

Česká zemědělská univerzita v Praze

Fakulta agrobiologie, potravinových a přírodních zdrojů

Katedra veterinárních disciplín



Expres mRNA pro kalcineurin během růstové fáze oocyту prasete

Diplomová práce

Autor práce: Bc. Karel Čapek

Vedoucí práce: doc. Ing. Eva Chmelíková, PhD

© 2014 ČZU v Praze

Čestné prohlášení

Prohlašuji, že svou diplomovou práci „Expresce mRNA pro kalcineurin během růstové fáze oocyty prasete“ jsem vypracoval 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 autor uvedené diplomové práce dále prohlašuji, že jsem v souvislosti s jejím vytvořením neporušil autorská práva třetích osob.

V Praze dne 10.4.2014

Poděkování

Chtěl bych touto cestou poděkovat vedoucí diplomové práce doc. Ing. Evě Chmelíkové, Ph.D. za odborné vedení, podnětné rady, čas strávený konzultacemi a její trpělivost.

Exprese mRNA pro kalcineurin během růstové fáze oocyty prasete

Souhrn

Práce potvrdila výskyt fosfatázy 2B, kalcineurinu, v oocyty prasete a jeho přilehlých kumulárních buňkách během růstové fáze. V prasečím oocyty byla detekována jak mRNA pro kalcineurin, tak vlastní kalcineurin protein ve dvou podjednotkách A a B. mRNA pro kalcineurin jsme našli ve všech analyzovaných skupinách rostoucích oocytů, v oocyttech meioticky nekompetencních o velikosti 80-89 μm a 90-99 μm , v oocyttech s částečnou meiotickou kompetencí o velikosti 100-110 μm , i v oocyttech na konci jejich růstové fáze s plnou meiotickou kompetencí o velikosti 120 μm , ve stádiu zárodečného vřčku.

Zatímco mRNA pro jednotku A kalcineurinu byla nalezena v izoformách β a γ , a to jak v oocyttech, tak i v kumulárních buňkách, mRNA pro podjednotku A v izoformě α nalezena nebyla. mRNA pro jednotku B byla v oocyttech prokázána pouze v izoformě B2 na rozdíl od kumulárních buněk, v nichž byla prokázána jak izoforma B2 vyskytující se v oocyttech, tak také izoforma B1 specifická pouze pro okolní buňky obklopující oocyt.

V oocyttech na konci růstové periody, ve stádiu zárodečného vřčku, i kumulárních buňkách z nich získaných, byl detekován také vlastní kalcineurin protein. Detekována byla jak katalytická podjednotka A, tak také jednotka regulační B. Změny v expresi jednotlivých izoform kalcineurinu mohou souviset s jeho rolí během růstové fáze a procesu získu meiotické kompetence. V dalších studiích bude třeba zaměřit se na konkrétní specifikaci jeho role v těchto procesech a také na mapování jeho významu pro zrání a aktivaci oocyty.

Klíčová slova: Prase, oocyt, fáze růstu, mRNA, kalcineurin, katalytická podjednotka A, regulační podjednotka B, izoformy.

Calcineurin mRNA expression during the growth phase of porcine oocyte

Summary

The work confirmed the presence of phosphatase 2B, calcineurin, in the pig oocyte and its surrounding cumulus cells during the growth phase. mRNA and also calcineurin protein in two subunits A and B were detected in porcine oocyte. The mRNA for calcineurin was found in all analyzed groups of growing oocytes, in meiotically incompetent oocytes of 80-89 μm and 90-99 μm , in oocytes of partial meiotic competence with 100-110 μm in diameter and also in oocytes with the diameter of 120 μm with fully developed meiotic competence in germinal vesicle stage.

While mRNA for A calcineurin subunit was found in cumulus cells and oocytes in β and γ isoforms, mRNA for subunit A α isoform was not detected in oocytes. mRNA for B subunit was detected in oocytes only in B2 isoform, both isoforms of B subunit were detected in cumulus cells.

Also protein was detected in oocytes at the end of growth period at the germinal vesicle stage and their surrounding cumulus cells. We detected both subunits, catalytic subunit A and also regulatory subunit B. Changes in isoforms' expression during growth period could be in relationship with the meiotic competence acquisition. In the next experiments it will be necessary to study the role of calcineurin in these processes and also to study the role of calcineurin phosphatase in the process of meiotic maturation and activation.

Keywords: Pig, oocyte growth phase, mRNA, calcineurin catalytic subunit A, regulatory subunit B, isoform

Obsah

1. Úvod	7
2. Cíl práce	8
3. Literární rešerše	9
3.1 Oogeneze a folikulogeneze	9
3.1.1 Fáze množení.....	9
3.1.2 Fáze růstu	11
3.1.3 Fáze zrání	14
3.1.4 Vývoj folikulu	16
3.1.5 Regulační faktory meiotického zrání	18
3.2 Kalcineurin.....	25
4. Materiály a metodika	27
4.1 Získávání a kultivace oocytů.....	27
4.2 Stanovení mRNA metodou RT - PCR	28
4.3 Analýza exprese proteinů metodou Western blotting	31
5. Experimentální schéma	35
5.1 Experiment 1: Ověření meiotické kompetence rostoucích oocytů v daných laboratorních a kultivačních podmínkách	35
5.2 Experiment 2: Stanovení exprese mRNA jednotlivých izoforem kalcineurinu v oocytech prasete pomocí RT PCR metody.....	35
5.3 Experiment 3: Detekce podjednotek proteinu kalcineurinu v oocytech metodou Western blot	36
5.4 Statistické vyhodnocení	36
6. Výsledky	37
6.1 Ověření meiotické kompetence oocytů	37
6.2 Analýza mRNA kalcineurinu metodou RT – PCR	38
6.3 Analýza proteinových podjednotek kalcineurinu metodou Western blot.....	39
7. Diskuse	42
8. Závěr	44
9. Literatura	45

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, objevuje se mnoho překážek souvisejících mimo jiné s nedostatkem kvalitních dozrálých oocytů, které jsou kompetentní dokončit meiotické zrání. Využití prasečích oocytů pro biotechnologie ztěžuje zejména nedostatek informací o mechanismech, které ovlivňují proces nabývání meiotické kompetence během růstové fáze oogeneze. Na regulaci zisku meiotické kompetence a růstové fázi se podílí řada faktorů, mezi které patří například některé cyklické molekuly, plyny, či kinázy anebo fosfatázy. Za důležitou fosfatázu může být při regulaci signálních drah oocytů považována fosfatáza 2B, která se účastní regulace meiotického zrání oocytů mouchy rodu *Drosophila* a žáby rodu *Xenopus*. Cílem této diplomové práce bylo zjistit, zda je tato fosfatáza zapojena také do růstové fáze a procesu zisku meiotické kompetence oocytu prasete.

2. Cíl práce

Cílem diplomové práce bylo ověření hypotézy, podle které během růstové fáze oocyty prasete dochází k syntéze mRNA pro fosfatázu 2B, kalcineurin a je rovněž exprimován vlastní protein. Tato hypotéza byla potvrzena na základě sledování exprese mRNA pomocí RT-PCR metody a metody Western blotting, která umožňuje sledování exprese proteinů.

3. Literární rešerše

3.1 Oogeneze a folikulogeneze

Oogeneze je proces vývoje oocytů, samičích pohlavních buněk. Tento proces lze rozdělit na fázi množení, růstu a meiotického zrání. K dokončení meiózy dochází pouze v případě oplození nebo partenogenetickou aktivací (Nussbaum *et al.*, 2004).

Vývoj oocyty je doprovázen také změnami na úrovni folikulů, které jsou souhrnně označovány jako folikulogeneze. Proces folikulogeneze se vyznačuje množением vrstev granulóznic buněk a dalšími morfologickými změnami, které jsou řízeny gonadotropiny a změnami uvnitř vaječnic. Svůj počátek má již v prenatálním období. Probíhá současně s vývojem oocyty až do ovulace. Na základě morfologického hodnocení je folikul hodnocen jako primordiální folikul, rostoucí folikul, preantrální folikul až po antrální Graafův folikul, který zakončuje vývoj folikulu ovulací (Wartenberg, 1990).

3.1.1 Fáze množení

Zárodečné kmenové buňky, z nichž vznikají savčí oocyty, jsou extragonadálního původu. Vznikají v oblasti kaudální části primitivního proužku, odtud migrují podél epitelu *proctodea*, následuje pohyb mesenteriem a vstup do oblasti gonadální lišty. Ta se stává základem pro vaječnic (Chawengsaksophak *et al.*, 2011). Po dosažení cíle ztrácejí kmenové buňky svou schopnost pohybu a stávají se z nich rychle se mitoticky dělicí oogonie (Wassarman, 1988). Oogonie zaplňují povrchové okrajové vrstvy vaječnic a zahajují mnohokrát opakované mitotické množení. U prasete začíná mitotická aktivita oogonií kolem třináctého dne života embrya a končí až 7 dní po porodu. Po padesáti dnech od oplození může počet oogonií stoupnout až na 1 100 000 (Hunter, 2000).

Oogonie komunikuje s okolním prostředím pomocí mezibuněčných můstků, gap junctions, jejichž přechodná funkce zaniká s ukončením cytokineze (Shultz, 1985).

Oogonie ve stádiu interfáze mají pravidelné jádro s rozptýleným fibrilogramulárním materiálem a výraznými jadérky. Mitotické oogonie naopak vykazují hustý nepravidelný chromatin (Baker, 1967).

Na konci fáze množení dochází k zahájení meiózy. V profázi prvního meiotického zrání je zárodečná buňka označována již jako oocyt. Profáze je rozdělena do několika po sobě jdoucích kroků. Nejprve se mitochondrie přikládají těsně k jadernému obalu a vajíčko, již ve formě oocyty, prochází fází *leptotene*. Vytváří se charakteristický „*leptotenní buket*“, který

vzniká kondenzací chromozomů a upnutím telomer k jaderné membráně v místě upínacích plotének (Vacek, 2006; Sherthan, 2007).

Následující stádium *zygotene* se vyznačuje tvorbou synaptického komplexu. Chromozomy se nadále zkracují, začínají se párovat a vytvářet bivalenty, v nichž jsou homologní chromatinová vlákna spojena dvěma laterálními a jedním centrálním elementem výše uvedeného synaptického komplexu (Heting, 1996).

Také v dalším stádiu, *pachytene*, pokračuje kondenzace a zkracování chromozomů. U každého chromozomu dojde k rozdělení do dvou sesterských chromatid. Každý bivalent obsahuje celkem čtyři chromatidy, vzniká tedy tetráda chromatid. Následuje překřížení nesesterských chromatid (crossing-over) s výměnou části genetického materiálu (rekombinace) (Wassarman, 1988).

Během *diplojene* jsou jednotlivé chromatidy uvolněny ze synaptického komplexu, zůstávají však nadále spojeny v tzv. chiasmatech, místech vzájemného překřížení. *Pozdní diplojene* je charakteristické pro přerušení profáze prvního meiotického bloku. Jádru oocyty, který dospěl až do této fáze, nazýváme zárodečným váčkem (Wassarman, 1988). Asi ve čtyřicátém dni po oplození dochází u prasat k odstartování meiózy I a třicet pět dní *post partum* jsou již všechny oocyty zastavené v *diplojením* stádiu meiotické profáze (Hunter, 2000).

Ještě nedávno platilo v reprodukční biologii dogma, podle kterého dochází k množení PGC pouze v prenatalním vývoji samic. Schopnost dalšího dělení poté ustává. Z toho vyplývá, že dospělé zárodečné buňky vznikají pouze z buněk, které nalzáme v embryonální fázi vývoje gonád (Wassarman *et* Albertini, 1988). Vědecký tým Johnatana Tilliho toto dogma před deseti lety zpochybnil. Autoři při svých pokusech zjistili v myších ovariích přítomnost buněk, které připomínají PGC. Představují tak buňky, které by mohly nahradit zanikající oocyty. Pro pokus byla ztráta původních oocytů vyvolána uměle, a to podáním chemoterapeutika busulfanu. Po vzájemném porovnání počtů zanikajících a zdravých oocytů samic myší různého věku bylo potvrzeno, že zjištěné počty oocytů nejsou schopny pokrýt ani reprodukční období samice. Dále byly publikovány výsledky označující jako možný zdroj oocytů kmenové buňky kostní dřeně. Eggan (2006) svými experimenty tuto teorii zpochybnil. Jiné týmy provedly pokusy, jež prokazují jako zdroj zárodečných buněk kůži prasete (Dyce *et al.*, 2006; Dyce *et* Li., 2006), či buňky pankreatu potkana (Danner *et al.*, 2007).

3.1.2 Fáze růstu

Mezi strukturální změny ve fázi růstu oocyty zahrnujeme změny týkající se uspořádání a velikosti buněčného jádra a jadérka organel, inkluzí, tělísek a granul v cytoplazmě, i silného extracelulárního obalu *zona pellucida*.

Jádro a jadérko

Jádro i nadále setrvává v první meiotické profázi přerušené ve stádiu *diktyotene*. V této fázi je jádro obklopené jadernou membránou označováno jako zárodečný váček. V růstové fázi dochází k výraznému zvětšení objemu jádra i jadérka oocyty. Mnohonásobně se zvyšuje objem nukleoplazmy a intenzivně vzrůstá počet jaderných tělísek. Také dochází k syntéze všech RNA, které jsou připraveny pro zdárné dokončení meiotického zrání, oplození a počáteční období embryonální fáze vývoje (Antonie, 1989). Jadérko nahrazuje původní rozptýlenou fibrilogramulární strukturu hustou, výhradně fibrilární hmotou (Wassarman, 1988).

Během růstové fáze oocyty jsou chromozomy vlivem vysoké transkripční aktivity rozptýleny ve formě euchromatinu. V závěru fáze růstu dochází k jejich shromažďování v okolí jadérka, kde postupně kondenzují a podstupují přeměnu na heterochromatin. Tato forma chromatinu již neumožňuje navázání transkripční jednotky a ukončuje období intenzivní transkripce (Wassarman, 1988).

Organely

Pro období růstu oocyty je charakteristické výrazné zvýšení počtu mitochondrií. Mitochondrie prasečích oocytů jsou nejčastěji kulovitého tvaru, nepřesahující velikost 0,8 μm . Ke konci růstové fáze mnohé prodělávají vakuolizaci, což snižuje jejich aktivitu. Jedná se o jistou formu uchování pro budoucí využití a zároveň o ochranu organismu před účinky volných kyslíkových radikálů vznikajících během energetického metabolismu mitochondrií (Norberg, 1972). Mitochondrie pozorované ve stádiu *diplojene* jsou často v úzkém kontaktu s endoplazmatickým retikulem (Wassarman, 1988).

