

**Česká zemědělská univerzita v Praze**

**Fakulta agrobiologie, potravinových a přírodních zdrojů**

**Katedra veterinárních disciplín**



**Stanovení vybraných proliferačních markerů a receptorů gonadotropních hormonů v oocyty obklopujících buňkách**

**Diplomová práce**

**Bc. Tereza Lodeová**

**Reprodukční biotechnologie**

**doc. Ing. Eva Chmelíková, Ph.D.**

© 2019 ČZU v Praze

## **Čestné prohlášení**

Prohlašuji, že svou diplomovou práci „Stanovení vybraných proliferačních markerů a receptorů gonadotropních hormonů v oocyty obklopujících buňkách“ jsem vypracovala samostatně pod vedením vedoucího diplomové práce a s použitím odborné literatury a dalších informačních zdrojů, které jsou citovány v práci a uvedeny v seznamu literatury na konci práce. Jako autorka uvedené diplomové práce dále prohlašuji, že jsem v souvislosti s jejím vytvořením neporušila autorská práva třetích osob.

V Praze dne 12. dubna 2019

---

## **Poděkování**

Ráda bych touto cestou poděkovala vedoucí diplomové práce doc. Ing. Evě Chmelíkové, Ph.D. za odbornou pomoc, ochotu a vstřícnost při sepisování této práce.

# **Stanovení vybraných proliferačních markerů a receptorů gonadotropních hormonů v oocyty obklopujících buňkách**

## **Souhrn**

V této práci byla studována exprese receptorů gonadotropních hormonů a proliferačních markerů v kumulárních buňkách člověka a prasete. Zaměřili jsme se na detekci receptorů pro folikulostimulační a luteinizační hormon a detekci proliferačního markeru CD71 transferin R.

V obou typech kumulárních buněk jsme detekovali receptor pro FSH. Síla signálu reakce antigenu s protilátkou proti FSHR na blotu byla vyjádřena na základě parametru integrované optické denzity (IOD), která je rovna součinu průměrné optické denzity a plochy v místě reakce antigenu s protilátkou. Aby bylo možné posuzovat množství proteinu v kumulárních buňkách, byly hodnoty integrované optické denzity vztaženy k hodnotě integrované optické denzity proteinu tubulinu v příslušném typu kumulárních buněk. Porovnávány byly vždy denzity proteinů na stejném blotu. Tubulin byl zvolen jako referenční protein, protože se vyskytuje ve všech eukaryotických buňkách. V porovnání s tubulínem se v kumulárních buňkách člověka i prasete vyskytuje vyšší množství proteinu FSHR.

Dále bylo naším cílem v kumulárních buňkách člověka a prasete detekovat receptor pro luteinizační hormon. Podle doporučení výrobce byla použita primární králičí protilátka v koncentraci 1:2000. Po aplikaci chemiluminiscenčního substrátu a vyvolání přístrojem Azure c600 nebyl detekován žádný signál. Koncentraci použité protilátky jsme nejprve zdvojnásobili, později jsme koncentraci ještě upravili na 1:500, ale hledaný protein o molekulové hmotnosti 85 kDa se nám detekovat nepodařilo. Pro další experimenty bude vhodné zvolit protilátku od jiného výrobce s vyšší specifitou nebo změnit systém detekce proteinu.

Dále jsme studovali expresi transferinového receptoru CD71. Hledaný protein se nám podařilo detekovat ve vzorcích obou typů kumulárních buněk. Síla signálu reakce antigenu s protilátkou proti CD71 receptoru na blotu byla stejně jako v případě FSHR vyjádřena na základě parametru integrované optické denzity a pro porovnání množství byly hodnoty IOD CD71 R vztaženy k hodnotě IOD tubulinu. V porovnání s tubulínem se v kumulárních buňkách člověka i prasete vyskytuje nižší množství CD71 R.

V další fázi experimentů budou kumulární buňky člověka a prasete kultivovány. Během kultivace bude sledován jejich vývoj, proliferační aktivita a viabilita. Následně budou jednotlivé subpopulace buněk hodnoceny z hlediska jejich proliferace a diferenciaci. Pro tento postup bude využito stanovení charakteristických mezenchymových markerů, jako jsou proteiny CD29 B1 integrin, či CD44 nebo CD 105 endoglin a také výše detekované markery proliferace jako je CD71 transferin R a receptory pro gonadotropní hormony.

**Klíčová slova:** Člověk; prase; markery proliferace; receptory gonadotropních hormonů; detekce proteinů; Western blot.

# **Chosen proliferation markers and gonadotropin hormones receptors determination in oocytes surrounding cells**

## **Summary**

In this thesis the expression of gonadotropic hormones receptors and proliferative markers were studied in human and porcine cumulus cells. We focused on the detection of follicle-stimulating and luteinizing hormone receptors, and the detection of the proliferation marker CD71 transferrin R.

We detected receptors for FSH in both types of cumulus cells. The antigen response signal to anti-FSHR antibody on the blot was expressed on the basis of the integrated optical density parameter (IOD) which is equal to the product of the average optical density and the area at the antigen-antibody response. In order to assess the amount of protein in cumulus cells, the integrated optical density values were compared to the integrated optical density of the tubulin protein in the respective type of cumulus cells. Protein densities on the same blot were always compared. Tubulin had been selected as a reference protein because it occurs in all types of eukaryotic cells. Compared to tubulin, there is a higher amount of FSHR in human and porcine cumulus cells.

Furthermore, our goal was to detect the luteinizing hormone receptor in human and porcine cumulus cells. According to recommendations of the manufacturer, a rabbit primary antibody at a ratio 1:2000 was used. After application of the chemiluminescent substrate and induction with Azure c600 no signal was detected. At first we doubled the concentration of the primary antibody used, and later we adjusted the concentration to 1:500, but the 85 kDa protein of interest was not detected. For further experiments, it would be appropriate to select the antibody with a higher specificity or to change the protein detection system.

We also studied the transferrin receptor expression, CD71. We detected the protein in samples of both types of cumulus cells. The signal response strength of the antigen with the anti-CD71 receptor antibody on the blot was, as in the case of FSHR, expressed on the basis of the integrated optical density parameter, and the IOD of CD71 R values were referenced to the IOD value of tubulin for comparison. Compared to tubulin, there is a lower amount of CD71 R in both human and pig cumulus cells.

In the next phase of the experiments, the human and porcine cumulus cells will be cultured. During cultivation, the cell's development, proliferation activity, and viability will be monitored. Subsequently, individual cell subpopulations will be evaluated for their

proliferation and differentiation. For this procedure, determination of characteristic mesenchymal markers, such as endoglin CD29 B1 integrin or CD44 or CD105 proteins, as well as the proliferation markers detected above, such as CD71 transferrin R and gonadotropic receptors, will be utilized.

**Keywords:** Human; pig; proliferation markers; gonadotropic hormone receptors; protein detection; Western blotting.

# Obsah

<b>1</b>	<b>Úvod .....</b>	<b>1</b>
<b>2</b>	<b>Cíl práce.....</b>	<b>2</b>
<b>3</b>	<b>Literární rešerše.....</b>	<b>3</b>
<b>3.1</b>	<b>Oogeneze .....</b>	<b>3</b>
<b>3.2</b>	<b>Folikulogeneze .....</b>	<b>8</b>
<b>3.3</b>	<b>Kumulární buňky.....</b>	<b>9</b>
<b>3.4</b>	<b>Expanze kumulu.....</b>	<b>11</b>
<b>3.5</b>	<b>Faktory regulující oocyt .....</b>	<b>13</b>
<b>3.6</b>	<b>Mezenchymové markery .....</b>	<b>21</b>
3.6.1	CD29.....	21
3.6.2	CD44.....	22
3.6.3	CD105.....	23
<b>3.7</b>	<b>Gonadotropní hormony .....</b>	<b>24</b>
3.7.1	Receptory gonadotropinů - LHR a FSHR.....	25
<b>3.8</b>	<b>Transferin .....</b>	<b>27</b>
3.8.1	Transferinový receptor.....	28
<b>4</b>	<b>Metodika .....</b>	<b>30</b>
<b>4.1</b>	<b>Příprava vzorků kumulárních buněk člověka a prasete .....</b>	<b>30</b>
<b>4.2</b>	<b>Stanovení exprese proliferačních markerů a receptorů gonadotropních hormonů .....</b>	<b>30</b>
4.2.1	Elektroforetická separace proteinů .....	30
4.2.2	Western blot.....	32
<b>4.3</b>	<b>Imunodetekce proteinů ve vzorcích kumulárních buněk člověka a prasete .....</b>	<b>33</b>
<b>4.4</b>	<b>Vyhodnocení experimentu.....</b>	<b>34</b>
<b>5</b>	<b>Výsledky.....</b>	<b>35</b>
<b>5.1</b>	<b>Expresce receptorů gonadotropních hormonů ve vzorcích kumulárních buněk.....</b>	<b>36</b>
5.1.1	Expresce FSHR.....	36
5.1.2	Expresce LHR.....	38
<b>5.2</b>	<b>Expresce transferinového receptoru .....</b>	<b>38</b>
<b>6</b>	<b>Diskuze .....</b>	<b>41</b>
<b>7</b>	<b>Závěr .....</b>	<b>43</b>
<b>9</b>	<b>Literatura.....</b>	<b>44</b>



# 1 Úvod

V oblasti asistované reprodukce člověka je stále velké množství nevyjasněných otázek, jejichž zodpovězení může významně ovlivnit proces získávání pohlavních buněk, jejich zrání, oplození a následný embryonální vývoj. Současný systém v České republice neumožňuje jakékoliv invazivní analýzy vývoje lidského zárodku, a to ani pokud se jedná o embrya přebytečná. Veškeré znalosti získané o dané problematice proto přichází výhradně ze studií zaměřených na oocyty a embrya experimentálních zvířat, nejčastěji hlodavců. Je však známo, že řada regulačních mechanismů významných například pro meiotické zrání a oplození se mezi člověkem a hlodavci významně liší. Z tohoto důvodu jsou hledány nové modelové organizmy, jako je například prase. Výsledky týkající se reprodukce jsou z prasete mnohem snadněji extrapolovatelné na člověka, než je tomu u laboratorní myši a potkana.

Z důvodu toho, že legislativní normy neumožňují práci s lidskými oocyty, je významné studovat buňky, které jsou s oocyty v těsném kontaktu, což jsou buňky folikulární. Současné systémy využívající lidských i zvířecích folikulárních buněk nejsou však dostatečně efektivní. Optimalizace kultivačních systémů pro lidské i zvířecí folikulární buňky a jejich účelné využití jako modelové linie je cesta, jak rozvíjet metody asistované reprodukce.

Prvním krokem k naplnění tohoto cíle je buňky obklopující oocyty dostatečně poznat.

## **2 Cíl práce**

Cílem diplomové práce bylo stanovit expresi vybraných proliferačních markerů a receptorů gonadotropních hormonů v oocyty obklopujících buňkách člověka a prasete. Detekce markerů byla provedena ve vzorcích oocyty obklopujících buněk metodou Western blotting.

## 3 Literární rešerše

### 3.1 Oogeneze

Oogeneze je soubor evolučních mechanismů, jejichž výsledkem je vznik oocyty, samičí pohlavní buňky. Oocyty vznikají z kmenových buněk, tzv. primordiálních zárodečných buněk (PGCs – Primordial Germ Cells), které mají extragonadální původ.

Oogenezi lze rozdělit do tří fází – množení, růstu a zrání (Picton et al. 1998).

#### Fáze množení

Pro fázi množení je typické opakované mitotické dělení diploidních zárodečných buněk, lokalizovaných v zárodečné vrstvě na povrchu gonád. Mitotickou aktivitou primordiálních gonocytů se vytvářejí provazce diploidních oogonií, které pronikají hlouběji do kortexu ovária. Oogonie se poté oddělují od společného provazce, obklopují se vstvou buněk a tím vznikají primordiální folikuly (Briggs et al. 1999).

Oogeneze je zahájena v průběhu časného embryonálního vývoje seskupením PGCs ve žloutkovém váčku endodermu v zadní části střeva embrya. Poté dochází k jejich migraci, ta probíhá zprvu pasivně, poté améboidním pohybem, podél dorsálního mesenteria genitální lišty na klenbě coelomu do místa budoucích gonád. Zde je postupně kolonizována celá genitální lišta. K celému migračnímu procesu dopomáhají chemotaktické substance jako je transformující růstový faktor  $\beta 1$  a jiné intracelulární signální molekuly, ale je ovlivněn také působením extracelulární matrix, ve které se mění distribuce kolagenu IV, fibronektinu a lamininu (Wassarman & Albertini 1994; Picton 2001; Vanderhyden 2002). Postup PGCs řídí růstové faktory a jejich signalizace je vedena přes tyrokinázové receptory, popřípadě i receptory spřažené s G-proteiny. Pohyb PGCs do zárodečné rýhy také ovlivňuje C-kit ligand, který tvoří somatické buňky v oblasti migrace PGCs (Hutt et al. 2006; Moore et al. 2008).

Když PGCs dosáhnou povrchu epitelu gonád, vstupují společně s podpůrnými epitelovými buňkami do korové vrstvy vaječnicků, kde tak vytvářejí základ pro kortikální gonadální provazce. V místě budoucích vaječnicků ztrácejí PGCs motilitu a od chvíle, kdy dochází k jejich intenzivnímu mitotickému dělení, jsou tyto buňky označovány jako oogonie (Wassarman & Albertini 1994, Gosden & Bownes 1995). Oogonie spolu vzájemně

komunikují pomocí mezibuněčných spojů (*gap junctions*) a dezmozómů, čímž je umožněn přenos aminokyselin, metabolitů, nukleotidů a dalších látek (Eppig 1991). Oogonie tímto způsobem komunikují i s přilehlými somatickými buňkami, čímž je ovlivněno jejich dělení a degenerativní procesy. Toto spojení buněk pomocí mezibuněčných spojů je pouze dočasné a je přerušeno až ukončenou cytokinezí oogonií (Guraya 2000).

Dle původního dogmatu se tvrdilo, že k množení PGCs dochází pouze v prenatálním období samičího vývoje, poté ztrácejí svou schopnost dělení a apoptózou či nekrózou dochází už jen k jejich postupnému ubývání a tím jsou tedy veškerým zdrojem dospělých zárodečných buněk pouze ty buňky, které vznikly během embryonálního vývoje (Wassarman 1988; Picton et al. 1998). Bylo potvrzeno, že toto dogma je mylné. Ve vaječnicích dospělých samic myši byly objeveny specifické buňky s mitotickou aktivitou, které se svými vlastnostmi podobají PGCs. Následně bylo také potvrzeno, že zásobárnou pro budoucí oocyty může být také kostní dřev (Johnson et al. 2004; Johnson et al. 2005). Přítomnost těchto mitoticky aktivních buněk byla následně prokázána i u lidí (Bukovsky 2005).

