<sup>2+</sup>). Právě jednou z možností jak oxidanty inhibují aktivitu kalcineurinu je, že superoxid a peroxid vodíku potlačují jeho katalytickou činnost tím, že způsobí oxidaci Fe<sup>2+</sup> na Fe<sup>3+</sup> (Sommer *et al.*, 2000).

### **3.3.4 Inhibitory kalcineurinu**

Mezi velmi dobře známé inhibitory kalcineurinu patří cyklosporin A (CsA) a takrolimus FK506. Cyklosporin A a FK506 jsou široce využívaná imunosupresiva, především při transplantaci orgánů, která inhibují kalcineurin. Tato imunosupresiva nejsou sama o sobě schopná inhibice kalcineurinu, pokud však vytvoří komplexy se svými příslušnými endogenními partnery, imunofiliny, vykazují schopnost inhibovat kalcineurin. Cyklosporin A tvoří komplex s cyklofilinem A, FK506 se váže na FK506 vázající protein 12 (FKBP12). Tyto komplexy výrazně omezují přístup substrátů na aktivní místo kalcineurinu a inhibují tak defosforylaci cílových proteinů kalcineurinu (Sieber *et Baumgrass*, 2009). Podobný účinek

jako cyklosporin A vykazuje například hymenistatin (Dutta, 2002). FK506 má několik derivátů se stejným mechanismem účinku. Patří mezi ně imunosupresivní sloučeniny ascomycin a pimecrolimus (Sieber *et* Baumgrass, 2009).

Dalšími účinnými inhibitory kalcineurinu jsou pyretroidy, konkrétně cypermetrin, deltametrin a fenvalerát (Enan *et* Matsumara, 1992). Pyretroidy jsou látky s insekticidním účinkem. Na základě své chemické struktury mohou být děleny do dvou skupin: na pyretroidy typu II, které obsahují kyanidovou skupinu a pyretroidy typu I, které tuto skupinu neobsahují. Cypertmetrin, deltametrin a fenvalerát patří do skupiny pyretroidů typu II (Bradberry *et al.*, 2005).

Katalytické centrum kalcineurinu má velmi podobnou strukturu a konformaci jako jiné serin/threonin protein fosfatázy (PP1 a PP2A) a tak mnoho inhibitorů, které se vážou na katalytické centrum, inhibují i tyto fosfatázy. Některé z těchto inhibitorů mohou vykazovat odlišnou afinitu k příslušným fosfatázám. K takovým inhibitorům se řadí kyselina okadaová nebo endothall. Dalším inhibitorem kalcineurinu je dibuferin (metabolit hub) (Sieber *et* Baumgrass, 2009).

### **3.3.5 *Funkce kalcineurinu***

Kalcineurin se uplatňuje v mnoha fyziologických procesech, má schopnost defosforylovat širokou škálu proteinů. Jedněmi z velmi dobře známých substrátů kalcineurinu jsou některé proteiny z rodiny NFAT (Nuclear Factor of Activated T cell) (Sieber *et* Baumgrass, 2009). Aktivovaný kalcineurin je defosforyluje, což vede k jejich translokaci z cytoplazmy do jádra, kde NFAT spolupracují s dalšími faktory a podporují genovou transkripci (Macian, 2005). Defosforylaci NFAT mohou inhibovat již zmíněné komplexy léčivo – imunofilin, které se vážou na kalcineurin a v důsledku toho NFAT zůstávají v cytoplazmě (Reynolds *et* Al-Daraji, 2002). Kalcienurin je pravděpodobně jedinou protein fosfatázou, která defosforyluje NFAT (Sieber *et* Baumgrass, 2009). I když tyto transkripční faktory NFAT byly původně objeveny v T – buňkách, jejich exprese probíhá i mimo imunitní systém. Kalcineurin-NFAT signalizace je zapojena do regulačních procesů v různých tkáních. (Chang *et al.*, 2004). Kalcineurin se dále uplatňuje v procesech, které zahrnují nervový vývoj a paměť, imunitní odpověď a vývoj svalů (Rusnak *et* Mertz, 2000). Kalcineurin se podílí i na některých procesech, které probíhají ve vajíčku.

Nárůst hladiny intracelulárních vápenatých iontů ve vajíčku a následné aktivování  $\text{Ca}^{2+}$  dependentních signalizačních drah jsou klíčové procesy, které vedou k prolomení meiotického bloku při fertilizaci. Oplození vajíčka vyvolá přechodné zvýšení koncentrace

cytoplazmatického  $\text{Ca}^{2+}$ , což vede k aktivaci CaMKII. Aktivace CaMKII je nezbytná k tomu, aby mohlo dojít k prolomení druhého meiotického bloku, který je udržován cytostatickým faktorem. Nishiyama *et al.* (2007) a Mochida *et al.* (2007) zjistili, že aktivace kalcineurinu, stejně jako CaMKII, v oocytech žab rodu *Xenopus* je nutná pro výstup z metafáze II a kalcineurin je pravděpodobně důležitý i pro další procesy potřebné pro zahájení embryonálního vývoje. Nishiyama *et al.* (2007) zjistili, že aktivita kalcineurinu i CaMKII vzrůstá ihned po zvýšení intracelulárních hladin  $\text{Ca}^{2+}$  a jejich přechodná aktivace předchází inaktivaci Cdk1 pomocí degradace cyklinu B. Z dalších jejich vyplývá, že aktivace kalcineurinu probíhá nezávisle na aktivaci CaMKII. Kalcineurin byl nalezen také u mouchy rodu *Drosophila* v raném embryu a ve vaječnicích (Takeo *et al.*, 2006). Kalcineurin zde také sehrává úlohu během meiotického dělení (Takeo *et al.*, 2010). Inhibice kalcineurinu může narušit některé události, ke kterým dochází v oocytu po zvýšení intracelulárních hladin  $\text{Ca}^{2+}$ . Jedná se například o degradaci cyklinu B, migraci prvojader, přeuspořádání cytoskeletu v kortikální oblasti buňky nebo defosforylaci proteinů, které byly fosforylovány během M fáze (Jesus *et al.*, 2007).

## 4 MATERIÁL A METODY

### 4.1 Odběr vaječníků a izolace oocytů

Vaječníky byly odebírány na místních jatkách z poražených prasniček, které se nacházely v neznámém stádiu pohlavního cyklu. Z jatek do laboratoře byly vaječníky transportovány během jedné hodiny ve vyhřátém fyziologickém roztoku (0,9% chlorid sodný) na 39°C. Z vaječníků byly získávány oocyty ve fázi růstu a oocyty s ukončeným růstem.

- **Získ oocytů ve fázi růstu**

Oocyty ve fázi růstu různých velikostí byly získávány z tenkých pruhů ovariální tkáně (10 - 15 mm dlouhé a 1 – 2 mm široké), které byly odříznuté z povrchu vaječníků pomocí skalpelu. Následně byly tyto pruhy ovariální tkáně vloženy do Petriho misek, které obsahovaly kultivační médium. Poté byly oocyty uvolněny z jejich folikulů. To bylo provedeno otevřením folikulární stěny pomocí hrotu jehly 25 G. Měření vnitřního průměru oocytů (bez vrstvy *zona pellucida*) probíhalo pod mikroskopem s okulárovým mikrometrem. Oocyty byly rozděleny do čtyř velikostních kategorií: 80 – 89  $\mu\text{m}$ , 90 – 99  $\mu\text{m}$ , 100 – 110  $\mu\text{m}$  a 120  $\mu\text{m}$ .

K dalším pokusům byly vybrány pouze ty oocyty, které byly obklopené několika vrstvami kumulárních buněk. Před kultivací byly oocyty třikrát opláchnuty v kultivačním médiu.

- **Získ oocytů s ukončeným růstem**

Oocyty s ukončeným růstem byly získávány z folikulů o velikosti 2 – 5 mm v průměru pomocí aspirace jehlou 20G. K dalším pokusům byly použity pouze oocyty s kompaktním obalem kumulárních buněk.

### 4.2 Kultivace oocytů

Jako kultivační médium bylo použito médium M199 (GibcoBRL, Life Technologies, Paisley, Skotsko), které bylo modifikováno hydrogenuhličitanem sodným (0,039 ml 7% roztoku na mililitr média), laktátem vápenatým (0,6 mg/ml), gentamicinem (0,025 mg/ml), HEPES (1,5 mg/ml), 13,5 IU eCG: 6,6 IU hCG/ml (P.G.600 Intervet, Boxmeer, Holandsko) a 10% fetálním telecím sérem (GibcoBRL, Life Technologies, Německo).

Kultivace oocytů probíhala po dobu 24, 48 nebo 72 hodin v Petriho miskách o průměru 3,5 cm (Nunc, Roskilde, Dánsko), které obsahovaly 3,0 ml kultivačního média vyhřátého na 39°C v prostředí směsi 5% CO<sub>2</sub> se vzduchem.

### **4.3 Stanovení kalcineurinu v oocytu metodou Western blot**

Oocyty byly zbaveny kumulárních buněk a následně byly promyty ve třech 200 µl kapkách fosfátového pufru PBS (Sigma-Aldrich, Německo). Pak byly tyto oocyty dány do mikrozkravky se 7 µl koncentrovaného vzorkového pufru. Takto byly povařeny ve vodní lázni po dobu 3 minut a následně byly zamraženy. Kumulární buňky, které byly na začátku odstraněny z oocytů, byly centrifugovány při 5000 otáčkách 3 minuty v 1 ml PBS. Tyto buňky byly poté přemístěny do 7 µl koncentrovaného SDS vzorkového pufru. Po dobu 3 minut byly takto povařeny a pak zamraženy. Vzorky byly skladovány při -20°C nejvýše 14 dnů. Připravené vzorky byly před elektroforetickou separací naředěny 13 µl redestilované vody. Pozitivní kontrolou byl čistý protein kalcineurin v množství 5 ng (Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Německo, C-1907).