Podobně jakou mitochondrií dochází také k dramatickému nárůstu počtu polyribosomů. Tento trend je vyvolán zvýšenou potřebou proteosyntézy (Wassarman, 1988).

Endoplazmatické retikulum (ER) vytváří v počáteční růstové fázi cisterny kolem jaderného obalu. Vzhledem k vyšším nárokům na látkovou syntézu se během růstu počet cisteren zvyšuje. Tento trend je ukončen vznikem perivitelinního prostoru, kdy se množství cisteren ER začíná snižovat (Fair et al., 1997). Některé cisterny přecházejí k periférii

cytoplasmy ve formě pohárkovitých struktur, jiné více komunikují s mitochondriemi (Osuchowska, 2006).

Ploché lamely a vakuoly Golgiho komplexu jsou klíčovou součástí procesu zpracování a transportu glykoproteinů vrstvy *zona pellucida*. Podílí se také na formování kortikálních granul (CG) a jejich exportu k periférii oocyty (Vassarman, 1988). V období růstu dochází ke značnému nárůstu struktur Golgiho komplexu a následnému rozpadu se separací na jednotky. Ty putují k *zona pellucida* ve formě vakuol s glykoproteiny, nebo jako budoucí kortikální granula (Gosden et al., 1997). Také Vassarman (1988) uvádí, že kortikální granula jsou přemístěna do subkortikálních oblastí rozšiřujícím se Golgiho komplexem. Význam kortikálních granul (CG) spočívá především v zamezení polyspermii. K tomu dojde vylitím obsahu CG do perivitelinního prostoru při procesu oplození.

V savčích oocytech se vyskytují v poměrně velkém množství inkluze glykogenu, či lipidů ve formě lipidových kapének. U prasat jsou velké lipidové kapénky (až 4 μm) označovány jako žlutkové inkluze. Ty byly pozorovány v blízkosti mitochondriálních skupinek (Osuchowska, 2006).

Zona pellucida se jako extracelulární obal oocyty začíná vytvářet již v počátečním období růstové fáze. Slouží k ochraně vajíček savců, podporuje reakci akrozómu a brání polyspermii (Vassarman, 2008). Je prvním zdokumentovaným případem amyloidu, který plní fyziologickou ochrannou funkci (Amyloidy většinou tvoří nerozpustné proteinové usazeniny s patologickým účinkem na organismus. Příkladem tohoto typu onemocnění je Alzheimerova choroba.) (Louros et al., 2013). U prasete nabývá síly 8,6 mikrometrů (Norberg, 1972). *Zona pellucida* u savců se skládá ze tří až čtyř glykoproteinů, ZP1, ZP2, ZP3, ZP4. Tyto proteiny mohou polymerovat za vzniku dlouhých vláken propojených společnou konstrukční jednotkou, známou jako doména ZP (Louros et al., 2013; Vassarman, 1988).

Biochemické změny ve fázi růstu oocyty

Z biochemického hlediska nabývá na významu v průběhu růstové fáze především již zmíněná intenzivní exprese RNA a proteinů. Z tohoto důvodu má rozhodující úlohu správné působení růstových faktorů. Neméně důležitá je funkce inhibičních faktorů, blokující předčasný vstup do zrací fáze a faktorů, které období růstu ve vhodném okamžiku ukončují. Oocyt primárního folikulu není schopen syntézy ribozomů v důsledku chybějící fibrilární složky jadérka. Tuto schopnost získává až ve fázi sekundárního oocyty, tedy v době, kdy jadérko nabývá fibrilogramulárního obsahu a dochází k nárůstu transkripční aktivity (Hyttel et al., 1999).

Rostoucí syntéza proteinů se týká především mitochondriálních proteinů a to do 2%, ribozomálních proteinů z 1,5%, glykoproteinů *zona pellucida* do 10%, histonů 0,3%, tubulinů alfa i beta do 2%, aktinu 1%, kalmodulinu 0,3%, laktát dehydrogenázy do 5% a dalších z biochemického hlediska nepostradatelných látek, jejichž dostatečná exprese slouží k zajištění zdárného vývoje oocyty i časného embryonálního vývoje (Wassarman, 1988).

Za rozhodující složku z hlediska vzniku sekundárního oocyty je považován růstový faktor GDF-9. Další růstový faktor BMP 15 je spojován především s expresí KL, růstem oocyty, proliferací granulózy a ovlivnění sekrece FSH (Zuccoti et al., 2011). Další faktory ovlivňující průběh růstu a zrání oocytů budou podrobněji popsány v kapitole 3.1.5.

Meiotická kompetence

Pojmem meiotická kompetence je označena schopnost oocyty znovuzahájit a také dokončit meiotické zrání. Této schopnosti oocyt nabývá během růstové fáze. Zisk meiotické kompetence je charakterizován dvěma kroky, které je kompetentní oocyt schopen uskutečnit. Prvním krokem je rozpad jaderné membrány zárodečného váčku s následným vstupem do metafáze I. Tento krok je ukazatelem pouze částečné meiotické kompetence a ještě nezaručuje schopnost ve vývoji pokračovat. Oocyty, které mají u myši velikost vnitřního průměru do 70 μm a u hospodářských zvířat 100-110 μm , jsou schopny v podmínkách *in vitro* zahájit kondenzaci chromatinu, rozpustit jadernou membránu, projít procesem rozpadu zárodečného váčku a dosáhnout metafáze prvního meiotického dělení, se nazývají částečně meioticky kompetentní (Schramm et Bavister, 1999). Dalším krokem, který je nezbytný pro plnou meiotickou kompetenci, je uskutečněný přechod z metafáze I do metafáze II (Morbeck et al., 1992).

U oocytů, které zcela postrádaly meiotickou kompetenci, tedy i schopnost rozpadu zárodečného váčku a vstupu do MI, byl zjištěn nedostatek exprimovaného cyklinu B (Blanco et al., 2011).

Dalším znakem meiotické kompetence, je kromě velikosti, uspořádání jaderného chromatinu. Chromatin z kondenzovaný do hustého prstence okolo jádra, považovat za jeden ze znaků meiotické kompetence (Wickramasinghe et al., 1991).

Také podle fosforylace centrozomu a délky mikrotubulů lze usuzovat na schopnost dokončení meiozy. Dlouhé mikrotubuly a nefosforylovaný centrozom značí neschopnost meiózu dokončit a naopak krátké mikrotubuly a fosforylovaný centrozom poukazují na meiotickou kompetenci oocyty (Albertini, 1992).

Motlík a Fulka (1986) zjistili korelaci mezi schopností shromažďovat a iniciovat klíčové signální molekuly zapojené do fáze růstu a zrání a meiotickou kompetencí.

3.1.3 Fáze zrání

Meiotické zrání představuje konečnou fázi vývoje oocyty a jeho transformaci v neoplozené vajíčko s haploidním počtem chromatid. Jedná se o přechod ze stádia *diplojene* profáze I do metafáze II (Motlík a Fulka, 1976; Wassarman, 1988). Při procesu zrání dochází k zásadním změnám především v oblasti jádra a oblasti cytoplazmy oocyty. U jaderného zrání závisí úspěšnost na správném rozdělení chromatinu. Cytoplazmatické zrání zahrnuje znovurozdělení organel a depozici mRNA a klíčových proteinů umožňujících transkripci (Ferreira et al., 2009).

Jaderné zrání

V průběhu procesu jaderného zrání dochází především k zásadní přestavbě a uspořádání chromatinu. Počátek této vývojové fáze je situován do ukončení stádia *diktotene*, kdy dochází k rozpadu zárodečného váčku, dále navazuje metafáze I a celý proces je završen v metafázi II, ve stádiu druhého meiotického bloku. Pokud došlo ke zdárnému průběhu zrání i v oblasti cytoplazmy (*tzv. vývojová kompetence*), měl by tou dobou být oocyt připravený k oplození a zdárnému ukončení meiotického dělení (Marteil et al., 2009).

Rozpad zárodečného váčku (Germinal vesicle break down, GVBD) je členěn do pěti stádií, která jsou seřazena podle intenzity kondenzace chromatinu a stupně rozpadu jaderného obalu. Pro počáteční stupeň GV0 je typické viditelné jádro i jaderná membrána. Dle Lucase et al. (2002) dochází v této době k nepatrnému vlnění membrány, které postupem času začíná nabývat na intenzitě. V GV1 fázi dochází k formaci kondenzovaného chromatinu do tvaru podkovy, či prstence (Tan et al., 2009). GV2 je charakterizována výskytem několika menších shluků chromatinu v blízkosti jaderné membrány. V GV3 pokračuje nárůst shluků chromatinu a vláken, které se rozptylují po celé nukleoplazmě. V GV4 fázi přestává být patrné jádro i jaderná membrána (Lucas et al., 2002). Přechod těmito fázemi trvá asi 16 – 18 hodin (Motlík et al., 1984).

Následuje formace chromozomů do metafáze I. K ukončení metafáze I dochází asi 16 – 18 hodin *in vivo* po 20 hodinách a *in vitro* přibližně po 6-8 hodinách (Motlík et al., 1984). Rozdělení a rozchod chromozomů v anafázi I pokračuje v telofázi I vydělením prvního pólového tělíska a oocyt tak nabývá haploidního počtu chromozomů (Eppig, 1991). Metafáze II *in vitro* nastává dle Motlíka a Fulky (1976) po 40 – 48 hodinách. V této době dochází k dalšímu

přerušeni vývoje a k opětovnému zahájení meiózy dochází až po penetraci spermií, nebo po partenogenetické aktivaci. U myši nastává metafáze I po 8 hodinách, metafáze II následuje po 18 hodinách (Wassarman, 1988).

Cytoplazmatické zrání

Proces cytoplazmatického zrání se týká změn organizace organel, filament a mikrotubulů cytoskeletu i molekulární složky oocyty (Ferreira *et al.*, 2009).

Z organel prochází výraznými změnami Golgiho aparát, ribozomy, mitochondrie a endoplazmatické retikulum. Změny jsou podmíněny dynamikou složek cytoskeletu, které jim umožňují řízený pohyb v cytoplazmě (Ferreira *et al.*, 2009).

Pohyb mitochondrií je spojen s aktuální potřebou energie ve formě ATP, a proto se na počátku zrací fáze shlukují v prstencové formě okolo zárodečného váčku. Po ukončení metafáze I dochází k dočasnému rozptýlení a v metafázi II je opět zaznamenáno soustředění mitochondrií kolem chromatinu (Ferreira *et al.*, 2009). Marteil *et al.* (2009) zmiňuje, že tvorba ATP ztrácí po vydělení prvního pólového tělíska na své původní intenzitě. Příčinou může být vznik volných radikálů při mitochondriální syntéze ATP, jejichž zvýšené množství by mohlo být letální pro počátek embryonálního stádia plodu.

Endoplazmatické retikulum (ER) leží v růstové fázi oocytů blízko centrální oblasti cytoplazmy (Jaffe a Terasaki, 1994). Je depozitem kationtů vápníku, které jsou uvolněny při penetraci oocyty spermií. Zahajují tak kortikální reakci, která zabraňuje vzniku polyspermie. Proto se ER v procesu zrání přemísťuje v podobě kortikálních klastrů na periferii oocyty (FitzHarris *et al.*, 2003).

Také cisterny Golgiho komplexu jsou v období zárodečného váčku soustředěny spíše v okolí jádra. V průběhu zrání i zde dochází k distribuci do blízkosti plazmatické membrány v podobě kortikálních granul (Payene a Schatten, 2003).

Kortikální granula mají zásadní úlohu v mechanismu, který zabraňuje polyspermii během oplození. Proto jsou v průběhu zrání přemístěny do korové oblasti oocyty. Ve zralém oocyty prasete jsou uloženy v podobě souvislé vrstvy těsně sousedící s oolemou (Marteil *et al.*, 2009). Wang *et al.* (1997) zaznamenal nárůst tvorby kortikálních granul v metafázi I. V průběhu metafáze II již ke zvýšení jejich počtu nedochází.

Základní zásoba energie pro vývoj oocyty je uložena ve formě tukových kapének. U koní a prasat byla pozorována změna v jejich distribuci v okolí meiotického vřeténka v MII

fázi. Vyšší schopnost zrání byla zjištěna u oocytů, u nichž k této polarizaci dochází (Marteil *et al.*, 2009).

Na dynamice procesu zrání se podílejí prvky cytoskeletu, a to mikrotubuly a mikrofilamenta. Význam mikrotubulů souvisí především s rozdělením větších organel a chromozomů meiotického vřeténka. Mikrofilamenta, vzhledem ke své jemnější struktuře, slouží k upřesnění polohy chromozomů a přerozdělení menších organel, jako jsou kortikální granula a cisterny endoplazmatického retikula (Marteil *et al.*, 2009). K jejich distribuci dochází v periferní oblasti oocytu v době mezi rozpadem zárodečného váčku a anafází I (Ferreira *et al.*, 2009). Mikrotubuly meiotického vřeténka jsou prasete pozorovatelné až při rozpadu zárodečného váčku. Vycházejí z centrozomu a jsou zakončené kinetochory v místě napojení na centromeru příslušného chromozomu (Marteil *et al.*, 2009). Vytváří tak vřeténko soudkovitého tvaru. Vzhledem k diploidnímu počtu chromozomů, nabývá meiotické vřeténko v metafázi I větších rozměrů než v metafázi II, kdy je počet chromozomů již haploidní. V anafázi dochází k oddělení chromozomů a prodlužování vřeténka. V telofázi I je jedna sada chromozomů vytlačena působením mikrotubulů mimo buňky za vzniku prvního pólového tělíska. Poté nastává *interkinéze*. Tak je nazývána doba přechodu mezi meiózou I a meiózou II. Interfáze je vynechána, chromatin opět kondenzuje a prvky meiotického vřeténka meiózy I jsou degradovány (Ferreira *et al.*, 2009). Marteil *et al.* (2009) zachytil odlišnosti ve vývoji oocytu prasete. Mikrotubuly nevycházejí z centromer, ale přímo z kůry oocytu a k jejich degradaci dochází až na konci fáze zrání. Ve fázi MII oocyt setrvává do doby aktivace penetrující spermií nebo partenogenetickým činitelem. Pokud k tomu nedojde, oocyt zaniká. (Sun *et al.*, 2003).