### **Fáze růstu**

Po skončení fáze množení, nastává fáze růstu, kdy je oocyt zastaven v I. meiotickém bloku. Růstová fáze oocyty představuje řadu modifikací v množství, struktuře a rozložení jeho organel, stejně jako period transkripce, které jsou nezbytné k dosažení meiotické a vývojové kompetence (Luciano et al. 2012).

Tím, jak oocyty rostou, zvětšují svůj průměr a dochází k přerozdělování cytoplasmatických organel a také se objevuje periviteliní prostor, kdy organely, jako jsou mitochondrie, Golgiho aparát, kortikální granula a jádro, migrují na více periferní polohu (Fair 2003).

Během růstové fáze dochází k zvyšování absolutního počtu ribozomů, jejichž koncentrace ale v důsledku rostoucího objemu cytoplasmy naopak klesá. S měnící se strukturou jádérka, v němž se vytvářejí fibrilární centra, začíná syntéza RNA. Zvyšuje se aktivita RNA-polymerázy, probíhá transkripce a tím se i zvyšuje množství RNA v oocyty. Syntéza RNA a její hromadění jsou nezbytné pro proteosyntézu. Dále jsou během této fáze intenzivně syntetizovány zonální glykoproteiny, proteiny kortikálních granul a histony (Wassarman 1988; Wassarman & Albertini 1994).

Také se v této době vytváří Balbianiho žloutkové jádro, což je shluk organel buňky, který se nachází poblíž cytoplasmy nedaleko od jádra. V rostoucím oocytu se Balbianiho žloutkové jádro rozšiřuje k periferii, kde se rozkládá na nepravidelné části (Guraya 2008).

### **Fáze zrání**

Změny, které probíhají při zrání oocytu, jej připravují na budoucí fertilizaci, iniciaci a zahájení embryonálního vývoje. Zrání oocytu je spojeno se získáním meiotické kompetence, neboli schopnosti prodělat jak zrání jaderné, tak i cytoplasmatické a genomické. (Opiela & Katska-Ksiazkiewicz 2004)

V této fázi vývoje dochází k obnovení prvního meiotického dělení a vstoupení do II. meiotického bloku a přípravě oocytu na oplození. Pouze oocyty na konci růstové fáze a meioticky kompetentní jsou schopné reagovat na hormonální stimulaci a vystoupit z druhého meiotického bloku (Marteil et al. 2009).

Vystoupení z prvního meiotického bloku je iniciováno zvýšením koncentrace luteinizačního hormonu nebo vyjmutím oocytu z antrálního folikulu, čímž dojde ke spontánnímu meiotickému zrání. Zrání oocytu je zcela závislé na vzájemné komunikaci mezi oocytem a folikulárními buňkami a celý tento proces je pod kontrolou gonadotropních hormonů (Torner et al. 1998; Kanitz et al. 2001).

### **Jaderné zrání**

Do zrací fáze oocyty vstupují v profázi prvního meiotického dělení ve stádiu zárodečného váčku neboli germinal vesicle stage (GV), kde je jádro tvořené jadernou membránou a jadérkem, které obklopuje rozptýlený chromatin. Při vstupu do této fáze dochází k rozpadu zárodečného váčku v procesu zvaném germinal vesicle break down (GVBD) (Torner et al. 1998; Kanitz et al. 2001).

Během jaderného zrání nastávají změny na chromatinu během rozpadu zárodečného váčku. Původně se mělo za to, že rozpad zárodečného váčku je způsoben MPF (Metaphase Promoting Factor), nicméně později bylo prokázáno, že MPF je univerzálním regulátorem pro vstup do metafáze II a je v oocytu přítomen ještě před GVBD. Jeho hladina se snižuje po konci první meiotické fáze a zase se zvyšuje se začátkem druhé (Wang et al. 2007).

Jaderné zrání je možno rozdělit do 5 fází, fáze GV 0 – GV IV. Ve fázi GV 0 je chromatin lokalizován po celém GV, je to stádium intaktního GV. Pro fázi GV I je charakteristický chromatin, který zaujímá podobu koňské podkovy okolo jadérka. GV II je první fází rozpadu zárodečného váčku, chromatin je zde stále přítomen v podobě prstýnku či podkovy. Ve fázi GV III chromatin vytváří shluky či sítě filament, které jsou rozptýleny po celém jádře, jaderná membrána je stále pozorovatelná. Ve fázi GV IV je jadérko již nepozorovatelné a jaderná membrána je rozptýlena do membránových fragmentů, které jsou spojeny s endoplasmatickým retikulem. V této fázi je pozorovatelné dělicí vřeténko s chromozomy (Lucas et al. 2002).

### **Cytoplasmatické zrání**

Ve vývoji meiotické kompetence oocyty má cytoplasmatické zrání velmi důležitou roli. V této fázi dochází k přerozdělení organel, cytoskeletární dynamice a molekulárnímu zrání (Marteil et al. 2009).

Komplex událostí během zrání oocyty nezávisí pouze na správné dynamice chromozomální separace, ale také na redistribuci cytoplasmatických organel a uložení mRNA, proteinů a transkripčních faktorů, které jsou potřebné v dalších procesech. Jedná se o specifický proces hromadění substrátů a živin, které jsou nezbytné pro dosažení vývojové kompetence oocyty. Transkripty a proteiny, jež jsou uloženy v cytoplasmě oocytů, jsou důležité při procesu zrání (Sirard et al. 2006; Ferreira et al. 2009).

### Přerozdělení organel oocyty

Během zrání oocyty je možné pozorovat několik ultrastrukturálních změn, které se týkají především morfologie a rozdělení cytoplasmatických organel. Během jednotlivých fází vývoje dochází k distribuci organel pomocí mikrotubulů a mikrofilament v závislosti na momentálních potřebách buňky (Ferreira et al. 2009).

Během přerozdělování vnitrobuněčných organel dochází k přesunu mitochondrií, ribozomů, endoplasmatického retikula, Golgiho komplexu a kortikálních granul. Mitochondrie jsou klíčovou součástí metabolických dějů zodpovědných za přísun energie během procesu zrání, proto je mitochondriální systém jedním z nejdůležitějších ukazatelů

cytoplazmatické zralosti oocyty, jelikož je důležitý pro produkci ATP, ale také pro regulaci apoptózy a homeostázy vápníku (Stojkovic et al. 2001; Sun et al. 2001; Sato et al. 2014).

Ve zralém oocyty jsou mitochondrie ve velkém počtu, to souvisí s budoucími nároky na zrání. U oocytů s dostatečným stupněm zrání se ložiska mitochondrií přesouvají nejdříve z periferních částí cytoplazmy do ostatních, s meiotickou kompetencí lze pozorovat přesun mitochondrií až kolem jádra (Ferreira et al. 2009).

Důležitou roli v maturačním procesu má také endoplazmatické retikulum, ve kterém dochází ke skládání a degradaci proteinů a metabolismu lipidů. Účastní se také intracelulární regulace vápenatých iontů a je jejich hlavní endogenní zásobárnou, díky čemuž má podstatnou roli při aktivaci oocyty během fertilizace. Nacházejí se zde také receptory pro inositol-3-fosfát (IP3) a ryanodinové receptory (RYR), které zprostředkovávají vypuštění vápenatých iontů. Pro správnou funkci regulace intracelulárního vápníku jsou důležité biochemické a strukturální změny v endoplazmatickém retikulu během zrání (Mehlmann et al. 1995; Ferreira et al. 2009).

K formování kortikálních granul dochází díky hypertrofické a proliferační činnosti Golgiho komplexu (Gulyas 1979; Guraya 1982). Kortikální granula, která byla rozptýlena po celé cytoplazmě, se během zrání postupně přesouvají do kůry oocyty (Marteil et al. 2009).

### Dynamika cytoskeletálních filament

Cytoskeletální filamenta jsou dynamické a adaptabilní struktury, které mohou prodělat potřebné změny nebo zůstat nezměněné. Jsou zodpovědné také za segregaci chromozomů během mitózy i meiózy, dělení buňky během cytokineze a za přesun molekul a organel uvnitř buňky (Alberts et al. 2002). Cytoskelet se skládá z mikrotubulů a aktinových vláken, což jsou polymery lobulárních podjednotek,  $\alpha$  -  $\beta$  tubulin a G - aktin. Dále se mezi ně řadí intermediální filamenta, která jsou složena z tetrameru fibrózních polypeptidů (Marteil et al. 2009).

### Molekulární zrání

V době mezi začátkem jaderného zrání a aktivací embryonálního genomu nedochází k žádné genové transkripci. Proteiny, popřípadě jejich mRNA, které jsou potřeba k regulaci jaderného zrání, fertilizaci, formování prvojader a časnému embryonálnímu vývoji, jsou

uskladněny v oocytu během oogeneze ve stabilní inaktivní formě až do doby, než mohou být vhodně využity (Sirard 2001; Marteil et al. 2009).

### 3.2 Folikulogeneze

Primordiální folikuly, skládající se z oogonie a několika plochých pregranulózních buněk, lze nalézt již prenatálně, kdy dochází k obklopení oogonií somatickými buňkami. Ty zůstávají v klidovém stádiu po různě dlouhou dobu, dokud nejsou stimulovány k dalšímu růstu (Hafez & Hafez 2000).

Změna morfologie granulózních buněk z plochých na kubické je známkou aktivace folikulů a v tomto stádiu folikuly označujeme jako primární, zároveň také meiózou dochází k změně oogonie na oocyt prvního řádu. Oocyty zůstávají v I. meiotickém bloku, ve fázi diplotene profáze I. a jejich následný vývoj je spojen s folikulárním vývojem (Hafez & Hafez 2000). Od puberty až do senia je z primordiálních folikulů kontinuálně vybíráno malé množství oocytů, které následně vstupuje do růstové fáze (Miyano 2005). Když je folikul vybrán, v oocytu dojde k zahájení transkripce a translace a tento stav je udržován tak dlouho, dokud oocyt nedosáhne své konečné velikosti (Gosden 2002).

Postupným dělením granulózních buněk primárního folikulu se vytváří několik vrstev buněk, čímž se formuje sekundární (preantrální) folikul (Krisher 2013). V tuto chvíli vstupuje oocyt do rozsáhlé růstové fáze, která je typická vysokou proliferační aktivitou granulózních buněk. (Picton et al. 1998). V tomto stádiu se u folikulu vytváří théka, která společně s granulózními buňkami produkuje hormony a podporuje růst oocytu (Hafez & Hafez 2000; Krisher 2013). Tu lze rozdělit na *theca folliculi interna*, která je oddělena od granulózních buněk bazální membránou a vzniká přeměnou z vazivových buněk, a na *theca folliculi externa*, která se skládá z hustě uspořádaného vaziva, kde se nacházejí především kolagenní vlákna (Wassarman 1988). *Theca folliculi interna* spolu s granulózními buňkami jsou nezbytné pro nabývání meiotické kompetence oocytu, jelikož *theca folliculi interna* je schopna produkovat androgeny v závislosti na vlně luteinizačního hormonu, ty dále vstupují do granulózních buněk a působením enzymu cyp19 aromatázy se přeměňují na estrogeny (Vanderhyden 2002).



V tomto období je důležitá komunikace mezi oocytem a granulózními buňkami, která je zabezpečována pomocí mezibuněčných spojů, tzv. gap junctions. Tyto spoje umožňují výměnu živin, metabolických prekurzorů, informačních molekul a informačních a inhibičních faktorů, jež jsou nezbytné pro indukci a regulaci diferenciací folikulárních oddílů z určité vývojové fáze na další (Smith 2001; Van den Hurk & Zhao 2005).

Oocyt mezitím vystupuje z prvního meiotického bloku a dokončuje tak I. meiotické dělení. Jeho zrání je ovšem opět zastaveno ve II. meiotickém bloku, v metafázi II., přičemž druhé meiotické dělení je dokončeno, pouze pokud dojde k oplození (Ohashi et al. 2013).

Následuje přeměna v terciární (antrální) folikul, často také označovaný jako Graafův, pro který je typická tvorba velké dutiny naplněné antrální tekutinou s vejconosným hrbolkem, *cumulus oophorus*, jenž je tvořen granulózními buňkami (Epping 2001; Miyano 2005).

### 3.3 Kumulární buňky

V poslední fázi folikulárního cyklu se folikulární buňky formují a dávají vznik struktuře tzv. *cumulus oophorus*. Tento útvar se skládá z tisíce buněk, které jsou vzájemně propojeny sítí gap junctions a následně, po fyziologické ovulační stimulaci luteinizačním hormonem (LH), rozsáhlou extracelulární matrix. Preovulační ukládání kumulární matrix způsobuje charakteristické zvětšení objemu komplexu kumulus-oocyt (COC) a disociaci COC ze stěny folikulu, doprovázené obnovením meiózy oocyty, která je charakterizována rozpadem zárodečného váčku a vydělením prvního pólového tělíska. Zároveň tato vlna LH stimuluje aktivní steroidogenezi, prostaglandin/leukotrien syntézu a sekreci matrix-degradující proteázy v murálních buňkách a thékálních buňkách a přispívá ke změnám v permeabilitě folikulo-krevní bariéry, které vedou k akumulaci folikulární tekutiny a zvýšení intrafolikulárního tlaku. V důsledku těchto změn dochází k narušení kumulo-oocytárního komplexu. *Cumulus oophorus* má velmi důležitou roli při vývoji oocytů, ovulaci a fertilizaci (Zhuo & Kimata 2001).

Kumulární a granulózní buňky mají stejný základ, ale mají jinou funkci a hormonální vnímavost. Granulózní buňky lze rozdělit do tří podskupin dle jejich hormonální vnímavosti a genové exprese. Prvním typem jsou murální granulózní buňky, které obklopují folikulární stěnu a často jsou v kontaktu s folikulární bazální membránou. Druhým typem jsou antrální

granulózní buňky, které obklopují antrální dutinu. Posledním typem jsou kumulární buňky, které jsou v přímém kontaktu s oocytem pomocí buněčných projekcí (projections), které procházejí přes vrstvu *zona pellucida* a formují zde gap junction spoje s oocytární plasmatickou membránou (Winterhager & Kidder 2015).

Na kumulární buňky mají specifický vliv morfogeny produkované oocyty, konkrétně Growth and Differentiation Factor 9 (GDF9) a Bone Morphogenic Protein 15 (BMP15). Tyto dva specifické oocytární růstové faktory indukují v kumulárních buňkách expresi genů, které zahrnují především supresi receptoru na luteinizační hormon (LHR) a expresi progesteronového receptoru, což zabraňuje reakci kumulárních buněk na endokrinní stimuly granulózniích buněk (Eppig et al. 1997; Elvin et al. 1999).

GDF9 a BMP15 aktivují expresi klíčových kumulo-specifických genů, jako jsou glykolytické enzymy a enzymy syntézy cholesterolu, které jsou zásadními mediátory pro správné fungování oocytů (Siguirra et al. 2007; Su et al. 2008; Peng et al. 2013).

