

Česká zemědělská univerzita v Praze
Fakulta agrobiologie, potravinových a přírodních zdrojů

Katedra veterinárních disciplín



Vliv fosfatázy 2B na meiotické zrání oocyту prasete

Diplomová práce

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

Autor práce: Bc. Adriana Slezáková

estné prohlá-ení

Prohlašuji, že jsem svou diplomovou práci na téma šVliv fosfatázy 2B na meiotické zrání oocytu prasete 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 neporušil autorská práva těchto osob.

V Praze dne 11. dubna 2014

Poděkování

Ráda bych touto cestou poděkovala vedoucí diplomové práce doc. Ing. Evě Chmelíkové, Ph.D. za odbornou pomoc, připomínky a vedení při řešení zadaného tématu. Dále děkuji Ing. Tereze Fialmanové za její pomoc, ochotu a vstřícnost při sepsání této práce.

Mé díky patří také mým rodičům, kteří mne během celého studia podporovali a pevně věřili, že tato práce brzy vznikne.

Souhrn

V práci byla potvrzena exprese fosfatázy 2B, kalcineurinu, v oocytu prasete během meiotického zrání. Pomocí imunocytochemické lokalizace byly zmapovány změny v expresi proteinu během meiotického zrání a přítomnost proteinu byla stanovena také metodou Western blot.

V oocytech byla prokázána přítomnost obou podjednotek kalcineurinu, kalcineurin A i B. Kalcineurin byl detekován ve všech zkoumaných kategoriích oocytů tj. ve stádiu zárodečného váčku a v první a druhé meiotické metafázi v oblasti chromozómů, v cytoplazmě a v korové oblasti. V průběhu meiotického zrání byla sledována významná změna lokalizace kalcineurinu A a kalcineurinu B. Výrazným rysem byla kumulace kalcineurinu A i kalcineurinu B v korové části oocytů. Nejvyšší množství obou podjednotek bylo v korové části dozrálých oocytů v metafázi II, což není překvapivé vzhledem k tomu, že kalcineurin je asociován s aktinovým cytoskeletem.

Z výsledků práce vyplývá, že kalcineurin může sehrávat významnou roli při regulaci zrání oocytů. Konkrétní úloha obou podjednotek a jejich izoform během meiotického zrání oocytu prasete zůstává nejasná a k jejímu objasnění bude třeba provést další experimenty, které budou zaměřeny na objasnění funkce kalcineurinu v jednotlivých fázích oogeneze a aktivace oocytu po oplození.

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

Summary

The thesis confirmed the expression of phosphatase 2B, calcineurin in porcine oocytes during meiotic maturation. The changes in protein expression during meiotic maturation have been charted using immunocytochemical localization technique and the presence of protein was also demonstrated by the Western blot method. Both subunits of calcineurin, calcineurin A and B have been found in oocytes. Calcineurin was detected in all examined categories of oocytes i.e. in the germinal vesicle stage and the first and second meiotic metaphase in the area of chromosomes, and in the cytoplasm in the cortical region. During meiotic maturation, the significant change in the localization of calcineurin A and calcineurin B has been observed. A distinctive feature was the accumulation of calcineurin A and calcineurin B in the cortex of oocytes. The highest amounts of both subunits were in the cortex of matured oocytes in metaphase II, which is not surprising given the fact that calcineurin is associated with the actin cytoskeleton. The results of the thesis indicate that calcineurin may play important role in regulating the maturation of oocytes. The specific roles of the two subunits and their isoforms during meiotic maturation of porcine oocytes remain unclear, and its clarification would require further experiments which would be aimed at clarifying of the function of calcineurin in various stages of oogenesis and activation of oocytes after fertilization.

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	3
3.1.1	<i>Fáze množení</i>	3
3.1.2	<i>Fáze růstu</i>	5
3.1.3	<i>Fáze zrání</i>	8
3.1.4	<i>Faktory ovlivňující oogenezi</i>	12
3.2	FOSFATÁZA 2B	19
3.2.1	<i>Struktura a izoformy fosfatázy 2B</i>	19
3.2.2	<i>Aktivace fosfatázy 2B</i>	21
3.2.3	<i>Cílové proteiny fosfatázy 2B</i>	21
3.2.4	<i>Funkce fosfatázy 2B v reprodukci</i>	22
4	MATERIÁL A METODY	24
4.1	ODBĚR VAJEČNÍKŮ	24
4.2	ZÍSKÁVÁNÍ OOCYTŮ S UKONČENÝM RŮSTEM	24
4.3	KULTIVACE OOCYTŮ	24
4.4	BARVENÍ A FIXACE OOCYTŮ	25
4.5	STANOVENÍ FOSFATÁZY 2B METODOU WESTERN BLOT	25
4.6	IMUNOCYTOCHEMICKÁ ANALÝZA	27
4.7	HODNOCENÍ VÝSLEDKŮ KONFOKÁLNÍ MIKROSKOPIE	28
4.8	USPOŘÁDÁNÍ EXPERIMENTŮ	28
4.8.1	<i>Detekce podjednotek A a B proteinu kalcineurinu během meiotického zrání oocytů prasete</i>	28
4.8.2	<i>Intracelulární lokalizace podjednotek kalcineurinu A a B během fáze zrání prasečích oocytů</i>	29
4.9	STATISTICKÁ ANALÝZA	29
5	VÝSLEDKY	30
5.1	DETEKCE PODJEDNOTEK A A B PROTEINU KALCINEURINU	30
5.2	INTRACELULÁRNÍ LOKALIZACE PODJEDNOTEK KALCINEURINU A A B BĚHEM FÁZE ZRÁNÍ PRASEČÍCH OOCYTŮ	31

6	DISKUSE.....	34
7	ZÁVĚR.....	36
8	SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY	37

1 Úvod

V současné době dochází k rychlému rozvoji biotechnologií, který se projevuje také v chovu hospodářských zvířat. U prasete je uplatnění biotechnologických postupů oproti jiným hospodářským zvířatům obtížné, jelikož se vyskytuje mnoho problémů souvisejících mimo jiné také s nedostatkem kvalitních dozrálých oocytů. Využití oocytů pro biotechnologie zůstává zejména nedostatek informací o mechanismech, které ovlivňují meiotické zrání oocytů. Na regulaci meiotického zrání se podílí řada faktorů, mezi které patří neurotransmitery, řada kináz a fosfatáz. Fosfatáza 2B se účastní regulace meiotického zrání u oocytů mouchy rodu *Drosophila* a žáby rodu *Xenopus*. Cílem diplomové práce bylo zjistit, zda je tato fosfatáza zapojena také do regulace meiotického zrání oocytu prasete.

2 Hypotéza a cíle práce

Na základ dostupných informací z odborné literatury byla stanovena hypotéza, podle které je fosfatáza 2B, calcineurin, zapojena do procesu meiotického zrání prasčího oocyty.

Cílem práce je ověření hypotézy, podle které je fosfatáza 2B přítomna v oocyty prasce během jeho meiotického zrání a má podíl na jeho regulaci. Hypotéza bude ověřena na základ sledování exprese regulační a katalytické podjednotky proteinu metodou Western blot a sledování změn v buněčné lokalizaci podjednotek proteinu pomocí imunocytochemické metody během meiotického zrání oocyty prasce.

3 Literární re-er-e

3.1 Oogeneze

Oogeneze je soubor evolu ních mechanism , jejichž výsledkem je vznik samí í pohlavní bu ky, oocyty. Oogeneze u v-ech savc za íná brzy, je jífl sou ástí embryonálního vývoje samice a kon í afl na konci pohlavní aktivity samice (Picton *et. al*, 1998).

P vod oocyt je v kmenových bu kách - tzv. primordiálních zárode ných bu kách (Primordial Germ Cells ó PGC), které vznikají extragonadáln .

Meiotický proces pokračuje v době ovulace. Z jednoho primárního oocyty vznikne po reduk ním d lení (meióza) pouze jedno vají ko (Reece, 2009). Oogeneze je len na do t í fází, fáze množení, r stu a zrání.

3.1.1 Fáze množení

Fáze množení spo ívá v opakovaném d lení diploidních kmenových bun k, oogonií.

Pro tuto fázi je charakteristické mitotické d lení zárode ných bun k. Primordiální zárode né bu ky se zakládají jífl v období embryonálního vývoje v procesu vzniku primitivního proufku a poté migrují (Picton *et. al*, 1998). Na po átku probíhá pasivní migrace ze st ny floutkového vá ku do epitelu zadního st eva, dal-í migraci zárode ných uskute uje chemotaxe, která probíhá podél dorzálního mesenteria pohlavní li-ty do oblasti budoucích gonád (Wassarman, 1988).

Vají ka vznikají z malého po tu zárode ných kmenových bun k, které vznikají extra-gonáln .

P echod zárode ných bun k je zprvu pasivn do endodermálního epithelia zadního st eva a pak pomocí pohybu améb kolem dorsálního mesenteria sm rem ke genitální li-t . Patrn b hem p esunu zárode ných bun k z extraembryonální oblasti do domn lých gonád pracuje chemotaktický mechanismus (Wassarman, 1988).

Gonády embrya prasete jsou poprvé zaznamenány 24-26. den po oplození, p estofle primordiální zárode né bu ky jsou popisovány v míst zárode né brázdy nejprve po 18 dni oplození. Mitóza zárode ných bun k je patrná od 13. dne embryonálního flivota afl do 7. dne p ed dobou narození. Po et zárode ných bun k nápadn roste z 5 000 ve 20. dnu po oplození

do klimaxu 1 100 000 v 50. dnu po oplození. Pak dochází ke konci mitotické aktivity a k nekróze některých zárodečných buněk (Eppig *et al.*, 2004).

Na plemenných buněk epiblastu v PGC se podílí řada faktorů, například transformační růstový faktor TGF β (Transforming Growth Factor) a morfogenické faktory jako BMP-4. Signalizace těchto faktorů probíhá přes tyrozinkinázové receptory popřípadě receptory související s G-proteiny (Moore *et al.*, 2008). C-Kit ligand působí na chod PGC do zárodečné rýhy. Somatické buňky tvoří c-Kit ligand v oblasti migrace PGC (Logan *et al.*, 2003; Hutt *et al.*, 2006).

Okolo 30. dne probíhá u prasete migrace zárodečných buněk do ovárií (Eppig *et al.*, 2004).

Po ztrátě motility v oblasti vyvíjejícího vaječníku vstupují zárodečné buňky do mitózy a nazývají se oogonie (Gosden *et Bownes*, 1995).

Součástí typické morfologické stavby oogonií jsou mezibuněčné mstky, které spojují sousední zárodečné buňky (Wassarman, 1988). Sloučení zárodečných buněk je pomocí gap junction a je považováno za primární spojení mezi buňkami. Tyto mstky jsou zde přítomny pouze do začátku a toto spojení zárodečných buněk je permenou ukončeno cytokinezí oogonií (Shultz, 1985).

Tvar oogonií je v interfázi většinou kulového nebo vejčitého tvaru. Jádro je rovnoměrné a v matrix má náhodně rozptýlený fibrilogramulární materiál. Nápadná jádérka oogonií se podobají hrubé nepravidelné síti granulární hmoty (Baker, 1967).

Velké mitochondrie vejčitého tvaru jsou obsaženy v cytoplazmálních klidových a dýchacích oogoniích, součástí mitochondrií bývají obvykle kristy (Baker, 1967) s tzv. ortodoxní polohou a transverzální orientací (Wassarman, 1988).

Oogonie jsou primordiální zárodečné buňky vaječníku, z nichž se vyvíjejí oocyty (Reece, 2009). Jedná se o diploidní buňky, z nichž některé se přestanou dělit mitoticky a vstoupí do diplotene profáze I meiotického dělení. V tomto stadiu se z nich stávají primární oocyty (Depreux *et al.*, 2010).

V určitém stupni oogeneze se oogonie dostanou do stádia preleptotene profáze prvního meiotického dělení. Toto období je typické pro počátek redukčního dělení a tím také pro přeměnu oogonie v oocyt (Wassarman, 1988). Vstupem do stádia leptotene začíná vlastní dělení,

nastává kondenzace chromozomů v jádře a jsou pozorovatelná jako tenká vlákna s centrálním osovým bílkovinným vláknem. K jaderné membráně se upínají na obou koncích vlákna chromozomy a v místě připojení je nápadné zmnofnění tkáně, které je nazýváno upínací plošná. Velmi důležitá funkce v této fázi meiózy zaujímají konce chromozomů, zvané teloméry (Vacek, 2006; Sherthan, 2007).

Kondenzace chromozomů probíhá také v dalším stádiu, v zygotene. Je nápadné zkracování chromozomů a nastává homologické párování zkrácených chromozomů.

Bivalenty jsou úzce k sobě přiložené tímto způsobem vytvořené dvojice chromozomů. Následuje postupné vytváření propojovací struktury flexibilní povahy, která se nazývá synaptický komplex (Heyting, 1996).

V pachytene, následujícím období meiotické profáze, probíhá zkracování a kondenzace homologních chromozomů, jsou zřetelně rozpuštěny na dvě sesterské chromatidy, takto vzniklá dvojice spojených chromatid se nazývá tetráda, jenž je vytvořena ze dvou k sobě přiložených homologních chromozomů o bivalent. Dále dochází k překřížení chromatid (crossing over) a k reciproční výměně částí nesesterských chromatid mezi homologními chromozomy v bivalentech (rekombinace). V dalším diplotenním stádiu profáze probíhá oddělování chromatid díky zrušení synaptického komplexu, pouze v místech, kde došlo k překřížení a zapletení nesesterských chromatid jsou k sobě ještě připojeny. Redukční dělení se poprvé zastavuje v pozdní diplotene, nazývané také diktyotene (Wassarman, 1988).

Meióza začíná u prasat u 40. den embryonálního vývoje a zhruba 35. dně před narozením jsou v oocytech v profázi prvního meiotického dělení (Hunter, 2000). Zároveň

oocyt v této době postupně obklopuje jedna vrstva granulózních buněk (Black a Erickson, 1968). Tímto vývojovým procesem vzniká primární folikul, který čeká na začátek další fáze (Hunter, 2000).

3.1.2 Fáze r estu

Fáze r estu zaujímá dlouhé období, které přetrvává až do konce pohlavní aktivity. Fáze r estu se od počátku pohlavní dospělosti během každého ovariačního cyklu účastní vlnění kolik primárních oocytů (Marvan *et al.*, 1998). Každá oocyty dosahují hodnot v průměru 12-15 μm na počátku r estové fáze a v jejím průběhu se přibližně zvětší průměrem 7-10x. Objem

oocytu se tak zvětší 300 násobně (Wassarman, 1988). U prasečího oocytu vzroste jeho objem v průběhu růstové fáze z 30 na 120 μm (Motlík a Fulka, 1986).

Během této fáze dochází ke slučování difuzibilních molekul pro jeho další vývoj a dochází ke změně velikosti oocytu. Oogonie je menší než diplotenní oocyt, který zahrnuje více cytoplasmatických organel (Picton, 1998). V okolí oocytu dochází ke shromažďování podporujících buněk, které vytvářejí folikul. Ten se v růstové fázi zvětšuje a zaujímá podstatnou roli při vývoji oocytu (Motlík a Fulka, 1986).