3.1.4 Vývoj folikulu

Vývoj a růst oocytů ve vaječníku je úzce spjat s vývojem folikulů, které jsou tvořeny buňkami obklopujícími oocyt a provází jej až k ovulační fázi. V počátečním období prvního meiotického bloku je kolem oocytu vytvořena jedna vrstva somatických, pregranulózniích buněk plochého tvaru (Picton *et al.*, 1998), které později nabývají tvar kubický (Bielanska-Osuchowska, 2006). Utváření primárního folikulu je řízeno faktory, které růst stimulují, nebo naopak inhibují. Příkladem inhibičních faktorů jsou proteiny retinoblast a onkogen myc exprimované v jadérku (Picton *et al.*, 1998), dále TNF α (Tumour Necrosis Factor Alpha) (Glister *et al.*, 2014). Růst stimuluje faktor je například WT-1 (Wilms Tumor Protein), SF-1 (Steroidogenic Factor) (Logan *et al.*, 2003), nebo bFGF (Basic Fibroblast Growth Factor) (Wang *et al.*, 2014).

Růstová fáze je zahájena a udržována působením gonadotropinů a vstupuje do ní vždy několik folikulů v průběhu ovariálních cyklů (Cortvrindt *et al.*, 1997). Vyznačuje se růstem oocyty, tvorbou a diferenciací folikulárních vrstev a vytvořením antrální dutiny s folikulární tekutinou (Norberg, 1972).

Dojde-li k tvorbě více vrstev granulózy okolo oocyty, hovoříme již o preantrálním, neboli sekundárním folikulu. Pro toto období je charakteristická intenzivní proliferace granulózních buněk a diferenciací obalu folikulu na vrstvu vnější (*theca folliculi externa*) a vnitřní (*theca folliculi interna*). U prasete dorůstá folikul do velikosti 300 μm a vnitřní průměr dorostlého oocyty, tj. bez *zona pellucida*, nabývá 120 μm (Van den Hurk *et al.*, 1997). Úlohou granulózních buněk je především výživa oocyty během růstu (Buccione *et al.*, 1990). Podmínkou dalšího vývoje folikulu i oocyty je dostupnost pro regulační gonadotropiny a jiné endokrinní faktory. Dochází proto k rozvoji krevních kapilár, které prorůstají mezi vnějším a vnitřním obalem folikulu (van den Hurk *et al.*, 2000). U sekundárního folikulu zatím nedochází k produkci estrogenů, protože ještě není schopen exprese aromatázy (enzym který transformuje androgeny na estrogeny). Růst krevních kapilár připravuje folikul i oocyt na další řízení procesu gonadotropními hormony. Na buňkách granulózy se objevují receptory pro estrogeny a FSH. Buňky vnitřního obalu folikulu dávají vznik receptorům pro LH. Dochází tak k přípravě na vznik folikulu, který je již cele závislý na hormonálním působení. V tomto folikulu jsou produkovány androgeny buňkami *theca folliculi interna*, které podléhají hormonálnímu řízení LH. Androgeny difundují do buněk granulózy, kde jsou transformovány na estrogeny. Regulaci tohoto procesu řídí hormon FSH. Vznikající estrogeny stimulují proliferaci granulózních buněk a dávají podnět k sekreci antrální tekutiny. Spolu s narůstajícím množstvím antrální tekutiny se uvnitř folikulu vytváří dutina, zvaná antrum (Wasserman, 1988).

Buňky antrálního folikulu rozdělujeme do dvou skupin, na buňky *corona radiata* a na buňky murální. *Corona radiata* lemuje oocyt a vytváří s ním mezibuněčné komunikační spoje typu gap junction. Murální buňky pokrývají folikulární stěnu. Vlivem intenzivního růstu folikulu vajíčko opouští centrální pozici uprostřed folikulu, posunuje se ke straně a vzniká tzv. vejconosný hrbolek, *cumulus oophorus* (Eppig, 2001). Rostoucí množství folikulární tekutiny dává vznik velkému Graafovu folikulu, který je již viditelný na povrchu vaječníku a je schopen ovulovat (Wasserman, 1988). Vliv na výběr folikulů, které budou ovulovat máu prasnic zejména žluté tělísko (Knox, 2005).

3.1.5 Regulační faktory meiotického zrání

Cyklické nukleotidy

Cyklický adenosin monofosfát (cAMP) patří mezi významné regulační faktory, sloužící mimo jiné k přenosu extracelulárních signálů ovlivňujících chování buňky. Signální dráha začíná navázáním extracelulární signální molekuly na membránový receptor spojený s G-proteinem. Aktivovaná alfa-podjednotka G proteinu aktivuje enzym adenylátcyklázu (AC), který syntetizuje cAMP z adenosin trifosfátu (ATP) (Alberts *et al.*, 1998). K této reakci dochází odstraněním difosfátové skupiny z ATP a adicí zbývajících fosfátů k sacharidové skupině molekuly. Odbourání cAMP je realizováno enzymem cAMP-fosfodiesterázou. Ta štěpí cAMP na AMP. Ke změnám koncentrace cAMP může dojít během několika sekund při výrazné amplifikaci signálu. Cílové buňky odpovídají na změny koncentrace cAMP odlišně. Pomalejší cestou, která trvá až několik hodin může dojít pomocí cAMP k fosforylaci některých regulačních proteinů, které aktivují genovou transkripci (Alberts *et al.*, 1998). cAMP přenáší signál nejčastěji aktivací enzymu proteinkinázy A (PKA) (Alberts *et al.*, 1998). Cho (1974) uvádí, že cAMP má významný vliv na udržení prvního meiotického bloku. PKA inhibicí exprese genu *c-mos* znemožňuje průběh signální dráhy MAPK, která má významnou roli při rozpadu zárodečného váčku. V opačném případě, tedy při poklesu koncentrace cAMP a následně i PKA, dojde k fosforylaci Cdc25 a k aktivaci komplexu MPF (Mehlmann, 2005). Sela-Abramovich *et al.* (2006) uvádí, že na zvýšení cAMP v oocyty se podílejí také kumulární buňky transportem cAMP přes spoje gap junction.

Cyklický GMP působí zvýšením činnosti fosfodiesterázy (PDE) snížením koncentrace cAMP oocyty. K syntéze cGMP dochází enzymem guanylátcyklázou odštěpením difosfátové skupiny a napojením zbývajících fosfátové skupiny na cukerný zbytek. (Alberts *et al.*, 1988).

OMI

Produkcí tohoto peptidu zajišťují folikulární buňky. Do oocyty je signál přenášen přes spoje gap junction. Působí inhibicí meiotického zrání a spolupodílí se na udržení bloku v profázi meiózy I (Wassarman, 1998). OMI je nízkomolekulární peptid, který je produkován folikulárními buňkami. Tento peptid můžeme nalézt ve folikulární tekutině mnoha savců. Jeho molekulová hmotnost je kolem 1-2 kDa. OMI blokuje meiotické zrání oocytů a udržuje je v diktotenním stádiu profáze I. Jeho inhibiční účinek pravděpodobně působí na oocyty nepřímo a ovlivňuje je přes kumulární buňky a jejich gap junction. Jeho

hladina je snížena během doby předovulačního zrání folikulu. Je pravděpodobné, že inhibiční účinek OMI je potencován pomocí cAMP (Wassarman, 1988).

Není známo, zda cAMP, či OMI je do oocyty přenesen jako inhibiční signál. Tato inhibice není druhově specifická, je možné využít OMI z prasečího oocyty na inhibici meiózy oocyty lidského. U prasat, či potkanů bylo prokázáno, že OMI inhibuje meiózu pouze oocytů s kumulem. OMI je pouze jedním faktorů, podílejících se na zastavení meiotického bloku. Je možné, že LH vyvolává znovuzahájení meiózy prostřednictvím odstranění inhibičního signálu narušením průchodu OMI přes gap junction, nebo že blokuje jeho další tvorbu (Tsafiriri *et al.*, 1982).

Protein kináza C (PKC)

PKC fosforylují serinové a threoninové zbytky proteinových substrátů, uplatňují se jako přenašeči signálů a rovněž se podílejí na řízení buněčného cyklu. Aktivaci PKC působí vápníkové ionty a diacylglyceroly (DAG). Podle způsobu aktivace rozdělujeme PKC na konvenční, nové a atypické. Mezi konvenční PKC patří izoformy PKC- α , PKC- β I, PKC- β II, PKC- γ . K aktivaci těchto izotopů dochází prostřednictvím vápníkových iontů a diacylglyceroly DAG. Mezi nové PKC patří izoformy PKC- δ , PKC- ϵ , PKC- η , PKC- μ , PKC- θ . Jejich aktivace je závislá pouze na DAG. Atypické PKC zastupují izoformy PKC- ζ , PKC- λ , PKC- τ . Aktivace těchto izotopů není závislá na iontech vápníku, ani na DAG (Petr *et al.*, 2007).

Po aktivaci se PKC váže na membránové fosfolipidy nebo na receptory, které jsou lokalizovány v subcelulárních kompartmentech. Je-li PKC aktivována v kumulárních buňkách, dochází ke znovuzahájení meiózy. Pokud však dochází k aktivaci PKC v oocyttech, je pokračování meiózy inhibováno. Účinek závisí na tom, která z izoform je aktivována. U oocyty se stimulační, či inhibiční účinky PKC mění dle aktuální fáze zrání (Viveiros *et al.*, 2003). V oocyttech prasat navodí aktivace PKC inhibici MAPK, čímž zabraňuje GVBD. Pokles aktivity PKC je tedy nezbytný pro výstup z prvního meiotického bloku (Fan *et al.*, 2002).

Vápník

Nejběžnějším druhým poslem jsou ionty vápníku, které se účastní řady signálních drah jak v somatických buňkách, tak v gametách. Významnou roli hrají i ve fázi růstu a v regulaci meiotického zrání (Miyazaki, 1991).

Funkce signálních drah prostřednictvím vápníku je umožněna nízkou koncentrací Ca^{2+} iontů v cytosolu. Tento stav je udržován permanentním odčerpáváním iontů Ca^{2+} membránovými pumpami do extracelulárního prostoru, do endoplazmatického retikula, či jiných organel, které mohou sloužit jako zásobárny vápníku (Alberts et al., 1998).

V oocytech prasete je vápník shromažďován zejména v mitochondriích, vakuolách, žloutkových granulech a karyoplazmě (Petr et al., 2001).

Při výsledném strmém elektrochemickém gradientu iontů vápníku stačí přechodné otevření Ca^{2+} kanálů k okamžitému vylití iontů do cytosolu pro zahájení signalizace prostřednictvím Ca^{2+} (Alberts et al., 1998).

Popsány byly dvě základní dráhy. Dráha vedoucí přes inositoltrifosfátové IP_3 receptory a dráha využívající ryanodinové receptory RyR.

Molekula IP_3 vzniká odštěpením z membránového fosfolipidu činností fosfolipázy C, která byla aktivována přenosem extracelulárního signálu. Dochází k difuzi IP_3 , napojení na receptory ER, otevření kanálů a úniku molekul vápníku do cytosolu (Berridge, 1993).

Ryanodinové-RyR-receptory se nacházejí na membráně endoplazmatického retikula (Meissner, 1994). K navýšení koncentrace vápníkových kationtů v periférii cytosolu dochází u savčích oocytů bezprostředně po oplození. Schopnost uvolnění vápníku z vnitrobuněčných zásob je na počátku meiotického zrání poměrně malá. Vyvíjí se postupně během zrání a při zastavení meiózy v metafázi II dosahuje maxima. Je nezbytnou složkou pro zahájení vývoje embrya po oplození oocyty (Carroll *et al.*, 1994; Mehlmann *et al.*, 1994). Vápenaté ionty ovlivňují fázi zrání oocytů i vývoj po oplození. Zásadní úlohu mají především v rané fázi iniciace výstupu z meiotického bloku profáze I. Tím se účastní znovuzahájení meiotického zrání (Kaufman *et al.*, 1993; Carroll *et al.*, 1994) a to jako řídicí prvek výstupu z metafáze meiozy I. Při zablokování vápníkových kanálů během kultivace prasečích oocytů došlo k zastavení meiotického zrání (Kaufman *et al.*, 1993; Rozinek *et al.*, 2003). Účinky vápníku jsou většinou nepřímé, zprostředkovány převodními proteiny. Příkladem je kalmmodulin (CaM). Po navázání vápníku (4 vazebná místa) dojde ke změně konformace se získáním schopnosti vazby k cílovým proteinům. Tato vazba mění jejich aktivitu (Valeyev *et al.*, 2008). Ca/CaM dependentní dráha pravděpodobně ovlivňuje aktivitu MPF a MAPK s účinkem na formaci dělicího vřeténka a separaci prvního pólového tělíska. Uvolnění vápníku z depozit, včetně jeho pulzace při aktivaci a oplození, má nezastupitelnou úlohu (Fan *et al.*, 2003).

MPF

Komplex cyklin dependentních kináz, který reguluje vstup do M-fáze (MPF), patří mezi univerzální regulační faktory buněčného dělení (Stojkovic et al., 1999). Vysoká aktivita MPF udržuje oocyty zastavené v metafázi II (Nurse, 1990). Poprvé byla činnost MPF popsána na oocytech skokana levhartího *ranapipines* (Masui a Market, 1971).

MPF je heterodimer složený ze dvou podjednotek. Katalytická podjednotka serin/threonin protein kináza p34^{cdc2} je také nazývána jako CDK 1 (cyclin dependent kinase 1). Regulační podjednotkou je cyklin B (Gautier, 1998; Gautier et al., 1989). Koncentrace katalytických podjednotek se v průběhu meiotických cyklů nemění, zatímco koncentrace regulačních podjednotek zaznamenává výraznou degradaci ubiquitin-dependentním systémem v období mezi metafází I a metafází II. Jedná se o proteolytické komplexy, v nichž jsou označené proteiny hydrolyzovány protézami. Molekuly ubiquitinu se naváží na regulační podjednotku. Označí tak cyklin pro proteazóm, který protein degraduje pomocí enzymů, jež jsou jeho součástí (Alberts et al., 1998).