Pro přežití oocytů a jejich správný rozvoj je těsné spojení s kumulárními buňkami velmi důležité. Dokonce i v posledních hodinách dozrávání oocytu může disociace kumulárního pláště (vestment) závažně ovlivnit jejich kompetenci (Zhang et al. 2008). Kumulární buňky přímo komunikují s oocytem pomocí dlouhých transzonálních výstupků (projections) s koncovými gap junctions spojujícími oocyt s kumulem (Winterhager & Kidder 2015). Tyto gap junctions spoje umožňují transport malých molekul (~ 1 kDA) mezi oocytem a cytoplasmou kumulárních buněk (Edry et al. 2006; Sela-Abramivich et al. 2006). Endogenní molekuly transportované z kumulárních buněk do oocytů zahrnují metabolity glukózy, laktát a pyruvát, ATP, cAMP a cGMP.

Transport těchto látek je důležitý, jelikož oocyt není schopen samostatně metabolizovat glukózu a je tedy zcela závislý na kumulárních buňkách, které glukózu rozštěpí a poté produkty této reakce dopraví do oocytu, kde jsou využity mitochondriemi jako zdroj energie (Johnson et al. 2007). Cyklické nukleotidy cAMP a cGMP jsou významnými regulátory pro zastavení meiózy oocytů (Russel et al. 2016).

Kumulární buňky také zajišťují oocyty ochranu před zánikem způsobeným zvýšením reaktivních kyslíkových radikálů prostřednictvím přenosu antioxidantu glutathionu přes gap junctions (Ozawa et al. 2010).

Kumulární buňky spolu s granulózniimi hrají významnou roli ve vývoji oocytu během meiózy. Oocyty jsou schopny opustit meiotický blok až po aktivaci metaphase protomiting factoru (MPF) (Eppig et al. 1997).

Matrix cumulu oophoru je bohatá na hyaluronan, který je sekretován kumulárními buňkami. Například u myši je syntéza hyaluronanu poprvé detekovatelná po 2 - 3 hodinách po stimulaci gonadotropiny, maximálních hodnot dosahuje během 4 - 10 hodin a klesá po 18 hodinách (Tirone et al. 1997). V plně expandovaném cumulu oophoru je koncentrace hyaluronanu 0,5 - 1 mg/ml, a tak tvoří převládající složku matrix poskytující viskoelastickou vlastnost struktury cumulu oophoru. Syntéza hyaluronanu je časově přísně regulována úrovní transkripce hyaluronan syntázy 2 (HAS2), jelikož časový rámec exprese HAS2 mRNA koreluje s hyaluronan syntézou. Zpočátku chybějící mRNA se v kumulu objevuje během jedné hodiny po nárůstu gonadotropinu před začátkem hyaluronan syntézy a znovu ustává v době, kdy se syntéza hyaluronanu snižuje (Fulop et al. 1997).

Důležitými komponenty matrix cumulu oophoru jsou proteoglykany a proteiny sekretované kumulárními a murálními granulózními buňkami. Glykosaminoglykany v těchto proteoglykanech zahrnují chondroitin sulfát, dermatan sulfát a heparan-like substance (Salustri et al. 1999).

### **3.4 Expanze kumulu**

Kumulární expanze je závislá na syntéze glykosaminoglykanu bohatého na hyaluronovou kyselinu v extracelulárním prostoru, kde má významnou roli jako strukturální složka expandovaného kumulu a signální molekula regulující zrání oocytů. Správný počet vrstev kumulárních buněk a adekvátní produkce hyaluronové kyseliny zajišťuje kumulární expanzi, která je klíčová pro úspěšné zrání oocyty, fertilizaci a časný embryonální vývoj (Chen et al. 1993; Tirone et al. 1993; Kimura et al. 2002; Han et al. 2006; Yokoo et al. 2010).

Kumulo-oocytární komplex je tvořen jednotlivými oocyty a sousedními buňkami. Současně s růstem folikulů rostou uvnitř nich i samotné oocyty (Marchal et al. 2002). Současně se zráním oocytů uvnitř folikulů dochází v kumulárních buňkách k syntéze strukturálních komponentů extracelulární matrix, což umožňuje následnou expanzi kumulu (Dekel et al. 1979; Eppig 1979).

Kumulární expanze nastává bezprostředně před ovulací a dochází k ní i během *in vitro* zrání. Expanze kumulu závisí na syntéze extracelulární hmoty složené z proteoglykanů. Proteoglykany jsou tvořené membránovými proteiny a glykosaminoglykany (GAGs)

kumulárních buněk. Běžnými GAGs u živočichů jsou kyselina hyaluronová, chondroitin sulfát, keratan sulfát a heparan sulfát (Murray Jr. et al. 2003). Kyselina hyaluronová je nejhojněji zastoupená složka extracelulární matrix v expandovaném kumulu (Chen et al. 1990; Nakayama et al. 1996).

Kumulární expanze usnadňuje uvolnění kumulo-oocytárního komplexu ze stěny folikulu, jeho uvolnění při ovulaci a zachycení nálevkou vejcovodu a je nezbytná pro úspěšné oplodnění a vývoj zygoty (Vanderhyden & Armstrong 1989; Chen et al. 1993). Kumulární expanze způsobuje přerušení gap junctions spojů, následkem čehož není oocyt schopen přijímat inhibiční molekuly z kumulárních buněk, a tak dochází k opětovnému zahájení meiózy (Šutovský et al. 1994).

Na regulaci kumulární expanze se významně podílí preovulační vlna LH a také růstový diferenciací faktor 9 (GDF9) (Elvin et al. 1999), jehož působení je pozorováno během celého folikulárního vývoje (Richards et al. 2002). GDF9 vyvolává sekreci hyaluronové kyseliny kumulárními buňkami a také indukuje cyklooxygenázu 2, která je důležitá pro syntézu prostaglandinu E2, jenž se váže na prostaglandin E2 receptory (COX-2). Dále GDF9 potlačuje produkci plasminogenového aktivátoru urokinázového typu (uPA) v granulózních buňkách (Elvin et al. 1999; Richards et al. 2002). Plasminogenové aktivátory (PA) jsou serinové proteázy štěpící plazminogen na aktivní proteázový plazmin. Tyto enzymy se zapojují do přestavby extracelulární matrix v různých tkáních včetně vaječnicků. UPA jsou zodpovědné za změnu struktury preovulačních folikulů na ovulační (Salustri 2000).

Za stimulaci kumulární expanze oocytem je zodpovědný faktor umožňující expanzi kumulu (CEEF), který produkují granulózní i kumulární buňky. Zatímco produkce CEEF granulózními buňkami plně dorostlého folikulu je zcela závislá na gonagotropní stimulaci, produkce CEEF kumulárními buňkami hormonální stimulaci nevyžaduje a parakrinní signalizace je dostačující (Zhang et al. 2008).

Dalšími faktory, které se podílejí na regulaci kumulární expanze, jsou epidermální růstový faktor (EGF) a růstový faktor podobný inzulinu (IGF) (Němcová et al. 2007). Ve folikulární tekutině se tyto faktory podílí na parakrinní regulaci kumulární expanze a zrání oocytu (Naito et al. 1988).

### 3.5 Faktory regulující oocyt

#### MPF (M-phase Promoting Factor)

MPF se řadí mezi proteinkinázy a je univerzálním buněčným regulátorem mitózy i meiózy, významně se podílí na mitotickém dělení somatických buněk a na meiotickém zrání oocytů. Jedná se o heterodimer, který se skládá z katalytické a regulační podjednotky (Nurse 1990; Stojkovic et al. 1999; Li et al. 2013).

Katalytická podjednotka je tvořena serin/threonin protein kinázou p34<sup>cdc2</sup>(Cdk1 – cyklin-dependentní kináza) z rodiny tyrosinových cyklin - dependentních kináz a regulační podjednotkou je cyklin B (Li et al. 2013). Další součástí komplexu MPF je Greatwall kináza (Dupré et al 2013).

V růstové fázi oocytu je přítomen pre - MPF, což je neaktivní komplex Cdk1/cyklin B. Tento komplex je katalyticky neaktivní v důsledku inhibice fosforylace Cdk1 na threoninu 14 a tyrosinu 15 (Tunquist & Maller 2003), která je řízena aktivitou Wee1/Myt1 kinázou (Jones 2004). Základním kontrolním bodem ke vzniku komplexu pre - MPF je syntéza a degradace cyklinu B. Vytvoření pre - MPF působí na změny hladin cyklinu B a dochází tak po konečné aktivaci komplexu MPF k regulaci fáze buněčného cyklu v průběhu meiózy (Murray & Kirschner 1989; Brunet & Maro 2005). Pro znovuzahájení meiózy je nezbytná aktivace nashromážděného komplexu pre - MPF (Motlík & Kubelka 1990). K aktivaci MPF dochází pomocí Cdc25 fosfatázy, která zapříčiňuje defosforylaci Cdk1. K aktivaci MPF je zapotřebí vysoká aktivita Cdc25 a zároveň nízká aktivita Wee1/Myt1. Během několika hodin po aktivaci MPF pak dochází k zániku zárodečného váčku (Jones 2004).

K poklesu aktivity MPF dochází během meiotického zrání oocytu. Nejdříve se aktivita MPF zvyšuje v metafázi prvního meiotického dělení, nicméně s přechodem z metafáze do anafáze jeho aktivita klesá (Motlík & Kubelka 1990; Jones 2004). Za pokles MPF je zodpovědný komplex podporující anafázi (APC). APC (Anaphase Promoting Complex/Cyclosome) je E3 ubikvitin ligázový komplex, který umožňuje připojení ubikvitinu na cyklin B, který je poté rozeznán a degradován proteazómem (Jones 2004).

V metafázi II dochází k opětovnému zvýšení aktivity MPF prostřednictvím cytostatického faktoru CSF (cytostatic factor). CSF udržuje po celou dobu MPF ve vysoce

aktivním stavu tím, že zabraňuje proteolytické degradaci cyklinu B (Murray & Kirschner 1989; Li et al. 2013).

Během celého buněčného cyklu je hladina Cdk1 stabilní, naproti tomu hladina cyklinu B je kolísavá, což je jednou z možností regulace MPF. MPF je pro správný průběh fáze zrání naprosto nezbytná (Stojkovic et al. 1999).

### **MAP kináza (Mitogen Activated Protein Kinase)**

Mitogeny aktivovaná proteinkináza (MAPK, jinak také ERK – extracellular signal-regulated kinase) patří mezi serin/treonin proteinkinázy a může nabývat několik izoform, z nichž jsou nejčastěji exprimovány izoformy MAPK1 a MAPK2 (Davis 1993). Aktivace MAPK je regulována kaskádou fosforylačních reakcí, kterou zahajuje aktivace MAPKKK (Mos), která poté aktivuje MAPKK (Mek). MAPK je aktivována fosforylací na serinových a treoninových zbytcích. Celá tato kaskáda je řízena prostřednictvím G-proteinů a membránových tyrozin-kináz (Matsuda et al. 1992; Roux & Blenis 2004; Liang et al. 2007)

Aktivace MAP-kinázové kaskády začíná navázáním extracelulárního ligandu na receptor v plasmatické membráně buňky. Jako extracelulární ligandy zde figurují růstové faktory, hormony a cytokiny. Avšak aktivace tzv. stresových MAP kináz může být zapříčiněna některými patologickými procesy, jako např. buněčným stresem, tepelným šokem, osmotickou disbalancí či poškozením DNA (Garrington & Johnson 1999).

Umístění MAPK se během meiotického zrání oocyty dynamicky mění. V rostoucích oocytech jsou neaktivní formy MAP kinázy lokalizovány pouze v cytoplasmě a na začátku zrání fáze se část molekul přesunuje před procesem GVBD do zárodečného váčku (Stojkovic et al. 1999).

V oocytech savců má MAP kináza uplatnění při procesu meiotického zrání. Mezi její funkce patří účast na aktivaci MPF prostřednictvím pozitivní zpětné vazby na translaci cyklinu B a zabránění inhibiční fosforylace cdk2, čímž dochází k udržení její počáteční aktivity. Také se účastní tvorby dělicího vřeténka (Fan et al. 2002; Liang et al. 2007). Dále má významný podíl na regulaci dynamiky mikrotubulů a reguluje velikost a vydělení prvního pólového tělíska (Choi et al. 1996; de Vantéry et al. 1997).

Čas aktivace MAP kinázy je druhově specifický. U savců je MAPK aktivována ve chvíli, kdy probíhá rozpad zárodečného váčku nebo krátce po něm (Inoue et al. 1995; Lee et al. 2000).

## **CSF (Cytostatic Factor)**

Cytostatický faktor (CSF) je komplex proteinů, který potlačuje přechod metafáze II do anafáze II, podílí se tedy na udržení II. meiotického bloku. CSF není pouze jediná molekula či protein, ale je to komplex tvořený z několika typů proteinkináz. Katalytickou součástí CSF je Mos, serin/treonin kináza, produkt proto-onkogenu c-mos. Dalšími proteiny, ze kterých se CSF skládá, jsou MAPK a p90<sup>Rsk</sup> (ribosomální protein S6-kináza) (Albertio et al. 2001; Fan et al. 2002).

Při probíhající metafázi II je aktivita CSF vysoká, nicméně krátce po oplození se jeho aktivita rapidně snižuje. Bylo popsáno, že CSF má také vliv na regulaci zahájení partenogeneze i proces oplození (Schmidt et al. 2006).

CSF má výraznou roli při regulaci aktivity MPF. CSF chrání během druhého meiotického bloku MPF před destrukcí tím, že udržuje APC v neaktivním stavu. Schopnost inhibice APC je důležitou funkcí CSF. Protein p90<sup>Rsk</sup> fosforyluje s MAP kinázou, jejíž aktivita je ovlivněna pomocí Mos, a p90<sup>Rsk</sup> také aktivuje protein Bub1, který pomocí proteinů Mad1 a Mad2 inhibuje APC. APC tedy není schopen degradovat cyklin B v proteazómech, tím pádem hladina MPF neklesá (Yamano et al. 2004; Heytens et al. 2008).

Během fertilizace je naopak důležité, aby hladina MPF klesla natolik, aby byl oocyt schopen dokončit meiózu a zahájit zrání. Vápenaté kationty poté aktivují CaMKII (kalmodulin dependentní kinázu II), enzym citlivý na frekvenci Ca<sup>2+</sup> oscilací. CaMKII přímo aktivuje APC a zároveň také podpoří degradaci CSF, v důsledku čehož se uvolňuje APC. Aktivace APC způsobuje pokles aktivity MPF a zároveň vede k prolomení druhého meiotického bloku. Oscilace vápenatých kationtů zabraňují opětovné aktivitě MPF, a tím se výrazně podílejí na úspěšné aktivaci oocytu (Heytens et al. 2008).

## **OMI (Oocyte maturation inhibitor)**

Inhibitor zrání oocytu (OMI) je nízkomolekulární peptid produkováný granulózními buňkami, který způsobuje, že primární oocyty zůstávají blokovány ve fázi diplotene profázi I a před pubertou nedokončují své první meiotické dělení (Sadler & Langman 2004).