Morfologické změny ve fázi růstu

V růstové fázi je zejména specifické uspořádání cytoplazmy oocyta, které je vytvořeno v důsledku tvorby nových organel a genových produktů. Toto uspořádání je úzce spjato s perezodělením a modifikací stávajících produktů (Schatten, 1994). Dochází k vytvoření tzv. Balbianiho floutkového jádra, šBalbiniani's body. Je to shluk organel buněk nacházejících se poblíž cytoplazmy nedaleko od jádra a v rostoucím oocytu je docíleno rozšíření Balbianiho floutkového jádra k periferii a hned na to dochází k jeho rozložení na nepravidelné části (Guraya, 2008).

Centrioly mizí během fáze růstu a jsou při oplození vstříknuty od spermie (Wassarman a Josefowicz, 1978).

Difuzibilní roli v cytoplasmatické distribuci budoucí zygoty má exaktnost a spolehlivost replikace organel v ooplasmu, zejména mitochondrií a jejich DNA (Schatten, 1994).

Množství mitochondrií rychle vzrůstá v průběhu růstové fáze oocyta. Tvar mitochondrií se mění na zakulacený a později oválný, mají klenuté pířiny orientované krysty (Wassarman a Josefowicz, 1978). Endoplasmatické retikulum je připojeno k mitochondriím (Guraya, 2000).

Asociace mitochondrií s drsným endoplasmatickým retikulem probíhá v rostoucím oocytu malého antrálního folikulu. Mitochondrie jsou v oocytu ve stadiu zárodečného váčku (GV) často seskupené s hladkým endoplasmatickým retikulem (Sathananthan a Trounson, 2000).

Podobné funkční i metabolické změny prodává i Golgiho aparát, který je situovaný pod plasmatickou membránou rostoucího oocyta. Zvětšuje se a mění z drobných váčků na velké dilatované cisterny, které aktivně předávají glykoproteiny do zóny *pellucidy* (Mehlmann *et al.*, 1995).

V r stové fázi vzniká *zóna pellucida*, která funguje jako glykoproteinový obal. Role *zóny pellucidy* je d ležitá i p i oplození, protože je sou ástí akrozomální reakce, vazby spermie a také zabrá uje polyspermii (Yurewicz *et al.*, 1987).

Zárode ný vá ek (GV) je rozsáhlé sférické jádro, které je spolu s jedním afl dv mi men-ími jádérky sou áti rostoucích oocyt . Jejich charakter je nejprve granulární, pozd ji fibrogranulární a ke konci r stové periody je výrazn fibrilární. Hyttel *et al.* (1999) uvádí, fle v dob fibrilárního charakteru ufl jsou schopné syntézy RNA. V závislosti na velikosti oocytu se zv t-uje i jádro.

Dochází ke kondenzaci d íve dekonzenzovaného chromatinu zárode ného vá ku do perinukleárních prstenc nebo dal-ích podobných struktur v závislosti na druhu (Tan *et al.*, 2009).

Syntéza hromad ní protein a RNA probíhá v rostoucím oocytu. V té dob se tvo í párové smy ky na -t tkovité chromozómy. Ve smy kách dochází k masivní produkci protein a RNA (Bachvarova, 1974). Zhruba 20% rRNA má polyzomální formu a zbylá ást je v translaci neaktivní. Aktivním se stává afl b hem ásné embryogeneze (Gosden *et Bownes*, 1995; Guraya, 2000).

Interakce somatických bun k s oocyttem je d ležitá pro vývoj oocytu. Získávání substrát pro energetický metabolismus je uskute ováno pomocí gap junctions. Zdrojem nukleotid , aminokyselin a fosfolipid jsou somatické bu ky a ty také zachovávají stálost mRNA a iont ve zv t-ujících se oocytech. Po et granulózních bun k, které obklopují oocyt je p ímo závislý na rychlosti r stu oocyt (Hunter, 2000).

Folikulogeneze

B hem r stu oocytu probíhá také r st folikulu. Tvo í se druhá vrstva granulózních bun k kolem oocytu. Tímto je p ízna ný sekundární folikul (Hunter, 2000). Dále dochází k diferenciaci bu ek okolo oocytu do *theca interna* a *externa* a vzniká tak terciální folikul (Fair, 2003). R st je bezmála dokon en v prase ím folikulu o velikosti 1,8 mm (Motlík *et Fulka*, 1986).

3.1.3 Fáze zrání

Tato fáze začíná v prenatalním období a je zakončena u většiny druhů savců před ovulací. Je nutné zde zdůraznit rozdíl mezi meiózou a zráním, jelikož zrání je jen úsek meiózy (Motlík *et* Fulka, 1986).

Základním principem fáze zrání je přechod primárního oocyta na oocyt sekundární. Již v prenatalním období probíhá po ukončení fáze zrání, dochází k zastavení dozrávání primárního oocyta, které je dokončeno před ovulací. Podstatným znakem je vymizení jaderné membrány a vznik dělícího vřeténka.

Pro fázi zrání je typický rozpad zárodečného váčku a kondenzace chromatinu. Dále dochází k formaci dělícího vřeténka, vydělení prvního pólového tělíska, k přechodu mezi meiózou I a meiózou II, ukončení S-fáze a nastupuje druhý blok meiózy (Schmitt a Nebreda, 2002).

Dokončení meiózy u ovulovaných oocytů se separovanými chromozomy a s vyděleným druhým pólovým tělískem probíhá až po oplození. (Wassarman-Albertini, 1994)

Druhé zrcídelné dělení je dokončeno jedině v případě oplození. Pak dochází k oddělení dalších chromozomů s malou částí cytoplazmy a vzniká sekundární polocyt.

LH vlna znovu zahajuje meiozu *in vivo*. LH signál (OMI, Oocyte Maturation Inhibitor) je příčinou odstranění jednoho či více faktorů, například inhibitoru zrání oocytů. Opětování oocyta z intrafolikulárního prostředí je příčinou znovuoobnovení meiózy *in vitro* (Stojkovic *et al.*, 1999, Fan *et al.*, 2002).

Oocyt vstupuje během fáze zrání do metafáze prvního zrcídelného dělení, rozpadá se zárodečný váček (GVBD, Germinal Vesicle Breakdown), probíhá kondenzace chromozomů a také i vydělování prvního pólového tělíska (Sharma *et* Chowdhury, 1998). Průběh meiózy probíhá na konci této fáze zrání v metafázi druhého meiotického dělení. Tento proces meiózy v metafázi II je pojmenován jako druhý meiotický blok (Motlík *et* Kubelka, 1990; Swann, 1993; Lawrence *et al.*, 1997). U prasete je možno pozorovat pět stádií změny vnitřní stavby zárodečného váčku během GVBD (Sun *et al.*, 2004). Stádium GV0 je typické pro rozptýlení chromatinu ve velké jaderné oblasti, fáze GV1 je charakteristická počátkem kondenzace a vytvářením prstencovitého i podkovovitého útvaru kolem jádra (Motlík *et* Fulka, 1976; Guthrie *et* Garrett, 2000; Sun *et al.*, 2004). Ve stádiu GV2 se shromažďuje chromatin v blízkosti

jádra. Ve fázi GV3 se rozpadá podkovovitá struktura a tvoří se základ filamentární síť. V následujícím stádiu GV4 se ztrácí jaderná membrána a není patrné jádérko (Motlik *et Fulka*, 1976, Tan *et al.*, 2009).

Fáze zrání je charakteristická dvěma hlavními postupy zrání, konkrétně jaderným a cytoplazmatickým (Wolf *et Zelinski-Wooten*, 2001).

Zárodeček (GV, Germinal Vesicle) je ohraničen nejprve celistvou jadernou membránou, po zahájení zrání se ale membrána zvlídně sledkem rozpadu zárodečného váku. Konečný vzhled membrány je v podobě dublet spojených s endoplazmatickým retikulem, jejich přítomnost je vyuffivána k optimálnímu pozdějšímu vytvoření prvojaderné a jaderné membrány (Wassarman, 1988). Ve stádiu diktyotene nastává kondenzace chromozomů na vnitřním ohraničení jaderné membrány, na konce chromozomů přestupují chiasmata. Telocentrické bivalenty jsou tvaru písmene V v případě téměř dokončené kondenzace a mnohdy jsou spojeny s pozstatky jaderné membrány. Ve vysoké míře kondenzace probíhá seskupování chromozomů, ztrácejí své propojení s fragmenty obalu jádra a rovnají se do ekvatoriální roviny (Calarco, 1972; Wassarman, 1988).

Spojení centromer s mikrotubuly se objevuje spolu s GVBD a kondenzací chromozomů a tvoří se také další organizační centra mikrotubul (MTOCs, microtubule-organizing centers), ze kterých vystupující mikrotubuly zasahují až do nukleoplazmy (Thibault *et al.*, 1987). Pomocí kinetochoru zde dojde k napojení na každou chromatidu homologních chromozomů a společně s mikrotubuly se tvoří první meiotické dílčí v eténko (Calarco, 1972; Alberts *et al.*, 1998, Miao *et al.*, 2012). Centrioly chybí na vrcholech dílčích v etének (Wassarman, 1988). Velké množství mitochondrií, granul a vakuol se nachází v okolí dílčích v etének (Motlik *et Fulka*, 1976; Hafez *et Hafez*, 2000).

Během prvního meiotického dělení probíhá výměna genetického materiálu souasně i meiotický crossing over. V párech homologních chromozomů dochází k výměně homologních segmentů DNA mezi nesesterskými chromatidami, díky čemuž nejsou vytvořené gamety mezi sebou identické.

První meiotické dělení

Dělení profáze prvního meiotického dělení je v pěti stádiích: leptotene, zygotene, pachytene, diplotene a diakineze.

Další fází je metafáze I, ve které je typické srovnání spárovaných homologních chromozomů do ekvatoriální roviny a orientace centromerů k opačným pólům v eténka. Uspořádání je do bivalentů a přemisují se pomocí depolymerovaných kinetochorových mikrotubulů u kinetochoru (Alberts *et al.*, 1998, Mc Ginnis *et al.*, 2012).

Následující fází je anafáze I., v níž se pohybují oba homologní chromozomy každého bivalentu samostatně a jejich centromery se sesterskými chromatidami jsou situovány k protilehlým pólům buňky. Tento proces se nazývá disjunkce. Dochází k redukci počtu chromozomů na polovinu a haploidní počet chromozomů platí pro každý buněčný produkt prvního meiotického dělení. Nezávisle na sobě probíhá rozdělování bivalentů vytváření náhodných kombinací ploidní otcovskou a mateřskou sadou. Díky crossing-overu vzniká proměnlivost genetického materiálu přeneseného z rodiče na potomka (Wassarman, 1988; Eppig, 1991).

V průběhu telofáze I se v protilehlých pólech buňky obě haploidní sady chromozomů shluknou a nastane vydělení prvního pólového tělíska s polovinou genetického materiálu. Součástí prvního pólového tělíska jsou mimo další buněčné orgány také mitochondrie, ribozomy a kortikální granula (Zamboni, 1970; Wassarman *et al.* Fujiwara, 1978).

Obr. 3.1 Oocyt s prvním pólovým tělískem a zóna *pellucida* (Malenovská, 2013)



Tab. 3.1 Pohled prvního meiotického dělení

PROFÁZE I	Leptotenní	kondenzace a párování chromosom
	Zygotenní	formování synaptonemálního komplexu
	Pachytenní	crossing over
	Diplotenní	rozvolnění synaptonemálního komplexu
PROMETAFÁZE I	vymizení jaderného obalu	
METAFÁZE I	seřazení chromosomů do ekvatoriální roviny	
ANAFÁZE I	pohyb chromosomů k opačným pólům	
TELOFÁZE I	přechod z meiózy I do meiózy II	

Druhé meiotické dělení

Stádium zdvojení DNA nepředchází druhému meiotickému dělení (Motlík *et* Kubelka, 1990). Do meiózy II vstupují buňky s haploidním počtem chromosomů. U těchto vajíčkových savců dochází v metafázi II k druhému zastavení buněčného cyklu. Ukončení meiózy je možné jen za předpokladu oplození nebo partenogenetické aktivace (Sun *et* Nagai, 2003).

Syntéza a skladování širokého spektra molekul není jedinou podmínkou cytoplazmatického zrání. Dále je důležitá také modifikace molekul a jejich správné vyuffití při konečném zrání a oplození (Lodish *et al.*, 2008). Na začátku embryogeneze probíhá reorganizace organel, skladuje se mRNA a proteiny, které přispívají v průběhu celé fáze zrání (Brevini-Gandolfi *et* Gandolfi, 2001; Sirard *et al.*, 2006). Přizpůsobení z fáze GV do metafáze II dochází k přeskupování Golgiho aparátu, endoplazmatického retikula, ribozómů a mitochondrií. Lokomocí těchto organel je umožněna pomocí cytoskeletárních mikrofilament a mikrotubul (Ferreira *et al.*, 2009).

U prasečích oocytů kultivovaných *in vitro* může dojít k deficitu cytoplazmatických faktorů, který je příčinou vývojové nekompetence. Procesy cytoplazmatického a jaderného zrání jsou koordinovány tak, aby byly dokončeny současně (Hunter, 2000). Proces cytoplazmatického zrání je dále udržován v případě zablokování jaderného zrání inhibitorem

MG132. K jeho akceleraci dojde po následující stimulaci jaderného zrání (Chmelíková a kol., 2004).

3.1.4 Faktory ovlivňující oogenezi

3.1.4.1 MPF (M-phase Promoting Factor)

Maturation/M phase-promoting factor (MPF) je univerzální buněčný mitotický i meiotický regulátor (Stojkovic *et al.*, 1999). MPF se řadí mezi protein kinázy. Jde o heterodimer, který se skládá z regulační a katalytické podjednotky (Nurse, 1990).

Serin/threonin protein kináza p34cdc2 z rodiny tyrosinových cyklin dependentních kináz tvoří katalytickou podjednotku (Fulka *et al.*, 1998). Podjednotkou regulace je cyklin B (Dunphy *et al.*, 1988, Gautier et Maller 1988, Gautier *et al.* 1989). V poslední době bylo dokázáno, že součástí komplexu MPF může být GWL - kináza Greatwall (Hara *et al.*, 2012, Dupre *et al.*, 2013).

Spojení obou podjednotek vytváří základ aktivace MPF (Gautier *et al.*, 1991, de Vantery *et al.*, 1997). Takto se vytváří neaktivní komplex, pre-MPF, jenž se vyskytuje v rané fázi oocytů. Syntéza a degradace cyklinu B je základním kontrolním bodem ke vzniku komplexu pre-MPF (Murray et Kirschner, 1989). Vznik pre-MPF závisí na změně hladin cyklinu B a dochází tak po konečné aktivaci komplexu MPF k regulaci fáze buněčného cyklu v průběhu meiózy (Brunet et Maro, 2005). Aktivace nashromážděného komplexu pre-MPF v oocytu je potřebná pro znovuzahájení meiózy (Motlík et Kubelka, 1990).