Elektroforetická separace proteinových vzorků probíhala nejprve v zaostřovacím 4 % polyakrylamidovém gelu s dodecylsulfátem sodným (SDS-PAGE) a následně v 12,5 % separačním SDS-PAGE gelu. Po rozdělení proteinů v gelu podle molekulové hmotnosti byly tyto přetištěny na nitrocelulózovou membránu (Hybond, Amersham Pharmacia Biotech, USA). Přetištění proteinů na membránu bylo ověřeno pomocí hmotnostního markeru (Bio-Rad, Montreal, Kanada, 161-0318). Tento hmotnostní marker byl využit i pro identifikaci proteinů.

Membrána byla blokována přes noc v 2 % roztoku netučného mléka a PBS, který obsahoval 0,1% Tween 20. Membrána byla inkubována po dobu 2 hodin společně s primární anti-kalcineurin A protilátkou (Sigma.Aldrich, Německo, C1956) v koncentraci 1:10 000 nebo anti-kalcineurin B protilátkou v koncentraci 1:3 000. Následovalo promytí a inkubace membrány spolu se sekundární myší protilátkou (Amersham GE Healthcare, Life Sciences, Velká Británie, NIF825) o koncentraci 1:30 000. Přenesené proteiny značené protilátkami byly zviditelněny pomocí ECL Advance Western Blotting detekčního kitu (Amersham Pharmacia Biotech, Velká Británie). Snímány a kvantifikovány byly pomocí digitálního blot skeneru (C-DiGit Blot Scanner (LI-COR Biosciences, USA).

#### 4.4 Ošetření oocytů inhibitory kalcineurinu

K inhibici kalcineurinu byly použity dva inhibitory: inhibitor ze skupiny pyretroidů, fenvalerát a inhibitor nepyretroidové povahy, hymenistatin I. Pyretroid, který inhibuje kalcineurin – fenvalerát byl zakoupen od Sigma-Aldrich (Německo). Oba inhibitory byly rozpuštěny v dimethylsulfoxidu. Zásobní roztok 50 mM byl zředěn v DMSO. Předběžné experimenty ukázaly, že přidání čistého DMSO ve stejných koncentracích používaných při kultivaci oocytů s pyretroidem, nemělo žádný významný účinek na zrání oocytů *in vitro*. Testovány byly rostoucí oocyty s částečnou meiotickou kompetencí a oocyty s ukončeným růstem.

Aby se docílilo požadované koncentrace testované látky, před každou kultivací byl do kultivačního média přidán zásobní roztok. Oocyty ve fázi růstu s částečnou meiotickou kompetencí byly testovány s fenvalerátem v koncentracích 0, 10, 25, 50 a 100  $\mu\text{M}$  a s hymenistatinem I v koncentracích 0, 2, 4 a 8  $\mu\text{M}$ .

Meioticky kompetentní oocyty s ukončeným růstem byly testovány s fenvalerátem o koncentracích 0, 10, 25, 50 a 100  $\mu\text{M}$  a s hymenistatinem I o koncentracích 0; 0,5; 2; 4; 8  $\mu\text{M}$ .

Rozsah koncentrací testovaných chemických látek byl založen na předchozích pokusech (data nejsou uvedena) a jsou uvedeny pouze koncentrace s významným účinkem na zrání oocytů.

#### 4.5 Hodnocení oocytů

Na konci kultivace byly oocyty přeneseny na sklíčko a fixovány pomocí roztoku kyseliny octové a ethanolu (1:3, v/v) nejméně po dobu 24 hodin a následně barveny 1,0% orceinem. Fáze meiotického zrání byly hodnoceny pod mikroskopem s fázovým kontrastem. Jednotlivé fáze jaderného zrání - stádium zárodečného váčku (GV), pozdní diakineze (LD), metafáze I (MI), anafáze I (AI), telofáze I (TI) a metafáze II (MII) byly vyhodnoceny v souladu s kritérii popsány Motlíkem a Fulkou (1976). Abnormální konfigurace chromatinu, která neodpovídala výše uvedeným kritériím, byla vyhodnocena jako degenerativní. Pomocí obarvení kultivovaných oocytů trypanovou modří byla zhodnocena jejich životaschopnost. Čtyřicet oocytů z každé kategorie, to znamená meioticky kompetentní oocyty s ukončeným růstem, oocyty ve fázi růstu s částečnou meiotickou kompetencí a oocyty ve fázi růstu meioticky nekompetentní, byly hodnoceny po ošetření příslušnou chemickou látkou – fenvalerátem a hymenistatinem I. Po 48 hodinové kultivaci prasečích



oocytů, což je doba potřebná pro jejich zrání, byly tyto oocyty zkoumány pomocí barvení trypanovou modří.

Žádný z provedených pokusů neprokázal jakýkoli vliv pyretroidu na životaschopnost oocytů. Proto jsou uvedeny pouze výsledky získané po kultivaci s použitou nejvyšší koncentrací v daném pokusu zkoumajícího zrání oocytu.

## **4.6 Experimentální schéma**

### **Experiment 1: Ověření meiotické kompetence**

Cílem bylo ověřit meiotickou kompetenci oocytů prasete v daných laboratorních podmínkách. Kultivovány byly oocyty čtyř velikostních kategorií: 80 – 89  $\mu\text{m}$ , 90 – 99  $\mu\text{m}$ , 100 – 110  $\mu\text{m}$  a 120  $\mu\text{m}$ . Kultivace probíhala po dobu 48 hodin. Hodnocení oocytů bylo provedeno pomocí mikroskopu s fázovým kontrastem. Jednotlivé fáze zrání byly vyhodnoceny na základě kritérií popsanými Motlíkem a Fulkou (1976).

### **Experiment 2: Průkaz přítomnosti kalcineurinu**

Účelem bylo prokázat přítomnost kalcineurinu v prasečích oocytech a jejich přilehlých kumulárních buňkách. Analyzovány byly oocyty na konci růstové fáze, ve stádiu zárodečného vajíčku a během jejich následné kultivace 24 a 48 hodin, do stádia první a druhé meiotické metafáze. Stanovení přítomnosti kalcineurinu bylo provedeno pomocí metody Western blot. Byla detekována katalytická a regulační podjednotka kalcineurinu.

### **Experiment 2: Inhibice kalcineurinu**

Cílem experimentu bylo zjistit, zda se kalcineurin podílí na meiotickém zrání oocytu prasete. K tomuto účelu byly použity částečně meioticky kompetentní oocyty ve fázi růstu a meioticky kompetentní oocyty s ukončeným růstem. K inhibici kalcineurinu byly použity dva inhibitory. Fenvalerát, ze skupiny pyretroidů a hymenistatin I, inhibitor nepyretroidové povahy. Kultivace oocytů s danými inhibitory kalcineurinu probíhala po dobu 24, 48 a 72 hodin.

## **4.7 Statistická analýza výsledků**

Každé ošetření zvolenou koncentrací testovaných chemických látek bylo provedeno na 40 oocytech. Každé ošetření bylo provedeno třikrát. Korelace mezi koncentrací pyretroidů a

jejich účinkem na meiotické zrání prasečího oocyty byla stanovena pomocí Spearmanova korelačního koeficientu.

Koncentrace daného pyretroidu, která je potřebná k vyvolání inhibice zrání u 50 % oocytů s ukončeným růstem (inhibiční koncentrace 50,  $\text{InhM}_{50}$ ) a koncentrace pyretroidů potřebná k indukci zrání do MII u 50 % rostoucích oocytů s částečnou meiotickou kompetencí (indukční koncentrace 50,  $\text{Ind}_{50}$ ), byly vypočítány pomocí nelineární regrese.

Procento oocytů v dané fázi meiotického zrání v každé koncentraci inhibitoru bylo porovnáno s kontrolní skupinou za použití  $\chi^2$ -testu. Celkové procento oocytů, které dosáhly stanovené fáze meiotického zrání, se ve všech opakováních nelišilo o více než 2,5 %.

Jako statisticky významné byly hodnoceny rozdíly na hladině ( $P < 0.05$ ).

## 5 VÝSLEDKY

### 5.1 Ověření meiotické kompetence oocytů

Cílem experimentu bylo v našich kultivačních a experimentálních podmínkách zjistit meiotickou kompetenci oocytů prasete o různé velikosti vnitřního průměru

Zjistili jsme, že v našich laboratorních podmínkách jsou oocyty velikostní skupiny 80 - 89  $\mu\text{m}$  i oocyty o velikosti vnitřního průměru 90 - 99  $\mu\text{m}$  zcela meioticky nekompetentní. Při 48 hodinové kultivaci v podmínkách *in vitro* nepostoupily za stádium zárodečného vajíčku. Skupina oocytů o velikosti vnitřního průměru 100 - 110  $\mu\text{m}$  zahrnovala oocyty s již částečně vyvinutou meiotickou kompetencí. Tyto oocyty byly při 48 hodinové kultivaci schopné dojít do stádia první meiotické metafáze. Nebyly však schopny prolomit meiotický blok. Oocyty o velikosti 120  $\mu\text{m}$  jsou již zcela kompetentní dokončit meiotické zrání. V našich laboratorních podmínkách dosáhly po 48 hodinách druhé meiotické metafáze.

Prokázali jsme, že oocyty prasete získávají meiotickou kompetenci graduálně v závislosti na své velikosti.