Inhibiční účinek OMI je pravděpodobně do oocytů zprostředkováván přes kumulární buňky pomocí gap junctions spojů, nicméně je pouze jedním z faktorů, jakými jsou například i komunikace mezi oocyty a kumulem, cyklický AMP či steroidy, které kontrolují meiotický proces (Pincus & Enzmann 1935). Hladina OMI je snížena během předovulačního zrání

folikulu. Inhibiční účinek OMI je zřejmě ovlivněn pomocí cAMP, ale stále není zcela jisté, zda je OMI či cAMP do oocyty přenesen jako inhibitor. Jelikož tato inhibice není druhově specifická, je možné pomocí OMI získaného z prasečího oocyty inhibovat meiózu i u oocyty lidského. LH zřejmě umožňuje znovuzahájení meiózy tím, že odstraní inhibiční signál buďto tak, že znemožní další průchod OMI přes gap junction, nebo že zcela zablokuje tvorbu OMI (Tsafiriri et al. 1982; Tsafiriri & Pomerantz 1986; Wassermann 1988).

### **PKC (Protein kinase C)**

Protein kináza C je enzym ze skupiny serin/threonin kináz, který pro svou činnost potřebuje záporně nabitě fosfolipidy. Aktivita PKC je regulována diacylglycerolem (DAG) a také vápenatými kationty (Newton 1995).

Podle struktury je možné jej rozdělit do čtyř skupin. První skupinou je skupina konvenčních PKC, která zahrnuje izoformy PKC- $\alpha$ , PKC- $\beta_1$ , PKC- $\beta_2$  a PKC- $\gamma$ . Všechny izotopy z této skupiny mají vazebné místo pro  $\text{Ca}^{2+}$  i pro DAG, takže pro svou aktivaci vyžadují  $\text{Ca}^{2+}$ , DAG anebo fosfolipidy. Druhou skupinou jsou nové PKC, které tvoří izotopy PKC- $\delta$ , PKC- $\epsilon$ , PKC- $\eta$ , PKC- $\theta$ . Tyto izotopy mají vazebné místo pouze pro DAG, jejich regulace tedy není možná pomocí  $\text{Ca}^{2+}$ . Třetí skupinou jsou atypické PKC, do které patří PKC- $\zeta$  a PKC- $\lambda$  izotopy, jež nemají vazebná místa ani pro  $\text{Ca}^{2+}$  ani pro DAG a jejich aktivita je regulována pomocí fosfatidyl serinu. Poslední skupinou jsou nedávno popsány PKC- $\mu$  a PKC- $\nu$ . PKC slouží v organismu k přenosu velkého množství signálů, především pak k přechodu z jedné fáze buněčného cyklu do druhé. U prasečích oocytů není dosud známá přímá úloha PKC při meiotickém zrání, naproti tomu u myši bylo prokázáno, že se podílí na udržení metafázního stavu a udržení činnosti MPF. U myších oocytů inaktivace PKC zahajuje přechod z MI do AI (Newton 1995; Dempsey et al. 2000; Viveiros et al. 2001).

### **Cyklické nukleotidy**

Cyklické nukleotidy jsou významné regulátory meiotického zrání, především pak cyklický adenosinmonofosfát (cAMP) a cyklický guanosinmonofosfát (cGMP) (Ganong 2005). Syntéza cyklických nukleotidů probíhá v kumulárních buňkách, ze kterých se pomocí gap junctions dostávají do oocyty (Epigg 1982).



Cyklický adenosin-3',5'-monofosfát patří mezi významné druhé posly buněčných kaskád. Vzniká z adenosintrifosfátu (ATP) působením enzymu adenylátcykláza (AC). Dynamika cAMP je regulována dvěma mechanismy. Prvním z nich je regulován jeho vznik prostřednictvím aktivace AC a druhým naopak jeho degradace prostřednictvím enzymu cAMP-fosfodiesterázy. Mechanismus, který reguluje změnu extracelulární koncentrace cAMP, je závislý na aktivaci/inhibici AC heterotrimerními G-proteiny. Při vazbě ligandu na stimulační receptor dochází k aktivaci stimulačního G-proteinu a následně tak k aktivaci AC. Naproti tomu, pokud dojde k vazbě ligandu na inhibiční receptor, aktivuje se inhibiční G-protein, a tím se inhibuje i aktivita cAMP. K degradaci cAMP dochází prostřednictvím enzymu cAMP-fosfodiesterázy, který přeměňuje cAMP na fyziologicky neaktivní 5'-AMP (Ganong 2005).

cAMP má významnou účast při zrání oocyty. Aktivuje cAMP-dependentní proteinkinázu A (PKA), která je katalyzátorem pro fosforylaci dalších proteinů. PKA je enzym, který je složen ze dvou podjednotek – katalytické a regulační. Pokud se cAMP naváže na inaktivní enzym PKA, vyvolá rozpad komplexu a aktivaci katalytické podjednotky, což umožní fosforylaci proteinů, které způsobí pozastavení meiózy a udržují první meiotický blok v diktyotene profáze I. Při nízké hladině cAMP klesá i hodnota PKA, a tak mohou být naopak tyto proteiny defosforylovány a meióza může pokračovat, což následně způsobí i rozpad zárodečného váčku (Wassarman 1988; Kishimoto 2003).

Po stimulu luteinizačním hormonem dochází v důsledku morfologických změn obalu kumulárních buněk k přerušení gap junctions spojů mezi oocytem a kumulárními buňkami. Toto znemožní přenos cAMP z kumulárních buněk do oocyty, a tím jeho hladina v oocyty klesá. Regulace cAMP v oocyty je tedy možná pomocí hydrolytické degradace PDE nebo zastavením přenosu cAMP z kumulárních buněk (Sengoku et al. 2001; Kishimoto 2003).

Nízká hladina cAMP v oocyty je zachována v průběhu celého meiotického zrání až do druhého meiotického bloku v metafázi II (Dekel & Beers 1980).

Cyklický guanosin-3',5'-monofosfát (cGMP) je stejně jako cAMP druhý buněčný posel. Jeho vznik je ovlivněn účinkem guanylátcyklázy, která je aktivována oxidem dusnatým, a vzniká z guanosintrifosfátu (GTP) (Ganong 2005).

cGMP se syntetizuje v kumulárních buňkách a poté je přes gap junctions transportován do oocyty, kde se následně podílí na inhibici meiotického zrání a udržení meiotického bloku. Degradace cGMP je zajištěna enzymem cGMP-fosfodiesterázou. V kumulo-oocytárních

komplexech prasat byl zjištěn nárůst dagračného enzymu cGMP v kumulárních buňkách po působení luteinizačního hormonu (Törnell et al. 1991; Sasseville et al. 2008).

Inhibiční účinek cGMP při meiotickém zrání spočívá v inhibici cAMP-fosfodiesterázy, čímž je v oocytu inhibována degradace cAMP. Působení cGMP tak udržuje vysokou koncentraci cAMP, a tím pomáhá udržovat meiotický blok. Stejně jako cAMP, i koncentrace cGMP před GVBD klesá (Norris et al. 2009; Sun et al. 2009).

### **Vápenaté kationty**

Vápenaté kationty se řadí mezi signální molekuly a plní úlohu intracelulárních posílů (Ganong 2005).  $\text{Ca}^{2+}$  se váže na specifické intracelulární proteiny vázající kalcium, jako jsou kalmodulin, troponin a kalbindin, z nichž je nejhojnější a nejběžnější kalmodulin, který nese čtyři vazebná místa pro vápník. Po navázání  $\text{Ca}^{2+}$  na kalmodulin dojde ke změně konformace, která umožňuje vázat cílové proteiny a měnit jejich aktivitu. Pro tento komplex jsou důležitým cílem  $\text{Ca}^{2+}$ /kalmodulin dependentní protein kinázy (CaMKII), které fosforylují další proteiny (Alberts et al. 2002, Ganong 2005).

Koncentrace  $\text{Ca}^{2+}$  je zhruba 12000krát vyšší v intersticiální tekutině než v cytoplasmě, tudíž je zde významný koncentrační i elektrický gradient směřující z vnějšku dovnitř buněk. Jako intracelulární zásobárny pro vápenaté kationty slouží zejména endoplazmatické retikulum a mitochondrie, ze kterých mohou být mobilizovány přes kanály řízeným ligandem, čímž se koncentrace volných vápenatých kationtů v cytoplasmě zvýší (Ganong 2005).

Nejnámějším způsobem, jakým dochází k uvolnění  $\text{Ca}^{2+}$  z intracelulárních depozit, je uvolnění z endoplazmatického retikula. Tento proces je řízený buněčnou kaskádou, na jejímž začátku je extracelulární signální molekula, která se váže na receptor spřažený s G-proteinem. G-protein poté aktivuje membránový enzym fosfolipázu C, která štěpí membránový inositolový fosfolipid na dvě molekuly – inositol-1,4,5-trifosfát ( $\text{IP}_3$ ) a diacylglycerol (DAG).  $\text{IP}_3$  z plazmatické membrány difunduje do cytosolu a vazbou na endoplazmatické retikulum otevírá  $\text{Ca}^{2+}$  kanály. DAG zůstává připojený k plazmatické membráně, kde společně s vápenatými kationty aktivují proteinkinázu C. Dalším způsobem, jak dochází k aktivaci intracelulárního vápníku, je prostřednictvím ryanodinových receptorů (RZR), které jsou aktivovány cyklickou adenosindifosfát ribózou (cADPR) (Alberts et al. 2002).

$\text{Ca}^{2+}$  mají významnou funkci při regulaci meiotického zrání prostřednictvím měnící se koncentrace kationtů v oocytu a kumulárních buňkách. Po předovulačních vlnách LH, které působí jako stimulační faktor, se koncentrace  $\text{Ca}^{2+}$  v kumulárních buňkách zvyšuje. Z těch je

pak přes gap junctions signál přenášen do oocyty, čímž dochází ke zvýšení koncentrace  $\text{Ca}^{2+}$  v oocyty (Mattioli et al. 1998). Takto zvýšená koncentrace  $\text{Ca}^{2+}$  v oocyty spouští další buněčné kaskády, které způsobí znovuzahájení meiotického zrání. Tyto buněčné kaskády jsou zaměřené speciálně na regulátory meiotického zrání – adenylátcyklázu a MPF, z nichž jsou oba regulovány působením  $\text{Ca}^{2+}$ /kalmomodulin dependentní proteinkinázou. Aktivní CaMKII inaktivuje AC a zároveň je nutná pro správnou funkci MPF. Prasečí oocyty, které jsou vystaveny inhibitoru CaMKII, nejsou schopny akumulovat regulační podjednotku MPF cyklin B, a tak nedokážou plně fosforylovat MAPK, tím je zamezeno znovuzahájení meiózy (Fan et al. 2003; Horner et al. 2003; Chen et al. 2013).

Zvýšené koncentrace  $\text{Ca}^{2+}$  v kumulárních buňkách mají také důležitou funkci. Vápenaté kationty aktivují MAPK dráhu, která se podílí na sekreci progesteronu a estrogeneru, ale také expresi parakrinních faktorů, jež ovlivňují zrání oocytů (Yu et al. 2005; Miyoshi et al. 2007; Ebeling et al. 2011).

Vápenaté kationty mají také podíl na exocytóze kortikálních granul, která zabraňuje polyspermii, a vydělení druhého pólového tělíska (Fan et al. 2003).

## **Zinek**

Na regulaci meiotického zrání má významný podíl také zinek, který má v buňkách funkci intracelulárního druhého posla. Zvýšení intracelulární koncentrace zinku v oocyty v době prvního meiotického bloku zabraňuje předčasnému rozpadu zárodečného váčku. Zinek je také nezbytný pro dokončení meiotického zrání a pro dosažení a udržení druhého meiotického bloku (Kim et al. 2010; Bernhardt et al. 2011; Kim et al. 2011; Bernhard et al. 2012; Kong et al. 2012). Vytvoření druhého meiotického bloku je možné prostřednictvím zinek vázajícího proteinu – inhibitoru časně meiózy 2 (early meiosis inhibitor 2 – EMI2), jenž inhibuje anafázi podporující komplex, což má za následek degradaci cyklinu B během metafáze II (Shoji et al. 2006).

Během období zrání je výše koncentrace zinku v oocyty regulována prostřednictvím interakcí mezi oocytem a kumulárními buňkami. Kumulární buňky mají schopnost snižovat hladinu volného zinku v oocyty během zrání a před ovulací (Lisle et al. 2013).

## Gasotransmitery

Mezi gasotransmitery patří oxid dusnatý, oxid uhelnatý a sirovodík. Jsou to malé plynné molekuly, jejichž syntéza probíhá v buňkách pomocí enzymů a je přísně regulována. Snadno prostupují plasmatickou membránou a mají mnoho autokrinních, endokrinních a parakrinních efektů. Je pro ně typická rychlá degradace, endogenní produkce a specifita cílových molekul a také schopnost vzájemné spolupráce (Wang 2002; Pae et al. 2009).

Oxid dusnatý (NO) je nejlépe popsaným gasotransmiterem. Je to volná dvouatomová molekula, slouží jako buněčný posel s krátkým poločasem rozpadu 3 – 5 sekund, jenž zprostředkovává různé buněčné funkce. NO difunduje přes buněčné membrány a reguluje funkci buněk během fyziologických i patologických procesů v různých tkáních včetně oocytů (Dixit & Parvizi 2001; Bu et al. 2003; Huo et al. 2005).

V savčích buňkách je oxid dusnatý syntetizovaný pomocí enzymu NO-syntázy (NOS) z molekulárního O<sub>2</sub> a aminokyseliny L-argininu a nezbytný pro reakci je také nikotinamidadenin-dinukleotid fosfát (NADPH). NOS katalyzuje přeměnu L-argininu na L-citrullin, díky čemuž vzniká i oxid dusnatý (Rosselli et al. 1994; Huo et al. 2005).

NO-syntáza má několik izoform. Jako typ I je označována nervová či neuronová forma nNOS, která se vyskytuje především v mozku (Bredt et al. 1990; Huo et al. 2005). Nicméně byla detekována i v prasečích oocytech a byla potvrzena její účast během meiotického zrání *in vitro* v prasečích oocytech i kumulárních buňkách (Chmelíková et al. 2010). Typ II indukovatelná či makrofágová iNOS je exprimována v mnoha buněčných typech včetně makrofágů a hepatocytů a její přítomnost byla prokázána také v savčích folikulech (Jablonka-Shariff & Olson 1997; Huo et al. 2005) a typ III endoteliální eNOS je exprimována v cévním endotelu, nadledvinách, plicích, děloze a také ve folikulech savčích vaječnicků (Dinerman et al. 1994; Jablonka-Shariff & Olson 1997; Huo et al. 2005). Lze ji také nalézt v prasečích kumulárních buňkách, oocytech a endoteliálních buňkách (Tao et al. 2004).