K aktivaci MPF je nutné nejen spojení obou podjednotek, ale zároveň fosforylace dvou aktivačních a defosforylace jednoho inhibičního centra na cdc2 (Jones, 2004). Z tohoto důvodu může být MPF během růstové fáze oocyty hromádn v neaktivní jako pre-MPF a to díky inhibiční fosforylaci podjednotky p34^{cdc2} inhibiční kinázou Myt1 (Gautier et al., 1991; Touny a Banerjee, 2006). Aktivaci MPF pak působí aktivační defosforylaci fosfatáza Cdc25. Rovnovážný stav mezi aktivitami Myt 1 a Cdc25 je tedy podmínkou pro úspěšný průběh meiotického zrání (Palmer et al., 1998).

Ke zvyšování aktivity MPF dochází při rozpadu zárodečného váčku, vrcholu je dosaženo v metafázi I. Po té následuje pokles vlivem degradace cyklinu B a k opětovnému navýšení dochází v období metafáze II (Kikuchi et al., 1995). Měření aktivity MPF je umožněno sledováním nárůstu, či poklesu množství exogenního histonu H1. Nárůst aktivity kinázy H1 koresponduje s defosforylací p34^{cdc2} (Arion et al., 1988). Aktivita MPF je podmíněna zvýšenou syntézou proteinů a jejich fosforylací (Fulka et al., 1991). S postupem k rozpadu zárodečného váčku dochází ke zvyšování aktivity MPF a tím i fosforylaci intracelulárních proteinů (Taieb et al., 1997).

Součástí MPF je Greatwall kináza (GWL). Kináza Greatwall je nezbytná pro vstup a udržení M fáze. Negativně reguluje fosfatázy inhibující aktivaci Cdc25 a tím i vstup do M-fáze. Účastní se tak autoregulační smyčky, která řídí aktivitu Cdc25, do níž patří kromě GWL také MPF, Polo kinázy a MAPK. Úloha GWL je ve vyvolání prvních kroků ve fosforylaci

a aktivaci Cdc25. V pozdější M-fázi je fosforylace Cdc25 výsledkem činnosti MPF. Aktivita GWL je nezávislá na přítomnosti progesteronu a není závislá ani na Mos/MAPK dráze (Zaho et al., 2008).

MPF je nezbytný pro zajištění správného průběhu meiotického zrání. Fosforylací specifických proteinů působí kondenzaci chromozomů. Fosforyluje proteiny jaderné laminy a zajišťuje tak rozpad jaderné membrány. Podílí se na vytvoření mitotického vřeténka tak, že fosforyluje proteiny asociované s mikrotubuly a působí změnu jejich vlastností (Alberts *et al.*, 1998).

MAPK

Protein kináza, která aktivuje mitogen (MAPK), náleží do skupiny serin/threonin kináz a účastní se důležité vnitrobuněčné signální dráhy (Ferrell *et al.*, 1991).

Kinázová kaskáda MAPK se účastní regulace zrání oocytů (Fan a Sun, 2004). K fosforylaci dochází podobně jakou MPF na treoninových a serinových zbytcích (Verlhac et al., 1993). Způsob aktivace MAPK je druhově specifický (Verlhac *et al.*, 1993). V oocytech prasete je ve fázi G2 pozorována pouze v neaktivní formě v cytoplazmě. V době přechodu G2/M putuje část MAPK do GV před GVBD. Injekce MAP kinázy do zárodečného vaku jeho rozpad urychlila, na rozdíl od aplikace do cytoplazmy, kdy nedošlo k žádné změně. Přenos signálu do jádra má tedy významný vliv na chování jaderné membrány (Stojkovic et al., 1999).

Na význam MAPK pro vývoj oocytu prasete existuje více odlišných názorů. Inoue *et al.*, (1995) tvrdí, že aktivace MAPK je možná až po aktivaci MPF. Na rozdíl od něj dospěl Lee *et al.*, (2000) k názoru, že k aktivaci MAPK dochází již při GVBD vlivem účinku MPF. V roce 1998 Ioune *et al.*, (1998) přehodnotil svůj názor a dospěl k závěru, že k aktivaci MAPK dochází ještě před aktivací MPF.

Fan a Sun (2004) uvádí, že základní látkou aktivující MAPK oocytu je p90rsk. Stojkovic *et al.* (1999) provedl aplikaci mRNA c-mos do nezralých oocytů prasete a po šesti hodinách od aplikace zachytil aktivaci signální dráhy MAPK. Na druhou stranu Ohashi *et al.*, (2003) nezaznamenaly žádný vliv nedostatku MAPK na úspěšný start meiotického zrání oocytu prasete.

CSF

Cytostatický faktor sestává z několika molekul. Dosud byly popsány enzymy Mos (Colledge *et al.*, 1994), Cdk2 (Gabrieli *et al.* 1993), Emi (Tunquist, 2003). Význam tohoto komplexu, vyskytujícího se v cytoplazmě oocytů během ovulace, je v zabránění vývoje z metafáze II do anafáze II (Masui a Market, 1971). Toho je dosaženo inhibicí degradace cyklinu B potřebného pro aktivitu MPF. K této inhibici, podporující stabilizaci MPF, slouží s největší pravděpodobností Mos/MAP kináza jako součást CSF (Stojkovic *et al.*, 1999).

Degradace proteinů CSF je navozena činností komplexu APC/C ubikvitin dependentní dráhou v proteasomech 26S. Anafázi podporující enzymatický komplex (APC) má rozhodující úlohu v přechodu mezi metafází a anafází především tím, že podporuje rozestup chromozomů do dceřiných buněk. Zároveň řídí označení proteinů CSF ubikvitinem. Tento malý protein, sloužící k označení větších proteinů určených k likvidaci, je rozpoznán v proteasomech (Alberts *et al.*, 1998).

Po uskutečněné degradaci CSF přechází oocyt do anafáze II a pokračuje v meiotickém vývoji (Jones, 2005).

Oxid dusnatý (NO)

Oxid dusnatý patří mezi plynné signální molekuly. Díky schopnosti regulace jak intracelulárních, tak extracelulárních procesů, dochází k využití NO v mnoha fyziologických pochodech. Oxid dusnatý působí ve tkáních jako lokální mediátor. Pokud se NO nachází v organismu v nízkých koncentracích, má nepostradatelnou funkci jako vnitrobuněčný posel. Vysoká koncentrace však může způsobit v oocytu nevratné škody svými deriváty (Bu *et al.*, 2003).

Rozpuštěný hydrofobní NO snadno difunduje do okolních buněk. Vzhledem ke krátkému poločasu rozpadu (5-10s, vlivem reakce s kyslíkem a vodou na dusičnany a dusitany), je jeho působení jen lokální. Cílem bývá většinou enzym guanylátcykláza, katalyzující tvorbu cGMP, která aktivuje krátkou vnitrobuněčnou dráhu k cílovému proteinu (Alberts *et al.*, 1998).

V oblasti reprodukce se účastní regulace mnoha procesů. Příkladem je regulace aktivity pohlavních hormonů, prokrvení pohlavních orgánů, vývoj folikulů, oocytu, načasování ovulace, nidace embrya i spermatogenezeu samců (Jablonka-Shariff a Olson, 2000).

Existence NOS byla poprvé prokázána v roce 1989. Od té doby byly izolovány tři izoformy NOS.

nNOS, nazývaná, jako nervová NO-syntáza vděčí svému názvu uskutečnění prvního nálezu v nervové tkáni. Na rozdíl od ostatních izoform však nebyla nalezena ve vaječnicích savců (Janssens *et al.*, 1992).

iNOS – indukovatelná NO-syntáza je také produkována řadou buněk, včetně folikulů savců. Je schopná dlouhodobé, stálé syntézy NO (Jablonka-Shariff a Olson, 1997). iNOS je schopna produkce většího množství oxidu dusnatého. V tom se liší od ostatních izoform (Bian a Murad, 2003). Aktivita iNOS má význam především pro vývoj terciálního folikulu, ovulaci a progresi CL (Tao *et al.*, 2004).

eNOS, nebo-li endoteliální NO-syntáza byla poprvé nalezena v buňkách endotelia (Alderton, 2001). K nálezu došlo i v savčích folikulech (Jablonka-Shariff a Olson, 1997), v Leydigových a Sertoliho buňkách a ve spermatidách (Ambrosino *et al.*, 2003). Je schopna krátkodobé syntézy menšího množství NO. Z hlediska reprodukce je eNOS spojena s vývojem oocyta, folikulu, progresí a regresí žlutého tělíska (Tao *et al.*, 2004).

Je pravděpodobné, že NO hraje klíčovou roli v regulaci signalizace kontrolující přechod mezi metafází I a metafází II, stejně jako přerušení meiozy v metafázi II (Jablonka-Shariff a Olson, 1998).

Sirovodík

Sirovodík patří mezi fyziologické signální gastrotransmitery. Prekurzorem endogenního sirovodíku je aminokyselina cystein. Syntéza sirovodíku je katalyzována třemi enzymy.

3-merkaptopyruvát sulfurtransferáza (MPST) syntetizuje sirovodík v mitochondriích i v cytosolu. Cystathionine beta-syntáza (CBS) byla poprvé izolována v myších vaječnicích, v oocytech její přítomnost prokázána nebyla. Nejsilnější expresi CBS prokazovaly folikulární buňky a to ve všech stádiích folikulárního vývoje. Genový knockout CBS způsobil inhibici zrací fáze oocyta. Touto cestou byl prokázán vliv na zrání oocyta, dále na průběh a délku estrálního cyklu, na růst folikulů a na plodnost samic i samečů (Zhu *et al.*, 2011). Třetím enzymem produkující sulfan je cystathionin gama-lyáza (CSE), jehož aktivita byla prokázána především v cévní soustavě (Zhao *et al.*, 2001).

3.2 Kalcineurin

Kalcineurin, označován také jako protein fosfatáza 2B, patří mezi serin/threonin fosfatázy. Hraje podstatnou roli v převodu vápníkových signálů na buněčné procesy (Klee *et al.*, 1988; Kincaid, 1993). Je přítomen v širokém spektru organismů od kvasinek po savce (Kincaid, 1993). Jedná se o heterodimer složený ze dvou podjednotek, katalytické a regulační. Katalytická A podjednotka u savců vyskytuje ve třech izoformách (alfa, beta, gama). Dosahuje molekulové hmotnosti 58 kDa. Obsahuje jedno místo pro navázání kalmodulinu. Regulační podjednotka B se vyskytuje ve dvou izoformách (A, B) o molekulové hmotnosti 18 kDa. Aktivaci kalcineurinu zajišťují ionty vápníku, které se váží na čtyři vazebná místa. Jedno z těchto míst vykazuje silnou a ostatní tři slabší afinitu k vápníku. Kalcineurin je jediná známá fosfatáza, která ke své aktivaci potřebuje jak ionty vápníku, tak kalmodulin.

Aktivace kalcineurinu

K aktivaci celého heterodimeru dochází odštěpením autoinhibičního peptidu po obsazení všech vazebných míst pro Ca a kalmodulin. To vyžaduje zvýšenou koncentraci vápníku. Při jeho nízké koncentraci je narušena pevná vazba kalcineurin – kalmodulin (Sobotková a Bartůňková, 2008). Pokud je obsah vápníku nižší než 10^{-7} M, dochází k jeho navázání pouze v místě vysoké afinity. Podjednotky A i B pak sice zůstávají spojeny, ale enzym postrádá aktivitu (Klee *et al.*, 1998). Dalšími látkami nezbytnými pro aktivitu kalcineurinu jsou ionty železa (Fe^{2+}) a zinku (Zn^{2+}) (Klee *et al.*, 1998). Pokud dojde k oxidaci Fe^{2+} na Fe^{3+} , může dojít k inaktivaci enzymu (Aramburu *et al.*, 2004).

Výskyt kalcineurinu

Zatímco izoformu A- γ , která se váže na regulační podjednotku B2, lze u savců nalézt pouze mozkové a varleční tkáni, kalcineurin A- α , A- β , vážící se na regulační podjednotku B1, byl detekován ve všech tkáních organismu (Molkentin, 2004). Příkladem může být tuková tkáň, nadledvinky, mícha, ledviny, játra, plíce, kostní dřeň, slinivka, placenta, krevní destičky. Sítnice, hladká svalovina, slezina, štítná žláza a brzlík (Rusnak *and* Mertz, 2000).

Pro všechny uvedené izoformy obou podjednotek kalcineurinu dochází v jádře během růstu k expresi příslušných mRNA, které jsou zde dočasně deponovány, nebo rovnou využity pro zajištění specifických potřeb dané buňky. Jedná se o mRNA pro izoformy katalytické podjednotky kalcineurinu A-alfa, A-beta a A-gama, dále o izoformy regulační podjednotky B1 a B2.

Funkce kalcineurinu

Kalcineurin patří do rodiny serin threonin protein fosfatáz (Rusnak and Merz, 2000). Cílem jeho aktivity je tedy regulace dalších proteinů prostřednictvím defosforylace (Jesus and Haccard, 2007). Kalcineurin upřednostňuje substráty se zásaditými AMK na N-konci a bez kyselých AMK na konci řetězce proteinu (Klee et al, 1998).

Těchto specifických vlastností je využito v somatických buňkách při řízení enzymatické aktivity, apoptózy i aktivaci T a B lymfocytů, expresi genů cytokinů a transportu molekul a iontů. Jako konkrétní příklad lze uvést regulaci transkripčního faktoru NAFT. Po defosforylaci serinových zbytků je NAFT translokován do jádra. Zde reguluje transkripci genů pro interleukiny (IL2, IL3, IL4, IL13) a jiné faktory (INF-gama, GM-CSF, TNF-alfa) (Sobotková a Bartůňková, 2008).

Mochida and Hunt (2007) provedli studii zaměřenou na oocyty žáby rodu *Xenopus laevis*. Bylo zjištěno, že uvolněním vápníku z endoplazmatického retikula IP3 cestou dochází k aktivaci kalcineurinu a jeho prostřednictvím k defosforylaci komplexu APC/C. Tento komplex je zodpovědný za degradaci cyklinu B a aktivitu MPF. V raném embryonálním vývoji kalcineurin ovlivňuje dekonenzaci chromatinu a změny v cytoskeletu včetně migrace prvojader (Jesus and Haccard, 2007).

Nishiyama et al., (2008) provedli inhibici kalcineurinu v oocytech drápatky a zjistil, že byl blokován výstup z druhé meiotické metafáze. Dále bylo pozorováno, že aktivace kalcineurinu provázená následující inaktivací v oplozeném oocytu, je nutná pro úspěšný začátek vývoje embrya.