**Tabulka 1. Ověření meiotické kompetence oocytů prasete o různých vnitřních průměrech po dobu 48 hod. kultivace v experimentálních laboratorních podmínkách**

Fáze meiotického zrání	% oocytů v dané fázi			
	80 – 89 $\mu\text{m}$	90 – 99 $\mu\text{m}$	100 – 110 $\mu\text{m}$	120 $\mu\text{m}$
GV	97,8 $\pm$ 2,2 <sup>a</sup>	88,5 $\pm$ 6,0 <sup>a</sup>	12,8 $\pm$ 5,4 <sup>b</sup>	6,2 $\pm$ 6,1 <sup>b</sup>
MI	1,5 $\pm$ 1,0 <sup>a</sup>	9,9 $\pm$ 4,7 <sup>a</sup>	87,2 $\pm$ 5,4 <sup>b</sup>	6,9 $\pm$ 4,8 <sup>a</sup>
MII	0,7 $\pm$ 0,7 <sup>a</sup>	1,6 $\pm$ 1,2 <sup>a</sup>	0,0 $\pm$ 0,0 <sup>a</sup>	86,9 $\pm$ 5,7 <sup>b</sup>

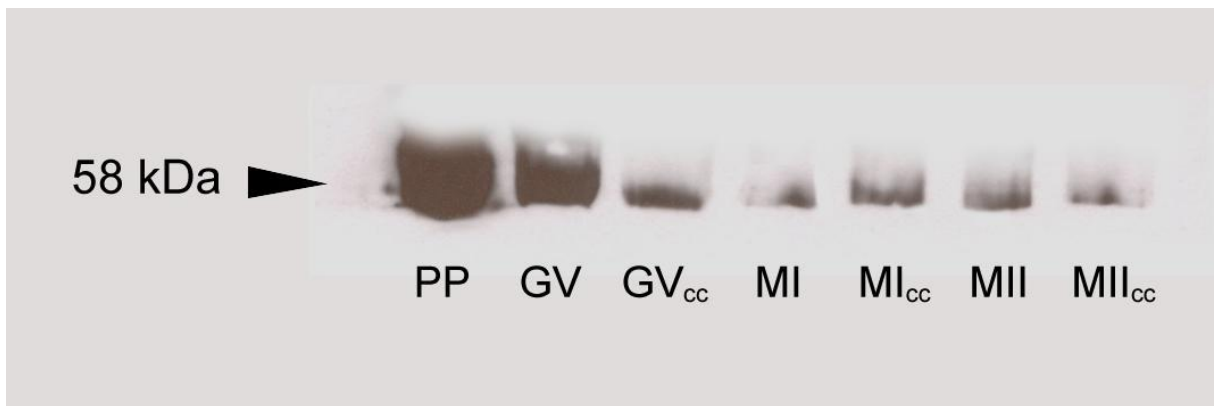
GV – fáze zárodečného vajíčku. MI - fáze první meiotické metafáze. MII – fáze druhé meiotické metafáze.

Analyzovány byly oocyty s vnitřním průměrem 80 - 89, 90 - 99, 100 - 110 a 120  $\mu\text{m}$ . Kultivace probíhala v modifikovaném médiu M199 po dobu 48 hodin. Získaná data byla prezentována jako průměr  $\pm$  směrodatná odchylka. Různá písmena v exponentech hodnot označují v rámci řádků statisticky významnou odlišnost ( $P < 0,05$ ). Pokus byl čtyřikrát opakován.

## 5.2 Detekce proteinu kalcineurinu v prasečím oocytu

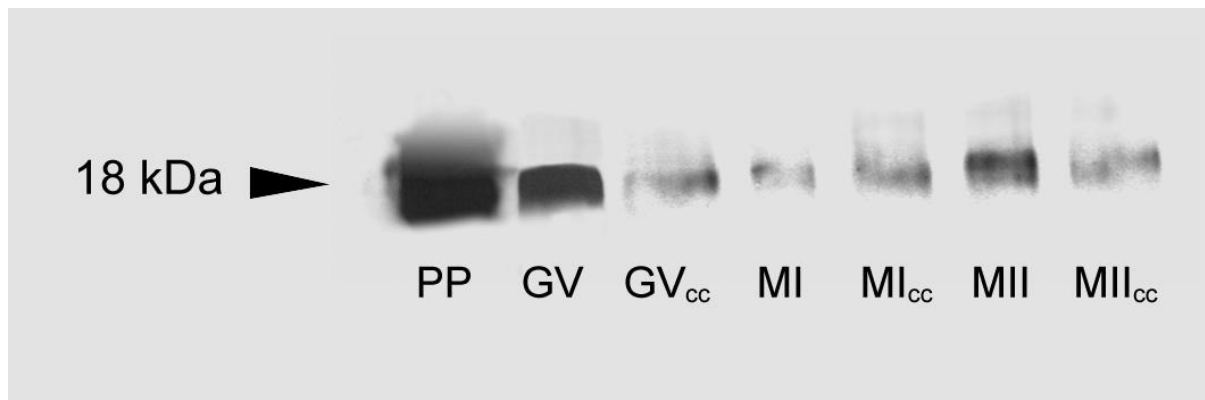
Pomocí metody Western blot bylo potvrzeno, že se obě podjednotky kalcineurinu vyskytují v prasečích oocytech s ukončeným růstem a v jejich kumulárních buňkách (obr. 4 a 5). Byla potvrzena reakce protilátky proti kalcineurinu A s proteinem, který měl molekulovou hmotnost 58 kDa, což odpovídalo molekulové hmotnosti kalcineurinu A. Stejně tak byla potvrzena reakce protilátky proti kalcineurinu B s proteinem, jehož molekulová hmotnost byla 18 kDa, což odpovídalo molekulové hmotnosti kalcineurinu B.

**Obrázek 4. : Detekce kalcineurinu A v oocytech a kumulárních buňkách metodou Western blot**



PP – čistý protein kalcineurin z hovězího mozku 1 ng. GV – oocyty s ukončeným růstem ve fázi zárodečného váčku. GV<sub>cc</sub> – kumulární buňky z oocytů ve fázi GV. MI – oocyty ve stádiu metafáze I. MI<sub>cc</sub> – kumulární buňky z oocytů ve fázi MI. MII – oocyty ve stádiu metafáze II. MII<sub>cc</sub> – kumulární buňky z oocytů ve fázi MII. Ve všech vzorcích bylo 150 oocytů nebo jejich kumulárních buněk.

**Obrázek 5.: Detekce kalcineurinu B v oocytech a kumulárních buňkách metodou Western blot**



PP – čistý protein kalcineurin z hovězího mozku 1 ng. GV – oocyty s ukončeným růstem ve fázi zárodečného váčku. GV<sub>cc</sub> – kumulární buňky z oocytů ve fázi GV. MI – oocyty ve stádiu metafáze I. MI<sub>cc</sub> – kumulární buňky z oocytů ve fázi MI. MII – oocyty ve stádiu metafáze II. MII<sub>cc</sub> – kumulární buňky z oocytů ve fázi MII. Ve všech vzorcích bylo 150 oocytů nebo jejich kumulárních buněk.

### **5.3 Vliv inhibitorů kalcineurinu na oocyty ve fázi růstu s částečnou meiotickou kompetencí**

Procento oocytů ve fázi růstu, které dozrály do stádia metafáze II, významně vzrostlo po 48 hodinové *in vitro* kultivaci pod vlivem kalcineurin – inhibujícího pyretroidu (fenvalerátu). Procento oocytů, které nebyly schopny obnovit meiózu a projít rozpadem zárodečného váčku (GVBD) se značně snížilo (Tabulka 2 a 3).

Po kultivaci oocytů ve fázi růstu pod vlivem nepyretroidového inhibitoru kalcineurinu – hymenistatinem I byly pozorovány podobné účinky jako po kultivaci s fenvalerátem. (Tabulka 2 a 4).

Během 48 hodinové kultivace rostoucích prasečích oocytů s částečnou meiotickou kompetencí s maximálními koncentracemi testovaných látek, což bylo 100  $\mu$ M fenvalerátu (n=50) a 8  $\mu$ M hymenistatinu I (n=50), nebyly pozorovány žádné degenerace oocytů.

Životaschopnost po 48 hodinové kultivaci nebyla významně ovlivněna.

**Tabulka 2.**

**Vliv kultivace rostoucích prasečích oocytů s částečnou meiotickou kompetencí (vnitřní průměr 110 μm) s fenvalerátem a hymenistatinem I.**

Testované látky	Spearmanův korelační koeficient mezi koncentracemi a zráním do MII	Indukční koncentrace 50 (μM)	Množství testovaných oocytů
Fenvalerát	0.92 <sup>A</sup>	48	600
Hymenistatin I	0.85 <sup>A</sup>	7	480

Spearmanův korelační koeficient mezi koncentracemi daných látek a procentem oocytů, které dožrály do stádia metafáze II byl významný (<sup>A</sup>), pokud hladina významnosti P byla menší než 0,05.

Indukční koncentrace 50 – koncentrace daných pyretroidů, která byla potřebná pro indukci zrání do metafáze II u 50 % rostoucích oocytů s částečnou meiotickou kompetencí.