Oxid dusnatý je důležitý pro řízení regulace reprodukce samic. Na úrovni hypotalamu reguluje gonadotropin releasing hormon (GNRH), který zajišťuje vyplavení gonadotropinů aktivací nNOS v hypofýze. U lidí a myší má významný podíl na folikulogenezi, navození ovulace, apoptóze folikulárních buněk, steroidogenezi, na relaxaci myometria i na luteolýze. NO se dále podílí na proliferaci a diferenciaci buněk. U prasat byl NO detekován ve folikulech, granulózích a kumulárních buňkách oocytu (Rosselli et al. 1994; Hattori et al. 2000).

Účinky oxidu dusnatého na meiotické zrání oocyty závisí na jeho koncentraci. Při nízkých koncentracích má stimulační účinek a naopak při vyšších koncentracích působí inhibičně. U prasečích oocytů měla vysoká koncentrace oxidu dusnatého jednoznačně inhibiční účinek na znovuzahájení meiózy (Sengoku et al. 2001; Bu et al. 2003; Tao et al. 2005; Viana et al. 2007).

### **3.6 Mezenchymové markery**

CD molekuly jsou antigeny v buněčné membráně, jež se objevují během specifických fází vývoje. Zde po určitou dobu zůstávají a fungují jako charakteristický marker, až dokud nedojde k zániku buněčné membrány. Jelikož se většina těchto molekul omezuje pouze na určitou tkáň či buňku, jsou označovány také jako diferenciační antigeny (Buc 2001). Dle některých studií se CD molekuly, především tetraspaniny, integriny a regulační proteiny komplementu, účastní procesu oplození (Fábryová & Simon 2009).

Integriny se řadí do skupiny na kationtech závislých heterodimerických transmembránových receptorů složených z nekovalentně spojených  $\alpha$  a  $\beta$  podjednotek (Hynes 1992). Patří mezi adhezní receptory, jež jsou zapojené do interakcí mezi buňkami a také mezi buňkou a matrix a také usnadňují přenos informací do buňky (Fábryová & Simon 2009). Integriny zřejmě také usnadňují adhezi spermie s oocytem, jelikož podporují somatickou adhezi (Evans 2002).

#### **3.6.1 CD29**

CD29 je  $\beta 1$  podjednotkou integrinu o molekulové velikosti 130 kDa. Spojuje se s CD49f a  $\alpha 6$  integrinovou podjednotkou a tím spolu vytváří integrin VLA-6 (CD49f/CD29;  $\alpha 6\beta 1$ ), který je exprimován mimo jiné i na povrchu oocytů u myši a lidí (Barclay et al. 1997). Almeida et al. (1995) se domnívali, že integrin  $\alpha 6\beta 1$  by mohl sloužit jako receptor pro navázání spermie na oocyt. Nicméně integrin  $\alpha 6$  u myších oocytů není pro vazbu spermie s oocytem nezbytný (Miller et al. 2000), ale naopak pro fúzi lidských gamet je integrin  $\alpha 6\beta 1$  důležitý, jelikož u 96 % fúzí spermie s oocytem byla po přidání  $\alpha 6\beta 1$  protilátky zaznamenána inhibice (Ziyyat et al. 2006). U prasat byla exprese CD29 zaznamenána v zárodečných vaječnickových buňkách (Lee et al. 2016).

Dle obecné hypotézy platí, že pro oplození je nezbytná spolupráce mezi CD molekulami (Fábryová & Simon 2009). U myších gamet je pro jejich spojení důležitá interakce mezi fertilinem a integrinem  $\alpha 6\beta 1$  (Almeida et al. 1995). Fertilin  $\alpha$  a  $\beta$  se řadí do skupiny disintegrinů a metalloproteáz (ADAM). Fertilin  $\alpha$  je důležitý pro fúzi plazmatické membrány oocytu a spermie a fertilin  $\beta$  je zřejmě součástí mechanismu při navázání spermie na oocyt, které vede k jejich fúzi (Ramaro et al. 1996; Evans et al. 2002). Fertilin  $\beta$  vytváří vazbu přímo s integrinem  $\alpha 6\beta 1$  na povrchu oocytu, což usnadňuje splynutí spermie s oocytem. Toto spojení je ještě podpořeno tetraspanem CD9 (Chen & Sampson 1999).

### 3.6.2 CD44

CD44 je polymorfní transmembránový glykoprotein, který je hojně zastoupen v mnoha typech buněk. Patří do skupiny proteinů vázajících hyaluronovou kyselinu, jež se nazývají také jako hyaladheriny. Spousta z těchto proteinů nese sekvenci aminokyselin homologní k proteinu, jenž je důležitý pro vázání hyaluronové kyseliny (Ohta 1999).

CD44 je hlavním receptorem na povrchu buňky pro extracelulární hyaluronovou matrix (Aruffo et al. 1990). Jeho molekulová velikost v kumulo-oocytárním komplexu se pohybuje mezi 85 a 90 kDa a jedná se o izoformu CD44s (Yokoo et al. 2004), avšak vyskytuje se i v několika jiných formách s molekulovou velikostí od 80 do 250 kDa a na mnoha buněčných typech (Aruffo et al. 1990).

V epiteliálních oblastech, které jsou bohaté na proliferující buňky, se hojně exprimuje CD44, zvláště varianta obsahující exon v6. Typickými proliferujícími epiteliálními buňkami jsou granulózní buňky, jelikož obalují povrchy a obklopují dutiny nepřetržitými vrstvami buněk, které jsou spojené pomocí gap junctions. CD44 se vyskytuje i u *in vitro* dozrálých kumulo-oocytárních komplexů lidí a u předimplantačních embryí savců (Ohta et al. 1999), mRNA pro CD44 byla detekována i v kumulo-oocytárních komplexech prasat (Kimura et al. 2002). Je znám rozdíl v expresi CD44 u murálních a kumulárních buněk, kdy byla prokázána vyšší exprese tohoto proteinu u kumulárních buněk, jež těsně obklopují oocyt, což značí, že by CD44 mohl mít významný efekt na oocyt (Ohta 1999).

U granulózních buněk bylo zjištěno, že exprimují pouze formu CD44s a ne jiné izoformy, což značí, že se granulózní buňky diferencují z epiteliálních buněk a mají tak jinou funkci (Ohta et al. 1999). Pouze forma CD44s je schopna vázat hyaluronovou kyselinu (Stamenkovic et al. 1991).

Prostřednictvím CD44 je za komunikaci mezi buňkami a extracelulární matrix zodpovědný hyaluronan. Ten také inhibuje apoptózu, zvýšení nádorových buněk a metastáz a stimulaci lymfocytů (Yokoo et al. 2010). Komunikace mezi CD44 a hyaluronanem zřejmě také ovlivňuje plodnost i kvalitu oocytů (Schoenfelder & Einspanier 2003). Interakce mezi CD44 a hyaluronanem je zapojena v indukci návratu do meiózy, proto se mělo za to, že CD44 je exprimován i na oocytech, avšak s využitím Real-time PCR bylo prokázáno, že je tento protein lokalizován v kumulárních buňkách (Tienthai et al. 2003). Během expanze kumulu je v kumulo-oocytárním komplexu exprimován primární hyaluronový receptor CD44. Komunikace mezi CD44 a hyaluronanem je ve vztahu s gap junctions komunikací komplexu během návratu do meiózy (Yokoo et al. 2010).

CD44 je nezbytný pro meiotické zrání oocytů prasat. Aktivní forma CD44 má účast na fosforylaci proteinů gap junctions, uzavření buněčných spojů a přerušení přísunu cyklických adenosinmonofosfátů do oocytu z kumulárních buněk (Yokoo et al. 2010). CD44 receptor aktivovaný hyaluronovou kyselinou reguluje kumulární expanzi (Yokoo et al. 2003), nicméně jeho aktivace pro expanzi kumulu není nezbytně nutná. Avšak když byla interakce mezi CD44 a hyaluronanem během *in vitro* kultivace kumulo-oocytárních komplexů nedostatečná, vedlo to k neúspěšné maturaci, oplození a časnému embryonálnímu vývoji (Yokoo et al. 2007). Potlačení vazby mezi CD44 a hyaluronanem může být zapříčiněno glykosylací extracelulární domény CD44 způsobené sialovou kyselinou (Bartolazzi et al. 1996). Například u embryí skotu navázání hyaluronanu k CD44 receptoru usnadňuje jejich časný embryonální vývoj (Toyokawa et al. 2005).

Expresi CD44 nestimuluje jen hyaluronan, ale také ligand pro CD44 a jiné glykosaminoglykany, jež ovlivňují schopnost CD44 vázat hyaluronovou kyselinu (Esford et al. 1998). mRNA pro syntézu hyaluronové kyseliny není exprimována pouze v kumulárních buňkách, ale i v samotném oocytu, což znamená, že hyaluronovou kyselinu syntetizují nejen kumulární buňky, ale i oocyty (Yokoo et al. 2004).

### 3.6.3 CD105

CD105 neboli endoglin patří mezi membránové glykoproteiny a je součástí receptoru komplexu transformujícího růstového faktoru  $\beta$  (TGF $\beta$ ). Jeho molekulová velikost je 180 kDa a je vysoce exprimován hlavně ve slezině a plicích, dále je také přítomen v pojivové tkáni, makrofázích, monocitech a hemotopoetických progenitorových buňkách.

Tento protein má významnou roli při vývoji kardiovaskulární soustavy a také při remodelaci cév (Basini et al. 2016) a je důležitý pro správnou tvorbu krve během embryonálního vývoje. Nedostatek CD105 může vést až k narušení hematopoézy (Borges et al. 2012). Dále se CD105 podílí na regulaci cytoskeletární organizaci aktinu (Sanz-Rodriguez et al. 2004). Exprese endoglinu může mít za následek změny diferenciacních a polarizačních procesů u makrofágů (Aristorena et al. 2014). Jeho exprese je vysoká v endoteliálních buňkách během hojení ran a zánětů, u vyvíjejících se embryí i v tumorech (Basini et al. 2016).

### 3.7 Gonadotropní hormony

Gonadotropiny jsou hormony glykoproteinové povahy ovlivňující vývoj a činnost gonád, zrání pohlavních buněk a tvorbu pohlavních hormonů (steroidů). Mezi gonadotropiny patří FSH (folikuly stimulující hormon), LH (luteinizační hormon) a hCG (lidský choriový gonadotropin). FSH a LH jsou pulsačně uvolňovány předním lalokem hypofýzy – adenohypofýzou vlivem gonadotropiny uvolňujícího hormonu (GnRH) (Simoni et al. 1997; Buffet et al. 1998; Ciccone & Kaiser 2009), hCG je z hypofýzy uvolňován pouze v malém množství a pochází převážně z placenty (Cole et al. 2008; Cole 2010).

Tyto hormony jsou heterodimery mající společnou  $\alpha$ -podjednotku a unikátní  $\beta$ -podjednotku, přičemž každá z podjednotek má dvě N-glykosylační místa. Glykosylace má vliv na jejich stabilitu, bioaktivitu a také životnost v oběhu (Ji et al. 1998; Fox et al. 2001). hCG má na C-konci ještě další čtyři O-vázané glykosilace, které zapříčiňují jeho delší poločas rozpadu v krvi a také zvýšenou bioaktivitu oproti LH (Olijve et al. 1996).

Glykoproteinové hormony jsou největšími (30 – 40 kDa) a nejkompexnějšími ligandy receptorů spřaženými s G-proteiny (Ji et al. 1998).

Během ovariálního cyklu započne svůj vývoj v ováriu několik folikulů, z nichž velká většina zanikne kvůli apoptóze a zůstává jen malé množství těch, které jsou schopné v dostatečné míře reagovat na FSH. FSH na folikuly působí jako antiapoptotický faktor a zároveň také podporuje jejich finální zrání, čímž má zásadní vliv na výběr a maturaci dominantního folikulu.

Luteinizační hormon je nepostradatelný pro terminální maturaci preovulačních folikulů, syntézu androgenů a pro indukci samotné ovulace.



Dominantní folikul pod vlivem FSH přeměňuje androgeny na estrogenery, včetně estradiolu, který působí na sliznici dělohy a připravuje ji na následnou implantaci. Po ovulaci dochází k migraci luteinizovaných granulóznic buněk přes indukci exprese vaskulárního endoteliálního růstového faktoru (VEGF), díky zvýšené expresi integrinů  $\alpha_5\beta_1$  a  $\alpha_5\beta_3$ , což napomáhá k vytvoření žlutého tělíska a jeho udržení. Pro vznik a zachování žlutého tělíska je také nezbytný LH, který sekretuje progesteron a tím podporuje časnou fázi březosti a spolu s dalšími látkami se podílí i na synchronizaci vývoje děložní sliznice a oocytu (Buffet et al. 1998; Piersma et al. 2007; Rolaki et al. 2007).

### 3.7.1 Receptory gonadotropinů - LHR a FSHR

Receptor luteinizačního hormonu (LHR) a receptor folikulostimulačního hormonu (FSHR) hrají významnou roli v reprodukci samic i samců.

LHR je důležitý při regulaci reprodukčních funkcí zahrnujících ovariální steroidogenesi a ovulaci u samic a produkci testosteronu v Leydigových buňkách varlat u samců. Díky své schopnosti vázat jak LH, tak i hCG s vysokou afinitou, je LHR označován jako LH/hCG receptor. Je nezbytný pro zrání folikulů a ovulaci, ale i pro luteální funkci. V případě těhotenství je restimulován zvyšováním hladin choriových gonadotropinů. Pomocí 3B5 myší monoklonální protilátky bylo u prasečnicích a lidských ovárií identifikováno šest odlišných LHR velikostí – 92, 80, 68, 59,52 a 48kDa (Bukovsky et al. 2003; Menon & Menon 2012).

FSHR naproti tomu je schopen vázat pouze FSH. FSHR je tak nepostradatelnou molekulou v regulaci ovariální funkce prostřednictvím jejího působení na vývoj folikulů a stimulaci tvorby estrogenů, u samců pak reguluje funkci Sertoliho buněk a spermatogenesi. Molekulová hmotnost FSHR u lidí i prasat dosahuje hodnoty okolo 78 kDa (Simoni et al. 1997; Menon & Menon 2012).

Oba tyto gonadotropní receptory jsou receptory spřažené s G-proteinem (GPCR) obsahující velké extracelulární N konce. Stejně jako ostatní receptory spřažené s G-proteinem, se i LHR a FSHR skládají ze sedmi transmembránových alfa-helixových domén a přiléhajících smyček, tří extracelulárních a tří intracelulárních, které na vnitrobuněčné straně membrány asociují s G-proteinem (Banerjee & Mahale 2015).

Za normálních podmínek zůstávají receptory v neaktivním stavu a k jejich aktivaci dochází ve dvou krocích. Za prvé je zde nutná vysoká afinita hormonální vazby

k extracelulární doméně a za druhé hormon či extracelulární doména (souhrnně tzv ligand) musí interagovat s extracelulárními smyčkami transmembránové domény za účelem vyvolání aktivace receptoru prostřednictvím konformační změny, což vede k aktivaci intracelulárních signalizačních kaskád (Banerjee & Mahale 2015).