Inhibice kalcineurinu

Při sledování účinků aktivity kalcineurinu hrají důležitou úlohu inhibitory. Jedním z nejvýznačnějších je cyklosporin A. Dalším příkladem inhibitorů kalcineurinu jsou takrolimus (FK506) a pimekrolimus (Sobotková a Bartůňková, 2008). Zhao et al., (2008) označuje insekticidy cypermethrin, deltamethrin a fenvalerát jako silné specifické inhibitory kalcineurinu s vlivem na meiózu oocytů savců.

4. Materiály a metodika

4.1 Získávání a kultivace oocytů

Získávání vaječnicků

K pokusům byly použity oocyty izolované z vaječnicků prasnic poražených na jatkách. Transport vaječnicků do laboratoře byl uskutečněn během jedné hodiny, v termolahvích naplněných fyziologickým roztokem. Teplota byla udržována na 38°C.

Získ rostoucích oocytů

Pro získání rostoucích oocytů byla použita korová tkáň povrchu vaječnicků dovezených z jatek. Ovariální tkáň byla vystříhnuta pomocí chirurgických nůžek a byly z ní vyrobeny tenké pruhy o délce asi 10 mm a šířce 2 mm. Izolace oocytů probíhala pod mikroskopem výběrem folikulů o velikosti menší, než 2 mm. Následovalo protržení vybraných folikulů jehlou 20G a rozdělení získaných oocytů do čtyř kategorií podle velikosti vnitřního průměru, to znamená bez vrstvy *zona pellucida*. Oocyty byly podle velikosti vnitřního průměru rozděleny do čtyř skupin. První dvě skupiny zahrnovaly oocyty o velikosti 80-89 μm a 90-99 μm , ve třetí skupině byly oocyty o velikosti 100-110 μm a čtvrtou skupinu tvořily oocyty o velikosti 120 μm .

Odběr oocytů s ukončeným růstem

Pro získání oocytů s ukončeným růstem byly použity folikuly o rozměru 2-5 mm a aspirační jehla 20G. Pod stereomikroskopem bylo provedeno jejich odsátí pipetou z folikulární tekutiny a transport oocytů do média M199. Médium M199 bylo obohaceno o laktát, pyruvát, HEPES, gentamicin a růstové proteiny fetálního séra (tab. č. 1). Do experimentu byly použity pouze oocyty, které měly celistvou cytoplazmu a neporušený obal z kumulárních buněk.

Tabulka č. 1: Složení modifikovaného média M199

CHEMIKÁLIE	MNOŽSTVÍ VE100 ML MÉDIA M199
Laktát sodný (Sigma-Aldrich)	60,0 mg
Pyruvát sodný (Sigma-Aldrich)	25,0 mg
HEPES (Sigma- Aldrich)	150,0 mg
Gentamicin (Sigm - Aldrich)	2,5 mg
Růstové proteiny (Gibco BRL)	10% (w/v)

4.2 Stanovení mRNA metodou RT - PCR

Metoda PCR umožňuje amplifikaci konkrétních sekvencí DNA, u nichž pak díky namnožení může být prováděna detekce. Je prováděna výhradně *in vitro* a bez použití vektorů a hostitelských buněk. K provedení této metody jsou potřeba syntetické oligonukleotidy komplementární ke známým sekvencím, které ohraničují konkrétní zkoumanou část DNA. Další nezbytnou složkou jsou dva nukleotidy (primer), které hybridizují vždy s jedním řetězcem na obou stranách amplifikovaného úseku DNA, dostatek deoxynukleosidtrifosfátů a nakonec speciální, termorezistentní DNA-polymerázu (Kolman et al., 2012) Metoda PCR sestává ze tří kroků, které se mnohokrát opakují. Nejprve dochází k denaturaci zahřátím na 92 – 95°C, při které dochází k přerušování vazeb vodíkových můstků a rozvolnění DNA na dvě komplementární vlákna, single bandy. V dalším kroku je DNA při zchlazení na 50-60°C po dobu 30 sekund hybridizována s nadbytkem syntetických oligonukleotidových primerů. Při třetím kroku je použita DNA-polymeráza pro replikaci úseku DNA mezi místy komplementárními k oligonukleotidovým primerům. Tyto primery poskytují volnou 3'OH skupinu pro započítání elongace řetězce. K polymeraci dochází při teplotě 70-72°C po dobu 1,5 min. Proces se mnohokrát opakuje až k dosažení potřebného množství kopií. Amplifikace je exponenciálního charakteru. Při 30 aplifikačních cyklech dojde ke vzniku více než miliardy kopií sekvence DNA. Při použití termostabilní polymerázy (nejčastěji tag-polymeráza) lze jednotlivé kroky procesu řídit automaticky, postupným střídáním teploty ve speciálním termálním cyklu.

Běžnou metodou PCR je detekován až finální produkt za použití fluorescenčního substrátu, který se vytvoří komplex se syntetizovanou DNA a umožní její detekci (Sunstad *et*

al., 2009). U námi použité metody RT – PCR (Real time PCR) lze kontinuálně sledovat přírůstky DNA při každém cyklu. Předpokladem je opět použití fluorescenčního substrátu. Vzhledem ke skutečnosti, že metodu PCR lze provést pouze na DNA, je nutné před zahájením amplifikace převést zkoumanou mRNA na použitelnou cDNA. Nejprve je pomocí enzymu *reverzní transkriptáza* zkopírováno vlákno DNA, komplementární k templátovému vláknu zkoumané mRNA. Po té je enzymaticky odbouráváno vlákno původní mRNA a nahrazováno vláknem DNA. Vzniká tak dvouvláknová cDNA, která svými sekvencemi odpovídá zkoumané mRNA.

Metodou RT-PCR jsme analyzovali oocyty čtyř velikostních, výše popsaných skupin. Každá skupina zahrnovala 50 oocytů v 50 µl izolačního pufru. Izolace celkové RNA proběhla za působení NucleicAcid PrepStation 6100 (Applied Biosystems, USA). Pro přepis celkové RNA do cDNA byl upotřeben High-Capacity cDNA Achieve kitu (Applied Biosystems, USA). Po přepisu do cDNA byla každá skupina o konečném objemu 10 µl konzervována zamražením na -20°C. Tabulka č. 2 uvádí sekvence použitých primerů a TaqMan sond pro amplifikaci specifických úseků cDNA pro kalcineurin A i B.

Tabulka č. 2: Sekvence použitých primerů a TaqMan sond

KALCINEURIN A	IZOFORMA ALFA	„FORWARD“ PRIMER:	5'-CCCTATATCGCTAATTGCCATTTT-3'
		Reverzní primer:	5'-AGTTTGTGTTTGTGCCATGGTTCA-3'
		TaqMan sonda:	5'-TACATAAAACAAAGTGCACCTGAA-3'
	Izoforma beta	„Forward“ primer:	5'-GGCAGCGGAACCATCTATTG-3'
		Reverzní primer:	5'-TCCAACCTTAGACAGGAGACCATACA-3'
		TaqMan sonda:	5'-TTTGCCAGAAAGTGCACC-3'
	Izoforma gama	„Forward primer:	5'-CATCAGAGGGTTTTTCGCTTCA-3'
		Reverzní primer:	5'-CCAGACCTCGGGCTTCTTC-3'
		TaqMan sonda:	5'-CACAGGATCCGCAGTT-3'
Kalcineurin B	Izoforma B1	„Forward primer:	5'-AGGTGCCAAGAACCTTTTCTCA-3'
		Reverzní primer:	5'-GCAGGGTTGCCAGCTAGCT-3'
		TaqMan sonda:	5'-CCACACCTTGGAGTAGG-3'
	Izoforma B2	„Forward primer:	5'-CAGGGCGATGATGGTTTTG-3'
		Reverzní primer:	5'-GGTGGGAGACAACCTGAAAGAC-3'
		TaqMan sonda:	5'-CCACCAGCTGCTGTAA-3'

Amplifikace RNA byla provedena metodou RT-PCR za použití aparátu Fast Real-Time PCR System 7500. Při realizaci byl dodržen předepsaný TaqMan PCR kit protokol. Pro výchozí denaturaci byl přístroj nastaven na 95°C po 20s. Následovalo 40 cyklů. Při nich trvala denaturace 2s při 95°C a polymerace 20s při 60°C. Reakční směs zahrnovala 1 µl cDNA, primery koncentrace 500 nM a TaqMan sondy koncentrace 200 nM/5mikrolitrů Fast TaqMan Universal Master Mixu 2x koncentrovaný. To vše bylo doplněno vodou s absencí nukleáz do objemu 10 µl reakční směsi. Pro vyhodnocení exprese jednotlivých forem kalcineurinu byla použita metoda relativní kvantifikace exprese RNA, použitím srovnávací metody delta delta Ct. Kontrola byla provedena použitím genu pro GAPDH (glyceraldehyd 3 fosfát dehydrogenázu).

4.3 Analýza exprese proteinů metodou Western blotting

Příprava vzorků

Analyzovány byly oocyty s ukončenou růstovou fází a plně dosaženou meiotickou kompetencí, oocyty ve stádiu zárodečného vajíčka, GV. Kumulární buňky získané z oocytů s ukončeným růstem tvořily samostatné vzorky. Poté byly oocyty a získané vzorky kumulárních buněk třikrát promyty v pufru PBS (Sigma – Aldrich Chemie GmbH, Mnichov, Německo). Následovala lyzace v pufru (0,15 ml 10% Triton X; 0,05 ml 10% SDS; 4,3 ml PBS). Lyzační pufr obsahoval inhibitory proteáz (Roche, Německo) v množství 0,5 ml. Vzorky byly zmrazeny při teplotě - 20°C.

Elektroforéza

Principem elektroforézy je rozdíl v rychlosti pohybu různě velikých nabitých částic stejnoměrným elektrickým polem. Větší částice a částice s nižší hustotou náboje se pohybují pomaleji a po určité době dochází k jejich zřetelné separaci. Jako médium pro pohyb částic se používá polyakrylamidový gel. Pro usnadnění pohybu molekul proteinů byla nejprve provedena eliminace disulfidických vazeb pomocí redukčního činidla (beta merkaptotanol). Po té dochází k navázání SDS (dodecylsulfát sodný) pro získání jednotného záporného náboje. Díky svým elektrostatickým vlastnostem způsobují molekuly SDS denaturaci a natažení proteinu. Eliminují tak vliv tvaru molekuly na její pohyblivost a požadovaný pohyb mezi elektrodami polyakrylamidovým gelem je tak závislý pouze na molekulové hmotnosti. Pro elektroforézu byl použit separační gel o 12,5 % (tab. č. 4), pro který byl nejprve připraven pufr dle tab. č.3. Na něj byl navrstven zaostřovací gel smíchaný s pufrem (tab. č. 5). Do zaostřovacího gelu byl na 45 min. vložen hřebínek pro vytvoření jamek na příslušné vzorky. Po té byl gel vložen do vany s elektroforézovým pufrem (tab. č. 6).

Před vlastní elektroforetickou separací byly vzorky naředěny 20 ml pufru SDS a 5 μ l 0,1 N roztoku NaOH za účelem neutralizace pH. Samotná separace probíhala pomocí SDS – PAGE ve 4% zaostřovacím gelu a 12,5% separačním gelu. Jako pozitivní kontrolní vzorek byl použit 1ng čistého proteinu kalcineurinu (Sigma – Aldrich Chemie GmbH, Mnichov, Německo).

Tabulka č. 3: Pufr pro separační gel

2M TRIS – HCL (PH 8,8)	7,5 ML
10% SDS	0,4 ml
H₂O	2,1 ml

Tabulka č. 4: Separační gel (12%)

30 % AKRYLAMID	7,5 ML
Pufr (pH 8,8)	3,7 ml
H₂O - destilovaná	3,8 ml
Persulfát amonný	75 µl
TEMED	5 µl

Tabulka č. 5: Zaostrovací pufr

1M TRIS – HCL (PH 6,8)	5 ML
10 % SDS	0,4 ml
H₂O	4,6 ml

Tabulka č. 6: Elektroforetický pufr

25 MM TRIS	3 G
192 mM glycin	14,4 g
10 % SDS	10 ml
H₂O	doplnit do objemu 1 000 ml

Přenos proteinů na membránu

Při analýze Western blotting jsou proteiny separované metodou SDS PAGE přeneseny na nitrocelulóзовou, popřípadě polyvinylidendifluoridovou membránu. V našem případě bylo provedeno přenesení separovaných proteinů na nitrocelulóзовou membránu (Hybond, Amersham Pharmacia Biotech, USA). Využili jsme metody elektroblottingu, při níž je hnací silou přenosu energie elektrického pole. Polyakrylamidový gel, na kterém proběhla separace, byl na 10 minut inkubován v Towbinově pufru (tab. č. 7), který má funkci vodivého média a usnadňuje přenos proteinů na membránu. Také nitrocelulóзовá membrána byla po lázni v destilované vodě vložena na 10 minut do blotovacího pufru. Stejně tak byla v pufru namočená i houba a dva filtrační papíry. Nitrocelulóзовá membrána byla vložena mezi dva namočené filtrační papíry, dále pak mezi houbu a polyakrylamidový gel a umístěna do elektroforetické vany s destilovanou vodou doplněnou ledem. Celá aparatura byla připojena k elektrickému zdroji.

Pro potvrzení přenosu proteinů na membránu, byl použit standard (Bio – Rad, Montreal, Kanada).

Tabulka č. 7: složení pufru Towbinova pufru

25 MM TRIS	3 G
192 mM glycin	14,4 g
10% SDS	1 ml
methanol	100 ml
H₂O	do 1000 ml

Imunodetekce proteinů

Základem pro detekci proteinů po blottingu bylo využití specifické vazby protein – protilátka. Inkubace protilátkou byla provedena ve dvou cyklech. Nejprve proběhla inkubace nitrocelulóзовé membrány a na ni přenesených proteinů, pomocí specifické primární protilátky. Poté byla odstraněna přebytečná primární protilátka promytím membrány. Dále byla provedena inkubace s nespecifickou sekundární protilátkou, která má schopnost vázat se

na protilátku primární a je konjugovaná s látkou emitující světelný signál umožňující vizualizaci. Následovalo promytí a vizualizace.