Hladina fosforylace a aktivní syntéza proteinů v buňce souvisí se stavem aktivity MPF (Procházka *et al.*, 1989, Chen *et al.*, 2000). Regulace fosforylací MPF je jak negativní, tak i pozitivní. Díky inhibiční fosforylaci p34cdc2 je pre-MPF držen v neaktivním stavu (Marlovits *et al.*, 1998). Průběh tohoto procesu se uskutečňuje na tyrosinu 15 a threoninu 14 (Touny et Banerjee, 2006). Na threoninu 161 dochází k fosforylaci k dosažení aktivace komplexu p34^{cdc2} pomocí protein kinázy CAK (cdc-aktivací kináza) (Clarke, 1995).

Pokles v aktivitě MPF nastává během meiotického zrání oocytů (Mattiloli *et al.*, 1991). Nejprve tedy dojde ke zvýšení aktivity MPF v metafázi prvního meiotického dělení a až z důvodu přechodu z metafáze do anafáze klesá aktivita MPF (Kishimoto et Kariatani, 1976; Motlík et Kubelka 1990). Komplex podporující anafázi (Anaphase Promoting Com-

plex, APC) je odpov dný za pokles MPF (King *et al.*, 1996). Díky APC je možné p ipojení ubikvitinu na cyklin B a ten je pak rozeznán a degradován proteazómem (Glotzer *et al.*, 1991).

V metafázi druhého meiotického d lení dochází op t ke zvý-ení aktivity MPF pro-
st ednictvím nífle popsaného cytostatického faktoru (CSF), jejímfl úkolem je udržet po celou
dobu zastavení meiotického zrání aktivitu MPF na vysoké úrovni v metafázi II (Murray
et Kirschner, 1989).

Pro správný pr b h fáze zrání je nutná aktivita MPF. Má hlavní roli p i ízení d j ,
které vedou ke zformování funk ního d líčího v eténka (Hunter, 2000) a je d lefitý p i inici-
aci segregace chromozom (King *et al.*, 1996). Uplat uje se p i reorganizaci intermediálních
filament, b hem kondenzace chromozom a také p i p eskupení mikrofilament (Stojkovic *et*
al., 1999).

3.1.4.2 MAP kináza (Mitogen Activated Protein Kinase)

MAP kinázy mají d lefitou roli p i p enosu extracelulárního signálu uvnit bu ky a
proto jsou téfl nazývány jako extracelulárn regulované kinázy (ERK). Za azují se do skupiny
serin/threonin protein kináz (Haccard *et al.*, 1993). V pr b hu zrání sav ích oocyt mají vy-
sokou aktivitu (Haccard *et al.*, 1993). Davis (2000), Schaeffer a Weber (1999) rozd lují MAP
kinázy na t i podskupiny: ERK, JNK a p38 MAP kinázy. MAP kinázy jsou v rostoucích oocy-
tech umíst ny pouze v cytoplazm a k p esunu do zárode ného vá ku dochází na po átku fáze
zrání (Stojkovic *et al.*, 1999). MAP kinázy se podílejí na p enosu signálu indukujícího za átek
zrání do jádra z cytoplazmy (Inoue *et al.*, 1998). Aktivace MAP kináz nastává 2 hodiny po
GVBD p i spontánním zrání my-ích oocyt (Lu *et al.*, 2001). Jinak je tomu u drápatky, zde
probíhá aktivace MAP kináz je-t p ed stádiem GVBD (Kosako *et al.*, 1994), podobn je tomu
i v p ípad prasete (Josefsberg *et al.*, 2003). U naru-ené aktivity MAP kináz nebyl prokázán
vliv na zahájení meiózy v prase ích oocytech oproti výsledk m pokus provedených u oocyt
drápatky (*Xenopus*) (Josefsberg *et al.*, 2003). Je dokázáno, fle rozpad zárode ného vá ku
u prasat probíhá i p i znemofln ní nástupu aktivity MAP kináz pomocí inhibitoru MEK (Tong *et*
al., 2003). I tak Josefsberger (2003) uvádí, fle aktivní MAP kinázy jednozna n urychlují roz-
pad injikovaného zárode ného vá ku prasat.

V p ípad prasete jsou stanoviska na dobu aktivace MAPK zna n odli-ná. Goudet *et*
al., 1998 uvádí, fle dochází k sou asné aktivaci MPF a MAP kináz. Dal-í studie dokazuje, fle

jako první probíhá aktivace MPF a až potom jsou aktivovány MAP kinázy (Inoue *et al.*, 1998).

MAP kinázy indukují opotvňovací změny v cytoskeletu a v oblasti zrání se zúčastňují převodu signálu z cytoplazmy do jádra (Stojkovic *et al.*, 1999). Významně se účastní regulace dynamiky mikrotubul (de Vanter *et al.*, 1997) a ovlivňují velikost a extruzi prvního pólového tělíska (Choi *et al.*, 1996). Villa-Diaz *et al.* (2004) uvádí, že zaujímají důležitou roli v metafázi II během druhého meiotického bloku.

MAP kinázy dochází až po aktivaci MPF. Velké množství autorů jsou přesvědčeni o aktivaci MAP kináz ještě před GVBD a před aktivací MPF (Inoue *et al.*, 1998, Wehrend *et al.*, 2001; Villa-Diaz *et al.*, 2004). MAP kinázy prokazují oproti MPF vysokou aktivitu v procesu celé fáze zrání. Až po oplození i po partenogenetické aktivaci dochází k poklesu této aktivity (Sun *et al.*, 2001, Zhang *et al.*, 2001).

3.1.4.3 CSF (Cytostatic Factor)

Poprvé byl CSF objeven v oocytech obojživelníků a souvisí s aktivitou komplexu faktorů přítomných v cytoplazmě, která potlačuje změnu z metafáze II do anafáze II (Masui *et al.*, 1971; Clarke *et al.*, 1988).

Zvýšená aktivita CSF byla popsána v procesu metafáze II a již nedlouho po oplození se výrazně jeho aktivita snižuje. CSF reguluje také průběh partenogenetické aktivace nebo proces oplození (Schmidt *et al.*, 2006). Aktivní katalytická složka CSF se nazývá Mos, jde o serin/threonin kinázu, která je produktem proto-onkogenu *c-mos*. Je nepostradatelná jak pro meiotický blok oocytů v MII, tak i při aktivaci MPF v procesu meiózy I a II (Yew *et al.*, 1992; Hunt, 1992).

Inhibice APC je jednou z významných funkcí CSF. APC snižuje hladinu MPF pomocí degradace cyklinu B a podílí se tímto na uvolnění z metafázního bloku (Stojkovic *et al.*, 1999). Mos je jedním z prvků aktivní katalytické složky CSF. (Watanabe *et al.*, 1989, Yew *et al.*, 1992). Spojení Mos a CSF bylo prokázáno ve studii provedené u myši. (Colledge *et al.*, 1994; Hashimoto *et al.*, 1994). Aktivitu MAP kinázy přes MEK ovlivňuje Mos (Verlhac *et al.*, 1994). Protein p90Rsk (ribosomální protein S6-kináza) fosforyluje s MAP kinázou a p90Rsk také aktivuje protein Bub1, který pomocí proteinů Mad1 a Mad2 inhibuje APC. Takto je za-

již na blokaci možnosti APC degradovat cyklin B v proteazómech. Díky tomuto procesu neklesne hladina MPF (Yamano *et al.*, 2004).

Udržení druhého meiotického bloku je nejpodstatnějším úkolem CFS. CSF inhibuje činnost mikrotubulárních motorů a tak udržuje neporušené díplicí v eténko, tímto způsobem je možno pomocí CSF zadržet oocyt v metafázi II (Shiina *et al.*, 1992).

3.1.4.4 Cyklické nukleotidy

Cyklické nukleotidy jsou významnými regulátory meiotického zrání, jedná se hlavně o guanosinmonofosfát (cGMP) a cyklický adenosin (cAMP) (Beverly *et al.*, 2002).

Rozpad zárodečného váčku je blokován (Sengoku *et al.*, 2001) v případě, že je během kultivace oocytů myší uplatněn inhibitor fosfodiesterázy (fosfodiesteráza –tápi cAMP) nebo analog cAMP dibutyrylcyklický adenosinmonofosfát (dbcAMP), aktivátor adenyl cyklázy (katalyzuje vznik cAMP z ATP) či isobutyl metylxantin (IBMX). P estofle kondenzace chromozomů bývá zahájena, téměř před vznikem kompaktních bivalentů se zastavuje (Wassarman, 1988). Pravděpodobně dochází k působení cAMP přes cAMP dependentní protein kinázu. Podíl na aktivaci této kaskády má nejspíše r stový hormon (Sirard *et al.*, 2001). Katalytická podjednotka (K) a regulační (R) jsou dvě podjednotky enzymu cAMP dependentní protein kinázy (PAK) (Wassarman, 1988). V případě, že RK komplex není enzymaticky aktivní, dojde k rozpadu komplexu inhibiční podjednotky pomocí vazby cAMP k R a také je aktivována K podjednotka kinázy. Meióza je zastavena fosforylací jistých proteinů protein kinázou. Pokud je úroveň cAMP nízká může dojít k defosforylaci fosfoproteinů v oocytu a tak k začátku meiotického zrání (Wassarman, 1988). Způsobem, kterým je možno snížit hladinu cAMP v oocytu je zvýšit hydrolytickou degradaci oocytu fosfodiesterázou, popřípadě zastavit přenos cAMP z granulózních budů přes gap junction do oocytu (Sengoku *et al.*, 2001).

Enzym cGMP pravděpodobně zvyšuje aktivitu fosfodiesterázy (Denninger *et Marletta*, 1999). Oproti tomu Dekel *et al.* (1988) udává, že ke znovuzahájení meiotického zrání v oocytu je nutné v první řadě zvýšení intracelulární hladiny cAMP a až potom její snížení. Podle těchto autorů je zvýšení i snížení hladiny cAMP odezvou na působení LH vlnu.

3.1.4.5 Vápník

Ionty vápníku mají v buněčných signálních drahách velmi důležitou roli. K jejich funkci patří přenos intracelulárních signálů, regulace fyziologických procesů, hlavně kontrakce a relaxace svalového vlákna, membránová excitabilita, buněčný a mitochondriální metabolismus, proteosyntéza, průběh buněčného cyklu a apoptóza. Podstatná role vápníku je i v průběhu meiotického zrání (Homa *et al.*, 1993) a oplození oocytů (Yanagimachi, 1981, 1994; Miyazaki, 1991).

K uložení vápníku slouží depozita, která reprezentují především endoplazmatické retikulum a mitochondrie. Hladina vápenatých iontů je v cytosolu na velmi nízké úrovni. (Clapham, 1995; Nader *et al.*, 2012). Karyoplazma, vakuoly, mitochondrie a povrchy lipidových granul jsou hlavní depozita iontů vápníku v prasečím oocytu.

Koordinaci protichůdných mechanismů iontovými kanály specifickými pro Ca^{2+} a Ca^{2+} transportujícími ATPázami reguluje koncentrace extracelulárních vápenatých iontů. Otevřením Ca^{2+} kanálů je umožněn přechod vápníku do cytosolu. Ca^{2+} kanály reprezentují hlavně dvě signální kaskády. Jedná se o trifosfátové receptory (IP_3R) - dráha vyvolávající inositol 1,4,5 a dráhu vyvolávající ryanodinové receptory (RyR) (Clapham, 1995; Petr *et al.*, 2002). Díky ATPázovým SERCA pumpám (Pozzan *et al.*, 1994) může probíhat transport vápníku opačným směrem.

Membránový protein fosfolipáza C (PLC) je na počátku inositolfosfolipidové signalizace IP_3R dráhy. Jde o enzym, který pomocí hydrolytické aktivity štěpí fosfatidylinositol - 4,5 - bisfosfát (PIP^2). Inositol - 1, 4, 5 - trifosfát (IP^3) a 1, 2 - diacylglycerol (DAG) jsou dvě signální sloučeniny, produkty hydrolýzy katalyzované PLC. IP^3 volně difunduje cytozolem po opuštění plazmatické membrány (Sun, 2003).

Ve všech eukaryotických buňkách se vyskytuje kalmodulin (CaM). Skládá se ze 148 aminokyselin, je to malý, acidický protein o molekulové hmotnosti 17 kDa.

Kalmodulin dependentní proteinkinázy (CaMK) a proteinfosfatázy jsou součástí proteinů, které vytvářejí funkční změnův komplex pomocí navázání komplexu Ca^{2+} -kalmodulin (Tunquist et Maller, 2003). Kalmodulin dependentní kináza CaMK II zaujímá nezastupitelnou pozici ve vývoji oocytů. Aktivovaná CaMK II se díky Ca^{2+} iontů účastní iniciace degradace cyklinu B, jenž tvoří součást MPF (Lorca *et al.*, 1993).

B hem zrání oocytu se postupně vyvíjí schopnost uvolnit vápník z vnitrobuněných zásob. Tato schopnost je nepostradatelná po oplození oocytu k zahájení vývoje. (Carroll *et al.*, 1994; Mehlmann et Kline, 1994).

3.1.4.6 Gasotransmitery

Sirovodík, oxid dusnatý a oxid uhelnatý jsou součástí skupiny mediátorů nazývaných gasotransmitery (Wang, 2002). Jde o nevelké plynné molekuly, které jsou syntetizovány v buňkách enzymy a jejich syntéza je přesně regulována. Snadno prostupují přes plasmatickou membránu a mohou mít mnoho autokrinních, endokrinních i parakrinních efektů (Wang, 2004)

Gasotransmitery se nezávislým způsobem na receptorech účastní buněčné signalizace. Jsou typické rychlou degradací, endogenní produkcí, specificitou cílových molekul a spoluprací mezi sebou (Pae *et al.*, 2009).

Oxid dusnatý

Oxid dusnatý (NO) je volná dvouatomová molekula s mimořádným bioregulačním významem v buňkách. Její úkol nebyl je-t v polovině 80. let minulého století známa, i když byla popsána už před více než dvěma sty lety. NO difunduje přes buněčné membrány a reguluje funkci buněk během fyziologických i patologických procesů (Dixit *et Parvizi*, 2001; Bu *et al.*, 2003)

Oxid dusnatý je v savcích buňkách syntetizován enzymem NO-syntázou (NOS) (Nathan a Xie, 1994). NOS katalyzuje přeměnu aminokyseliny L-argininu na L-citrullin, přičemž vzniká také molekula oxidu dusnatého. K reakci je nutný jako substrát nikotinamidadenin-dinukleotid fosfát (NADPH) a kyslík.

Mezi kofaktory, které jsou zapojené do pětielektronové oxidační reakce N atomu guanidinu z L-argininu patří: flavinmononukleotid (FMN), nikotinamidadenin-dinukleotid fosfát (NADPH), tetrahydrobiopterin (H₄B), flavinadenindinukleotid (FAD) a skupina hem obsahující železo (protoporfyrin IX). NO nedisponuje v tkáních dlouhou životností, jeho poloas rozpadu je 3 až 5 sekund.

Účast NO je nezastupitelná při řízení regulace reprodukce samic. Gonadotropin releasing hormon je díky němu regulován na úrovni hypotalamu (GNRH), který spouští vyplavení

gonadotropin aktivací nNOS v hypofýze (Rosselli *et al.*, 1994). Podílí se na navozování ovulace, na relaxaci *myometria* a také na luteolýze (Yang *et al.*, 2003).