Přesný mechanismus, kterým interakce mezi ligandem a receptorem aktivuje receptor, není znám, existují však tři modely.

Za první, část ligandu vázaná na extracelulární doménu interaguje s oblastí transmembránových helixů, což vede k aktivaci receptoru.

Za druhé, interakce ligandu a extracelulární domény vede k interakci mezi extracelulární doménou a transmembránovými helixy a tím dochází k aktivaci receptoru.

A za třetí, extracelulární doména má inhibiční účinek na transmembránové domény, které udržuje v inaktivním stavu, a navázání ligandu tedy způsobuje zmírnění tohoto jevu (Menon & Menon 2012).

Přestože není zcela vysvětleno, jak je receptor aktivován, je jisté, že extracelulární doména, extracelulární smyčky a ligand jsou nezbytně nutné pro vytvoření specifické vazby, která vede ke konformační změně a tím umožňuje přenos signálu do buněk (Themmen & Huhtaniemi 2000).

Místem přenosu signálu je transmembránová doména. Jakmile je ligand navázán na receptor, je fosforylován proteinkinázou. Receptor je poté funkčně odpojen od G-proteinu, což znamená, že G-protein je připraven k vazbě s dalšími faktory v signální dráze. Po odpojení G-proteinu se aktivuje adenylátcykláza, která katalyzuje syntézu cyklického adenosinmonofosfátu (cAMP) a to vše vede k aktivaci proteinové kinázy A (PKA). LHR a FSHR jsou tak schopny aktivovat signální dráhu vedoucí k nárůstu produkce isositoltrifosfátu (IP3), zvýšení obsahu vápníku a aktivaci mitogenen aktivované proteinkinázy (MAPK) (Themmen & Huhtaniemi 2000).

Signalizace je poté ukončena buďto desenzitizací nebo snížením vnímavosti LHR a FSHR mechanismy zabraňujícími nadměrné stimulaci. Desenzitizace zahrnuje fosforylaci receptoru a oddělení signálních cest. Při regulaci, která vede ke snížení vnímavosti, mají významnou roli také arrestiny. Arrestiny navázané k aktivovanému a fosforylovanému GPCR prostorově blokuje interakci GPCR s G-proteinem, tím dojde k terminaci G-protein-dependentní signalizace. Receptor-ligand-arrestinové komplexy jsou následně endocytózou

vnořeny do buňky. Tento proces je označován jako receptorová sekvestrace nebo internalizace a je důležitý nejen pro tlumení GPCR signalizace při dlouhodobém působení podnětu, ale také pro receptorovou resenzitizaci a downregulaci (Luttrell & Lefkovitz 2002; Shenoy & Lefkovitz 2003; Banerjee & Mahale 2015).

Exprese LHR prochází dynamickými změnami během normálního ovariálního cyklu. Granulózní buňky časných antrálních folikulů exprimují FSHR se zvyšujícím se růstem folikulů. Antrální folikuly také exprimují malé množství LHR, které je většinou omezeno na buňky *theca interna*. Hladina exprese LHR vzrůstá s růstem folikulů po odezvě na FSH, estradiol a další parakrinní faktory dosahující maximálních hladin před ovulací, exprese LHR je přechodně downregulována v závislosti na preovulační vlně LH během diferenciací estrogen produkujících granulózni buněk na luteální buňky. Během této doby přeměněné granulózní buňky zůstávají nevnímavé vůči LH v důsledku desenzitizace reakčního systému spojeného s G-proteiny. Nejsou žádné důkazy, že by FSHR bylo obdobně downregulováno během tohoto období. Toto je poté následováno úplným obnovením LHR stejně jako vnímavost přeměněných granulózni buněk vůči LH. Exprese LHR dosahuje maximální úrovně během střední luteální fáze (mid-luteal) se zvýšenou produkcí progesteronu.

Úroveň receptorů poté klesá s regresí žlutého tělíska. LHR je tedy regulováno transkripční cestou a více pak také post-transkripčními mechanismy. FSHR je zřejmě regulováno zejména na úrovni transkripce, nicméně jeho regulace může být ovlivněna i post-transkripčními procesy. Faktory, ovlivňující expresi FSHR, zahrnují FSH, faktory ze skupiny transformujících růstových faktorů TGF- $\beta$  a TGF- $\alpha$  a epidermálních růstových faktorů (Menon & Menon 2012).

### 3.8 Transferin

Transferin je glykoprotein patřící do skupiny  $\beta$ -1 globulinů a jeho primární funkcí je přenos železa v plazmě. Přestože je syntetizován v játrech, je známa i jeho extrahepatetická produkce (Entman et al. 1987).

U samic je transferin jedním z mnoha proteinů nacházejících se ve folikulární tekutině, ale nijak se nepodílí na folikulogenezi, ovariální steroidogenezi nebo vývoji oocyty, nicméně je nezbytný pro proliferující buňky obklopující oocyt (Entman et al. 1987).

Proliferující buňky mají absolutní požadavek na železo, které je do buněk dopravováno transferinem s následným intracelulárním transportem přes transferinový receptor (Aleshire et al. 1989).

Preovulační folikul je avaskulární a tak, jelikož je transferin důležitý pro buněčný růst, může jeho lokální koncentrace korelovat s vývojem folikulů (Entman et al. 1987).

Transferin a jeho receptor je úzce spjat s dozráváním ovariálních folikulů. Protein transferin se významně podílí na proliferaci buněk savců. Železo se váže s vysokou afinitou na apotransferin, a tak se dostává do jak proliferujících, tak i neproliferujících buněk, kde se železo stává nedílnou součástí cytochromového elektronového transportního řetězce. Připojení transferinu na buněčnou membránu je zajištěno pomocí transferinového receptoru. Tento receptor, který přispívá k příjmu železa do buněk, se nalézá na povrchu aktivních proliferujících buněk, ale například i na transformovaných maligních buňkách. Ferrotransferin je, na rozdíl od apotransferinu, nezbytný pro buněčnou proliferaci. Nicméně apotransferin může s ferrotransferinem soupeřit o transferinový receptor a tím tak snižovat rychlost růstu buněk. (Aleshire et al. 1989).

### **3.8.1 Transferinový receptor**

Transferinový receptor je disulfidovou vazbou vázaný dimer, složený ze dvou identických podjednotek a každá je schopna vázat jednu molekulu transferinu. Jedná se o transmembránový glykoprotein obsahující alespoň tři N - asparaginové oligosacharidy a převážná část receptoru je vystavena na povrchu buňky (Trowbridge et al. 1984; Ward 1987).

Transferinový receptor by měl být neustále nasycen ligandem, čímž se liší od většiny hormonálních receptorů. Protože transferinový receptor je neustále nasycen, počet transferinových receptorů může být hlavním determinantem buněčného vychytávání železa (Ward 1987).

Navázání transferinu, uvolnění železa do buňky a návrat apotransferinu do vnějšku buňky se nazývá transferinový cyklus. Při fyziologickém pH má transferinový receptor monohem vyšší afinitu k ferrotransferinu než k apotransferinu, to dovoluje buňce vázat pouze ty molekuly transferinu, které nakonec dodají do vnitřku buňky železo. Poté, co je takovýto transferin navázán na transferinový receptor, dochází k endocytóze zprostředkované receptorem pomocí klathrinových váčků. Tento váček obsahuje jak receptor, tak i navázaný

ligand, který je předán endozómům. V endozomu je pH nižší než 5,5, což umožňuje uvolnění železa z transferinu, které je následně z endozomu odstraněno. Apotransferin v tomto nízkém pH zůstává stále navázán na transferinový receptor a tento komplex se vrací v transportním váčku zpět na povrch cytoplasmatické membrány k opětovnému použití. Jakmile se komplex apotransferinu a transferinového receptoru vrátí zpět na buněčný povrch, dovolí nízká afinita transferinového receptoru k apotransferinu neutrálním pH jeho rychlou disociaci od receptoru, což umožňuje apotransferinu opět navázat železo a tak iniciovat další cyklus (Ward 1987; Alberts 2002).

## **4 Metodika**

### **4.1 Příprava vzorků kumulárních buněk člověka a prasete**

K analýze byly využity lidské a prasečí kumulární buňky získané z oocytů s plnou meiotickou kompetencí ve stádiu zárodečného vajíčku.

Kumulární buňky byly od oocytů odděleny opakovaným pipetováním skrze skleněnou tenkostěnnou pipetu a následně byly přeneseny do zkumavky eppendorf. Každý ze vzorků obsahoval kumulární buňky z dvaceti oocytů příslušného druhu. Získané kumulární buňky byly třikrát promyty v PBS pufru (Sigma – Aldrich Chemie GmbH, Mnichov, Německo). Následovala jejich lyzace v lyzačním pufru (0,15 ml 10% Triton X; 0,05 ml 10% SDS; 4,3 ml PBS), který obsahoval inhibitory proteáz (Roche, Německo) v množství 50 µl na 1 ml pufru. Poté byly vzorky zmrazeny při teplotě - 20°C a takto byly uchovávány až do analýzy metodou Western blot.

### **4.2 Stanovení exprese proliferačních markerů a receptorů gonadotropních hormonů**

#### **4.2.1 Elektroforetická separace proteinů**

Principem elektroforézy je rozdíl v rychlosti pohybu různě velkých nabitých částic stejnosměrným 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 merkaptoetanol). Poté 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 10% akrylamidový separační gel s přidavkem dodecylsulfátu sodného (SDS-PAGE) (viz Tabulka č. 1), který byl nalit mezi skla připevněná ve stojáncích, převrstven destilovanou vodou a ponechán 30 minut polymerovat. Po ztuhnutí separačního gelu se slila vrstva destilované vody a na separační gel byl aplikován 4% zaostřovací gel

SDS-PAGE (viz Tabulka č. 2), do kterého byla pro lepší viditelnost jamek přidána pipetou kapka bromfenolové modři. Do zaostřovacího gelu byl vložen hřebínek pro vytvoření patnácti jamek na příslušné vzorky a celá tato soustava byla ponechána 15 minut polymerovat. Po úplném ztuhnutí zaostřovacího gelu byla skla vložena do aparatury na elektroforézu (Bio Rad, USA), zalita elektroforézovým pufrem a byl vyjmut hřebínek. Do vytvořených jamek byly poté pomocí Hamiltonovy jehly nanесeny vzorky lidských a prasečích kumulárních buněk a vzorkový pufr (17  $\mu$ l na jamku). Pro pozdější ověření přetištění proteinů na membránu a jejich následnou identifikaci byl použit hmotností marker (5  $\mu$ l) prestained molecular weight bovine standard (Bio-Rad, Montreal, Kanada, 161-0318). Elektroforéza byla spuštěna na 20 minut při konstantním elektrickém napětí 80 V a následně zvýšena na 150 V po dobu 60 minut.

**Tabulka č. 1** Složení 10% separačního gelu

destilovaná voda (ml)	4,16
roztok A (ml)	3,33
pufr B (ml)	2,5
10% SDS ( $\mu$ l)	100
TEMED ( $\mu$ l)	4,5
10% APS ( $\mu$ l)	70

**Tabulka č. 2** Složení 4% zaostřovacího gelu

destilovaná voda (ml)	1,52
pufr C (ml)	0,625
roztok A (ml)	0,325
10% SDS (ml)	0,025
TEMED ( $\mu$ l)	3,8
10% APS ( $\mu$ l)	50

**Tabulka č. 3** Složení jednotlivých roztoků pro přípravu separačního a zaostřovacího elfo gelu

Roztok A 30% AA, bis AA	58,4 g akrylamidu 1,6 g bis akrylamidu 200 ml destilované vody
Pufr B 1,5 M Tris.HCl, pH 8,8	18,5 g Tris Pomocí destilované vody upraveno na objem 80 ml pH upraveno použitím HCl na 8,8 Dolito destilovanou vodou na objem 100 ml
Pufr C 0,5 M Tris.HCl, pH 6,8	6 g Tris 60 ml destilované vody pH upraveno použitím HCl na 6,8 Dolito destilovanou vodou na objem 100 ml
10% SDS	10 g SDS 100 ml destilované vody
10% APS	1 g persíranu amonného 10 ml destilované vody
Vzorkový pufr-neredukující	4,2 ml destilované vody 1ml 0,5M Tris.HCl pH 6,8 0,8 ml glycerolu 1,6 g 10% SDS 0,4 g 0,05% bromfenolové modři
Vzorkový pufr-redukující	3,8 ml destilované vody 1,0 ml 0,5M Tris.HCl pH 6,8 0,8 ml glycerolu 1,6 ml 10% SDS 0,4 ml 0,05% bromfenolové modři 0,4 ml merkptoetanolu

#### 4.2.2 Western blot

Při analýze Western blotting jsou proteiny separované metodou SDS PAGE přeneseny na nitrocelulóзовou nebo polyvinylidendifluoridovou membránu. V našem případě bylo provedeno přenesení separovaných proteinů na oba typy blotovacích membrán (Hybond, Amersham Pharmacia Biotech, USA) využitím metody elektroblottingu, při níž je hnací silou přenosu energie elektrické pole.

Nejprve byly připraveny všechny komponenty, filtrační papíry, membrána a houby, které byly na 15 minut namočený v blotovacím pufru. Gel se separovanými proteiny byl nejdříve promyt v destilované vodě a pak také v blotovacím pufru. Poté byla připravena blotovací kazeta, do které byla nejdříve na černou stranu vložena houba, na ni byly umístěny dva filtrační papíry, gel, membrána, opět dva filtrační papíry a houba. Takto vytvořené kazety



byly umístěny do aparatury a zality transferovým pufrům. Přenos proteinů z gelu na membránu probíhal 90 minut při konstantním elektrickém proudu 0,5 A. Po ukončení blottingu byla membrána vyjmuta a opláchnuta destilovanou vodou. Pro důkaz přenesení proteinů na membránu byla membrána obarvena pomocí Ponceau červeně, která na membráně označila přetištěné proteiny. Před dalším použitím membrány byla červeně znovu odmyta pomocí destilované vody a PBS. Membrána byla poté inkubována přes noc v lednici v 5% roztoku sušeného netučného mléka (Blotting Grade Blocker Non-Fat Dry Milk, Bio-Rad, USA) v PBS s přísadkou 0,1% Tween 20.

### **4.3 Imunodetekce proteinů ve vzorcích kumulárních buněk člověka a prasete**

Byla provedena detekce receptorů gonadotropních hormonů FSHR a LHR a proliferačního markeru CD71-transferin R v kumulárních buňkách člověka a prasete.

Základem pro detekci proteinů je využití specifické vazby protein – protilátka. Inkubace protilátkou byla prováděna ve dvou fázích.