Vzhledem ke skutečnosti, že většina metod používaných pro detekci látek přenesených na membránu využívá pro indikaci proteiny, je nutné ještě před vlastní detekcí zablokovat všechna vazebná místa na membráně, která nejsou obsazena zkoumanou látkou. Za tímto účelem je používán kasein, nízkotučné mléko, hemoglobin, či inertní proteiny BSA. V našem případě probíhala blokace přes noc ve 2% odtučněném mléce PBS s 0,1% Twen 20. Označení bylo provedeno dvouhodinovou inkubací s protilátkou (Sigma – Aldrich Chemie GmbH, Mnichov, Sigma – Aldrich, Německo) o koncentraci 1:10 000 anti - A, nebo 1:3000 anti – B. Následovala inkubace v sekundární protilátce myší IgG o koncentraci 1:30 000. Vizualizace přenesených proteinů s navázanou protilátkou byla provedena pomocí ECL Advance Western Blotting Detection Kit (Amersham Pharmacia Biotech, UK), za využití přístroje C-DiGit Blot Scanner (LICOR Biosciences, USA).

5. Experimentální schéma

5.1 Experiment 1: Ověření meiotické kompetence rostoucích oocytů v daných laboratorních a kultivačních podmínkách

Cílem experimentu bylo zjistit kompetenci oocytů prasete o různé velikosti v našich experimentálních podmínkách.

Nejprve byly oocyty rozděleny do čtyř skupin. V první skupině byly oocyty o velikosti vnitřního průměru 80-89 μm , ve druhé o velikosti 90-99 μm , ve třetí s průměrem 100-110 μm a ve čtvrté skupině byly analyzovány oocyty o velikosti 120 μm . Oocyty všech velikostních skupin byly odděleně kultivovány po dobu 48 hodin v modifikovaném médiu M199 při 5% CO_2 a 39°C. Po ukončení kultivace a odstranění kumulárních buněk pipetováním skrz tenkostěnnou skleněnou pipetu byly oocyty fixovány na podložní sklo, překryty krycím sklem upevněným lékařskou bílou vazelínou a takto zhotovené preparáty byly přeneseny do kyvety obsahující roztok kyseliny octové a alkoholu (1:3, v/w). Po fixaci trvající 24 hodin byly preparáty barveny 1% roztokem orceinu a jaderné struktury hodnoceny pomocí mikroskopu s fázovým kontrastem podle kritérií publikovaných Motlíkem a Fulkou (1986).

5.2 Experiment 2: Stanovení exprese mRNA jednotlivých izoform kalcineurinu v oocytech prasete pomocí RT PCR metody

Záměrem bylo prokázat, že během růstové fáze dochází v oocytech a kumulárních buňkách prasat k expresi mRNA pro obě podjednotky kalcineurinu a stanovit jednotlivé izoformy. Jedná se o podjednotku A (izoforma α , β , γ), a o podjednotku B (izoforma B1, B2). Analyzovány byly oocyty čtyř výše popsaných skupin. Byla stanovena mRNA pro podjednotky kalcineurinu včetně jeho izoform $\text{CnA}\alpha$, $\text{CnA}\beta$, $\text{CnA}\gamma$ a CnB1 a CnB2 . Hodnocení bylo provedeno postupem relativní kvantifikace, tedy kvantitativním poměrem jednotlivých skupin rostoucích oocytů k čtvrté skupině, v níž se vyskytovaly oocyty, jejichž růst byl ukončen a dosáhly plné meiotické kompetence včetně referenčního genu GAPDH a to pomocí programu SDS a s využitím vzorce pro výpočet $2^{-\delta\text{Ct}}$ a srovnávací metody CT.

5.3 Experiment 3: Detekce podjednotek proteinu kalcineurinu v oocytech metodou Western blot

Byly analyzovány vzorky oocytů s ukončeným růstem a plně dosaženou meiotickou kompetencí o velikosti vnitřního průměru 120 μm pro průkaz exprese proteinu kalcineurinu ve dvou podjednotkách, regulační a katalytické.

5.4 Statistické vyhodnocení

Získané výsledky pro specifické izoformy kalcineurinu byly vyhodnoceny pomocí programu Statistica 6.0 CZ, jednofaktorová ANOVA. Analýza rozdílů mezi jednotlivými vzorky byla provedena Tukey HSD testem ($P < 0,05$).

6. Výsledky

6.1 Ověření meiotické kompetence oocytů

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

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

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

Tabulka 2. Ověření meiotické kompetence oocytů prasete o různých vnitřních průměrech po dobu 48 hod. kultivace v experimentálních laboratorních podmínkách

Fáze meiotického zrání	% oocytů v dané fázi			
	80 – 89 μm	90 – 99 μm	100 – 110 μm	120 μm
GV	97,8 \pm 2,2 ^a	88,5 \pm 6,0 ^a	12,8 \pm 5,4 ^b	6,2 \pm 6,1 ^b
MI	1,5 \pm 1,0 ^a	9,9 \pm 4,7 ^a	87,2 \pm 5,4 ^b	6,9 \pm 4,8 ^a
MII	0,7 \pm 0,7 ^a	1,6 \pm 1,2 ^a	0,0 \pm 0,0 ^a	86,9 \pm 5,7 ^b

GV: fáze zárodečného vajíčku

MI: fáze první meiotické metafáze

MII: fáze druhé meiotické metafáze

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

6.2 Analýza mRNA kalcineurinu metodou RT – PCR

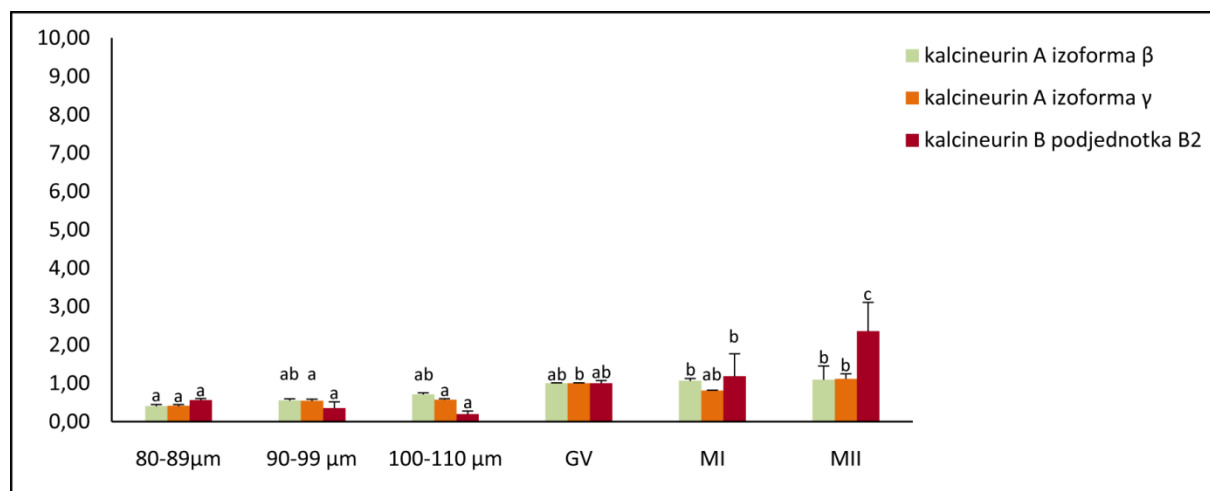
Cílem tohoto experimentu bylo prokázat, že během růstové fáze dochází v oocytech a kumulárních buňkách prasat k expresi mRNA pro obě podjednotky kalcineurinu.

mRNA pro podjednotku A byla nalezena v izoformách β a γ a to jak v oocytech, tak i v kumulárních buňkách. mRNA pro podjednotku A v izoformě α nalezena nebyla.

mRNA pro podjednotku B byla v oocytech prokázána pouze v izoformě B2 na rozdíl od kumulárních buněk, v nichž byla prokázána v obou izoformách B1 i B2.

Míra exprese všech uvedených forem kalcineurinu je zobrazena v grafech 1 a 2.

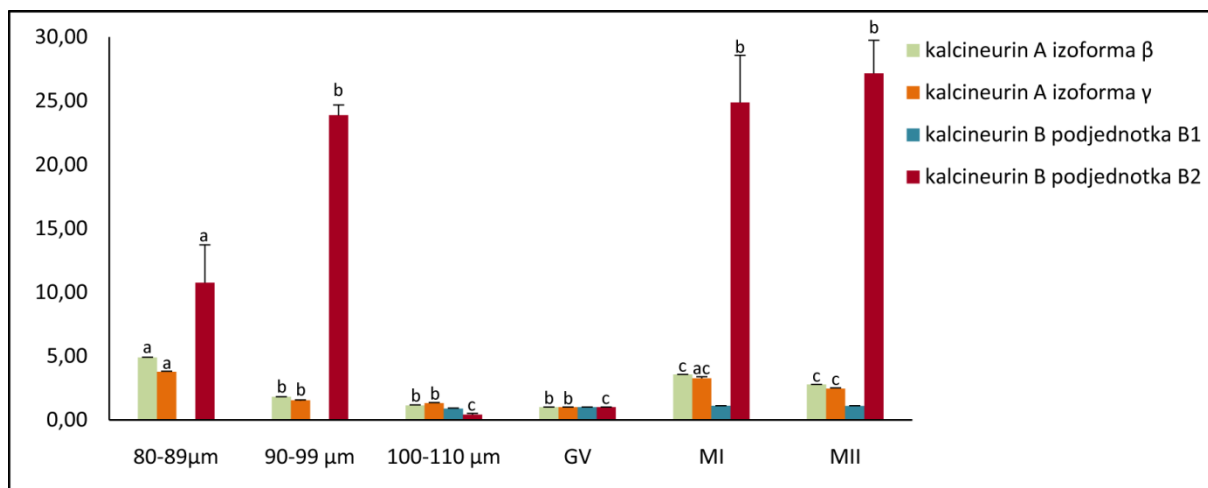
Graf 1: Relativní úroveň exprese mRNA izoform kalcineurinu v rostoucích a *in vitro* zrajících oocytech



a,b,c - odlišné superskripty značí statisticky průkazné rozdíly v relativní úrovni exprese mRNA mezi oocyty a jejich kumulárními buňkami v rámci příslušného velikostního stadia ($P < 0,05$).

Získané oocyty byly rozděleny do 4 skupin (80-89 μm , 90-99 μm , 100-110 μm a 120 μm). Expres mRNA byla hodnocena metodou relativní kvantifikace a vztažena k hodnotám exprese mRNA oocytů s ukončeným růstem.

Graf 2: Relativní úroveň exprese mRNA izoform kalcineurinu v kumulárních buňkách.



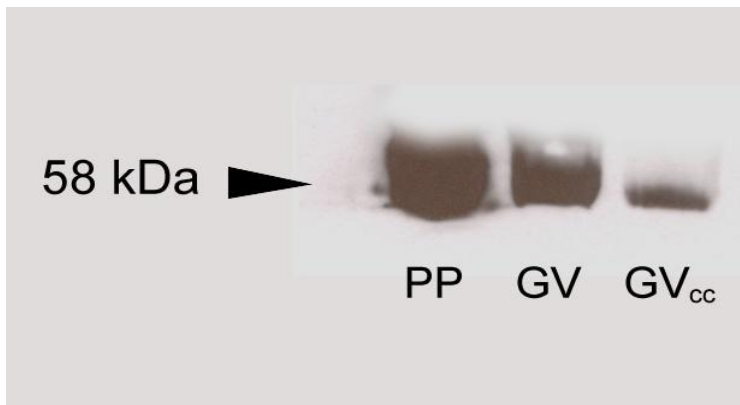
a,b,c - odlišné superskripty značí statisticky průkazné rozdíly v relativní úrovni exprese mRNA mezi oocyty a jejich kumulárními buňkami v rámci příslušného velikostního stadia ($P < 0,05$).

Kumulární buňky byly rozděleny do 4 skupin podle rozměru oocytů, z nichž byly získány (80-89 μm , 90-99 μm , 100-110 μm a 120 μm). Expres mRNA byla hodnocena metodou relativní kvantifikace a vztažena k hodnotám exprese mRNA oocytů s ukončeným růstem.

6.3 Analýza proteinových podjednotek kalcineurinu metodou Western blot

Analýzou Western blotting byla prokázána přítomnost proteinů kalcineurinu jaku všech vzorků zkoumaných oocytů, taku jejich kumulárních buněk. (obr. 3 a 4). V případě podjednotky A (molekulová hmotnost 58 kDa) byl zaznamenán silnější signál než pro podjednotku B (molekulová hmotnost 18 kDa).

Obrázek 1. Stanovení podjednotky A proteinu kalcineurinu oocytů a jejich kumulárních buněk metodou Western blotting



PP – čistý protein.

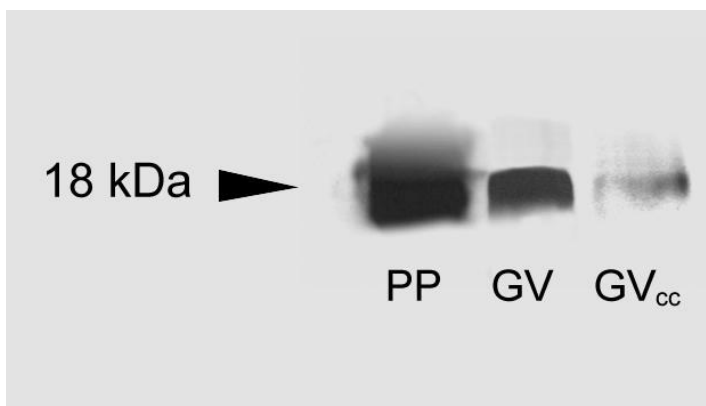
GV – oocyty ve stádiu zárodečného váčku

GV_{CC} – kumulární buňky oocytů ve stádiu zárodečného váčku

Každý vzorek obsahoval 150 oocytů ve stádiu GV.

Experimenty byly 4x opakovány.

Obrázek 2. Stanovení podjednotky B proteinu kalcineurinu oocytů a jejich kumulárních buněk metodou Western blotting



PP – čistý protein.

GV – oocyty ve stádiu zárodečného váčku

GV_{CC} – kumulární buňky oocytů ve stádiu zárodečného váčku

Každý vzorek obsahoval 150 oocytů ve stádiu GV.

Experimenty byly 4x opakovány.

Metoda Western blotting prokázala expresi podjednotky A i B kalcineurinu v oocytech ve stádiu zárodečného vajíčka a jejich kumulárních buňkách. Specifické protilátky se vážaly na A katalytickou podjednotku (58 kDa) a B regulační podjednotku (18 kDa).