**Tabulka 3.**

**Vliv pyretroidu fenvalerátu na zrání oocytů s částečnou meiotickou kompetencí**

Stádium zrání	Koncentrace fenvalerátu (μM)				
	0	10	25	50	100
GV (%)	18±2 <sup>a</sup>	14±3 <sup>a</sup>	13±2 <sup>a</sup>	7±1 <sup>ab</sup>	0±0 <sup>b</sup>
MI – TI (%)	65±3 <sup>a</sup>	66±4 <sup>a</sup>	49±3 <sup>b</sup>	42±3 <sup>bc</sup>	37±4 <sup>c</sup>
MII (%)	17±2 <sup>a</sup>	20±2 <sup>a</sup>	38±3 <sup>b</sup>	51±4 <sup>c</sup>	63±4 <sup>d</sup>

<sup>a,b,c,d</sup> Významné rozdíly na hladině ( $P < 0.05$ ) mezi procenty oocytů v příslušné fázi jaderného zrání s různým ošetřením (rozdíly v rámci řádků) jsou označeny rozdílnými horními indexy. Pro každé ošetření (pro každou koncentraci pyretroidu) bylo použito 120 oocytů

#### Tabulka 4.

#### Vliv nepyretroidu hymenistatinu I na zrání oocytů s částečnou meiotickou kompetencí

Stádium zrání	Koncentrace hymenistatinu I ( $\mu\text{M}$ )			
	0	2	4	8
GV (%)	18 $\pm$ 2 <sup>a</sup>	8 $\pm$ 1 <sup>ab</sup>	0 $\pm$ 0 <sup>ab</sup>	0 $\pm$ 0 <sup>b</sup>
MI – TI (%)	65 $\pm$ 3 <sup>a</sup>	63 $\pm$ 3 <sup>a</sup>	68 $\pm$ 3 <sup>a</sup>	44 $\pm$ 4 <sup>b</sup>
MII (%)	17 $\pm$ 3 <sup>a</sup>	29 $\pm$ 2 <sup>ab</sup>	32 $\pm$ 3 <sup>b</sup>	56 $\pm$ 4 <sup>c</sup>

<sup>a,b,c,d</sup> Významné rozdíly na hladině ( $P < 0.05$ ) mezi procenty oocytů v příslušné fázi jaderného zrání s různým ošetřením (rozdíly v rámci řádků) jsou označeny rozdílnými horními indexy. Pro každé ošetření (pro každou koncentraci pyretroidu) bylo použito 120 oocytů

#### 5.4 Vliv inhibitorů kalcineurinu na oocyty s ukončeným růstem

Testovaný kalcineurin – inhibující pyretroid ovlivnil schopnost meioticky kompetentních oocytů s ukončeným růstem dokončit zrání v průběhu 48 hodin. Tento vliv byl závislý na dávce (tabulka 5 a 6). Bylo pozorováno pouze opoždění zrání. Jestliže oocyty byly kultivovány po dobu 72 hodin se 100  $\mu\text{M}$  fenvalerátu, všechny oocyty dozrály do stádia metafáze II (100% MII ve fenvalerátu).

Po 48 hodinové kultivaci plně dorostlých prasečích meioticky kompetentních oocytů pod vlivem specifického nepyretroidového inhibitoru kalcineurinu – hymenistatinu I, byl pozorován podobný účinek (tabulka 5 a 7) jako po kultivaci s fenvalerátem.

Hymenistatin I také pouze zpomalil zrání plně dorostlých oocytů. Jestliže plně dorostlé oocyty byly kultivovány po dobu 72 hodin s 8  $\mu\text{M}$  hymenistatinu I, 88 % z těchto oocytů dozrálo do metafáze II. Všechny zbývající oocyty dosáhly metafáze I. Prodloužení kultivace oocytů s nepyretroidovým inhibitorem kalcineurinu o 24 hodin (celkový čas kultivace bylo 72 hodin) vedla ke zrání na stejné úrovni jako 48 hodinová kultivace bez inhibitoru.

Během 48 hodinové kultivace prasečích oocytů s ukončeným růstem s plně meiotickou kompetencí s maximálními koncentracemi testovaných látek, což bylo 100  $\mu\text{M}$

fenvalerátu a 8  $\mu\text{M}$  hymenistatinu I ( $n=5$ ), nebyly pozorovány žádné degenerace oocytů. Také životaschopnost oocytů nebyla výrazně ohrožena po 48 hodinové kultivaci.

**Tabulka 5.**

**Vliv kultivace oocytů s ukončeným růstem s plnou meiotickou kompetencí s fenvalerátem a hymenistatinem I.**

Testovaná látka	Spearmanův korelační koeficient mezi koncentracemi a zráním do MII	Inhibiční koncentrace 50 ( $\mu\text{M}$ )	Počet testovaných oocytů
Fenvalerate	- 0.94 <sup>A</sup>	79	600
Hymenistatin I	-0.91 <sup>A</sup>	10	600

Spearmanův korelační koeficient mezi koncentracemi daných látek a procentem oocytů, které dozněly do stádia metafáze II byl významný (<sup>A</sup>), pokud hladina významnosti P byla menší než 0,05.

Inhibiční koncentrace 50 – koncentrace daných pyretroidů, která byla potřebná pro vyvolání inhibice zrání u 50 % oocytů s ukončeným růstem.

**Tabulka 6.**

**Vliv pyretroidu fenvalerátu na zrání oocytů s plnou meiotickou kompetencí**

Stádium zrání	Koncentrace fenvalerátu ( $\mu\text{M}$ )				
	0	10	25	50	100
GV (%)	0 $\pm$ 0 <sup>a</sup>	0 $\pm$ 0 <sup>a</sup>	0 $\pm$ 0 <sup>a</sup>	7 $\pm$ 3 <sup>a</sup>	18 $\pm$ 3 <sup>b</sup>
MI – TI (%)	2 $\pm$ 0 <sup>a</sup>	3 $\pm$ 1 <sup>a</sup>	29 $\pm$ 3 <sup>b</sup>	37 $\pm$ 4 <sup>b</sup>	37 $\pm$ 1 <sup>b</sup>
MII (%)	98 $\pm$ 0 <sup>a</sup>	97 $\pm$ 1 <sup>a</sup>	71 $\pm$ 3 <sup>b</sup>	56 $\pm$ 2 <sup>c</sup>	45 $\pm$ 3 <sup>c</sup>

<sup>a,b,c,d</sup> Významné rozdíly na hladině ( $P < 0.05$ ) mezi procenty oocytů v příslušné fázi jaderného zrání s různým ošetřením (rozdíly v rámci řádků) jsou označeny rozdílnými horními indexy.

Pro každé ošetření (pro každou koncentraci pyretroidu) bylo použito 120 oocytů



**Tabulka 7.****Vliv nepyretroidu hymenistatinu I na zrání oocytů s plnou meiotickou kompetencí**

Stádium zrání	Koncentrace hymenistatinu I ( $\mu\text{M}$ )				
	0	0,5	2	4	8
GV (%)	0 $\pm$ 0 <sup>a</sup>	0 $\pm$ 0 <sup>a</sup>	0 $\pm$ 0 <sup>a</sup>	0 $\pm$ 0 <sup>a</sup>	7 $\pm$ 2 <sup>a</sup>
MI – TI (%)	0 $\pm$ 0 <sup>a</sup>	9 $\pm$ 1 <sup>ab</sup>	20 $\pm$ 2 <sup>b</sup>	35 $\pm$ 3 <sup>c</sup>	38 $\pm$ 5 <sup>c</sup>
MII (%)	100 $\pm$ 0 <sup>a</sup>	91 $\pm$ 1 <sup>ab</sup>	80 $\pm$ 2 <sup>b</sup>	65 $\pm$ 3 <sup>c</sup>	55 $\pm$ 4 <sup>c</sup>

<sup>a,b,c,d</sup> Významné rozdíly na hladině ( $P < 0.05$ ) mezi procenty oocytů v příslušné fázi jaderného zrání s různým ošetřením (rozdíly v rámci řádků) jsou označeny rozdílnými horními indexy. Pro každé ošetření (pro každou koncentraci pyretroidu) bylo použito 120 oocytů

## 6 DISKUZE

V oocytu prasete a jeho kumulárních buňkách byla potvrzena přítomnost proteinu kalcineurinu. Kalcineurin se vyskytuje v oocytech v obou podjednotkách, v katalytické podjednotce (kalcineurin A) i v regulační podjednotce (kalcineurin B). Tato práce byla první, ve které se kalcineurin podařilo detekovat u savčího oocytu. Z literatury byla doposud popsána exprese proteinu kalcineurinu pouze v oocytech žáby rodu drápatka *Xenopus* (Nishiyama *et al.*, 2007; Mochida *et al.*, 2007) a u mouchy rodu *Drosophila* (Takeo *et al.*, 2006). Výskyt kalcineurinu u prasete byl pozorován v somatických buňkách, například byl prokázán v kosterní svalovině (de Jonge *et al.*, 2006). Dokonce přítomnost kalcineurinu byla potvrzena i u samčích prasečích pohlavních buněk, ve spermích (Tash *et al.*, 1988). To, že kalcineurin je přítomný v prasečích oocytech během meiotického zrání naznačuje, že by mohl mít důležitou roli v tomto procesu. Nishiyama *et al.* (2007) a Mochida *et al.* (2007) zjistili, že je kalcineurin v oocytech *Xenopus laevis* nutný pro výstup z metafáze II a nejspíše je důležitý i pro další procesy, které jsou potřebné pro zahájení embryonálního vývoje. Stejně tak i u mouchy rodu *Drosophila* je kalcineurin nutný pro správné dokončení meiotického zrání (Takeo *et al.*, 2010).