Nejprve byla membrána promyta PBS s 0,05% Tweenem (PBS-T) 20 na třepačce. Poté byla inkubována pomocí specifické primární protilátky přes noc v lednici. Protilátka proti FSHR (FSHR Polyclonal Antibody, PA5-50963, ThermoFisher Scientific, USA) byla ředěna v poměru 1:1000 a 1:500, CD71 (Transferrin Receptor Polyclonal Antibody, PA5-27739, ThermoFisher Scientific, USA) 1:1000 a 1:500 a proti LHR (LHR Polyclonal Antibody, PA5-77474, ThermoFisher Scientific, USA) v poměru 1:2000, 1:1000, 1:500.

Po inkubaci byla membrána třikrát v odstupu 10 minut promyta PBS-T. Poté byla na membránu nanášena sekundární králičí protilátka (Goat Anti-Rabbit IgG (H+L)-HRP Conjugate, 170-6515, Bio Rad, USA), která má schopnost vázat se na primární protilátku a je konjugovaná s látkou emitující světelný signál umožňující vizualizaci, ředěná v PBS v poměru 1:3000 a byla inkubována po dobu 60 minut na třepačce.

Po inkubaci v sekundární protilátce byla membrána pětikrát po pěti minutách promyta PBS-T. Poté byla provedena vizualizace přenesených proteinů s navázanou protilátkou. Pro vizualizaci byl použit chemiluminiscenční substrát (SuperSignal West Femto Maximum

Sensitivity Substrate; 34095, Thermo SCIENTIFIC, USA) a přístroj Azure c600 (Azure Biosystems; Biocev, Vestec).

Experimenty byly celkem šestkrát opakovány.

#### 4.4 Vyhodnocení experimentu

Výsledky experimentu byly měřeny s využitím programu pro analýzu a zpracování obrazu NIS (Laboratory Imaging, ČR).

V programu byly nadefinovány příznaky pro měření, plocha a průměrná optická denzita. Pomocí příkazu *Změřit jednotlivé objekty* byly poté změřeny objekty na segmentovaném optickém obrazu. Síla signálu reakce byla na blotu vyjádřena na základě parametru integrované optické denzity – IOD, přičemž integrovaná optická denzita je rovna součinu průměrné optické denzity a plochy v místě reakce antigenu s protilátkou.

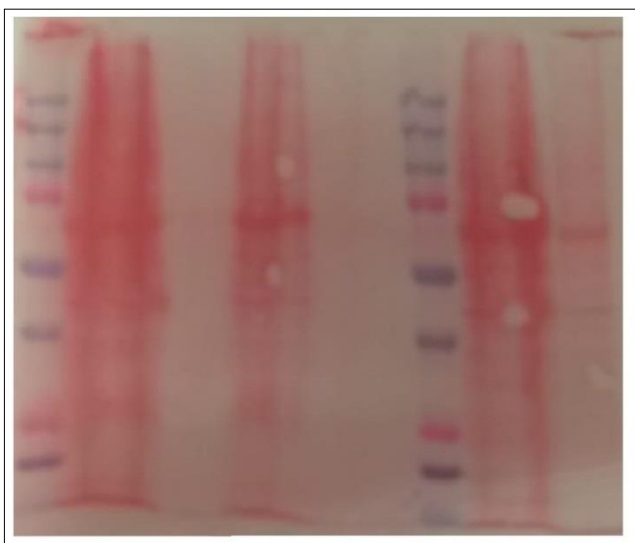
Pro porovnání množství detekovaného proteinu v kumulárních buňkách byly hodnoty IOD příslušného detekovaného proteinu vztaženy k IOD proteinu tubulinu v kumulárních buňkách příslušného druhu. Tímto způsobem byla získána relativní integrovaná optická denzita RIOD, která byla v případě tubulinu v kumulárních buňkách člověka i prasete rovna 1. Porovnávány byly vždy denzity proteinů na stejném blotu. Tubulin byl zvolen jako referenční protein, protože se vyskytuje ve všech eukaryotických buňkách.

Data ze všech experimentů byla vyhodnocena pomocí statistické analýzy, která byla provedena pomocí programu STATISTICA, verze 12. Pro zjištění statistické významnosti množství proteinů v kumulárních buňkách byla použita analýza rozptylu jednoduchého třídění (One-way ANOVA). Pro podrobnější zjištění rozdílu byl zvolen Tukeyho test na hladině významnosti  $\alpha = 0,05$ .

## 5 Výsledky

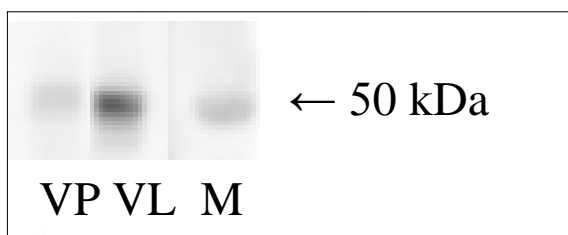
Metodou Western blot byly analyzovány kumulární buňky člověka a prasete získané z oocytů s plnou meiotickou kompetencí.

Po SDS elektroforetické separaci proteinů na gelu byly proteiny následně přetištěny na membránu. Správné přetištění proteinů z elfo gelu na blotovací membránu bylo vždy ověřeno pomocí kontrolního barvení membrány červeným roztokem barvy Ponceau (Obrázek č. 1). Poté byla červená barva z membrány odmyta a následovala inkubace membrány s příslušnými protilátkami.



**Obrázek č. 1** Kontrolní barvení membrány pomocí Ponceau červeně

Pro porovnání množství detekovaných proteinů v kumulárních buňkách byl použit jako referenční protein tubulin  $\alpha$ , o kterém je známo, že se vyskytuje ve všech typech buněk. Obrázek č. 2 ukazuje detekci tubulinu  $\alpha$  ve vzorcích kumulárních buněk člověka a prasete. Síla signálu protilátky s tubulinem byla na blotu vyjádřena na základě parametru integrované optické denzity – IOD, kdy IOD je rovna součinu průměrné optické denzity a plochy v místě reakce tubulinu s protilátkou.



**Obrázek č. 2** Exprese tubulinu v kumulárních buňkách

VP – vzorek prasečích kumulárních buněk

VL – vzorek lidských kumulárních buněk

M – marker

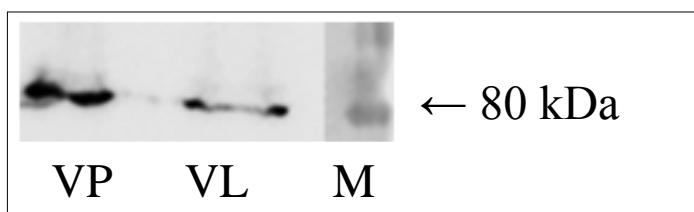
## 5.1 Exprese receptorů gonadotropních hormonů ve vzorcích kumulárních buněk

### 5.1.1 Exprese FSHR

Byla zjišťována exprese FSH receptoru v lidských kumulárních buňkách a prasečích kumulárních buňkách.

Primární protilátka byla nejprve ředěna s 5% roztokem sušeného mléka dle doporučení výrobce v poměru 1:1000, ale signál byl příliš slabý, proto pro další detekce tohoto proteinu byla zvolena koncentrace protilátky 1:500, která poskytla vyšší intenzitu signálu detekovaného proteinu. Při této koncentraci byl v analyzovaných lidských i prasečích kumulárních buňkách nalezen hledaný protein FSHR s molekulovou hmotností 78 kDa.

Smímek blotu (Obrázek č. 3) dokládá expresi FSHR proteinu v kumulárních buňkách prasete i člověka.



**Obrázek č. 3** Exprese FSHR v kumulárních buňkách

VP – vzorek prasečích kumulárních buněk

VL – vzorek lidských kumulárních buněk

M – marker

V tabulkách č. 4 a 5 jsou uvedeny naměřené hodnoty plochy, průměrné optické denzity a relativní integrované optické denzity FSHR a tubulinu v kumulárních buňkách člověka a prasete společně s jejich směrodatnými odchylkami. Pro porovnání množství detekovaného proteinu FSHR v kumulárních buňkách, byly hodnoty IOD FSHR vztaženy k IOD tubulinu v kumulárních buňkách příslušného druhu. Tímto způsobem byla získána relativní integrovaná optická denzita RIOD, která byla v případě tubulinu v kumulárních buňkách člověka i prasete rovna 1.

**Tabulka č. 4** Expres FSHR v lidských kumulárních buňkách

Sledované ukazatele ( $\bar{x} \pm s$ )	n	Lidské kumulární buňky	
		tubulin	FSHR
<b>Plocha</b> (mm <sup>2</sup> )	6	3,21±0,05	4,32±0,03
<b>POD</b>	6	0,71±0,02	0,69±0,02
<b>IOD</b>	6	2,28±0,03 <sup>A</sup>	2,98±0,02 <sup>B</sup>
<b>RIOD</b>	6	1,00 <sup>A</sup>	1,31 <sup>B</sup>

**POD** - průměrná optická denzita, **IOD** - integrovaná optická denzita, **RIOD** - relativní integrovaná optická denzita, **n** - počet opakování,  $\bar{x}$  - průměr, *s* - směrodatná odchylka

Hodnota integrované optické denzity tubulinu v lidských kumulárních buňkách byla zvolena jako výchozí pro výpočet RIOD.

Statisticky významné rozdíly ( $P < 0,05$ ) mezi průměry (IOD, RIOD) jsou vyjádřeny různými písmennými superskripty.

**Tabulka č. 5** Expres FSHR v prasečích kumulárních buňkách

Sledované ukazatele ( $\bar{x} \pm s$ )	n	Prasečí kumulární buňky	
		tubulin	FSHR
<b>Plocha</b> (mm <sup>2</sup> )	6	3,15±0,04	4,51±0,02
<b>POD</b>	6	0,56±0,02	0,72±0,03
<b>IOD</b>	6	1,76±0,03 <sup>A</sup>	3,24±0,02 <sup>B</sup>
<b>RIOD</b>	6	1,00 <sup>A</sup>	1,84 <sup>B</sup>

**POD** - průměrná optická denzita, **IOD** - integrovaná optická denzita, **RIOD** - relativní integrovaná optická denzita, **n** - počet opakování,  $\bar{x}$  - průměr, *s* - směrodatná odchylka

Hodnota integrované optické denzity tubulinu v prasečích kumulárních buňkách byla zvolena jako výchozí pro výpočet RIOD.

Statisticky významné rozdíly ( $P < 0,05$ ) mezi průměry (IOD, RIOD) jsou vyjádřeny různými písmennými superskripty.

### **5.1.2 Expresse LHR**

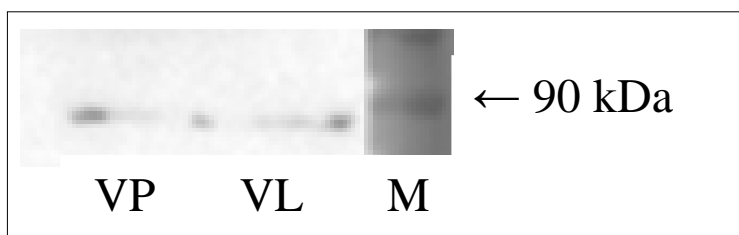
Dalším proteinem, který byl studován, byl receptor pro LH v lidských a prasečích kumulárních buňkách. Primární protilátka byla nejprve použita v ředění 1:2000, které doporučuje výrobce, ale intenzita signálu byla velmi slabá. Proto byla zvýšena její koncentrace na 1:1000, později až na 1:500. Ani v poslední výše uvedené koncentraci však nebylo možné protein námi zvolenou metodou Western blot detekovat. Jedním z důvodů může být pravděpodobně nízké množství proteinu, které je pod detekčním limitem námi zvolené metody.

V případě potřeby detekce LH receptoru metodou Western blot v dalších experimentech by bylo nezbytné ještě navýšit koncentraci primární protilátky proti LHR, popřípadě zvolit protilátku jiného výrobce, dále by bylo možné změnit systém detekce proteinu, popřípadě použít jinou metodu detekce.

## **5.2 Expresse transferinového receptoru**

Byla zjišťována exprese transferinového receptoru u lidských a prasečích kumulárních buněk. Primární protilátka byla nejprve ředěna s 5% roztokem sušeného mléka dle doporučení výrobce v poměru 1:1000. Při tomto ředění primární protilátky byl signál příliš slabý, proto byla pro další detekce tohoto proteinu zvolena koncentrace protilátky 1:500. Při této koncentraci již bylo možné v analyzovaných lidských i prasečích kumulárních buňkách nalézt hledaný transferinový receptor s molekulovou hmotností 90 kDa.

Smímek blotu (Obrázek č. 4) dokládá expresi transferinového receptoru v lidských a prasečích kumulárních buňkách.



**Obrázek č. 4** Expresa transferinového receptoru v kumulárních buňkách

VP - vzorek prasečích kumulárních buněk

VL - vzorek lidských kumulárních buněk

M – marker

V tabulkách č. 6 a 7 jsou uvedeny naměřené hodnoty plochy, průměrné optické denzity a relativní integrované optické denzity transferinového receptoru a tubulinu společně s jejich směrodatnými odchylkami. Pro porovnání množství detekovaného proteinu receptoru transferinu v kumulárních buňkách byly hodnoty IOD receptoru transferinu vztaheny k IOD tubulinu v kumulárních buňkách příslušného druhu. Tímto způsobem byla získána relativní integrovaná optická denzita, která byla v případě tubulinu v kumulárních buňkách člověka i prasete rovna 1.

**Tabulka č. 6** Expresa transferinového receptoru v lidských kumulárních buňkách

Sledované ukazatele ( $\bar{x} \pm s$ )	n	Lidské kumulární buňky	
		tubulin	Transferin R
<b>Plocha</b> (mm <sup>2</sup> )	6	3,08±0,02	4,02±0,02
<b>POD</b>	6	0,73±0,03	0,25±0,03
<b>IOD</b>	6	2,25±0,02 <sup>A</sup>	1,01±0,02 <sup>B</sup>
<b>RIOD</b>	6	1,00 <sup>A</sup>	0,45 <sup>B</sup>

**POD** - průměrná optická denzita, **IOD** - integrovaná optická denzita, **RIOD** - relativní integrovaná optická denzita, **n** - počet opakování,  $\bar{x}$  - průměr, **s** - směrodatná odchylka

Hodnota integrované optické denzity tubulinu v lidských kumulárních buňkách byla zvolena jako výchozí pro výpočet RIOD.

Statisticky významné rozdíly ( $P < 0,05$ ) mezi průměry (IOD, RIOD) jsou vyjádřeny různými písmennými superskripty.

**Tabulka č. 7** Exprese transferinového receptoru v prasečích kumulárních buňkách

Sledované ukazatele ( $\bar{x} \pm s$ )	n	Prasečí kumulární buňky	
		tubulin	Transferin R
<b>Plocha</b> (mm <sup>2</sup> )	6	3,02±0,03	4,15±0,03
<b>POD</b>	6	0,63±0,02	0,28±0,02
<b>IOD</b>	6	1,87±0,02 <sup>A</sup>	1,16±0,02 <sup>B</sup>
<b>RIOD</b>	6	1,00 <sup>A</sup>	0,62 <sup>B</sup>

**POD** - průměrná optická denzita, **IOD** - integrovaná optická denzita, **RIOD** - relativní integrovaná optická denzita, **n** - počet opakování,  $\bar{x}$  - průměr, **s** - směrodatná odchylka

Hodnota integrované optické denzity tubulinu v prasečích kumulárních buňkách byla zvolena jako výchozí pro výpočet RIOD.