7. Diskuse

V této práci byla prokázána exprese proteinu fosfatázy 2B, kalcineurinu v oocytech prasete. Izolace kalcineurinu byla již provedena ve spermiích prasete (Tash *et al.*, 1988). Není tedy překvapením, že došlo k izolaci kalcineurinu také v samičích gametách, oocytech. Izolována byla mRNA různých izoform obou podjednotek kalcineurinu. Překvapivá však byla izolace izoformy 2 kalcineurinu B, protože tato izoforma byla obecně považována za specifickou pro varleční tkáň (Ueki *et al.*, 1992). Potvrdili jsme však, že se vyskytuje již v oocytech.

mRNA pro podjednotku A byla nalezena v izoformách β a γ a to jak v oocytech, tak i v kumulárních buňkách. mRNA pro podjednotku A v izoformě α nalezena nebyla.

mRNA pro podjednotku B byla v oocytech prokázána pouze v izoformě B2 na rozdíl od kumulárních buněk, v nichž byla prokázána v obou izoformách B1 i B2.

Je možné, že mRNA pro podjednotku A v izoformě α byla degradována v rostoucích oocytech a proto ji nebylo možné detekovat. Lze se tedy domnívat, že oocyt pro řízení své růstové fáze a meiotické kompetence vyžaduje pouze izoformy β a γ , nikoliv izoformu α a není pro něj rovněž nezbytná izoforma B1. Vzhledem k tomu, že se B1 izoforma vyskytuje pouze v okolních kumulárních buňkách, je možné že hlavní regulační význam této izoformy se uplatňuje především v kumulaci, nikoliv ve vlastním oocytu.

U některých izolovaných mRNA kalcineurinu nedocházelo během růstové, ani zrací fáze k translaci do funkčního proteinu. Zde se nabízí možnost využití této deponované mRNA k pokrytí potřeb raného embryonálního vývoje.

Vzhledem ke skutečnosti, že se nám podařila prokázat přítomnost proteinů kalcineurinu podjednotek A i B v oocytech prasete na konci jeho růstové fáze a počátku meiotického zrání, je vysoce pravděpodobné, že kalcineurin hraje důležitou roli právě v regulaci meiózy oocytů savců podobně jako v meióze bezobratlých (Takeo *et al.*, 2006; Takeo *et al.*, 2010), nebo nižších obratlovců (Nishiyama *et al.*; Mochida a Hunt, 2007). Význam role kalcineurinu v regulaci meiózy prasečích oocytů potvrzuje aplikace inhibitorů kalcineurinu (Petr *et al.*, 2013), která prokázala vliv kalcineurinu na zrání *in vitro* jaku oocytů s částečnou kompetencí, taku oocytů plně meioticky kompetentních. Tyto inhibitory mají vliv na výstup oocytů z metafáze I meiotického zrání. Konkrétní role kalcineurinu v regulaci oogeneze a meiózy samic savců nám však prozatím zůstává skryta.

Se zřetelem na skutečnost, že byla prokázána přítomnost fosfatázy 2B, kalcineurinu, v oocytech prasete v období růstu i zrání, bylo by prospěšné provést výzkum vedoucí ke

zjištění funkce tohoto regulačního proteinu pro růst a vývoj savčích vajíček a zaměřit se také na proces partenogenetické aktivace a fertilizace *in vitro* a také průběh vývoje embrya.

8. Závěr

V prasečím oocytu se nám podařilo prokázat výskyt mRNA pro fosfatázu 2B, kalcineurin. mRNA jsme našli ve všech sledovaných skupinách rostoucích oocytů. Zatímco mRNA pro podjednotku A byla nalezena v izoformách β a γ a to jak v oocytech, tak i v kumulárních buňkách, mRNA pro podjednotku A v izoformě α nalezena nebyla. mRNA pro podjednotku B byla v oocytech prokázána pouze v izoformě B2 na rozdíl od kumulárních buněk, v nichž byla prokázána v obou izoformách B1 i B2.

V oocytech jsme také detekovali vlastní protein kalcineurinu. Nalezli jsme jak jeho regulační, tak také katalytickou podjednotku, což naznačuje, že kalcineurin může sehrávat roli během růstové fáze. V dalších studiích bude třeba zaměřit se na konkrétní specifikaci jeho role během růstové fáze oocytu a také na mapování jeho významu pro zrání a aktivaci oocytu.

9. Literatura

Alberts, B., Bray, D., Johnson, A., Lewis, J., Raff, M., Roberts, K., Walter, P. 1998.

Základy buněčné biologie. Espero Publishing, Ústí nad Labem, 630 s. ISBN: 80-902906-2-0

Albertini, D. F. 1992. Cytoplasmic microtubular dynamics and chromatin organization during mammalian oogenesis and oocyte maturation. *Mutation Research*. 296. 57-68.

Alderton, K. W., Cooper, Ch. E., Knowles, G. R. 2001. Nitric oxide synthases: structure, function and inhibition. *Biochem*. 357. 593 – 615.

Ambrosino, A., Russo, D., Lamanna, C., Assisi, L., Rizzo, M., Vittoria, A., Cecio, A. 2003. Isoforms of nitric oxide in the pig testis. *Acta Veterinaria Brno*. 72. 493 – 498.

Antoine, N., Thiry, M., Goessens, G. 1989 Ultrastructural and cytochemical studies on extranucleolar bodies in rat oocytes at the preovulatory follicle stage. *Biology of the Cell*. 65. 61-66.

Aramburu, J., Heitman, J., Crabtree, G. R. 2004. Calcineurin: a central controller of signalling in eukaryotes. 5. 343–348.

Arion, D., Meier, L., Brizuela, L., Beach, D. 1988. *cdc*² is a component of the M phase-specific histone H1 Evidence for identity with MPF. *Cell*. 55. 371-378.

Baker, T. G., Franchi, L. L. 1967. The fine structure of oogonia and oocytes in human ovaries *Journal of Cell Science*. 2. 213-224.

Berridge, M. J. 1993. Inositol triphosphate and calcium signalling. *Nature*. 361. 315-325.

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

Blanco, F. J., Montoya, G. 2011. Transient DNA/RNA-protein interactions. *Febs Journal*. 278. 1643-1650.

- Bu S., Xia G., Tao Y., Lei L., Zhou B. 2003. Dual effects of nitric oxide on meiotic maturation of mouse cumulus cell-enclosed oocytes in vitro. *Molecular and cellular endocrinology* 207. 21–30.
- Buccione, R., Schroeder, A. C., Eppig, J. J. 1990. Interactions between Somatic Cells and Germ Cells throughout Mammalian Oogenesis. *Biology of Reproduction*. 43. 543-547.
- Carroll, J., Swann, K., Whittingham, D., Whitaker, M. 1994. Spatiotemporal dynamics of intracellular (Ca^{2+})ⁱ oscillations during the growth and meiotic maturation of mouse oocytes. *Development*. 120. 3507-3517.
- Cortvrindt, R., Smits, J., Van Steirteghem, A. C. 1997. Assessment of the need for follicles stimulating hormone in early preantral mouse follicle culture in vitro. *Human Reproduction* 12. 759–768.
- 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. 65-68.
- Danner, S., Kajahn, J., Geismann, C., Klink, E., Kruse, C. 2007. Derivation of oocyte-like cells from a clonal pancreatic stem cell line. *Molecular Human Reproduction*. 13. 11-20.
- Dyce, P. W., Li, J. 2006. From skin cells to ovarian follicles? *Cell Cycle*. 5. 1371-1375.
- Dyce, P. W., Wen, L., Li, J. 2006. In vitro Germáne potential of stem cells derived from fetal porcine skin. *Nature Cell Biology*. 8. 384-390.
- Eggan, K., Jurga, S., Gosden, R., Min, I. M., Wagers, A. J. 2006. Ovulated oocytes in adult mice derive from non-circulating germ cells. *Nature*. 441. 1109-1114.
- Eppig, J. J. 1991. Maintenance of meiotic arrest and the induction of oocyte maturation in mouse oocyte-granulosa cell complexes developed in vitro from preantral follicles. *Biological reproductions*. 45. 824-830.

- Eppig, J. J. 2001. Oocyte control of ovarian follicular development and function in mammals. *Reproduction*. 122. 829–838.
- Fair, T., Hulshof, S. C. J., Hyttel, P., Boland, M., Greve, T. 1997. Bovine oocyte ultrastructure in primordial to tertiary follicles. *Anatomy and Embryology*. 195. 327-336.
- Fan, H. Y., Huo, L. J., Meng, X. Q., Zhong, Z. S., Hou, Y., Chen, D. Y., Sun, Q. Y. 2003. Involvement of calcium/calmodulin-dependent protein kinase II (CaMKII) in meiotic maturation and activation of pig oocytes. *Biology of Reproduction*. 69. 1552-1564.
- Fan, H. Y., Tong, C., Chen, D. Y., Sun, Q. Y. 2002. Protein kinase involved in the meiotic maturation and fertilization of oocyte. *Sheng Wu Hua Xue Zu Sheng Wu Li Xue Bao*. 34. 259-265.
- Fan, H. Y., Sun, Q. Y. 2004. Involvement of Mitogen-Activated Protein Kinase Cascade During Oocyte Maturation and Fertilization in Mammals. *Biology of Reproduction*. 70. 535–547.
- Ferreira, E. M., Vireque, A. A., Adona, P. R., Meirelles, F. V., Ferriani, R. A., Navarro, P. A. 2009. Cytoplasmic maturation of bovine oocytes: structural and biochemical modifications and acquisition of developmental competence. *Theriogenology*. 71. 836-848.
- Ferrell, J. E., Wu, M., Gerhart, J. C., Martin, G. S. 1991. Cell cycle tyrosine phosphorylation of p34cdc2 and microtubule-associated protein kinase homolog in *Xenopus* oocytes and eggs. *Molecular cellular biology*. 11. 1965-1971.
- FitzHarris, G., Marangos, P., Carroll, J. 2003. Cell cycle-dependent regulation of structure of endoplasmic reticulum and inositol 1,4,5-triphosphate-induced Ca^{2+} release in mouse oocytes and embryos. *Molecular Biology of the Cell*. 14. 288-301.
- Fulka, J., Leibfried-Rutledge, M. L., First, N. L. 1991. Effect of 6-dimethylaminopurine on Terminal vesicle breakdown of oocytes. *Molecular Reproduction and Development*. 29. 379-384.

- Gabrieli, B. G., Roy, L. M., Maller, J. L. 1993. Requirement for cdk2 in cytostatic factor-mediated metaphase II arrest. *Science*. 259. 1766-1769.
- Gautier, J., Matsukawa, T., Nurse, P., Maller, J. 1989. Dephosphorylation and activation of *Xenopus* p34cdc2 protein kinase during the cell cycle. *Nature*. 339. 626-629.
- Gautier, J., Norbury, C., Lhoka, M., Nurse, P., Maller, J. 1988. Purified maturation-promoting factor contains the product of homolog of the fission yeast cell cycle control gene *cdc2+*. *Cell*. 54. 433-439.
- 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. 197–211.
- Glister, C., Hatzirodos, N., Hummitzsch, K., Kinght, P. G., Rodgers, R. J. 2014. *BMC Genomic*. 15. 72.
- Gosden, R., Krapez, J., Briggs, D. 1997. Growth and development of the mammalian oocyte. *BioEssays*. 19. 875-882.
- Heyting, C. 1996. Synaptonema complexes: structure and function. *Current Opinion in Cell Biology*. 8. 389-396.
- Hunter, M. G. 2000. Oocyte maturation and ovum quality in pigs. *Reproduction*. 5. 122–130.
- Hyttel, P., Fair, T., Avery, B., Callesen, H., Greve, T. 1999 Transcriptional Activity and Ultrastructure in Bovine Oocytes. *Reproduction in Domestic Animals*. 34. 247–254.
- Chawengsaksophak, K., Svingen, T., Ng, E. T., Epp, T., Spiller, C. M., Clark, Ch., Cooper, H., Koopman, P. 2011. Loss of *Wnt5a* disrupts primordial germ cell migration and male sexual development in mice. *Biology of Reproduction*. 111. 095232.
- Cho, W. K., Stern, S., Biggers, J. D. 1974. Inhibitory effect of dibutyryl cAMP on mouse maturation in vitro. *Journal of Experimental Zoology*. 187. 383-386.

- Ioune, M., Natio, K., Aoki, F., Toyoda, Y., Sato, E. 1995. Activation of mitogen-activated protein kinase during meiotic maturation in porcine oocytes. *Zygote*. 3. 265-271.
- Inoue, Y., Tsujimoto, Y., Kimura, A. 1998. Expression of the glyoxalase I gene of *Saccharomyces cerevisiae* is regulated by high osmolarity glycerol mitogen-activated protein kinase pathway in osmotic stress response. *Journal of Biological Chemistry*. 273. 2977–2983.
- Jablonka-Shariff, A., Olson, L. M. 1997. Hormonal regulation of nitric oxide synthases and their cell-specific expression during follicular development in the rat ovary. *Endocrinology*. 138. 460-468.
- Jablonka-Shariff, A., Olson, L. M. 1998. The role of nitric oxide in oocyte meiotic maturation and ovulation: meiotic abnormalities of endothelial nitric oxide synthase knockout mouse oocytes. *Endocrinology*. 139. 2954.
- Jablonka-Shariff, A., Olson, M. L. 2000. *Molecular reproduction and development*. 55. 412 – 421.
- Jaffe, L. A., Terasaki, M. 1994. Structural changes in the endoplasmic reticulum of starfish oocytes during meiotic maturation and fertilization. *Developmental Biology*. 164. 579-587.
- Janssens, S. P., Shimouchi, A., Quertermous, T., Bloch, D. B., Bloch, K. D. 1992. *The Journal of Biological Chemistry*. 267. 14519 – 14522.
- Jones, K. T. 2004. Turning it on and off: M-phase promoting factor during meiotic maturation and fertilization. *Molecular Human Reproduction*. 10. 1-5.
- Jones, K. T. 2005. Mammalian egg activation: From Ca²⁺ spiking to cell cycle progression. *Reproduction*. 130. 813-823.
- Jessup, C., Haccard, O. 2007. Calcium's double punch. *Nature*. 449. 20.