Dále tato práce prokázala, že je kalcineurin zapojen do regulace procesu zisku meiotické kompetence i meiotického zrání. Tento fakt potvrdily experimenty, ve kterých byl protein kalcineurin zablokován pyretroidovými a nepyretroidovými inhibitory. K tomuto účelu bylo využito zrání *in vitro* oocytů prasete s různou úrovní meiotické kompetence pod vlivem pyretroidu, který má inhibiční účinek na kalcineurin – fenvalerátu. Zrání rostoucích prasečích oocytů s částečnou meiotickou kompetencí se zvýšilo, pokud tyto oocyty byly kultivovány s danými koncentracemi fenvalerátu. Naopak, pokud byly plně meioticky kompetentní oocyty s ukončeným růstem kultivovány s tímto pyretroidem, tak zrání bylo zpomaleno. Jakým způsobem pyretroid ovlivňuje zrání oocytů, není zcela jasné. Protože fenvalerát je známým specifickým inhibitorem kalcineurinu (Enan *et al.*, 1992) je tedy možné, že účinek tohoto pyretroidu, který byl pozorován v této práci, je zprostředkovaný přes jeho vliv na kalcineurin. Tento předpoklad byl podpořen výsledky, které byly získány z pokusů, ve kterých oocyty byly kultivovány společně se specifickým nepyretroidovým inhibitorem kalcineurinu – hymenistatinem I. V těchto pokusech účinek hymenistatinu I na zrání prasečích oocytů byl velmi podobný jako vliv fenvalerátu. Nicméně nelze vyloučit, že pyretroid ovlivňuje oocyty skrze iontové kanály, které jsou důležité během zrání savčích

oocytů (Tosti *et Boni*, 2004), protože pyretróidy působí negativně především právě na iontové kanály (Bradberry *et al.*, 2005).

Proč měly inhibitory kalcineurinu opačný vliv (inhibice a indukce meiózy) na zrání meioticky kompetentních oocytů s ukončeným růstem a na zrání oocytů ve fázi růstu s částečnou meiotickou kompetencí není jasné. Pro výstup savčích oocytů ze stádia metafáze I a pokračování meiózy je nutný pokles aktivity MPF (Hampl *et Eppig*, 1995). Inaktivace tohoto komplexu může probíhat přes různé mechanismy. Inhibice MPF může být způsobena destrukcí jeho podjednotky, cyklinu B (Fung *et Poon*, 2005). Aktivita MPF může být také ovlivněna jeho fosforylací či defosforylací (Norbury *et Nurse*, 1992). Jednou z možností proč inhibitory kalcineurinu mají tento opačný efekt na zrání prasečích oocytů, může být to, že různé mechanismy jsou cílem těchto inhibitorů u oocytů ve fázi růstu a oocytů s ukončeným růstem.

Pyretróidní insekticidy se využívají po celém světě a lidé a zvířata jsou jejich účinkům vystaveny při mnoha příležitostech. Hrozbou pro všechny živočichy je kontaminovaná potrava (Torres *et al.*, 1996). Pyretróidy jsou však používány také jako obvyčejné přísady domácích insekticidů. Toto neregulované užívání insekticidů v domácím prostředí zvyšuje riziko vystavení velké části populace nepříznivým účinkům pyretróidů (Soderlund, 2012). Důkazy o hromadění fenvalerátu v organismu lidí a hlodavců naznačují, že je škodlivé mimo jiné i pro jejich reprodukční systém (Arena *et al.*, 2008; Gao *et al.*, 2010). Proto zkoumání, jaký vliv mají pyretróidy na savčí oocyty, si zaslouží zvláštní pozornost.

Pyretróidy jsou chemické látky lipofilní povahy a mohou se ukládat v tkáních s vysokým obsahem tuku. Protože prasečí oocyty obsahují velké množství lipidů (obvykle 156 ng) (McEvoy *et al.*, 2000) na rozdíl od myších oocytů (4 ng na oocyt) (Lowenstein *et Cohen*, 1964) nebo oocytu skotu (58 ng na oocyt) (Ferguson *et Leese*, 1999), nebo oocytu ovce (89 ng na oocyt) (Coull *et al.*, 1998), nelze vyloučit možnost, že ovlivnění prasečích oocytů pyretróidy je větší, než u jiných druhů.

## 7 ZÁVĚR

V této práci byl prokázán výskyt proteinu kalcineurinu v průběhu meiotického zrání prasečího oocyty. V oocytech byla potvrzena exprese obou podjednotek kalcineurinu – kalcineurinu A i kalcineurinu B.

Na základě zablokování proteinu kalcineurinu pyretroidovými a nepyretroidovými inhibitory bylo dále prokázáno, že je kalcineurin zapojen do regulace procesu zisku meiotické kompetence i meiotického zrání. Zrání částečně kompetentních oocytů se zvýšilo, pokud byly oocyty kultivovány s danými koncentracemi fenvalerátu. Stejný inhibitor měl opačný efekt na meiotické zrání oocytů s plnou meiotickou kompetencí, zrání zpomaloval. Podobný účinek byl pozorován i v případě kultivace oocytů s nepyretroidovým inhibitorem, hymenistatinem I.

Přesný mechanismus působení kalcineurinu v oocyty není znám a je třeba se v dalších pracích na sledování úlohy této fosfatázy zapojené do regulace meiotického zrání a zisku meiotické kompetence zaměřit.

## 8 SEZNAM LITERATURY

- Althaus, M., Clauss, W. G. Gasotransmitters: novel regulators of ion channels and transporters. *Front Physiol* [online]. 2013. 4 (27) . [cit. 2015-01-31]. Dostupné z <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3578291/>.
- Arena, A. C. Fernandez, C. D., Porto, E. M., Bissacot, D. Z., Pereira, O. C., Kempinas, W. G. 2008. Fenvalerate, a pyrethroid insecticide, adversely affects sperm production and storage in male rats. *Journal of Toxicology and Environmental Health*. 71 (23). 1550-1558.
- Berridge, M. J. 1993. Inositol trisphosphate and calcium signalling. *Nature*. 361. 315–325.
- Bhatt, R. R., Ferrell, J. E. Jr. 1999. The protein kinase p90rsk as an essential mediator of cytostatic factor activity. *Science*. 286.1362–1365.
- Bielańska-Osuchowska, Z. 2006. Oogenesis in pig ovaries during the prenatal period: ultrastructure and morphometry. *Department of Histology and Embryology*. 22.
- 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.
- Bootman, M. D., Berridge, M. J. 1995. The Elemental Principles of Calcium Signaling. *Cell*. 83. 675-678.
- Bradberry, S. M., Cage, S. A., Proudfoot, A., Vale., J. A. 2005. Poisoning due to Pyrethroids. *Toxicological Reviews*. 24 (2). 93-106.
- Buccione, R., Schroeder A., C., Eppig, J. J. 1990. Interactions between Somatic Cells and Germ Cells throughout Mammalian Oogenesis. *Biology of Reproduction*. 43. 543-547.
- Calarco, P. G., Donahue, R. P., Szollosi, D. 1972. Germinal vesicle breakdown in the mouse oocyte. *Journal of cell science*. 10. 369-385.
- Castilho, P. V., Williams, B. C., Mochida, S., Zhao, Y., Goldberg, M. L. 2009. The M phase kinase Greatwall (Gwl) promotes inactivation of PP2A/B55delta, a phosphatase directed against CDK phosphosites. *Molecular Biology of the Cell*. 20. 477-4789.

- Chang, Ch. P., Neilson, J. R., Bayle, J. H., Gestwicki, J. E., Kuo, A., Stankunas, K., Graef, I. A., Crabtree, R. 2004. A Field of Myocardial-Endocardial NFAT Signaling Underlies Heart Valve Morphogenesis. *Cell*. 118. 649-663.
- Charlesworth, A., Meijer, H. A., de Moor, C. H. 2013. Specificity factors in cytoplasmic polyadenylation. *Wiley Interdisciplinary Reviews: RNA*. 4 (4). 437-461.
- Cheon, Y. 2012. Regulation and 3 dimensional culture of tertiary follicle growth. *Clinical Experimental Reproductive Medicine*. 39 (3). 95-106.
- Chin, D., Means, A. R. 2000. Calmodulin: a prototypical calcium sensor. *Cell Biology*. 10. 322-327.
- Choi, T., Fukasawa, K., Zhou, R., Tessarollo, L., Borror, K., Resau, J., Vande Woude G.F. 1996. The Mos/mitogen-activated protein kinase (MAPK) pathway regulates the size and degradation of the first polar body in maturing mouse oocytes. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 7032-7035.
- Comizzoli, P., Pukazhenti, B. S., Wildt, D. E. 2011. The competence of germinal vesicle oocytes is unrelated to nuclear chromatin configuration and strictly depends on cytoplasmic quantity and quality in the cat model. *Human Reproduction*. 26 (8). 2165-2177.
- Conti, M., Hsieh, M., Zamah, A. M., Oh, J. S. 2012. Novel signaling mechanism in the ovary during oocyte maturation. *Molecular and Cellular Endocrinology*. 356. 65-73.
- Coull, G. D., Speake, B. K., Staines, M. E., Broadbent, P. J., McEvoy, T. G. 1998. Lipid and Fatty acid composition of zona-intact sheep oocytes. *Theriogenology*. 49. 179.
- Crews, C. M., Erikson, R. L. 1992. Purification of a murine protein-tyrosine/threonine kinase that phosphorylates and activates the Erk-1 gene product: relationship to the fission yeast byr1 gene product. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 89. 8205-8209.
- Dalby, K. N., Morrice, N., Caudwell, F. B., Avruch, J., Cohen, P. 1998. Identification of regulatory phosphorylation sites in mitogen-activated protein kinases (MAPK)-activated protein kinase-1a/p90rsk that are inducible by MAPK. *J Biol Chem*. 273. 1496-1505.
- de Jonge, H. W., van der Wiel, C. W., Eizema, K., Weijs, W. A., Everts, M. E. 2006. Presence of SERCA and calcineurin during Fetal Development of Porcine Skeletal Muscle. *J. Journal of Histochemistry and Cytochemistry*. 54. 641-648.