Významná úloha neurotransmiteru NO v organismu spoívá v íení nervového vzruchu. NO je p ítomen p í vazodilataci krevních cév (Aberts *et al.*, 1998) podílí se na procesu proliferace a diferenciac bun k (Hattori *et al.*, 1996) a také je p ítomen u apoptózy (Stefanelli *et al.*, 1999).

Nervová NO - syntáza (nNOS) je nazývaná taktéfl jako typ I, NOS-I a NOS1. Hlavním místem výskytu nNOS je nervová tká mozku (Bredt *et al.*, 1990). nNOS byla detekována ve vaje níku v prase ích oocytech (Kim *et al.*, 2005). B hem meiotického zrání *in vitro* byla potvrzena ú ast proteinu nNOS v prase ích oocytech i v kumulárních bu kách (Chmelíková *et al.*, 2010).

Indukovatelná NO ó syntáza (iNOS) je také pojmenována jako typ II, NOS-II, NOS2. Její první nález je dokumentován v makrofágu my-i. (Nathan *et Xie*, 1994, Hattori *et al.*, 2000). P ítomnost iNOS je prokázána také ve folikulech sav ích vaje ník (Jablonka - Shariff *et Olson*, 1997). Aktivita iNOS je ozna ována jako Ca^{2+} independentní, protože její sou ástí je vldy pevn navázaný kalmodulin (Rosselli *et al.*, 1998; Alderton, 2001).

Endoteliální NO - syntáza (eNOS) ozna ována jako typ III, NOS-III, NOS3. Poprvé byla nalezena v cévních endotelových bu kách (Bredt *et al.*, 1990, Alderton, 2001). eNOS byla popsána krom jiných tkání taktéfl jako indukovatelná NO ve folikulech sav ích vaje ník (Jablonka - Shariff *et Olson*, 1997). Endoteliální NO je Ca^{2+} dependentní, taktéfl jako izoforma nNOS (Janssens *et al.*, 1992). eNOS se nachází v kumulárních bu kách prasete, v oocytech a endoteliálních bu kách (Tao *et al.*, 2004). Dále je její p ítomnost popisována i v oocytech prasete a v bu kách granulózního typu b hem folikulárního vývoje (Kim *et al.*, 2005). Izoforma eNOS byla ve stádiích GV, MI a MII v pr b hu meiózy oocyt *in vitro* nalezena v prase ích oocytech a kumulárních bu kách (Chmelíková *et al.*, 2010).

H²S (Sirovodík)

Molekulu bezbarvého plynu sirovodíku (neboli sulfanu) je tvo í jeden atom síry a dva atomy vodíku. Je endogenního p vodu vytvo ený z cysteinu enzymem 3-merkaptopyruvátém, enzymem cystathion beta-syntázou (CBS) a cystathion gamma-lyázou (CBE) (Kamoun, 2004). CBS je d leflitý pro reproduk ní cyklus samice. Nachází se ve vaje níku s nejsiln j-í

expresí ve folikulárních buňkách ve všech stádiích. Exprese tohoto enzymu v oocytu dosud není prokazána. CBS podporuje růst folikulů, má vliv na plodnost, pravidelnost a délku estrálního cyklu. CBS je podstatný v době zrání oocyta (Zhu *et al.*, 2011).

3.1.4.7 Protein fosfatázy

Jedná se o enzymy, které mají schopnost defosforylovat fosfátové ionty a molekuly s volnou hydroxylovou skupinou na rozsah substrátů hydrolyzou monoesteru kyseliny fosforené. Největší význam spoívá v regulaci mitotického i meiotického buněného cyklu (Wang *et al.*, 2004; Mochida *et al.*, 2010; Domingo-Sananes *et al.*, 2011; Mochida *et al.* Hunt, 2012). Pro správný průběh meiotického zrání oocyt je potřebným synchronní spolupráce mnoha protein kináz a protein fosfatáz (Smith *et al.*, 1998; Swain *et al.*, 2003; Wang *et al.*, 2004; Adhikari *et al.*, 2012). Ke skupině protein fosfatáz se řadí také fosfatáza 2B, kalcineurin.

3.2 Fosfatáza 2B

Kalcineurin byl objeven v roce 1976 Wangem a Desaiem byl poprvé detekován v mozkové tkáni skotu (Wang *et al.* Desai, 1976). Během 80. let výzkum prokázal přítomnost kalcineurinu v dalších tkáních různých živočišných. Je nepostradatelným účastníkem procesů, které pomocí Ca^{2+} dependentní signalizace mají vliv na buněnou odpověď. Prostřednictvím Ca^{2+} dependentní signalizace ovlivňuje kalcineurin také činnost iontových kanálů a změny v genové transkripci (Rusnak *et al.* Mertz, 2000). Spolupůsobení kalcineurinu s velkou skupinou substrátů a souvisejících proteinů je nezbytná k správnému průběhu mnoha biologických funkcí. Kalcineurin je jediná známá fosfatáza, u které je prokázána nezbytnost Ca^{2+} a kalcmodulinu k její aktivaci (Kingsbury *et al.* Cunningham, 2000).

3.2.1 Struktura a izoformy fosfatázy 2B

Fosfatáza 2B nazývána také jako kalcineurin se řadí do skupiny serin/threonin protein fosfatáz 2. typu. Cílem těchto fosfatáz jsou fosfothreonin a fosfoserin. Protein fosfatázy 2. typu jsou rozděleny podle vztahu ke dvojmocným iontům nestejných prvků na enzymy PP2B, PP2A a PP2C (Cohen, 1989). Citlivost k inhibitorům i substrátová specifita je u těchto fosfatáz vzájemně odlišná. U PP1, PP2A a fosfatázy 2B je zřejmá evoluční spojitost a jejich součástí jsou homologní aminokyselinové sekvence (Shenolikar *et al.* Nairn, 1991).

Fosfatáza 2B je molekula heterodimerického typu aktivovaná kalmodulinem a Ca^{2+} ionty. Kalcineurin p ednostn defosforyluje peptidy s bázemi aminokyselin na dusíkatém konci (Yamashita *et al.*, 2000). Zinek a flezo jsou prvky obsažené v aktivním katalytickém centru. Katalytická podjednotka, kalcineurin A a regula ní podjednotka kalcineurinu B jsou sou ástí heterodimerické struktury kalcineurinu (Klee *et al.*, 2000).

U savc existují t i r zné izoformy kalcineurinu A - CnA , CnA a CnA . Na t ech r zných genech PPP3CA, PPP3CB a PPP3CC dochází k expresi izoformem kalcineurinu A (Kincaid, 1993). U savc je rozsah molekulové hmotnosti podjednotky A podle izoformy v rozmezí od 57 do 59 kDa (Rusnak *et Mertz*, 2000).

Izoformy B1 a B2 jsou dv r flné izoformormy kalcineurinu B s molekulovou hmotností 18 kDa afl 19 kDa (Chan *et al.*, 2005).

Izoforma kalcineurinu A a A je funk n spojena s izoformou kalcineurinu B1, izoforma kalcineurinu A je ve funk ní souvislosti s izoformou kalcineurinu B2 (Kincaid, 1995).

Moflnost vazby vápenatých iont má podjednotka kalcineurinu B. Také specifická vápníková vazebná místa kóduje gen pro kalcineurin B, a to ty i EF-hand motivy et zce polypeptid , které zaji– ují modulate konformace kalcineurinu B hned navázání vápníku. Niflí afinitu k Ca^{2+} iont m mají dv z t chto vazebných míst. Regula ní úlohu zaji– uje obzazení t chto míst p edev–ím stimulací aktivity kalcineurinu a moflností navázat kalmodulin do cílové oblasti kalcineurinu A. (Kakalis, 1995; Yang *et Klee*, 2000). Vy–í afinita k Ca^{2+} iont m je z ejmá u dal–ích dvou vřdy obsazených vazebných míst. Nazývají se strukturální místa kalcineurinu, protofle ustalují heterodimerickou strukturu (Gallagher *et al.*, 2001).

Rozlofení izoformem obou podjednotek je ve tkáních r zné. Chang *et al*, 1992 uvádí, fle v mozku je nejvy–í exprese kalcineurinu A α a je prokázána také v dal–ích tkáních r zných flivo i–ných druh (Awumey *et al*, 1999). Mozek, ledviny, osteoklasty a srde ní svalovina jsou tkán , kde se nachází izoforma kalcineurinu A (Awumey *et al*, 1999, Heineke *et Molken- tin*, 2006, Moz *et al*, 2004). Taktéfl mozek, ale i krev jsou místa nálezu kalcineurinu A- γ (Mu- rata *et al*, 2008). V r zných typech bu ek se vyskytuje izoforma B1 kalcineurinu B a spojuje se s α a β izoformami kalcineurinu A. Jediné místo detekce izoformy B2 kalcineurinu B jsou varlata (Ueki *et al*, 1992).

V mozku je koncentrace kompletního heterodimeru kalcineurinu nejvy–í. Také tuko- vá tká , plíce, varlata, sítnice, placenta, ledviny, T a B lymfocyty, srdce, bu ky nadledvinek,

zadní mozek, osteoklasty, mícha, krevní destičky, slezina, buňky slinivky břišní, játra, brzlík, spermie savců, tělní flóra a kosterní svaly jsou místem, kde se vyskytují obě podjednotky kalcineurinu (Li *et al.*, 2011). V prasečích lymfocytech, cévách, kosterním i hladkém svalstvu byl také potvrzen nálezkalcineurinu (Chantler, 1985; Hamada *et al.*, 2010; Depreux *et al.*, 2010) a také v gametách samců (Tash *et al.*, 1988).

3.2.2 Aktivace fosfatázy 2B

Mnoho nezbytných konformačních změn provází průběh aktivace fosfatázy 2B.

Zahájení těchto změn je uskutečнено navázáním Ca^{2+} iontů na kalcineurin B. Pak je umožněna vazba kalmodulinu i přemístění autoinhibičního peptidu v etní aktivity fosfatáz (Stemmer *et al.*, 1994; Yang *et al.*, 2000). Bylo prokázáno, že existuje možnost přemístění autoinhibičního peptidu pomocí interakce kalmodulinu s dalšími odděly regulační složky kalcineurinu A (Shen *et al.*, 2008).

Změna intracelulární hladiny vápníku je podstatou procesu regulace aktivity kalcineurinu *in vivo*. Nízká koncentrace Ca^{2+} iontů znemožňuje navázání kalmodulinu a proto není v aktivní formě. Pro navázání Ca^{2+} na podjednotku B je nezbytné zvýšení množství vápníku. Množství volných iontů hořčíku a kalmodulinu jsou další faktory, které mají vliv na aktivitu fosfatáz kalcineurinu (Li *et al.*, 2011).

3.2.3 Cílové proteiny fosfatázy 2B

3.2.3.1 Šcaffoldové proteiny

Šcaffoldový protein je definována bílkovina v oblasti růstu tkání. Věchny její funkce jsou zatím neznámy, nicméně se považuje za proteinové řešení pro tvorbu tkání z buněk. Scaffoldy lze syntetizovat a vytvářet porézní materiál k přichycení chondrocytů a následné tvorbě tkání. Zajišťují ukotvení dalších proteinů. (Yoshioka, 2004). Šcaffoldové proteiny KSR a AKAP mají souvislost s funkcí fosfatázy 2B (Wassarman, 1988).

3.2.3.2 KSR (Kinase Suppressor of Ras)

Patí díky spolupráci s definovanými částmi ERK k definovaným modulátorům MAP kinázové dráhy. KSR zjednodušuje signalizaci Ras/ERK, způsobuje aktivaci ERK a stará se o kontrolu oblasti a času signálních výstupů v somatických buňkách. V savčích buňkách

m fléme najít dv ízoformy KSR: KSR1 a KSR2. Podstatná reakce kalcineurinu je typická u izoformy KSR2. Jakmile se zvýší hladina vápníku, dochází k defosforylaci KSR2 kalcineurinem a takto je zprostředkována regulace aktivity a lokalizace KSR2. K ERK signalizaci vytvořenou dráhou vápník/kalcineurin tak působí KSR2 (Dougherty *et al.*, 2009).

3.2.3.3 AKAP (Protein Kinase A Anchoring Protein)

Protein zakotvující proteinkináza A dává možnost zakotvení daných proteinů na specifické buněčné lokalitě. Nežádka se vyskytují vedle vstupu Ca^{2+} iontů poblíž L-typu Ca^{2+} kanálu a receptoru N-methyl-D-aspartátu (NMDA). PKC, PKA a kalcineurin jsou cílové místa AKAP. Nejspíše není aktivní kalcineurin umístěn na AKAP (Lai *et al.*, 1998). V současné době stále není jasně prokázáno, zda by komplex AKAP/ kalcineurin bránil aktivaci kalcineurinu pomocí Ca^{2+} iontů.

3.2.4 Funkce fosfatázy 2B v reprodukci

V současné době není zcela známa souvislost mezi kalcineurinem a fyziologií reprodukčních funkcí. Takeo *et al.* (2006) popsal signalizaci fosfatázy 2B v průběhu meiózy oocytů u mouchy rodu *Drosophila* spolu s postupem regulace kalcineurinu. Vdecky prokázána (Nishiyama *et al.*, 2007; Mochida *et al.*, 2007) je funkce kalcineurinu v oocytech drápatky *Xenopus laevis* při regulaci meiózy. Mochida a Hunt (2007), a také Nishiyama *et al.* (2007) popisují nezbytnost kalcineurinu k výstupu z metafáze II. Aby mohl raný vývoj embryí oocyt drápatky začít, je nutná aktivace kalcineurinu (Nishiyama *et al.*, 2007). V případě drápatky je během oplození došlo k zvýšené hladině vápníku, dojde tak k uvolnění z druhého meiotického bloku. Aktivované kinázy (CaMKII) jsou tak kalmodulinem a vápníkem aktivovány. Dojde k inaktivaci cytotatického faktoru fosforylací Erp1 spolu s CaMKII. Dojde tak k ubikvitinizaci proteinů cyklinu a securinu spolupracujících na podpoře buněčného cyklu během interfáze. Fosfatázová aktivita kalcineurinu je došlo aktivovaná zvýšenou koncentrací vápenatých iontů. Defosforylace proteinů působících v M-fázi, destrukce cyklinů a opětovné vytvoření zcela funkční jaderné membrány je znemožněno inhibitory kalcineurinu. Mochida a Hunt (2007) uvádí, že nástup druhé vlny aktivity fosfatáz, která je řízená pomocí mitotických fosfoproteinů, probíhá až po aktivaci kalcineurinu. Zánik tohoto procesu je po vstupu do M-fáze a na jejím konci dochází ke znovuoobnovění. Vstup do M-fáze buněčného cyklu je umožněn díky inhibici kalcineurinu, stejně tak i v došný návrat do interfáze. Druhý

meiotický blok doposud udržován pomocí Mos/MAPK kaskády je p eru-en kalcineurinem. (Mochida *et* Hunt).

Nález fosfatázy 2B u samice je v rámci pohlavních orgánu pozitivní ve vaje nících a raných embryích mouchy *Drosophila*. U drápatky *Xenopus* byl nalezen pouze ve vaje nících. Tam se ú astní regulace meiotického zrání, o oplození i aktivaci. V sou asné době však není znám žádný nález izoformy kalcineurinu v sav ích oocytech. A také není prokázáno, zda má kalcineurin mimo meiotické zrání vliv i na fázi r stu v oogenezi. Dote nejsou v odborné literatu e údaje o existenci kalcineurinu v sav ích oocytech a taktéfl ani o funkci fosfatázy 2B p i regulaci oogeneze u oocyt savc .