- Kaufman, M. L., Homa, S. T. 1993. Defining role for calcium in the resumption of meiosis in the pig oocyte. *The Journal of Experimental Zoology*. 265. 69-76.
- Klee, C. B., Draetta, G. F., Hubbard, M. J. 1988. Calcineurin. *Adv. Enzymol. Relat. Areas of Molecular Biology*. 61. 149-200.
- Kikuchi, K., Naito, K., Daen, F. P., Izaike, Y., Toyoda, Y. 1995. Histone H1 kinase activity during in vitro fertilization of pig follicular oocytes matured in vitro. *Theriogenology*. 43. 523-532.
- Kincaid, R. 1993. Calmodulin-dependent protein phosphatases from microorganisms to man - a study in structural conservatism and biological diversity. *Advances in Second Messenger and Phosphoprotein Research*. 27. 1-23.
- Klee, C. B., Ren, H., Wang, X. 1998. Regulation of the Calmodulin stimulated Protein Phosphatase, Calcineurin. *The Journal of biological chemistry*. 273. 13367–13370.
- Knox, R. V. 2005. Recruitment and selection of ovarian follicles for determinativ of ovulation rate in the pig. *Domestic Animal Endocrinoly* 29. 385-397.
- Lee, J., Miyano, T., Moor, R. M. 2000. Localization of phosphorylated MAP kinase during from meiosis I to meiosis II in pig oocytes. *Zygote*. 8. 119-125.
- Logan, K. P., McNatty, K. A., Juengel, J. L. 2003. Expression of Wilms tumor gene and protein localization during ovarian formativ and follicular development in sheep. *Biology of Reproduction*. 68. 635-643.
- Louros, N. N., Iconomidou, V. A., Giannelou, P., Hamodrakas, S. J. 2013. Structural analysis of peptide-analogues of human Zona Pellucida ZP1 protein with amyloidogenic properties: insights into mammalian Zona Pellucida formation. *PLoS One*. 8. 73258.
- Lucas, X., Martínez, E. A., Roca, J., Vázquez, J. M., Gil, M. A., Pastor, L. M., Alabart, J. L. 2002. Relationship between antral follicle size, oocyte diametres and nuclear maturation of immature oocytes in pigs. *Theriogenology*. 58. 871-885.

- Masui, Y., Markert, C. L. 1971. Cytoplasmatic kontrol of nuclear behavior during mestic maturation of frog oocytes. *The Journal of Experimental Zoology*. 177. 129-145.
- Mehlmann, L. M., Kline, D. 1994. Regulation of intracelular calcium in the mouse egg: calcium repase in response to sper mor inositol triphosphate is enhanced after mestic maturation. *Biology of Reproduction*. 51. 1088-1098.
- Meisner, G. 1994. Ryanodine receptor/Ca²⁺ repase channels and their regulativ by endogenous effectors. *Annual Review of Physiology*. 56. 485-508.
- Mochida, S., Hunt, T. 2007. Calcineurin is required to release *Xenopus* egg extracts from meiotic M phase. *Nature*. 449. 336–340.
- Miyazaki, S. 1991. Repetitive calcium transients in hamster oocytes. *Cell Calcium*. 12205-216.
- Molkentin, J. D. 2004. Calcineurin-NFAT signaling regulates the cardiac hypertrophic response in coordination with the MAPKs. *Cardiovascular Research* 63. 467– 475.
- Morbeck, D. E., Esbenshade, K. L., Flowers, W. L., Britt, J. H. 1992. Kinetics of follicle growth in the prepubertal gilt. *Biology of Reproduction*. 47. 485-491.
- Motlik, J., Crozet, N., Fulka, J. 1984. Meiotic competence in vitro of pig oocytes isolated from early antral follicles. *Journal of Reproduction and Fertility*. 72. 323-328.
- Motlík, J., Fulka, J. 1976. Breakdown of the Terminal vesicle in pig oocytes in vivo and in vitro. *Journal if Experimental Zoology*. 198. 155-162.
- Motlík, J., Fulka, J., 1986. Factors affecting mestic kompetence in pig oocytes. *Theriogenology*. 25. 87-96.

- Nishiyama, T., Yoshizaki, N., Kishimoto, T., Ohsumi, K. 2007. Transient activation of calcineurin is essential to initiate embryonic development in *Xenopus laevis*. *Nature*. 449. 341-345.
- Nishiyama, T., Yoshizaki, N., Kishimoto, T., Ohsumi, K. 2008. Transient activation of calcineurin is essential to initiate embryonic development in *Xenopus laevis*. *Nature*. 449. 341-345.
- Norberg, H. S. 1972. The follicular oocyte and its granulosa cells in domestic pig. *Zeitschrift fur Zellforschung und Mikroskopische Anatomie*. 131. 497-517.
- Nurse, P. 1990. Universal control mechanism regulativ onset of M-phase. *Nature*. 344. 503-508.
- Nussbaum, R. I., McIllnes, R. R., Willard, H. F. 2004. In: Thompson and Thompson, *Klinická genetika*. Triton. ISBN 80-7254-475-6.
- Ohashi, S., Naito, K., Sugiura, K., Iwamori, N., Goto, S., Naruoa, H., Tojo, H. 2003. Analyses of mitogen-activated protein kinase fiction in the maturation of porcine oocytes. *Biology of reproduction*. 68. 604-609.
- Osuchowska, Z. B. 2006. Oogenesis in pig ovaries during the prenatal period: ultrastructure and morphometry. *Reproductive Biology*. 6. 161-193.
- Palmer, A., Gavin, A. C., Nebreda, A. R. 1998. A link between MAP kinase and p34(cdc2)/cyclin B during oocyte maturation: p90(rsk) phosphorylates and inactivates the p34(cdc2) inhibitory kinase Myt1. *The EMBO Journal*. 17. 5037-5047.
- Payne, C., Schatten, G. 2003. Golgi dynamics during meiosis are distinct from mitosis and are coupled to endoplasmic reticulum dynamics until fertilization. *Developmental Biology*. 264. 50-63.

- Petr, J., Rozinek, J., Hruban, V., Jílek, F., Zedníková, M., Vaňourková, Z., Němeček, Z. 2001. Ultrastructural localization of calcium deposits during in vitro culture of pig oocytes. *Molecular Reproduction and Development*. 58. 196–204.
- Petr, J., Chmelíková, E., Dorflerová, A., Ješeta, M., Kuthanová, Z. 2007. Effects of protein kinase C on parthenogenetic activation of pig oocytes using calcium ionophore or nitric oxide-donor. *Czech Journal of Animal Science*. 52. 415-422.
- Picton, H., Briggs, D., Gosden, R. 1998. The molecular basis of oocyte growth and development. *Molecular and Cellular Endocrinology*. 145. 27-37.
- Rusnak, F., Mertz, P. 2000. Calcineurin: Form and Function. *Physiological Reviews*. 80. 1483-1521.
- Rozinek, J., Vaňourková, Z., Sedmíková, M., Lánská, V., Petr, J., Rajmon, R., Jílek, F. 2003. Ultrastructural localisation of calcium deposits in pig oocytes maturing in vitro: effects of verapamil. *Zygote*. 11. 253 – 260.
- Sela-Abramovich, S., Endry, I., Galiani, D., Nevo, N., Dekel, N. 2006. Disruption of gap junctional communication within the ovarian follicle induces oocyte maturation. *Endocrinology*. 147. 2280-2286.
- Scherthan, H. 2007. Telomereattachment and clustering during meiosis. *Cell*. 64. 117-124.
- Schramm, R. D., Bavister, B. D. 1999. Onset of nucleolar and extranuclear transcription and expression of fibrillarin in mouse embryos developing in vitro. *Biology of Reproduction*. 60. 721-728.
- Sobotková, M., Bartůňková, J. 2008. Antibiotická imunosupresiva. *Remedia*. 18. 233-241.
- Stojkovic, M., Motlik, J., Kölle, S., Zakhartchenko, V., Alberio, R., Sinowatz, F., Wolf, E. 1999. Cell-cycle control and oocyte maturation: Review of literature. *Reproduction of Domestic Animal*. 34. 335-342.

- Sun, Q. Y., Nagai, T. 2003. Molecular Mechanisms Underlying Pig Oocyte Maturation and Fertilization. *J Reproduction Development*. 49. 347-359.
- Taieb, F., Chartrain, I., Chevalier, S., Haccard, O., Jesus, C. 1997. Cyclin D2 arrest Xenopus early embryonic cell cycles. *Experimental Cell Research*. 237. 338-346.
- Takeo, S., Hawley, R. S., Agiaki, T. 2010. Calcineurin and its regulation by Sra/RCAN is required for completion of meiosis in *Drosophila*. *Developmental Biology*. 344. 957-967.
- Takeo, S., Tsuda, M., Akahori, S., Matsuo, T., Agiaki, T. 2006. The calcineurin regulator Sra plays an essential role in female meiosis in *Drosophila*. *Current Biology*. 16. 1435-1440.
- Tan, J. H., Wang, H. L., Sun, X. S., Liu, Y., Sui, H. S., Zhang, J. 2009. Chromatin configurations in the germinal vesicle of mammalian oocytes. *Molecular Human Reproduction*. 15. 1-9.
- Tao, Y., Fua, 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. 93-103.
- Touny, L. H., Banerjee, P. P. 2006. Identification of both Myt-1 and Wee-1 as necessary mediators of the 21-independent inactivation of the cdc-2/cyclin B1 complex and growth inhibition of TRAMP cancer cells by genistein. *Prostate*. 66. 1542-1555.
- Tsafiriri, A., Dekel, N., Bar-Ami, S. 1982. The role of oocyte maturation inhibitor in follicular regulation of oocyte maturation. *J Reprod Fertil*. 64. 541-551.
- Tunquist, B. J., Maller, J. L. 2003. Under arrest: cytostatic factor (CSF)-mediated metaphase arrest in vertebrate eggs. *Genes Development*. 17. 683-710.
- Ueki, K., Muramatsu, T., Kincaid, R. L. 1992. Structure and expression of 2 isoforms of the murine calmoduline-dependent protein phosphatase regulatory subunit (calcineurin B). *Biochemical and Biophysical Research Communications*. 187. 537-543.

- Vacek, Z. 2006. Embryologie. Grada Publishing. 256 s. 1633. ISBN: 978-80-247-1267-3.
- Valeyev, N. V., Bates, D. G., Harrison, P. H., Postelethwaite, I., Kotov, N. V. 2008. Elucidating the mechanism of calcium-calmodulin interactions: a structural systems biology approach. *BMC Systems Biology*. 2. 2-48.
- Van den Hurk, R., Abir, R., Telfer, E. E., Bevers, M. M. 2000. Primate and bovine immature oocytes and follicles as source of fertilizable oocytes. *Human Reproduction Update*. 6. 457-474.
- Van den Hurk, R., Bevers, M. M., Beckers, J. F. 1997. In vivo and vitro development of preantral follicles. *Theriogenology*. 47. 73-82.
- Verlhac, M. H., Depennart, H., Maro, B., Coby, M., Clarke, H. J. 1993. MAP kinase becomes stably activated at metaphase and is associated with microtubule organizing center during meiotic maturation of mouse oocytes. *Developmental Biology*. 158. 330-340.
- Viveiros, M. M., O'Brien M., Wigglesworth, K., Eppig, J. J. 2003. Characterization of Protein Kinase C in Mouse Oocytes Throughout Meiotic Maturation and Following Egg Activation. *Biology of Reproduction*. 69. 1494–1499.
- Wang, W. H., Sun, Q. I., Hosoe, M., Shioya, Y., Day, B. N. 1997. Quantified analysis of cortical granule distribution and exocytosis of porcine oocytes during meiotic maturation and activation. *Biology of Reproduction*. 56. 1376-1382.
- Wang, T. R., Yan, L. Y., Yan, J., Lu, C. L., Xia, X., Yin, T. L., Zhu, X. H., Gao, J. M., Ding, T., Hu, W. H. 2014. Basic fibroblast growth factor promotes the development of human ovarian early follicles during grow in vitro. *Human Reproduction*. 29. 568-576.
- Wartenberg, H., Breucker, H., Holstein, A. H., Dvořák, M., Tesařík, J. 1990. Entwicklung der Genitalorgane und Bildung der Gameten. In: Hinrichsen, V. K., Beier, M. H., Breucker, H., Christ, B., Duncker, R. H., Dvořák, M., Gaudecker, B., Dorsche, H. H., Holstein, A. F., Jacob, J. H., Jacob, M., Jorch, G., Kaufmann, P., Kostkovic, I., Prindull, G., Seidl, W.,

Steding, G., Tesářík, J., Wartenberg, H. (eds). Humanembryologie. Springer Berlin Heidelberg. Berlin. p. 745-822. ISBN: 978-3-622-07815-0.

Wassarman, P. M. 1988. The mammalian ovum. In Knobil E., Neil J. The physiology of reproduction. New York. Raven Press. 70 –102.

Wassarman, P. M. 2008. Zona pellucida glycoproteins. The Journal of biological chemistry. 283. 24285–24289.

Wassarman, P. M., Liu, C., Chen, J., Qi, H., Litscher, E. S. 1998. Ovarian development in mice bearing homozygous or heterozygous null mutations in zona pellucida glykoprotein gene mZP3. Histology and Histopathology. 13. 293-300.

Wickramasinghe, D., Ebert, K. M., Albertini, D. F. 1991. Meiotic competence acquisition is associated with the appearance of M-phase characteristics in growing mouse oocytes. Developmental Biology. 143. 162-72.

Zhao, G., Jeoung, N. H., Burgess, S. C., Rosaaen-Stowe, K. A., Inagaki, T., Latif, S., Shelton, J. M., McAnally, J., Bassel-Duby, R., Harris, R. A., Richardson, J. A., Kliewer, S. A. Overexpression of pyruvate dehydrogenase kinase 4 in heart perturbs metabolism and exacerbates calcineurin-induced cardiomyopathy. Am J Physiol Heart Circ Physiol. 294. 936-943.

Zhao, W., Zhang, J., LU, Y., Wang, R. 2001. The vasorelaxant effect of H₂S as a novel endogenous K(ATP) channel opener. EMBO. J. 20. 6008-6016.

Zhu, X. Y., Hang, G., Xin, N. 2011. Hydrogen sulfide in the endocrine and reproductive systems. Expert Review of Clinical Pharmacology. 4. 75-82.

Zuccotti, M., Merico, V., Cecconi, S., Redi, C. A., Garagna, S. 2011. What does it take to make a developmentally competent mammalian egg? Human Reproduction. 17. 525-540.