- Dekel, N., Aberdam, E., Sherizly, I. 1984. Spontaneous maturation *in vitro* of cumulus-enclosed rat oocytes is inhibited by forskolin. *Biology of Reproduction*. 31. 244–250.
- DiLuigi, A., Weitzman, V. N., Pace, M. C., Siano, L. J., Maier, D., Mehlmann, L. M. 2008. Meiotic Arrest in Human Oocytes is Maintained by a G<sub>5</sub> Signaling Pathway. *Biology of Reproduction*. 78 (4). 667-672.
- Dutta, R. C. 2002. Peptide immunomodulators versus infection; an analysis. *Immunology Letters*. 83 (3). 153 – 161.
- Edson, M. A., Nagaraja, A. K., Matzuk, M. M. 2009. The mammalian ovary from genesis to revelation. *Endocrine Reviews*. 30 (6). 624-712.
- Enan, E., Matsumara, F. 1992. Specific inhibition of calcineurin by type II synthetic pyrethroid insecticides. *Biochemical Pharmacology*. 43 (8). 1777-1784.
- Eppig, J. J. 2001. Oocyte control of ovarian follicular development and function in mammals. *Reproduction*. 122. 829-838.
- Eppig, J. J., Wigglesworth, K., Pendola, F., Hirao, Y. 1997. Murine Oocytes Suppress Expression of Luteinizing Hormone Receptor Messenger Ribonucleic Acid by Granulosa Cells. *Biology of Reproduction*. 56. 976-984.
- Erickson, G. F. Follicle Growth and Development [CD-ROM]. *Gynecology and Obstetrics*. 2004. [cit. 2014-10-15]. Dostupné z <http://www.glowm.com/resources/glowm/cd/pages/v5/v5c012.html?SESSID=dgkffbkhbvcspamcgn3t3mi491>.
- Ferguson, E. M., Leese, H. J. B. 1999. Triglyceride content of bovine oocytes and early embryos. *Journal of Reproduction and Fertility*. 116. 373-378.
- Ferreira, E. M., Vireque, A. A., Adona, P. R., Meirelles, F. V., Ferriani, R. A., Navarro, P. A. A. S. 2009. Cytoplasmic maturation of bovine oocytes: Structural and biochemical modifications and acquisition of developmental competence. *Theriogenology*. 71. 836-848.
- FitzHarris, G., Marangos, P., Carrol, J. 2007. Changes in endoplasmic reticulum structure during mouse oocyte maturation are controlled by the cytoskeleton and cytoplasmic dynein. *Developmental Biology*. 305.133-144.

- Förstermann, U., Closs, E. I., Pollock, J. S., Nakane, M., Schwarz, P., Gath, I., Kleinert, H. 1994. Nitric Oxide Synthase Isozymes. *Hypertension*. 23 (6). 1121-1131.
- Fung, T. K., Poon, R. Y. C. 2005. A roller coaster ride with the mitotic cyclins. *Seminars in Cell & Developmental Biology*. 16 (3). 335-342.
- Gao, X., Yu, L., Castro, L., Moore, A. B., Hermon, T., Bortner, C., Sifre, M., Dixon, D. 2010. An endocrine-disrupting chemical, fenvalerate, induces cell cycle progression and collagen type I expression in human uterine leiomyoma and myometrial cells. *Toxicology Letters*. 196 (3). 133-141.
- Greenfeld, Ch., Flaws, J. A. 2004. Renewed debate over postnatal oogenesis in the mammalian ovary. *BioEssays*. 26. 829-832.
- Gross, S. D., Schwab, M. S., Lewellyn, A. L., Maller, J. L. 1999. Induction of metaphase arrest in cleaving *Xenopus* embryos by the protein kinase p90rsk. *Science*. 286. 1365–1367.
- Hampl, A., Eppig, J. J. 1995. Analysis of the mechanism(s) of metaphase-I arrest in maturing mouse oocytes. *Development*. 121. 925-933.
- Hara, M., Abe, Y., Tanaka, T., Yamamoto, T., Okumura, E., Kishimoto, T. 2012. Greatwall kinase and cyclin B-CDK1 are both critical constituents of M-phase-promoting factor. *Nature communications*. 3.
- Hattori, M. A., Tabata, S. 2006. Nitric oxide and ovarian function. *Animal Science Journal*. 77 (3). 275-284.
- Herrick, J. R., Brad, A. M., Krisher, R. 2006. Chemical manipulation of glucose metabolism in porcine oocytes: effects on nuclear and cytoplasmic maturation *in vitro*. *Reproduction*. 131. 289-298.
- Hirao, Y., Nagai, T., Kubo, M., Miyano, T., Miyake, M., Kato, S. 1994. *In vitro* growth and maturation of pig oocytes. *Journal of Reproduction and Fertility*. 100. 333-339.
- Hishimoto, N., Kishimoto, T. 1988. Regulation of meiotic metaphase by a cytoplasmic maturation-promoting factor during mouse oocyte maturation. *Developmental Biology*. 126. 242-252.



- Huang, P. L. 2000. Mouse Models of Nitric Oxide Synthase Deficiency. *JASN*. 11 (2). 120-123.
- Hunter, M. G. 2000. Oocyte maturation and ovum quality in pigs. *Reviews of Reproduction*. 5. 122-130.
- Inoue, M., Naito, K., Nakayama, T., Sato, E. 1998. Mitogen-activated protein kinase translocates into the germinal vesicle and induces germinal vesicle breakdown in porcine oocytes. *Biology of Reproduction*. 58.130-136.
- Jablonka-Shariff, A., Olson, M. L. 1998. The role of nitric oxide in oocyte meiotic maturation and ovulation: Meiotic abnormalities of endothelial nitric oxide synthase knock-out mouse oocytes. *Endocrinology*. 139. 2944 – 2954.
- Jessus, C., Haccard, O. 2007. Calcium's double punch. *Nature*. 449. 297-298.
- John, G. B., Shidler, M. J., Besmer, P., Castrillon, D. H. 2009. Kit Signaling via PI3K promotes ovarian follicle maturation but is dispensable for primordial follicle activation. *Developmental Biology*. 331 (2). 292-299.
- 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*. 428. 145-150.
- Julien, R., Adamkiewicz, G., Levy, J. I., Bennett, D., Nishioka, M., Spengler, J. D. 2008. Pesticide loadings of select organophosphate and pyrethroid pesticides in urban public housing. *Journal of Exposure Science and Environmental Epidemiology*. 18. 167-174.
- Kagii, H., Naito, K., Sugiara, K., Iwamori, N., Ohashi, S., Goto, S., Yamanouchi, K., Tojo, H. 2000. Requirement of mitogen-activated protein kinase activation for the meiotic resumption of porcine oocytes. *Journal of Reproduction and Development*. 46. 249-256.
- Kanatsu-Shinohara, M., Schultz, R. M., Kopf, G. S. 2000. Acquisition of Meiotic Competence in Mouse Oocytes: Absolute Amounts of p34cdc2, Cyclin B1, cdc25C, and wee1 in Meiotically Incompetent and Competent Oocytes. *Biology of Reproduction*. 63. 1610-1616.
- Kim, H., Moon, CH., Ahn, M., Lee, Y., Kim, H., Kim, S., Ha, T., Jee, Y., Shin, T. 2005. Expression of nitric oxide synthase isoforms in the porcine ovary during follicular development. *Journal of Veterinary Science*. 6 (2). 97-101.

- Klee, C. B., Ren, H., Wang, X. 1998. Regulation of the Calmodulin-stimulated Protein Phosphatase, Calcineurin. *The Journal of Biological Chemistry*. 273 (22). 13367-13370.
- Kolluru, G. K., Shen, X., Bir, S. C., Kevil, Ch. G. 2013. Hydrogen Sulfide Chemical Biology: Pathophysiological roles and detection. *Nitric Oxide*. 30. 5-20.
- Landim-Alvarenga, F. C., Maziero, R. R. D. 2014. Control oocyte maturation. *Animal Reproduction*. 11 (3). 150-158.
- Lee, J., Miyano, T., Moor, R. M. 2000. Localization of phosphorylated MAP kinase during the transition from meiosis I to meiosis II in pig oocytes. *Zygote*. 8. 119-125.
- Li, H., Rao, A., Hogan, P. G. 2011. Interaction of calcineurin with substrates and targeting proteins. *Trends in Cell Biology*. 21 (2). 91-103.
- Liang, C. G., Huo, L. J., Zhong, Z. S., Chen, D. Y., Schatten, H., Sun, Q. Y. 2005. Cyclic adenosin 3'5'- monophosphate-dependent activation mitogen-activated protein kinase in cumulus cells is essential for germinal vesicle breakdown of porcine cumulus-enclosed oocytes. *Endocrinology*. 146. 4437-4444.
- Liang, C. G., Su, Y. Q., Fan, H. Y., Schatten, H., Sun, Q. Y. 2007. Mechanism regulating oocyte meiotic resumption: Roles of mitogen-activated protein kinase. *Molecular Endocrinology*. 21 (9). 2037-2055.
- Liang, R., Yu, W., Du, J., Yang, L., Shang, M., Guo, J. 2006. Localization of cystathionine  $\beta$  synthase in mice ovaries and its expression profile during follicular development. *Chinese Medical Journal*. 119 (22). 1877-1883.
- Liu, M. The biology and dynamics of mammalian cortical granules. *Reproductive biology and endocrinology* [online]. 2011. 9 (149). [cit. 2014-11-11]. Dostupné z <http://www.rbej.com/content/9/1/149>.
- Lohka, M. J., Maller, J. L. 1985. Induction of Nuclear Envelope Breakdown, Chromosome Condensation, and Spindle Formation in Cell-free Extracts. *The Journal of Cell Biology*. 101 (2). 518-523.
- Lowenstein, J. E., Cohen A. I. 1964. Dry mass, lipid content and protein content of the intact and zona-free mouse ovum. *Journal of Embryology and Experimental Morphology*. 12. 113-121.