4 Materiál a metody

4.1 Odběr vajec

Vaječníky prasnic v r zném stádiu pohlavního cyklu byly odebírány na jatkách. Transport vajec prasnic z jatek do laborato e byl uskute ován v termolahvích napln - ných fyziologickým roztokem (0,9 % chlorid sodný) za dodržení teploty 39 °C.

4.2 Získávání oocyt s ukon eným r stem

Pomocí aspirace jehlou 20G byly získávány oocyty s ukon eným r stem z folikulární tekutiny. Pr m r folikul se pohyboval s rozmezí 2-5 mm. Odsávání oocyt ze získané folikulární tekutiny pomocí sklen é pipety bylo provád no pod stereomikroskopem. Takto získané oocyty byly p emíst ny do kapek modifikovaného média M199, jehož složení je uvede - no v tabulce 4.1. Pouze oocyty s celistvou cytoplazmou a kompaktním obalem kumulárních bun k byly vyuffity k pokus m.

4.3 Kultivace oocyt

K práci s prase ími oocyty bylo také vyuffíváno médium M199, které obsahova - lo HEPES, pyruvát sodný, bovinní sérový abumin, laktát sodný a gentamycin (Sigma-Aldrich, N mecko). erstvost zásobního roztoku média byla zaji-t na týdenním obm ováním, sterili - zací a uchováváním p i teplot 4 °C v prost edí sm si 5% CO₂ se vzduchem.

Tab. 4.1 Složení modifikovaného média M199 pro práci s prase ími oocyty

Chemikálie	Množství ve 100 ml média M199
Pyruvát sodný (Sigma-Aldrich, N mecko)	25 mg
Laktát sodný (Sigma-Aldrich, N mecko)	60 mg
Gentamicin (Sigma-Aldrich, N mecko)	2,5 mg
HEPES (Sigma-Aldrich, N mecko)	150 mg
R stové proteiny (Gibco BRL, Life Technolo - gies, N mecko)	10% (w/v)

Kultivace oocyt byla prováděna ve 4-jamkových Petriho miskách (Nunc, Roskilde, Dánsko) v 1 ml modifikovaného média M199 bez bovinního sérového albuminu, s přidáním eCG/hCG (PG 600, Intervet Boxmeer, Holandsko) 13,4 : 6,6 IU/ml.

4.4 Barvení a fixace oocyt

Po odstranění kumulárních buněk bylo prováděno montování oocytů na podložní sklo. Oocyty byly pokryty krycím sklíčkem upevněným pomocí vazelínových proufků a fixace probíhala v roztoku kyseliny octové s ethanolem v poměru 1:3 po dobu minimálně 24 hodin. Následně došlo k barvení oocytů 1% orceinem (Sigma Aldrich, Německo). Ke stanovení fáze zrání byl použit mikroskop s fázovým kontrastem se zvětšením 400x. Fáze meiotického zrání tedy stádium zárodečného váčku (GV), pozdní diakinese (LD), metafáze I (MI), anaphase I (AI), telophase I (TI), nebo metafáze II (MII), byly rozpoznávány podle kritérií popsanými Motlíkem a Fulkou (1976). Abnormální konfigurace chromatinu neodpovídající daným kritériím byla označena jako degenerativní.

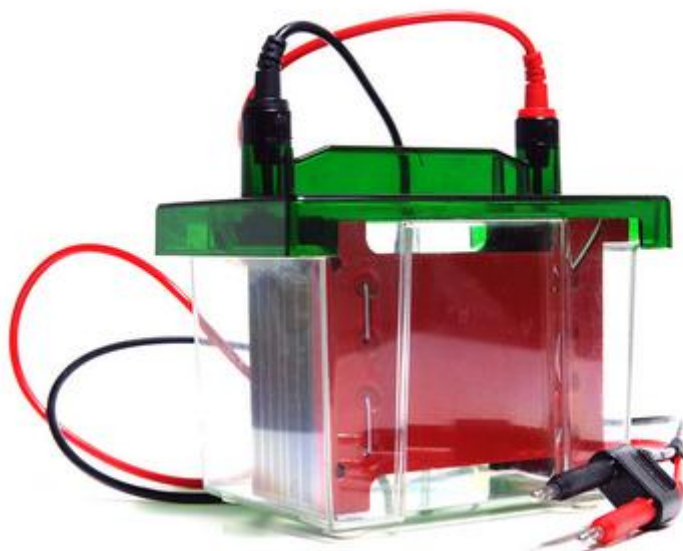
4.5 Stanovení fosfatázy 2B metodou Western blot

Nejprve byly z oocytů odstraněny kumulární buňky, poté probíhal oplach oocytů v teplotě 20 °C 1 kapkách fosfátového pufru PBS (Sigma-Aldrich, Německo). Následovalo vložení oocytů do mikroskopické kádinky s 7% koncentrovaného dodecylsulfátu sodného (SDS) vzorkového pufru, byly 3 minuty pováženy ve vodní lázni a poté zamrazeny. Dále probíhala centrifugace kumulárních buněk odstraněných na povrch a to v 1 ml PBS po dobu 3 min při 5000 otáčkách. Kumulární buňky byly pak umístěny do 7% koncentrovaného SDS vzorkového pufru. Následovalo vání po dobu 3 min a následné zamrazení. Skladování vzorků bylo při teplotě -20 °C po dobu maximálně 14 dní. Před elektroforetickou separací byly vzorky naředěny 13% redestilované vody. Jako pozitivní kontrola byl použit stejný protein kalcineurin (Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Německo, C-1907).

Proteiny byly elektroforeticky separovány nejprve v zraostovacím 4% polyakrylamidovém gelu spolu s dodecylsulfátem sodným (SDS-PAGE) a potom v 12,5% separačním SDS-PAGE gelu. Následovalo rozdělení proteinů v gelu a v závislosti na molekulové hmotnosti. Proteiny byly přetíženy na nitrocelulóзовou membránu (Hybond, Amersham Pharmacia Biotech, USA). Hmotnostní marker prestained molecular weight bovine standard (Bio-Rad, Montreal, Kanada, 161-0318) byl vyfouknutí proteinů na membránu a

jejich identifikaci. Po es noc pak probíhalo blokování membrány v 2% roztoku netu něho mléka v PBS s p ídavkem 0.1% Tween 20. Po dobu 2 hodin byla membrána inkubována spolu s primárním anti-kalcineurinem A (Sigma-Aldrich, N mecko, C-1956) v koncentraci 1:10 000, pop ípad probíhala inkubace s anti-kalcineurin B protilátkou (Sigma-Aldrich, N mecko, C-0581) v koncentraci 1:3 000. Membrána byla promyta a následn inkubována se sekundární my-í protilátkou (Amersham GE Healthcare, Life Sciences, United Kingdom, NIF825), jejichfl koncentrace byla 1:30 000. Rozpu-t ní primárních i sekundárních protilátek prob hlo v 2 % odtu n něm mléce. Vizuaizace p enesených protein s navázanou protilátkou byla uskute n na pomocí p ístroje C-DiGit Blot Scanner (LI-COR Biosciences, USA) metodou ECL Advance Western Blotting Detection Kit (Amersham Pharmacia Biotech, UK).

Obr. 4.1 P ístroj pro m ění metodou Western blog



Zdroj : http://commons.wikimedia.org/wiki/File:Western_blot_wet_transfer_system_Criterion-02.jpg

Tab. 4.2 pufr PBS

Na₂HPO₄	29g
NaH₂PO₄ . 2 H₂O	2,96g
NaCl (100 mM)	5,84g
H₂O	do 1 000ml

4.6 Imunocytochemická analýza

Pomocí pipetování skrz tenkou sklenou pipetu byly z oocyt sejmuty granulární a kumulární buňky a byla odstraněna 0.1 % pronázou v PBS z povrchu oocyt vrstva *zona pellucida*. Probíhlo omytí oocyt ve třech kapkách 0.1 % BSA v PBS. Poté probíhla 60-ti minutová fixace oocyt v 2.5% (w/v) paraformaldehydu v PBS při laboratorní teplotě, po 30-ti minutách byl roztok paraformaldehydu vyměněn za první.

Další byly po dobu 120 minut permeabilizovány fixované oocyty 0.5 % (v/v) Tritonem X-100 v PBS při laboratorní teplotě. Oocyty pak byly propláchnuty v 0.1 % (v/v) Tweenu 20 v PBS a v inkubačním médiu inkubovány (0.1 % w/v) BSA a 0.1 % (v/v) Tween 20 v PBS s primární anti-kalcineurin specifickou myší protilátkou (Sigma-Aldrich, Německo) na jednu v poměru 1:100 při teplotě 4°C přes noc. Po inkubaci probíhlo omytí oocyt třikrát po dobu 10 minut v roztoku 0.1% (v/v) Tween 20 v PBS při laboratorní teplotě. Dalším krokem byla inkubace se sekundární protilátkou anti-myším IgG konjugovaným s fluorescein-5izothiokyanátem 1:100 (FITC; Sigma-Aldrich, Německo) v inkubačním médiu ve tmě při laboratorní teplotě po dobu 60 minut. Poté třikrát probíhlo promytí oocyt 0.1% (v/v) roztokem Tween 20 v PBS a promytí v roztoku 0.1 % po dobu 10 minut (w/v) BSA v PBS. Ke zviditelnění chromatinu byly oocyty zbarveny barvivem 4',6-diamidino-2-phenylindole (DAPI) (Sigma-Aldrich, Německo). Pak byly oocyty omyty v ekvilibračním médiu. Dále byly montovány na podložní skla v kapce glycerolu v PBS.

Ošetřené oocyty v kontrolní skupině bylo totožné jako ve skupině experimentální, rozdílné bylo pouze v tom, že u nich k inkubaci nebyla použita primární protilátka.

Analýza vzorků oocyt na sklech probíhla laserovým konfokálním mikroskopem (Leica SPE, Německo). Při emisní vlnové délce 520 nm a u barviva DAPI při 461 nm byla snímána fluorescence FITC. Úroveň laseru byla u všech experimentálních skupin nastavena stejně.

Analýzou obrazu NIS Elements (Laboratory Imaging, Česká republika) probíhla pomocí makro analýza výsledků z konfokálního mikroskopu pro určení průměrné intenzity signálu fluorescence FITC v cytoplazmě oocytu, jeho korové oblasti a v oblasti jádra. Pokud bylo jádro uloženo na periferii oocytu, byla pak fluorescence měřena na tomto místě považována za signál v oblasti jádra a ne za signál korové oblasti. Porovnávání dat z jednotlivých oblastí oocytu probíhlo vzhledem k celkové intenzitě fluorescence FITC v oocytu a došlo

tímto ke stanovení relativní intenzity fluorescence v jádře, korové oblasti a cytoplazmu oocytu.

4.7 Hodnocení výsledků konfokální mikroskopie

Metodou analýzy obrazu byly hodnoceny výsledky získané z konfokálního mikroskopu (NIS Elements 2003, Laboratory Imaging, Česká republika). Díky partnerství s firmou Laboratory Imaging s.r.o. vzniklo makro ke stanovení průměrné intenzity signálu fluorescence FITC v cytoplazmu oocytu, v oblasti jádra a v korové oblasti. Intenzita fluorescence v oocytech ve stádiu I. a II. meiotické metafáze byla měřena v perichromozomální oblasti. Porovnávání dat z jednotlivých oblastí oocytu proběhlo vzhledem k celkové intenzitě fluorescence FITC v oocytu a došlo tímto ke stanovení relativní intenzity fluorescence v jádře, korové oblasti a cytoplazmu oocytu.

Na měřenou plochu jádra nebo perichromozomální oblasti, cytoplazmy i membrány byly položeny po čtyřech objektech, binární plocha a suma intenzit fluorescence. Pojmem šrelativní intenzitaž byla označena intenzita signálu. Je určena poměrem mezi měřenou průměrnou hodnotou intenzity v oocytech v dané skupině a průměrnou hodnotou intenzity oocytů ve stádiu zárodečného vajíčka. Označení intenzita fluorescence plochy je dané pro poměr intenzit fluorescence položené na měřenou plochu. Průměrná intenzita fluorescence byla položena na měřenou plochu jádra, cytoplazmy, membrány i perichromozomální oblasti. Maximální intenzita fluorescence hodnocena nebyla.

4.8 Úspokojení experimentu

Experiment 1: Detekce podjednotek A a B proteinu kalcineurinu během meiotického zrání oocytů prasete

Cílem bylo zjištění exprese podjednotek kalcineurinu A a B a současně prokázat specifitu zvolených protilátek. Vzorok oocytů prasnic a jejich kumulárních buněk byly analyzovány ve stádiu zárodečného vajíčka a v první i druhé meiotické metafázi. Došlo k elektroforetické separaci proteinů v polyakrylamidovém gelu spolu s dodecylsulfátem sodným. Poté byly proteiny přetíženy na nitrocelulózuovou membránu, a to hned po skonění rozdělování proteinů v gelu podle molekulové hmotnosti. Proběhla poté inkubace nitrocelulózuové membrány s primární (anti-kalcineurin A a B) a sekundární protilátkou (anti-myší IgG). Vizualizace proteinů byla uskutečněna metodou ECL Advance Western Blotting Detection Kit.

Experiment 2: Intracelulární lokalizace podjednotek kalcineurinu A a B během fáze zrání prasečích oocyt

Cílem tohoto experimentu bylo zjistit, zda během meiotického zrání dochází ke změně lokalizace podjednotek kalcineurinu v oocytech.

Oocyty ve stádiu zárodečného vajíčku byly analyzovány v první meiotické metafázi a byly kultivovány 24 a 48 hodin. V každé analyzované skupině bylo minimálně 12 oocytů.

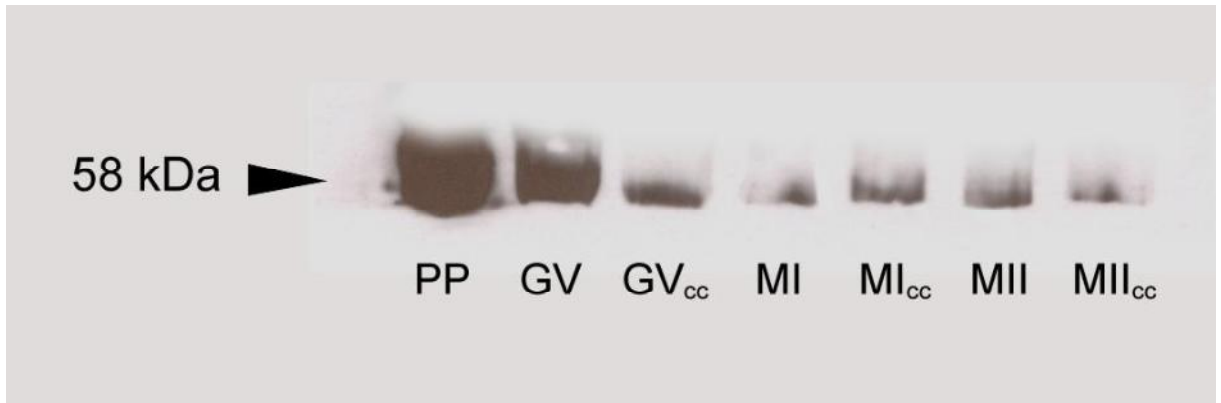
4.9 Statistická analýza

Všechny experimenty byly minimálně čtyřikrát opakovány. Data byla analyzována pomocí programu Statistica verze 6.0. Rozdíly mezi experimentálními skupinami oocytů byly stanoveny pomocí Tukeyho testu HSD. P-hodnoty menší než 0,05 byly považovány za statisticky významné.

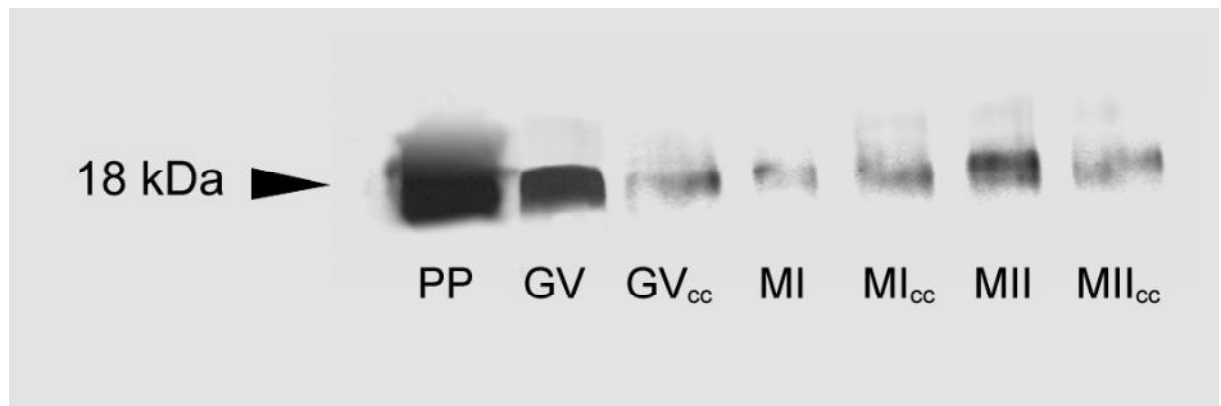
5 Výsledky

5.1 Detekce podjednotek A a B proteinu kalcineurinu

Obr. 5.1 Detekce podjednotky A kalcineurinu pomocí metody Western blot v oocytech a jejich kumulárních bu kách



Obr. 5.2 Detekce podjednotky B kalcineurinu pomocí metody Western blot v oocytech a jejich kumulárních bu kách



Obrázek 5.1 a 5.2: PP ó istý protein kalcineurin z hov zího mozku 1 ng, GV ó oocyty kultivované 0 hodin ve stádiu zárode ného vá ku, GVcc ó kumulární bu ky získané z oocyt ve stádiu zárode ného vá ku, MI ó oocyty ve stádiu první meiotické metafáze. MIcc ó kumulární bu ky získané z oocyt ve stádiu MI. MII ó oocyty ve stádiu druhé meiotické metafáze. MIIcc ó kumulární bu ky získané z oocyt ve stádiu MII. V každé jamce je 150 oocyt nebo jejich kumulárních bun k.

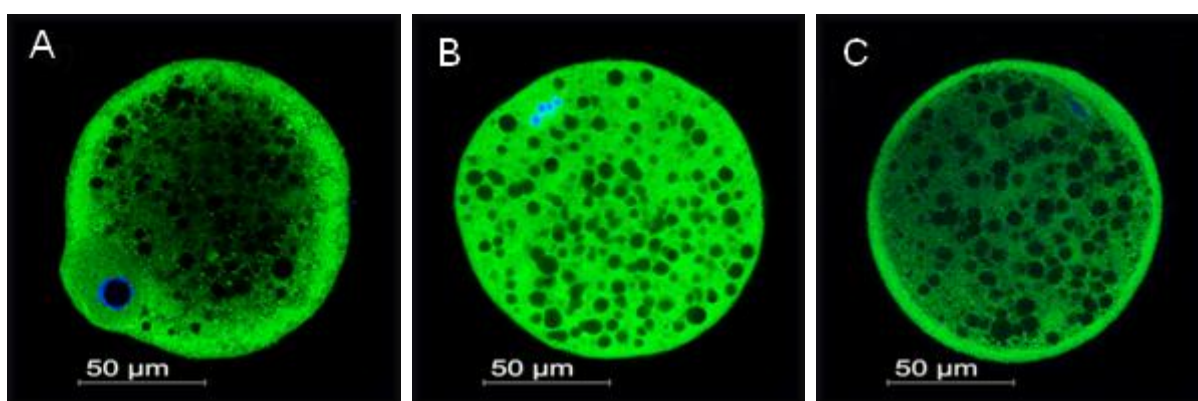
Pomocí metody Western blot jsme potvrdili, že protilátky proti kalcineurinu A reagují s proteinem o molekulové hmotnosti zhruba 58 kDa, která odpovídala molekulové hmotnosti dané podjednotky.

Dále jsme potvrdili, že protilátky proti kalcineurinu B reagují s proteinem o molekulové hmotnosti zhruba 18 kDa, která odpovídala molekulové hmotnosti dané podjednotky.

Obě podjednotky kalcineurinu byly přítomné jak v oocytech s ukončeným ritem ve stádiu zárodečného váčku tak i v jejich kumulárních buňkách (obr. 5.1 a 5.2).

5.2 Intracelulární lokalizace podjednotek kalcineurinu A a B během fáze zrání prasečích oocytů

Obr. 5.3 Intracelulární lokalizace podjednotek kalcineurinu A v průběhu zrání prasečího oocytu - Kalcineurin A



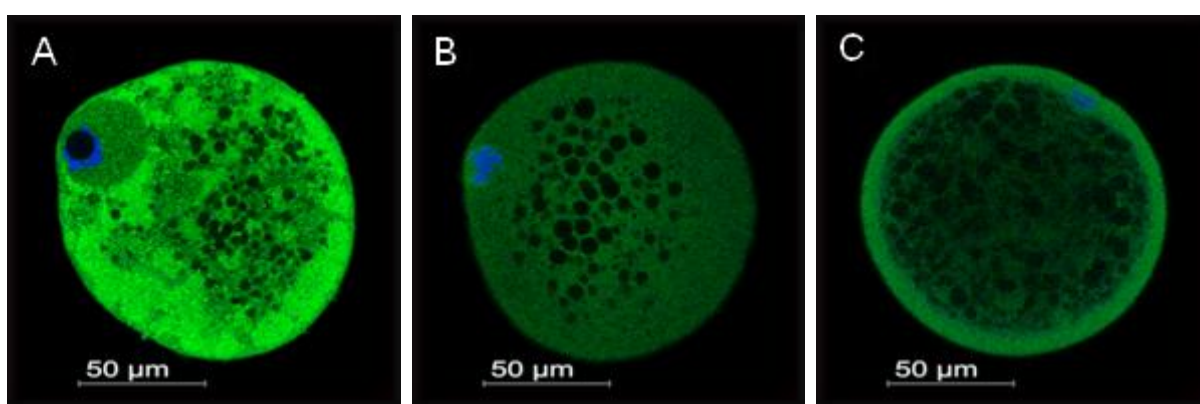
Lokalizace kalcineurinu v oocytech ve stádiu zárodečného váčku (GV) (A), ve stádiu první (B) a druhé meiotické metafáze (C) pomocí imunofluorescence s užitím protilátky anti-kalcineurinu. Zeleně zbarvenou fluorescencí je vyznačen protein pomocí FITC a modrou barvu má chromatin pomocí barviva DAPI. Vzorky byly 400x zvětšeny.

Tab. 5.1 Relativní intenzita fluorescence kalcineurinu A v oocytech prasete během meiotického zrání

kategorie oocytu	počet oocytů ve skupině	jádro ($x \pm \text{SEM}$)	korová oblast ($x \pm \text{SEM}$)	cytoplazma ($x \pm \text{SEM}$)
120 µm	16	$0,26 \pm 0,06^{aA}$	$0,43 \pm 0,07^{abB}$	$0,31 \pm 0,03^{aC}$
MI	15	$0,31 \pm 0,05^{bA}$	$0,39 \pm 0,06^{bB}$	$0,30 \pm 0,04^{aA}$
MII	17	$0,67 \pm 0,26^{cA}$	$1,18 \pm 0,38^{cB}$	$0,75 \pm 0,23^{bA}$

Nó po ty oocyt ve skupin , x ó pr m r, SEM ó sm rodatná odchylka. MI ó oocyt ve stádiu první meiotické metafáze, MII ó oocyt ve stádiu druhé meiotické metafáze. Významné rozdíly na hladin $p < 0,05$ mezi ástmi oocytu (jádro, korová oblast, cytoplazma) v jednotlivých sledovaných kategoriích oocyt (ádky) jsou ozna eny superskripty A, B, C. Ve vzorcích oocyt ve stádiu MI a MII byla sledována oblast d lícího v eténka.

Obr. 5.4 Intracelulární lokalizace podjednotek kalcineurinu B v pr b hu zrání prase ího oocytu - Kalcineurin B



Lokalizace kalcineurinu v oocytech ve stádiu zárode ného vá ku (GV) (A), ve stádiu první (B) a druhé meiotické metafáze (C) pomocí imunofluorescence s ufitím protilátky anti-kalcineurinu. Zelen zbarvenou fluorescencí je vyzna en protein pomocí FITC a modrou barvu má chromatin pomocí barviva DAPI. Vzorky byly 400x zv t-eny.

Tab. 5.2 Relativní intenzita fluorescence kalcineurinu B v oocytech prasete b hem meiotického zrání

kategorie oocytu	po et oocyt ve skupin	jádro (x ± SEM)	korová oblast (x ± SEM)	cytoplazma (x ± SEM)
120 µm	19	0,27 ± 0,05 aA	0,42 ± 0,08 aB	0,32 ± 0,03 aAB
MI	16	0,28 ± 0,03 aA	0,41 ± 0,04 aB	0,31 ± 0,02 aA
MII	19	1,04 ± 0,02 bA	1,16 ± 0,04 bB	0,80 ± 0,07 aC

Nó po ty oocyt ve skupin , x ó pr m r, SEM ó sm rodatná odchylka. MI ó oocyt ve stádiu první meiotické metafáze, MII ó oocyt ve stádiu druhé meiotické metafáze. Významné rozdíly na hladin $p < 0,05$ mezi ástmi oocytu (jádro, korová oblast, cytoplazma) v jednotlivých sledovaných kategoriích oocyt (ádky) jsou ozna eny superskripty A, B, C. Ve vzorcích oocyt ve stádiu MI a MII byla sledována oblast d líčího v eténka.

Imunocytochemické hodnocení prokázalo v oocytech p ítomnost obou podjednotek kalcineurinu. Intracelulární lokalizace proteinu kalcineurinu A a B se v oocytech li-ila. Re-rezentativní obrázky oocyt jsou v obrázku 5.3 a 5.4.

Kalcineurin A byl detekován ve v-ech zkoumaných kategoriích oocyt (viz obrázek A, B,C). V pr b hu fáze zrání do-lo k významné zm n v intenzit fluorescence kalcineurinu A. Ve stádiu první meiotické metafáze se obsah kalcineurinu A rovnom rn rozprost el a jednotlivé sledované kompartmenty oocytu, jaderná oblast, korová oblast a cytoplazma, se v obsahu tohoto proteinu neli-ily. U dozrálých oocyt ve stádiu druhé meiotické metafáze do-lo k významnému nár stu v intenzit fluorescence kalcineurinu A v cytoplazm , ale p edev-ím v korové oblasti oocytu. Viz tabulka 5.1.

V porovnání s kalcineurinem A do-lo v pr b hu meiotického zrání do stádía první meiotické metafáze k poklesu intenzity fluorescence kalcineurinu B. U oocyt v druhé meiotické metafázi byl oproti rostoucím oocyt m naopak patrný statisticky významný nár st intenzity fluorescence kalcineurinu B a to p edev-ím v korové oblasti a cytoplazm oocytu. Viz tabulka 5.2.

6 Diskuse

Expres fosfatázy 2B, kalcineurinu, byla potvrzena v oocytu b hem meiotického zrání oocytu prasete.

Pomocí imunocytochemické lokalizace byly zmapovány změny v expresi proteinu b hem meiotického zrání a přítomnost proteinu byla prokázána také metodou Western blot.

Doposud byl výskyt kalcineurinu popsán pouze v oocytech mouchy rodu *Drosophila* (Takeo *et al.*, 2006) a fláby drápatky *Xenopus laevis* (Nishiyama *et al.*, 2007; Mochida *et al.*, 2007). U prasete byl kalcineurin nalezen v různých typech somatických buněk, například v bílých krvinkách (Chantler *et al.*, 1985) nebo kosterní svalovině (de Jonge *et al.*, 2006). Jeho přítomnost byla prokázána také v kanálcích spermíích (Tash *et al.*, 1988). Jako první byl potvrzen výskyt kalcineurinu také v samičích pohlavních buňkách prasete, oocytech.

V oocytech byly přítomny obě podjednotky kalcineurinu, kalcineurin A i B. Kalcineurin byl detekován ve všech zkoumaných skupinách sledovaných oocytů v oblasti chromozómů, korové oblasti i cytoplasmě. V naší studii byla zaznamenána významná změna lokalizace kalcineurinu A a kalcineurinu B v průběhu průběhu meiotického zrání. To naznačuje, že kalcineurin může sehrávat významnou roli při regulaci zrání oocytů s ukončeným ritem.

Za výrazný rys byla označena kumulace kalcineurinu A i kalcineurinu B v korové části oocytů. Nejvyšší množství obou podjednotek bylo objeveno v korové části dozrálých oocytů v metafázi II, což nebylo překvapením vzhledem k tomu, že kalcineurin je asociován s aktinovým cytoskeletem v různých typech somatických buněk (Ferreira *et al.*, 1993; Faul *et al.*, 2008) a v prasečích ovocytech je přítomno velké množství filamentárního aktinu v korové části (Wang *et al.*, 2000). S ohledem na výrazný nárůst kalcineurinu v korové části oocytů dozrálých do stádia metafáze II je možno spekulovat o tom, že by kalcineurin mohl sehrávat určitou roli například také v exocytóze kortikálních granul. Kortikální granula jsou v průběhu zrání ovocytu shromažďovány v korové části a jejich exocytóza je kalcium-dependentním procesem (Cran *et al.*, 1988). Kalcineurin je zapojován mezi enzymy, kterými je zprostředkováván převod vápníkového signálu na celý komplex intracelulárních dějů. Náznakem zřejmého významu kalcineurinu pro plně dozrálý ovocyt v metafázi II je i hromadění obou podjednotek kalcineurinu v dalších kompartmentech – cytoplasmě a perichromozomální oblasti. Úloha kalcineurinu při aktivaci savčích oocytů po oplození není známa. Existuje možnost, že kalcineurin může i u savců sehrávat významnou roli při aktivaci oocytů po oplození spermíí po-

dobně jako je tomu u oocyty drápatky *Xenopus laevis*, kde je kalcineurin přítomen při uvolnění vlábkých vajíček z druhého meiotického bloku. Tento blok je udržován pomocí kaskády zahrnující Mos a MAPK. Klíčový regulátor této signální dráhy APC/Fizzy je u vlábkých drápatek cílovým substrátem kalcineurinu (Nishiyama *et al.* 2007; Mochida *et al.* 2007).