- Lucas, X., Martínez, E. A., Roca, J., Vázquez, J. M., Gil, M. A., Pastor, L. M., Alabart, J. L. 2002. Relationship between antral follicle size, oocyte diameters and nuclear maturation of immature oocytes in pigs. *Theriogenology*. 58. 871-885.
- Macian, F. 2005. NFAT proteins: key regulators of – cell development and function. *Nature Reviews Immunology*. 5. 472-484.
- Macháty, Z., Funuhashi, H., Day, B. N., Prather, R. S. 1997. Developmental Changes in the Intracellular  $Ca^{2+}$  Release Mechanism in Porcine Oocytes. *Biology of Reproduction*. 56. 921-930.
- Madwick, S., Jones, K. T. 2007. How eggs arrest at metaphase II: MPF stabilisation plus APC/C inhibition equals Cytostatic Factor. *Cell Division*. 2 (4).
- Marteil, G., Richard-Parpaillon, L., Kubiak, J. Z. 2009. Role of oocyte quality in meiotic maturation and embryonic development. *Reproductive Biology*. 9. 203-224.
- Masui, Y., Markert. C. L. 1971. Cytoplasmic control of nuclear behavior during meiotic maturation of frog oocytes. *Journal of Experimental Zoology*. 177. 129–145.
- Matova, N., Cooley, L. 2001. Comparative Aspect of Animal Oogenesis. *Developmental Biology*. 231. 291-320.
- McEvoy, T. G., Coull, G. D., Broadbent, P. J., Hutchinson, J. S. Speake, B. K. 2000. Fatty acid composition of lipids in immature cattle, pig and sheep oocytes with intact *zona pellucida*. *Journal of Reproduction and Fertility*. 11. 163-170.
- Mehlmann, L. M. 2005. Stop and starts in mammalian oocytes: recent advances in understanding the regulation of meiotic arrest and oocyte maturation. *Reproduction*. 130. 791-799.
- Mitra, J., Schultz, R. M. 1996. Regulation of the acquisition of meiotic competence in the mouse: changes in the subcellular localization of *cdc2*, cyclin B1, *cdc25C* and *wee1*, and in the concentration of these proteins and their transcripts. *Journal of Cell Science*. 109. 2407-2415.
- Mochida, S., Hunt, T. 2007. Calcineurin is required to release *Xenopus* egg extracts from meiotic M phase. *Nature*. 449. 336-339.

- Mochida, S., Ikeo, S., Gannon, J., Hunt, T. 2009. Regulated activity of PP2A-B55 $\delta$  is crucial for controlling entry into and exit from mitosis in *Xenopus* egg extracts. *EMBO Journal*. 28. 2777–2785.
- Motlik, J., Crozet, N., Fulka, J. 1984. Meiotic competence *in vitro* of pig oocytes isolated from early antral follicles. *Journal of the Society for Reproduction and Fertility*. 72. 323-328.
- Mueller, P. R., Coleman, T. R., Kumagai, A., Dunphy, W. G. 1995. Myt1: a membrane-associated inhibitory kinase that phosphorylates Cdc2 on both threonine-14 and tyrosine-15. *Science*. 270. 86–90.
- Nagaraja, A. K., Middlebrook, B. S., Rajanahally, S., Myers, M., Matzuk, M. M., Pangas, S. A. 2010. Defective Gonadotropin-Dependent Ovarian Folliculogenesis and Granulosa Cell Gene Expression in Inhibin-Deficient Mice. *Endocrinology*. 151 (10). 4994-5006.
- Nebreda, A. R., Hunt, T. 1993. The c-mos proto-oncogene protein kinase turns on and maintains the activity of MAP kinase, but not MPF, in cell-free extracts of *Xenopus* oocytes and eggs. *The EMBO journal*. 12 (5). 1979-1986.
- Nishiyama, T., Yoshizaki, N., Kishimoto, T., Ohsumi, K. 2007. Transient activation of calcineurin is essential to initiate embryonic development in *Xenopus laevis*. *Nature*. 449 (20). 341-345.
- Norbury, C., Nurse, P. 1992. Animal cell cycles and their control. *Annual Reviews of Biochemistry*. 61. 441–470.
- O'Connell, M. J., Osmani, A. H., Morris, N. R., Osmani, S. A. 1992. An extra copy of nimE<sup>cYclinB</sup> elevates pre-MPF levels and partially suppresses mutation of nimT<sup>cdc25</sup> in *Aspergillus nidulans*. *The EMBO Journal*. 11 (6). 2139-2149.
- Ohashi, S., Naito, K., Sugiura, K., Iwamori, N., Goto, S., Naruoka, H., Tojo, H. 2003. Analyses of Mitogen-Activated Protein Kinase Function in the Maturation of Porcine Oocytes. *Biology of Reproduction*. 68. 604-609.
- Palma, G.A., Argañaraz, M.E., Barrera, A.D., Rodler, D., Mutto, A.Á., Sinowatz, F. *Biology and Biotechnology of Follicle Development*. *The Scientific World Journal* [online] 2012. [cit. 2014-10-30]. Dostupné z <http://www.hindawi.com/journals/tswj/2012/938138/>.

- Palmer, A., Gavin, A. C., Nebreda, A. R. 1998. A link between MAP kinase and p34(cdc2)/cyclin B during oocyte maturation: p90(rsk) phosphorylates and inactivates the p34(cdc2) inhibitory kinase Myt1. *The EMBO J.* 17. 5037–5047.
- Papkoff, J., Verma, I. M., Hunter, T. 1982. Detection of a transforming gene product in cells transformed by Moloney murine sarcoma virus. *Cell.* 29. 417–426.
- Pelosi, E., Forabosco, A., Schlessinger, D. 2011. Germ cell formation from embryonic stem cells and the use of somatic cell nuclei in oocytes. *Annals of the New York Academy of Sciences.* 1221 (1). 18-26.
- Peter, M., Nakagawa, J., Dorée, M., Labbé, J. C., Nigg, E. A. 1990. *In vitro* disassembly of the nuclear lamina and M-phase specific phosphorylation of lamins by cdc2 kinase. *Cell.* 61. 591–602.
- Peters, J. M. 2002. The anaphase-promoting complex: proteolysis in mitosis and beyond. *Molecular Cell.* 9 (5). 931-43.
- Petr J., Rozinek J., Hruban V., Jílek F., Sedmíková M., Vaňourková Z., Němeček Z. 2001. Ultrastructural localization of calcium deposits during *in vitro* culture of pig oocytes. *Molecular Reproduction and Development.* 58. 196 – 204.
- Posada, J., Yew, N., Ahn, N. G., Vande Woude, G. F., Cooper, J. A. 1993. Mos stimulates MAP kinase in *Xenopus* oocytes and activates a MAP kinase kinase *in vitro*. *Molecular and Cell Biology.* 13. 2546–2553.
- Radford, H. E., Meijer, H. A., de Moor, C. H. 2008. Translational control by cytoplasmic polyadenylation in *Xenopus* oocytes. *Biochimica et Biophysica Acta.* 1779 (4). 217-229.
- Reynolds, N. J. Al-Daraji, W. I. 2002. Calcineurin inhibitors and sirolimus: mechanisms of action and application in dermatology. *Clinical and Experimental Dermatology.* 27. 555-561.
- Rhee, S. G. 2001. Regulation of Phosphoinositide-Specific Phospholipase C. *Annual Review of Biochemistry.* 70. 281-312.
- Rosselli, M., Keller, P. J., Dubey, R. K. 1998. Role of nitric in the biology, physiology and pathophysiology of reproduction. *Human Reproduction Update.* 4 (1). 3-24.

- Rusnak, F., Mertz, P. 2000. Calcineurin: Form and Function. *Physiological Reviews*. 80 (4). 1483-1521.
- Russo, C., Beaujois, R., Bodart, J-F., Blossey, R. 2009. Kicked by Mos and tuned by MPF-the initiation of the MAPK cascade in *Xenopus* oocytes. *HFSP J.* 3 (6). 428-440.
- Sagata, N., Watanabe, N., Vande Woude, G. F., Ikawa, Y. 1989. The c-mos proto-oncogene product is a cytostatic factor responsible for meiotic arrest in vertebrate eggs. *Nature* 342. 512–518.
- Santiquet, N., Robert, C., Richard, F. J. 2013. The Dynamics of Connexin Expression, Degradation and Localisation Are Regulated by Gonadotropins during the Early Stages of *In Vitro* Maturation of Swine Oocytes. *Plos One*. 8 (7).
- Sánchez, F., Smitz, J. 2012. Molecular control of oogenesis. *Biochimica et Biophysica Acta*. 1822. 1896-1912.
- Schultz, R. M., Montgomery, R. R., Belanoff, J. R. 1983. Regulation of mouse oocyte meiotic maturation: Implication of a decrease in oocyte cAMP and protein dephosphorylation in commitment to resume meiosis. *Developmental Biology*. 97. 264–273.
- Shi, Y. 2009. Serine/Threonine Phosphatases: Mechanism through Structure. *Cell*. 139. 468-484.
- Sieber, M., Baumgrass, R.. Novel inhibitors of the calcineurin/NFATc hub - alternatives to CsA and FK506?. *Cell Communication and Signaling* [online]. 2009. 7 (25). [cit. 2015-02-01] Dostupné z <http://www.biosignaling.com/content/7/1/25>.
- Soderlund, D. M. 2010. State-dependent modification of voltage-gated sodium channels by pyrethroids. *Pesticide Biochemistry and Physiology*. 97. 78-86.
- Soderlund, D. M. 2012. Molecular Mechanism of Pyrethroid Insecticide Neurotoxicity: Recent Advances. *Archives of Toxicology*. 86 (2). 165-181.
- Solomon, M. J., Glotzer, M., Lee, T. H., Philippe, M., Kirschner, M. W. 1990. Cyclin activation of p34<sup>cdc2</sup>. *Cell*. 63. 1013–1024.

- Sommer, D., Fakata, K. L., Swanson, S. A., Stemmer, P. M. 2000. Modulation of the phosphatase activity of calcineurin by oxidants and antioxidants *in vitro*. *European Journal of Biochemistry*. 267. 2312-2322.
- Stojkovic, M., Motlik, J., Kölle, S., Zakhartchenko, V., Alberio, R., Sinowatz F., Wolf, E. 1999. Cell-cycle control and oocyte maturation: Review of literature. *Reproduction of Domestic Animal*. 34. 335 –342.
- Stricker, S. A. 2006. Structural reorganization of the endoplasmic reticulum during egg maturation and fertilization. *Seminars in cell & developmental biology*. 17. 303-313.
- Sun, Q. Y., Breitbart, H., Schatten, H. 1999. Role of the MAPK cascade in mammalian germ cells. *Reproduction, Fertility and Development*. 11. 443–450.
- Sun, Q. Y., Miao, Y-L., Schatten, H. 2009. Towards a new understanding on the regulation of mammalian oocyte meiosis resumption. *Cell Cycle*. 8 (17). 2741-2747.
- Sun, Q. Y., Nagai, T. 2003. Molecular mechanism underlying pig oocyte maturation and fertilization. *Molecular Reproduction and Development*. 49. 347 – 359.
- Sun, Q. Y., Wu, G. M., Lai, L., Park, K. W., Cabot, R., Cheong, H. T., Day, B. N., Prather, R. S., Schatten, H. 2001. Translocation of active mitochondria during pig oocyte maturation, fertilization and early embryo development *in vitro*. *Reproduction*. 122. 155-163.
- Takahashi, K., Kikuchi, K., Uchida, Y., Kanai-Kitayama, S., Suzuki, R., Sato, R., Toma, K., Geshi, M., Nakano, M., Yonezawa, N. 2013. Binding of Sperm to the Zona Pellucida Mediated by Sperm Carbohydrate-Binding Proteins is not Species-Specific *in vitro* between Pigs and Cattle. *Biomeolecules*. 3 (1). 85-107.
- 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.
- Takeo, S., Tsuda, M., Akahori, S., Matsuo, T., Aigaki, T. 2006. The calcineurin regulator sra plays essential role in female meiosis in *Drosophila*. *Current Biology*. 16. 1435-1440.
- Tash, J., 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.

- Torres, C. M., Picó, Y., Mañes, J. 1996. Determination of pesticide residues in fruit and vegetables. *Journal of Chromatography A*. 754. 301 – 331.
- Tosti, E., Boni, R. 2004. Electrical events during gamete maturation and fertilization in animals and humans. *Human Reproduction Update*. 10. 53-65.
- Tripathi, A., Kumar, K. V. K., Chaube, S. K. 2010. Meiotic Cell Cycle Arrest in Mammalian Oocytes. *Journal of Cellular Physiology*. 223. 592-600.
- Tsai, P. S., van Haeften, T., Gadella, B. M. 2011. Preparation of the cortical reaction: maturation-dependent migration of SNARE proteins, clathrin, and complexin to the porcine oocyte's surface blocks membrane traffic until fertilization. *Biology of Reproduction*. 84 (2). 327-35.
- Tunquist, B. J., Maller, J. L. 2003. Under arrest: cytostatic factor (CSF)-mediated metaphase arrest in vertebrate eggs. *Genes & Development*. 17 (6). 683-710.
- Ueki, K., Muramatsu, T., Kincaid, R. L. 1992. Structure and expression of 2 isoforms of the murine calmoduline-dependent protein phosphatase regulatory subunit (calcineurin B). *Biochemical and Biophysical Research Communications*. 187. 537-543.
- Vaccari, S., Weeks, J. L., Hsieh, Menniti, F. S., Conti, M. 2009. Cyclic GMP Signaling Is Involved in the Luteinizing Hormone-Dependent Meiotic Maturation of Mouse Oocytes. *Biology of Reproduction*. 81 (3). 595-604.
- Van Voorhis, B. J., Dunn, M., Snyder, G., Weiner, C. 1994. Nitric oxide: an autocrine regulator of human granulosa-luteal cell steroidogenesis. *Endocrinology*. 135. 1799–1806.
- Van Blerkom, J. 1991. Microtubule mediation of cytoplasmic and nuclear maturation during the early stages of resumed meiosis in cultured mouse oocytes. *Proc Natl. Acad. Sci. USA*. 88. 5031-5035.
- van den Hurk, R., Zhao J. 2005. Formation of mammalian oocytes and their growth, differentiation and maturation within ovarian follicles. *Theriogenology*. 63 (6). 1717 – 1751.
- Verlhac, M. H., Kubiak, J. Z., Clarke, H. J., Maro, B. 1994. Microtubule and chromatin behavior follow MAP kinase activity but no MPF activity during meiosis in mouse oocytes. *Development*. 120. 1017-1025.



- Vigneron, S., Brioude, E., Burgess, A., Labbé, J. C., Lorca, T., Castro, A. 2009. Greatwall maintains mitosis through regulation of PP2A. *EMBO Journal*. 28, 2786–2793.
- Virant-Klun, I., Knez, K., Tomazevic, T., Skutella T. Gene Expression Profiling of Human Oocytes Developed and Matured *In Vivo* or *In Vitro*. *BioMed Research International* [online]. 2013. [cit. 2014-05-11]. Dostupné z <http://www.hindawi.com/journals/bmri/2013/879489/cta/>.
- Wang, R. 2002. Two's company, three's a crowd: can H<sub>2</sub>S be the third endogenous gaseous transmitter?. *The FASEB Journal*. 16 (13). 1792-1798.
- Wassarman, P. M., Albertini, D. F. 1994. The Mammalian Ovum. In: Knobil, E., Neill, J. D. (eds.). *The Physiology of Reproduction*. Raven Press. New York. 79–122. ISBN: 978-0781700863.
- Wassarman, P. M., Josefowicz, W. J., Letourneau, G. E. 1976. Meiotic maturation of mouse oocytes *in vitro*: inhibition of maturation at specific stages of nuclear progression. *Journal of Cell Science*. 22. 531-545.
- Wera, S., Hemmings, B. A. 1995. Serine/threonine protein phosphatases. *Biochemical Journal*. 311. 17-29.
- West, E. R., Shea, L. D., Woodruff, T. K. 2009 Engineering the Follicle Microenvironment. *Semin Reprod Med*. 25 (4). 287-299.
- Zhang, M., Zhou, B., Wang, Ch. 2007. Gonadotropine-controlled mammal oocyte meiotic resumption. *Frontiers in Bioscience*. 12. 282-296.
- Zhu, X. Y., Hang, G., Xin, N. 2011. Hydrogen Sulfide in the Endocrine and Reproductive Systems. *Exper Review of Clinical Pharmacology*. 4 (1). 75-82.

## 9 SEZNAM POUŽITÝCH ZKRATEK

APC/C	Anaphase Promoting Factor/Cyclosome
bFGF	basic Fibroblast Growth Factor
BMPs	Bone Morphogenetic Proteins
CaM	Kalmodulin
CaMK	Ca <sup>2+</sup> /kalmodulin dependentní proteinkináza
cAMP	Cyklický adenosinmonofosfát
CBS	Cystathionin-β-syntáza
CDK1	Cyklin dependentní kináza 1
cGMP	Cyklický guanosinmonofosfát
cNOS	Konstitutivní syntáza oxidu dusnatého
CsA	Cyklosporin A
CSF	Cytostatický faktor
COC	Kumulo – oocytární komplex
CSE	Cystathionin-γ-lyáza
DAG	Diacylglycerol
eNOS	Endoteliální syntáza oxidu dusnatého
ER	Endoplazmatické retikulum
ERK	Extracelulárně regulovaná kináza; MAPK
FK506	Takrolimus
FKBP12	FK506 vázající protein 12
FSH	Folikulostimulační hormon
GA	Golgiho Aparát

GV	Zárodečný váček (Germinal Vesicle)
GVBD	Rozpad zárodečného váčku (Germinal Vesicle Breakdown)
iNOS	Indukovatelná syntáza oxidu dusnatého
IP <sub>3</sub>	Inositol 1,4,5 trifosfát
IP <sub>3</sub> R	Inositol 1,4,5 trifosfátové receptory
KL	Kit Ligand
LH	Luteinizační hormon
LIF	Leukemia Inhibitory Factor
NO	Oxid dusnatý
nNOS	Nervová syntáza oxidu dusnatého
MI	Metafáze I
MII	Metafáze II
MAPK	Mitogen-Activated Protein Kinase
MEK1	MAPK kinase - Mitogen-Activated Protein Kinase kinase
MPF	Maturation Promoting Factor
mRNA	Messengerová ribonukleová kyselina
MUFs	Multilaminar Follicles
NFAT	Nuclear Factor of Activated T cell
p90rsk	Kináza ribozomálního proteinu S6
PGCs	Primordiální zárodečné buňky
PDE	Fosfodiesteráza
PDE3A	Fosfodiesteráza typu 3A
PIP <sub>2</sub>	Fosfatidyl inositol 4,5 – bis fosfát

PKA	Proteinkináza A
PKC	Proteinkináza C
PLC	Fosfolipáza C
PP1	Protein fosfatáza 1
PP2A	Protein fosfatáza 2A
PP2B	Protein fosfatáza 2B
rRNA	Ribozomální ribonukleová kyselina
RyR	Ryanidinové receptory
TGF $\beta$	Transforming Growth Factor
ZPGs	Glykoproteiny vrstvy <i>zona pellucida</i>