Významným rysem v relokaci kalcineurinu během zrání prasečího oocyty je v nahromadění kalcineurinu B v jádru oocyty s ukončeným ritem. Kalcineurin je znám jako regulátor transkripce u somatických buněk (Crabtree 2001), ale savčí oocyty s ukončeným ritem jsou transkripčně inaktivní (Motlík *et al.*, 1984; Crozet *et al.*, 1986). Je možné předpokládat, že akumulace kalcineurinu B v zárodečném vaku oocyty s ukončeným ritem může mít souvislost s přípravou na GVBD a vstup do metafáze I. Nelze vyloučit ani úlohu kalcineurinu pro přechod z metafáze I do metafáze II, jako je tomu u bezobratlých (Takeo *et al.* 2006, 2010). Ve prospěch této hypotézy jsou dlekazem i naše nepublikované výsledky, ve kterých zrání oocyty s plnou meiotickou kompetencí je ovlivněno specifickou inhibicí kalcineurinu. Efekt inhibitor kalcineurinu byl významný právě při výstupu zrajících oocyty z metafáze I.

7 Závěr

Pomocí experimentů byl prokázán výskyt fosfatázy 2B během meiotického zrání oocytu prasete. V průběhu zrání byla v oocytech detekována katalytická podjednotka A i regulační podjednotka B kalcineurinu. Na základě imunocytochemického sledování byly prokázány změny v lokalizaci obou podjednotek během meiotického zrání. Přechodem oocytů z první do druhé meiotické metafáze byly velmi výrazné změny v nárůstu proteinu. Změna polohy a buněčné lokalizace podjednotek fosfatázy 2B může být v souvislosti s její úlohou v řízení meiotického zrání oocytu prasete. Konkrétní úloha obou podjednotek a jejich izoform během meiotického zrání (Adhikari, Liu, & Shen, 2012) je označována za nejasnou a k jejímu objasnění bude třeba provést další experimenty, které budou zaměřeny na objasnění funkce kalcineurinu v jednotlivých fázích oogeneze a aktivace oocytu po oplození.

8 Seznam poufíté literatury

Adhikari D., Liu K., Shen Y. 2012. Cdk1 drives meiosis and mitosis through two different mechanisms. *Cell Cycl* 11(15), 276362764.

Alberts. B., Bray D., Johnson A., Lewis J., Raff M., Roberts K., Walter P. 1998. Základy bu-
n né biologie, Espero Publishing, Ústí nad Labem, ISBN: 8069029066260, 630s.

Alderton K. W., Cooper Ch. E., Knowles G. R. 2001. Nitric oxide synhases: structure, func-
tion and inhibition. *Biochemistry*. 357. 593 ó 61.

Awumey E. M., Moonga B. S., Sodam B. R., Koval A. P., Adebajo O. A., Kumegawa M.,
Zaidi M., Epstein S. 1999. Molecular and functional evidence for calcineurin-A and iso-
forms in the osteoclast: novel insights into cyclosporin A action on bone resorption. *Bioche-
mical and biophysical research communications*, 254(1), 2486252.

Bachvarova R., 1974. Incorporation of tritiated adenosine into mouse ovum RNA. *Develop-
mental Biology* 40, 53657.

Baker, T. G., Franchi, L. L. 1967. The fine structure of oogonia and oocytes in human ovaries
J. Cell Sci. 214-222.

Bredt D. S., Hwang P. M., Snyder S. H. 1990. Localization of nitric oxide synthase indicating
a neural role for nitric oxide. *Nature*, 347(6295), 7686770.

Brunet S., Maro B. 2005. Cytoskeleton and cell cycle control during meiotic maturation of the
mouse oocyte: integrating time and space. *Reproduction Review* 130, 8036810.

Brevini-Gandolfi T. A. L., Gandolfi F. 2001. The maternal legacy to the embryo: cytoplasmic
components and their effects on early development. *Theriogenology* 55, 125761275.

- Bu S., Xia G., Tao Y., Lei L. a Zhou B. 2003. Dual effects of nitric oxide on meiotic maturation of mouse cumulus cell-enclosed oocytes in vitro. *Molecular And Cellular Endocrinology* 207: 21630.
- Calarco P. G. 1972. The kinetochore in oocyte maturation In: Oogenesis. Eds. Biggers J. D. a Scheultz A. W., Univ. Park., Pennsylvania, 68687.
- Carroll J., Swann K., Whittingham D., Whitaker M. 1994. Spatiotemporal dynamics of intracellular Ca^{2+} oscillations during the growth and meiotic maturation of mouse oocytes. *Development*, 120(12), 350763517.
- Clapham D. E. 1995. Calcium signaling. *Cell* 80, 2596268.
- Clarke H., Rossant J., Masui Y. 1988. Suppresion of chromosome condensation during meiotic maturation induces parthenogenetic development of mouse oocytes. *Development* 104, 976 103.
- Clarke P. R., 1995. Cyclin-Dependent Kinases: CAK-handed kinase activation *Current Biology* 5(1), 40642.
- Cohen P. 1989. The structure and regulation of protein phosphatases. *Annual review of biochemistry*, 58(1), 4536508.
- Colledge W. H., Carlton M. B., Udy G. B., Evans M. J. 1994. Disruption of c-mos causes parthenogenetic development of unfertilized mouse eggs. *Nature* 370, 66668.
- Davis R. J. 2000. Signal transduction by the JNK Group of MAP kinases. *Cell*. 103. 2396252.
- Dekel N., Galiani D., Sherizly I.: Dissociation between the inhibitory and the stimulatory action of cAMP on maturation of rat oocytes. *Moll. Cell. Endocrinol.* 56, 115 ó 121, 1988.

Depreux, F. F., Scheffler, J. M., Grant, A. L., Bidwell, C. A., Gerrard, D. E. 2010 Molecular cloning and characterization of porcine calcineurin- γ subunit expression in skeletal muscle. *Journal of Animal Science*, 88.(2), 564-574.

de Vantéry C., Stutz A., Vassalli, J. D., Schorderet-Slatkine S. 1997. Acquisition of meiotic competence in growing mouse oocyte is controlled at both translational and posttranslational levels. *Developmental Biology*. 187. 45653.

Dixit D. V., Parvizi N.: Nitric oxide and the control of reproduction. *Animal reproduction science* 65, 1 616, 2001

Domingo-Sananes M. R., Kapuy O., Hunt T., Novak B. 2011. Switches and latches: a biochemical tug-of-war between the kinases and phosphatases that control mitosis. *Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences*, 366(1584), 358463594.

Dunphy W, Kumagai A. 1991. The cdc25 protein contains intrinsic phosphatase activity. *Cell* 54, 4246432.

Dupré A., Buffin E., Roustan C., Nairn A. C., Jessus C., Haccard, O. 2013. The phosphorylation of ARPP19 by Greatwall renders the autoamplification of MPF independent of PKA in *Xenopus* oocytes. *Journal of cell science*.

Eppig, J. J. 2001. Oocyte control of ovarian follicular development and function in mammals. *Reproduction*. 122. 8106837.

Fan H. Y., Tong C., Chen D. Y., Xia G. L., Song X. F., Schatten H., Sun Q. Y. 2002. Inhibitory effects of cAMP and protein kinase C on meiotic maturation and MAP kinase phosphorylation in porcine oocytes. *Molecular Reproduction and Development*. 63. 4816488.

Ferreira E. M., Vireque A. A., Adona P. R., Meirelles F. V., Ferriani R. A., Navarro P.A. 2009. Cytoplasmic maturation of bovine oocytes: structural and biochemical modifications and acquisition of developmental competence. *Theriogenology*. 15;71(5),837648

- Fulka J., Jung T, Moor R. M. 1992. The fall of biological maturation promoting factor (MPF) and histone H1 kinase activity during anaphase and telophase in mouse oocytes. *Molecular Reproduction and Development* 32, 3786381.
- Gautier J., Maller J. 1988. Cyclin B in *Xenopus* oocytes: implications for the mechanism of pre-MPF activation. *The EMBO Journal* 10, 1786182.
- Gautier J., Maller J., Langan T., Lohka M., Shwnoy S., Shalloway D., Nurse P. 1989. Maturation promoting factor and the regulation of the cell cycle. *Journal of Cell Science (Suppl)* 12, 54662.
- Gautier J., Solomon M. J., Booher R. N., Bazan J. F., Kirschner M. W. 1991. Cdc25 is a specific tyrosine phosphatase that directly activates p34cdc2. *Cell* 67, 1996211.
- Glotzer M., Murray A. W., Kirschner M. W. 1991 Cyclin is degraded by the ubiquitin pathway. *Nature* 349, 1326138.
- Gosden R. G., Bownes M. 1995. Cellular and molecular aspects of oocyte development, Gametes-The Oocyte, Cambridge University Press, Cambridge, pp. 25651.
- Goudet G., Belin F., Bezard J., Gerard N. 1998. Maturation-promoting factor (MPF) and mitogen activated protein kinase (MAPK) expression in relation to oocyte competence for in vitro maturation in the mare. *Molecular Human Reproduction* 4, 5656570.
- Guraya S. S. 2000. Comparative Cellular and Molecular Biology of Ovary in Mammals Fundamentals and Applications. *Science Publishers*, New Hampshire, USA and Oxford IBH, New Delhi.
- Guthrie H., Garrett W. M. 2000. Changes in porcine oocyte germinal vesicle development as follicles approach preovulatory maturity. *Theriogenology*, 54(3), 3906400.

- Haccard O., Sarcevic B., Lewellyn A., Hartley R., Roy L., Izumi T., Erikson E., Maller J. L., 1993. Induction of metaphase arrest in cleaving *Xenopus* embryos by MAP kinase. *Science* 262, 26261265.
- Hafez E. S. E., Hafez B. 2000. Folliculogenesis, Egg Maturation, and Ovulation In: *Reproduction in Farm Animals*. Lippincott Williams and Wilkins, Philadelphia, seventh, 509p.
- 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, 1059.
- Hashimoto N., Watanabe N., Furuta Y., Tamemoto H., Sagata N., Yokoyama M., Okazaki K, Nagayoshi M., Takeda N., Ikawa Y. 1994. Parthenogenetic activation of oocytes in c-mos-deficient mice. *Nature* 370, 67671.
- Hattori M. ó A., Nishida N., Takesue K., Kato Y., Fujihara N. 2000. FSH suppression of nitric oxide synthesis in porcine oocytes. *Journal of Molecular Endocrinology*. 24. 65673.
- Heyting, C. 1996. Synaptonema complexes: structure and function. *Curr Opin Cell Biol*. 8(3): 390-395.
- Hunt T. 1992. Cell cycle arrest and c-mos. *Nature* 355: 5876588.
- Homa S. T., Carroll J., Swann K. 1993. The role of calcium in mammalian oocyte maturation and egg activation. *Human Reproduction* 8: 127461281.
- Homa S. T. 1995. Calcium and meiotic maturation of the mammalian oocyte. *Molecular reproduction and development*, 40(1), 1226134.
- Hunter M. 2000. Oocyte maturation and ovum quality in pigs. *Reviews of reproduction* 5(2), 1236129.

- Hutt K. J., McLaughlin E. A., Holland M. K. 2006. Kit ligand and c-Kit have diverse roles during mammalian oogenesis and folliculogenesis. *Molecular human reproduction*, 12(2), 62668.
- Hyttel, P., Fair, T., Avery, B., Callesen, H., Greve, T., 1999 Transcriptional Activity and Ultrastructure in Bovine Oocytes. *Reproduction in Domestic Animals*. 34, 432-458.
- Chen W., Yang J., Li P., 2000. Effect of dexamethasone on the expression of p34cdc2 and cyclin B1 in pig oocytes in vitro. *Molecular Reproduction and Development* 56, 74-79.
- Chan B., Greenan G., McKeon F., Ellenberger T. 2005. Identification of a peptide fragment of DSCR1 that competitively inhibits calcineurin activity in vitro and in vivo. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA* 102(37):13075-13080.
- Choi T., Fukusawa K., Zhou R., Tessarollo L., Borror K., Resau J., Vande Woude G. 1996. The Mos / mitogen protein kinase (MAPK) pathway regulates the size and degradation of the first polar body in maturing mouse oocytes. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA* 93, 7033-7035.
- Chmelíková E., Sedmíková M., Petr J., Kott T., Lánská V., Těmlová L., Tichovská H., Jeřeta M. 2009. Expression and localization of nitric oxide synthase isoforms during porcine oocyte growth and acquisition of meiotic competence. *Czech Journal Of Animal Science* 54: 137-149.
- Chmelíková E., Jeřeta M., Sedmíková M., Petr J., Těmlová L., Kott T., Lipovová P., Jílek F. 2010. Nitric oxide synthase isoforms and the effect of their inhibition on meiotic maturation of porcine oocytes. *Zygote*. 18. 235-244.
- Chmelíková, E., Sedmíková, M., Rajmon, R., Petr, J., Těmlová, D., Jílek, F. 2004. Effect of proteasome inhibitor MG132 on *in vitro* maturation of pig oocytes. *Zygote*. 12. 156-163.

Inoue M., Naito K., Nakazma T., Sato E. 1998. Mitogen-activated protein kinase translocates into the germinal vesicle and induces germinal vesicle break down in porcine oocytes. *Biology of Reproduction* 58, 1316-1336.

Jablonka-Shariff A., Olson M. L. 1997. Hormonal regulation of nitric oxide synthases and their cell-specific expression during follicular development in the rat ovary. *Endocrinology*. 138. 4606-4618.

Janssens S. P., Shimouchi A., Quertermous T., Bloch D. B., Bloch K. D. 1992. Cloning and expression of a cDNA encoding human endothelium-derived relaxing factor/nitric oxide synthase. *Journal of biological chemistry*, 267(21), 14519-14522.

Johnson, J., Bagley, J., Skaznik-Wikiel, M., Lee, H. J., Adams, G.B., Niikura, Y., Tschudy, K. S., Tilly, J. C., Cortes, M. L., Forkert, R., Spitzer, T., Iacomini, J., Scadden, D. T., Tilly, J. L. 2005. Oocyte generation in adult mammalian ovaries by stative germ cells in bone-marrow and peripheral blood. *Cell*. 122(2). 304-14.

Josefsberg L. B., Galiani D., Lazar S., Kaufman O., Seger R., Dekel N. 2003. Maturation-promoting factor governs mitogen-activated protein kinase activation and interphase suppression during meiosis of rat oocytes. *Biology of Reproduction* 68, 1284-1289.

King R., Deshaies R., Peters J., Kirschner M., 1996. How proteolysis drives the cell cycle. *Science* 274, 1654-1658.

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

Kishimoto T., Kanatani H. 1976. Cytoplasmic factor responsible for germinal vesicle breakdown and meiotic maturation in starfish oocytes. *Nature* 221, 273-274.

Klee, C. B., Ren, H., Wang, X. 1998. Regulation of the Calmodulin stimulated Protein Phosphatase, Calcineurin. *The Journal of biological chemistry*. 273. 22. 13368-13369.

Kosako H., Gotoh Y., Nishida E. 1994. Requirement for the MAP kinase kinase/MAP kinase cascade in *Xenopus* oocyte maturation. *The EMBO Journal* 13, 213162138.

Lawrence Y, Whiteker M., Swann K. 1997. Spermegg fusion is the prelude to the initial Ca^{2+} increase at fertilization in the mouse. *Development* 124, 2346240.

Li Y. H., Kang H., Xu Y. N., Heo Y. T., Cui X. S., Kim N. H., Oh J. S. 2013. Greatwall Kinase Is Required for Meiotic Maturation in Porcine Oocytes. *Biology of reproduction*, 89(3), 53.

Lodish H., Berk A., Kaiser Ch. A., Krieger M., Scott M. P., Bretscher A., Ploegh H., Mutsaers P., 2008. *Molecular Cell Biology*, 6. vydání, W. H. Freeman, N. Y, ISBN-13, 978-0-7167-7601-7, 1150s.

Logan K. P., McNatty K. A., Juengel J. L. 2003. Expression of Wilms tumor gene and protein localization during ovarian formation and follicular development in sheep. *Biology of Reproduction*. 68. 636 ó 641.

Lorca T., Cruzalegui F., Fesquet D., Cavadore J., Mery J., Means A., Doree M., 1993. Calmodulin dependant protein kinase II mediates inactivation of MPF and CSF upon fertilization of *Xenopus* eggs. *Nature* 366, 2706273.

Lu Q, Smith G. D., Chen D. Y., Yang Z, Han Z. M., Schatten H, Sun Q. Y. 2001. Phosphorylation of mitogen-activated protein kinase is regulated by protein kinase C, cyclic 3 5 - adenosine monophosphate, and protein phosphatase modulators during meiosis resumption in rat oocytes. *Biology of Reproduction* 64, 144461450.

Marlovits G., Tyson Ch. J., Novak B., Tyson J. J. 1998. Modeling M-phase control in *Xenopus* oocyte extracts: the surveillance mechanism for unreplicated DNA *Biophysical Chemistry* 72, 1706184.

Masui Y., Markert C. 1971. Cytoplasmic control of nuclear behaviour during meiotic maturation of frog oocytes. *Journal of experimental zoology* 177, 1296146.

- Mattioli M., Galeati G., Bacci M. 1991 Changes in maturationpromoting activity in the cytoplasm of pig oocytes throughout maturation. *Molecular Reproduction and Development* 30, 1206125.
- Mehlmann L. M., Kline D. 1994. Regulation of intracellular calcium in the mouse egg: calcium release in response to sperm or inositol trisphosphate is enhanced after meiotic maturation. *Biology of reproduction*, 51(6), 108861098.
- Mehlmann L. M., Terasaki M., Jaffe L. A., Kline D. 1995. Reorganization of the endoplasmic reticulum during meiotic maturation of the mouse oocyte. *Developmental Biology* 170, 6086614.
- McGinnis L. K., Limback S. D., Albertini D. F. 2012. Signaling Modalities During Oogenesis in Mammals. *Current topics in developmental biology*, 102, 2276242.
- Miao Y. L., Zhang X., Zhao J. G., Spate L., Zhao M. T., Murphy C. N., Schatten, H. 2012. Effects of griseofulvin on in vitro porcine oocyte maturation and embryo development. *Environmental and molecular mutagenesis*, 53(7), 5626566.
- Miyazaki S. 1991: Repetitive calcium transients in hamster oocytes. *Cell Calcium* 12: 2056216.
- Mochida, S., Hunt, T. 2007. Calcineurin is required to release Xenopus egg extracts from meiotic M phase. *Nature*. 449. 3376340.
- Mochida S., Maslen S. L., Skehel M., Hunt T. 2010. Greatwall phosphorylates an inhibitor of protein phosphatase 2A that is essential for mitosis. *Science* 330:167061673.
- Moore H., Udayashankar R., Aflatoonian B. 2008. Stem cells for reproductive medicine. *Molecular and cellular endocrinology*, 288(1), 1056109.

- Motlík J., Fulka J. 1976. Breakdown of germinal vesicle in pig oocytes in vivo and in vitro. *Journal of Experimental Zoology* 198, 155 ó 162.
- Motlík J., Kubelka M. 1990. Cell-cycle aspects of growth and maturation of mammalian oocytes. *Molecular Reproduction and Development* 27, 368ó376.
- Murray A. W., Kirschner M. 1989. Cyclin synthesis drives the early embryonic cell cycle. *Nature* 339, 276ó280.
- Nader N., Kulkarni R. P., Dib M., Machaca K. 2012. How to make a good egg!: The need for remodeling of oocyte Ca²⁺ signaling to mediate the egg-to-embryo transition. *Cell calcium*.
- Nathan C., Xie, Q. W. 1994. Nitric oxide synthases: roles, tolls, and controls. *Cell*, 78(6), 915ó918.
- Nishiyama, T., Yoshizaki, N., Kishimoto, T., Ohsumi, K. 2007. Transient activation of calcineurin is essential to initiate embryonic development in *Xenopus laevis*. *Nature*. 449. 342-346.
- Nurse P. 1990. Universal control mechanism regulating onset of M-phase. *Nature* 344, 504ó508.
- Pae H. O., Lee Y. Ch., Jo E. K., Chung H. T. 2009. Subtle Interplay of Endogenous Bioactive Gases (NO, CO and H₂S) in Inflammation. *Archives of Pharmacal Research* 32(8), 1155-1162.
- Petr J., Urbánková D., Tománek M., Rozinek J., Jílek F. 2002. Activation of in vitro matured pig oocytes using activators of inositol triphosphate or ryanodine receptors. *Animal reproduction science*, 70(3), 235ó249.
- Picton H., Briggs D., Gosden R. 1998. The molecular basis of oocyte growth and development. *Molecular and Cellular Endocrinology* 145, 30ó38.

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

Procházka R., Motlík J., Fulka J. 1989. Activity of maturation promoting factor in pig oocytes after microinjection and serial transfer of maturing cytoplasm. *Cellular Differ Development* 27, 175-181.

Reece W. O. 2011. Fyziologie a funkce anatomie domácích zvířat. Grada Publishing. Praha. 473 s. ISBN: 8024732823.

Rosselli M., Imthurn B., Macas E., Keller P. J., Dubey R. K. 1994. Circulating nitrite/nitrate levels increase with follicular development: indirect evidence for estradiol-mediated NO release. *Biochemical and Biophysical Research Communications*. 202. 1543-1552.

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

Sathananthan A. H., Trounson A. O. 2000. Mitochondrial morphology during preimplantational human embryogenesis. *Human Reproduction*, 15(suppl 2), 149-158.

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

Sharma R. K., Chowdhury S. 1998. Ultrastructure changes in oocytes of caprine antral follicles. *Indian Journal of Animal Sciences* 68 (4), 333-336.

Sherthan, H. 2007. Telomere attachment and clustering during meiosis. *Cell*. 64(2). 118-125.

- Shiina N., Moriguchi T., Ohta K., Gotoh Y., Nishida, E., 1992. Regulation of a major microtubule-associated protein by MPF and MAP kinase. *The EMBO Journal* 11, 398063984.
- Schaeffer, H. J., Weber, M. J. 1999. Mitogen-activated protein kinases: specific messages from ubiquitous messengers. *Molecular and cellular biology*, 19(4), 243662444.
- Schatten G., 1994. The centrosome and its mode of inheritance: the reduction of the centrosome during gametogenesis and its restoration during fertilization, *Developmental Biology* 165, 3016329.
- Schmidt A., Rauh N. R, Nigg E. A., Mayer T. U. 2006. Cytostatic factor: an activity that puts the cell cycle on hold *Journal of Cell Science* 119, 121461217.
- Sirard M. A., Dubuc A., Bolamba D., Zheng Y., Coenen K. 1993: Follicle-oocyte-sperm interactions *in vitro* and *in vitro* in pigs. *Journal of reproduction and fertility. Supplement* 48: 5614.
- Stefanelli C., Pignatti C., Tantini B., Stani I., Bonavita F., Muscari C., Caldarella C. M. 1999. Nitric oxide can function as either a killer molecule or an antiapoptotic effector in cardiomyocytes. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Molecular Cell Research*, 1450(3), 4066413.
- Stojkovic M., Motlík J., Kölle S., Zakchartchenko V., Alberio R., Sinowatz F., Wolf E. 1999. Cell-cyclo control and oocyte maturation: Review of literature. *Reproduction in Domestic Animals* 34, 3366342.
- Sun Q. Y. 2003. Cellular and molecular mechanisms leading to cortical reaction and polyspermy block in mammalian eggs. *Microscopy research and technique*, 61(4), 3436348.
- Sun Q. Y., Lai L., Park K. W., Kuhholzer B., Prather R. S., Schatten H. 2001. Dynamic events are differently mediated by microfilaments, microtubules, and mitogen-activated pro-

tein kinase during porcine oocyte maturation and fertilization in vitro. *Biology of Reproduction* 64, 8756889.

Sun Q. Y., Nagai T. 2003. Molecular mechanisms underlying pig oocyte maturation and fertilization. *Journal of Reproduction and Development* 49, 3486359

Swain J. E., Wang X., Saunders T. L., Dunn, R., Smith G. D. 2003. Specific inhibition of mouse oocyte nuclear protein phosphatase-1 stimulates germinal vesicle breakdown. *Molecular reproduction and development*, 65(1), 966103.

Swann K. 1993. The soluble sperm oscillogen hypothesis. *Zygote* 1, 2746276.

Takeo, S., Hawley, R. S., Aigaki, T. 2010. Calcineurin and its regulation by Sra/RCAN is required for completion of meiosis in Drosophila. *Developmental Biology*, 344, (2), 956-968.

Takeo, S., Tsuda, M., Akahori, S., Matsuo, T., Aigaki, T. 2006. The Calcineurin Regulator Sra Plays an Essential Role in Female Meiosis in Drosophila. *Current Biology* 16. 143661439.

Tan J. H., Wang H., Sun X., Liu Y., Sui H., Zhang J. 2009. Chromatin configurations in the germinal vesicle of mammalian oocytes *Molecular Human Reproduction* 15(1), 268.

Tao Y., Fu Z., Zhang M., Xia G., Yang J., Xie H. 2004. Immunohistochemical localization of inducible and endothelial nitric oxide synthase in porcine ovaries and effects of NO on antrum formation and oocyte meiotic maturation. *Molecular and Cellular Endocrinology*. 222(1-2). 936103.

Tao J. Y., Fu Z., Zhang M. L., Xia G., Lei L., Wu Z. L. 2005. Nitric oxide influences the meiotic maturation of porcine oocytes cultured in hypoxanthine-supplemented medium. *Journal of Animal Physiology and Animal Nutrition*. 89(162). 38644.

Thibault C., Szollosi D., Gerard M. 1987. Mammalian oocyte maturation. *Reprod Nutr Dev* 27: 8716897.

Tong C, Fan H. Y., Chen D. Y., Song X. F., Schatten H., Sun Q. Y. 2003. Effects of MEK inhibitor U0126 on meiotic progression in mouse oocyte: microtubule organization, asymmetric division and metaphase II arrest. *Cell Research* 13, 3766384.

Touny L. H., Banerjee P. P. 2006. Identification of both Myt-1 and Wee-1 as necessary mediators of the p21-independent inactivation of the cdc-2/cyclin B1 complex and growth inhibition of TRAMP cancer cells by genistein. *Prostate*. 1;66(14),154261554.

Vacek, Z. 2006. Embryologie. Grada Publishing. 256 s. 1633. ISBN: 978-80-247-1267-3.

Verlhac M., Kubiak J., Clarke H., Maro B. 1994. Microtubule and chromatin behavior follow MAP kinase activity but not MPF activity during meiosis in mouse oocytes. *Development* 120, 101761025.

Villa-Diaz L. G., Miyano T. 2004. Activation of p38 MAPK During Porcine Oocyte Maturation. *Biology of Reproduction* 71, 6916696.

Wang J. H., Desai R. 1977. Modulator binding protein. Bovine brain protein exhibiting the Ca^{2+} -dependent association with the protein modulator of cyclic nucleotide phosphodiesterase. *Journal of Biological Chemistry*, 252(12), 417564184.

Wang R. U. I. 2002. Two's company, three's a crowd: can H₂S be the third endogenous gaseous transmitter? *The FASEB Journal*, 16(13), 179261798.

Wassarman P. M., Fujiwara K. 1978: Immunofluorescent anti-tubulin staining of spindles during meiotic maturation of mouse oocytes *in vitro*. *Journal of Cellular Science* 29: 1756183.

- Wassarman P. M., Josefowicz W. J. 1978. Oocyte development in the mouse: an ultrastructural comparison of oocytes isolated at different stages of growth and meiotic competence. *Journal of Morphology* 156, 2146241.
- Wassarman P. M. 1988. The Mammalian Ovum In: *The Physiology of Reproduction*. eds. Knobil E. a Neill J., Raven Press Ltd., New York, 75699.
- Wassarman, P. M. 2008. Zona pellucida glycoproteins. *The Journal of biological chemistry*. 283. 36 pp. 24286624288.
- Watanabe N., Vandeoude G., Ikawa Y., Sagata N. 1989. Specific proteolysis of the c-mos protooncogene product by calpain on fertilization of *Xenopus* eggs. *Nature* 342, 5066511.
- Wolf D. P., Zelinski-Wooten M. 2001. *Assisted Fertilization and Nuclear Transfer in Mammals*, Human Press, Totowa, New Jersey. ISBN: 97860689603666365, 320s.
- Yamano H., Gannon J., Mahbubani H., Hunt T. 2004. Cell Cycle-regulated recognition of the destruction box of cyclin B by the APC/C in *Xenopus* egg extracts. *Molecular Cell* 16;13(1), 263.
- Yanagimachi R. 1981. Mechanism of fertilisation *in mammals* In: *Fertilisation and embryonic development in vitro*. Eds. Mastroianni L. a Biggers J. D., Plenum Press, New York, 816182.
- Yanagimachi R. 1994. Mammalian fertilisation. *The Physiology of Reproduction*, eds. Knobil E. et Neil J., second edition, Raven Press, New York, 1896280.
- Yew N, Mellini M., Vande Woude G. 1992. Meiotic initiation by the Mos protein in *Xenopus*. *Nature* 355, 6496652.
- Yurewicz E. C., Sacco A. G., Subramanian M. G. 1987. Structural characterization of the Mr = 55,000 antigen (ZP3) of porcine oocyte zona pellucida. Purification and characterization

of alpha- and beta-glycoproteins following digestion of lactosaminoglycan with endo-beta-galactosidase. *Journal of Biological Chemistry* 262(2), 565670.

Zamboni L. 1970. Ultrastructure of mammalian oocytes and ova. *Biology of Reproduction* (Suppl.) 2: 48663.

Zhang X., Khimji I., Shao L., Safae H., Desai K., Keles H. O., Demirci, U. 2012. Nanoliter droplet vitrification for oocyte cryopreservation. *Nanomedicine*, 7(4), 5536564.

Zhu, X. Y., Hang, G., Xin, N. 2011. Hydrogen sulfide in the endocrine and reproductive systems. *Expert Review of Clinical Pharmacology*. 76-81.