Statisticky významné rozdíly ( $P < 0,05$ ) mezi průměry (IOD, RIOD) jsou vyjádřeny různými písmennými superskripty.



## 6 Diskuze

V této práci byla studována exprese receptorů gonadotropních hormonů a proliferačních markerů v kumulárních buňkách člověka a prasete. Zaměřili jsme se na detekci receptorů pro folikulostimulační a luteinizační hormon a detekci proliferačního markeru CD71 transferin R.

V obou typech kumulárních buněk jsme detekovali receptor pro FSH. Tento protein byl detekován v oblasti kolem 80 kDa, což odpovídá literatuře, která uvádí molekulovou hmotnost FSHR u člověka a prasete 78 kDa (Simoni et al. 1997; Menon & Menon 2012). Podle doporučení výrobce jsme ředili primární králičí protilátku s 5% roztokem sušeného mléka v poměru 1:1000, ale detekovaný signál byl příliš slabý. Proto jsme zvýšili koncentraci protilátky 1:500, kdy byla síla signálu detekovaného proteinu dostatečná. Síla signálu reakce antigenu s protilátkou proti FSHR na blotu byla vyjádřena na základě parametru integrované optické denzity, která je rovna součinu průměrné optické denzity a plochy v místě reakce antigenu s protilátkou. Stejným způsobem měřili množství proteinu např. Vogel et al. (1997) či Chmelíková et al. (2009). Aby bylo možné posuzovat množství proteinu v kumulárních buňkách, byly hodnoty integrované optické denzity vztaženy k hodnotě integrované optické denzity proteinu tubulinu v příslušném typu kumulárních buněk. Porovnávány byly vždy denzity proteinů na stejném blotu. Tubulin byl zvolen jako referenční protein, protože se vyskytuje ve všech eukaryotických buňkách, je základní složkou mikrotubulů, které jsou důležitou součástí cytoskeletu. Jedná se o dimerní protein, který se skládá z alfa a beta podjednotky (Downing & Nogales 1998). V našich experimentech byla použita jako referenční exprese podjednotky  $\alpha$ . V porovnání s tubulínem se v kumulárních buňkách člověka i prasete vyskytuje vyšší množství proteinu FSHR.

Dále bylo naším cílem v kumulárních buňkách člověka a prasete detekovat receptor pro luteinizační hormon. LHR je důležitý při regulaci reprodukčních funkcí zahrnujících ovariální steroidogenesi a ovulaci u samic a produkci testosteronu v Leydigových buňkách varlat u samců. Díky své schopnosti vázat jak LH, tak i hCG s vysokou afinitou, je LHR označován jako LH/hCG receptor. Molekulová hmotnost pro LHR se u člověka pohybuje kolem 85 kDa (Bukovsky et al. 2003; Menon & Menon 2012). Podle doporučení výrobce byla použita primární králičí protilátka v koncentraci 1:2000. Po aplikaci chemiluminiscenčního substrátu a vyvolání přístrojem Azure c600 nebyl detekován žádný signál. Podobně jako v případě detekce FSHR jsme koncentraci protilátky nejprve zdvojnásobili, později jsme koncentraci ještě upravili na 1:500, ale hledaný protein o molekulové hmotnosti 85 kDa se nám detekovat nepodařilo. Protein byl stanovován ve vzorcích kumulárních buněk z 20 oocytů, pro další

experimenty by bylo vhodné množství oocytů navýšit, také by bylo možné ještě zvýšit koncentraci použité primární protilátky, nebo pro další sledování zvolit protilátku od jiného výrobce, která by měla vyšší citlivost než protilátka námi zvolená. Popřípadě by také bylo možné změnit systém detekce či zvolit zcela jinou metodu detekce zvoleného proteinu.

Dále jsme studovali expresi transferinového receptoru, CD-71. Hledaný protein se nám podařilo detekovat ve vzorcích obou typů kumulárních buněk. Expresi jsme potvrdili na membráně v oblasti molekulové hmotnosti 90 kDa (Ward 1987). Nejprve byla primární protilátka proti transferinovému receptoru, CD-71 použita v ředění doporučeném od výrobce, 1:1000. Ale stejně jako v případě detekce FSHR se ukázalo, že je doporučená koncentrace primární protilátky příliš nízká a intenzita signálu na blotu byla velmi malá. Proto byla koncentrace primární protilátky zdvojnásobena a po provedení Western blotu byla síla signálu detekovaného proteinu dostatečná. Stejně jako v případě FSHR byly hodnoty integrované optické density CD71 porovnávány s hodnotami integrované optické density referenčního proteinu tubulinu. V obou typech kumulárních buněk bylo méně proteinu než tubulinu.

Transferinový receptor je disulfidovou vazbou vázaný dimer, složený ze dvou identických podjednotek a každá je schopna vázat jednu molekulu transferinu. Jedná se o transmembránový glykoprotein obsahující alespoň tři N – asparaginové oligosacharidy a převážná část receptoru je vystavena na povrchu buňky (Trowbridge et al. 1984; Ward 1987). Transferin a jeho receptor je úzce spjat s dozráváním ovariálních folikulů. Protein transferin se významně podílí na proliferaci buněk savců. Železo se váže s vysokou afinitou na apotransferin a tak se dostává do jak proliferujících, tak i neproliferujících buněk, kde se železo stává nedílnou součástí cytochromového elektronového transportního řetězce. Připojení transferinu na buněčnou membránu je zajištěno pomocí transferinového receptoru. Tento receptor, který přispívá k příjmu železa do buněk, se nalézá na povrchu aktivních proliferujících buněk, ale například i na transformovaných maligních buňkách. Ferrotransferin je, na rozdíl od apotransferinu, nezbytný pro buněčnou proliferaci. Nicméně apotransferin může s ferrotransferinem soupeřit o transferinový receptor a tím tak snižovat rychlost růstu buněk (Aleshire et al. 1989).

V našich experimentech jsme optimalizovali metodu detekce transferinového receptoru, CD71 a receptorů pro gonadotropní hormony v kumulárních buňkách člověka a prasete.

## 7 Závěr

Byla optimalizována detekce proliferačního markeru CD71 a receptorů gonadotropinů v oocyty obklopujících buňkách člověka a prasete. V další fázi experimentů budou kumulární buňky člověka a prasete kultivovány. Během kultivace bude sledován jejich vývoj, proliferační aktivita a viabilita. Jednotlivé subpopulace budou během kultivace pasážovány v závislosti na intenzitě jejich proliferace. Následně budou jednotlivé subpopulace buněk hodnoceny z hlediska jejich diferenciací. Pro tento postup bude využito stanovení charakteristických mezenchymových markerů, jako jsou proteiny CD29-B1 integrin, či CD44 nebo CD 105 endoglin a také výše detekované markery proliferace jako je CD71 – transferin R a receptory pro gonadotropní hormony. Pokud bude během kultivace studována také kumulární expanze, bude možné se zaměřit i na další faktory, které ji regulují, jako je GDF9, HAS2, SMAD 2/3, cyklooxygenáza 2, PTX3 a další. Optimalizace technik *in vitro* kultivace folikulárních buněk je velmi perspektivní a představuje zajímavou alternativu, jak zvýšit úroveň výzkumné práce v oblasti asistované reprodukce člověka i zvířat.

## 9 Literatura

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

Alberts B, Johnson A, Lewis J, Raff M, Roberts K, Walter P. 2002. *Molecular biology of the cell* (4th edition). Garland Science.

Aleshire SL, Osteen KG, Maxson WS, Entman SS, Bradley CA, Parl FF, 1989. Localization of transferrin and its receptor in ovarian follicular cells: morphologic studies in relation to follicular development. *Fertility and Sterility*, **51**: 444–449.

Almeida EA, Huovila AP, Sutherland AE, Stephens LE, Calarco PG, Shaw LM, Mercurio AM, Sonnenberg A, Primakoff P, Myles DG, White JM. 1995. Mouse egg integrin  $\alpha 6\beta 1$  functions as a sperm receptor. *Cell* **81**: 1095–1104.

Aristorena M. Blanco FJ. de Las Casas-Engel M. Ojeda-Fernandez L. Gallardo-Vara E. Corbi A. Botella LM. Bernabeu C. 2014. Expression of endoglin isoforms in the myeloid lineage and their role during aging and macrophage polarization. *Journal of Cell Science* **127**: 2723–2735.

Aruffo A, Stamenkovic I, Melnick M, Underhill CB, Seed B. 1990. CD44 is the principal cell surface receptor for hyaluronate. *Cell* **61**: 1303-1313.

Banerjee AA, Mahale SD, 2015. Role of the extracellular and intracellular loops of follicle-stimulating hormone receptor in its function. *Frontiers in Endocrinology*, **6**: 110.

Barclay AN, Brown MH, Law SKA, Knight AJ, Tomlinson MG, van der Merwe PA. 1997. *The Leucocyte Antigen Facts Book*. Academic Press, Oxford, U. K.

Bartolazzi A, Nocks A, Aruffo A, Spring F, Stamenkovic I. 1996. Glycosylation of CD44 is implicated in CD44-mediated cell adhesion to hyaluronan. *J Cell Biol* **132**: 1199-1208.

Basini G, Falasconi I, Bussolati S, Grolli S, Di Lecce R, Grasselli F. 2016. Swine Granulosa Cells Show Typical Endothelial Cell Characteristics. *Reproductive Sciences* **23**: 630-637.

Bernhardt ML, Kim AL, O'Halloran TV, Woodruff TK. 2011. Zinc requirement during meiosis I – meiosis II transitiv in mouse oocytes is dependent of the MOS-MAPK pathway. *Biology of Reproduction* **84**:526-36.

Bernhardt ML, Kong BY, Kim AM, O'Halloran TV, Woodruff TK. 2012. A zinc-dependent mechanism regulates meiotic progression in mammalian oocytes. *Biology of reproduction* **86**:114-18.

- Borges L, Iacovino M, Mayerhofer T, Koyano-Nakagawa N, Baik J, Garry DJ, Kyba M, Letarte M, Perlingeiro RCR. 2012. A critical role for endoglin in the emergence of blood during embryonic development. *Blood* **119**: 5417–5428.
- Bredt DS, Hwang PM, Snyder SH. 1990. Localization of nitric oxide synthase indicating a neural role for nitric oxide. *Nature* **347**:768–770.
- Briggs D, Miller D, Gosden R. 1999. Molecular biology of female gametogenesis. *Molecular Biology in Reproductive Medicine* 251 – 266.
- Brunet S, Maro B. 2005. Cytoskeleton and cell cycle control during meiotic maturation of the mouse oocyte: integrating time and space. *Reproduction Review* **130**: 803–810.
- 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.
- Buc M. 2001. Immunology. Veda, publisher SAS, Bratislava.
- Buffet NC, Djakoure C, Maitre SC, Bouchard P. 1998. Regulation of the human menstrual cycle. *Frontiers in Neuroendocrinology* **19**:151-186.
- Bukovsky A, Indrapichate K, Fujiwara H, Cekanova M, Ayala ME, Dominguez R, Caudle MR, Wimalseena J, Elder RE, Copas P, Foster JS, Fernando RI, Henley DC, Upadhyaya NB. 2003. Multiple luteinizing hormone receptor (LHR) protein variants, interspecies reactivity of anti-LHR mAb clone 3B5, subcellular localization of LHR in human placenta, pelvic floor and brain, and possible role for LHR in the development of abnormal pregnancy, pelvic floor disorders and Alzheimer's disease. *Reproductive Biology and Endocrinology* **46**:1-18.
- Bukovsky A. 2005. Origin of Germ Cells and Follicular Renewal in Adult Human Ovaries. *Microscopy and Microanalysis* **11**: 918-919.
- Cicccone NA, Kaiser UB. 2009. The biology of gonadotroph regulation. *Current Opinion in Endocrinology Diabetes and Obesity* **16**:321-327.
- Cole LA, Khanlian SA, Muller CY. 2008. Detection of perimenopause or postmenopause human chorionic gonadotropin: an unnecessary source of alarm. *American Journal of Obstetrics and Gynecology* **198**: 275-283.
- Cole LA. 2010. Biological functions of hCG and hCG-related molecules. *Reproductive Biology and Endocrinology* **8**:102.
- Davis R. 1993. The mitogen-activated protein kinase signal transduction pathway. *Journal of Biological Chemistry* **268**:14553-14556.

De Vantéry C, Stutz A, Vassalli JD, Schorderet-Slatkine S. 1997. Acquisition of meiotic competence in growing mouse oocyte is controlled at both translational and posttranslational levels. *Developmental Biology* **187**:43–54.

Dekel, N, Beers WH. 1980. Development of the rat oocyte in vitro: inhibition and induction of maturation in the presence or absence of the cumulus oophorus. *Developmental Biology* **75**:247-54.

Dekel N, Hillensjo Y, Kraicer PF. 1979. Maturation effects of gonadotropins on the cumulus-oocyte complex of the rat. *Biology of Reproduction* **20**:191–197.

Dempsey EC, Newton AC, Mochly-Rosen D, Fields AP, Reyland ME, Insel PA, Messing RO. 2000. Protein kinase C isozymes and the regulation of diverse cell responses. *Am J Physiol Lung Cell Moll Physiol* **279**:429-438.

Dinerman JL, Dawson TM, Shell MJ, Snowman A, Snyder SH. 1994. Endothelial nitric oxide synthase localized to hippocampal pyramidal cells: implications for synaptic plasticity. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **91**:4214 – 4218.

Dixit DV, Parvizi N, 2001. Nitric oxide and the control of reproduction. *Animal reproduction science* **65**:1 –16.

Downing KH, Nogales E. 1998. Tubulin structure: insights into mikrotubule properties and functions. *Current Opinion in Structural Biology* **8**:785-791.

Dupré A, Buffin E, Roustan C, Nairn AC, Jessus C, Haccard O. 2013. The phosphorylation of ARPP19 by Greatwall renders the autoamplification of MPF independent of PKA in *Xenopus* oocytes. *Journal of cell science* **126**:3916-3926.

Ebeling S, Topfer D, Meinecke B. 2011. Steroidogenesis and the influence of MAPK activity during in vitro maturation of porcine cumulus oocyte complexes. *Reproduction in Domestic Animals* **46**:513-19.

Edry I, Sela-Abramovich S, Dekel N. 2006. Meiotic arrest of oocytes depends on cell-to-cell communication in the ovarian follicle. *Molecular and cellular endocrinology* **252**:102-6

Elvin JA, Clark AT, Wang P, Wolfman NM, Matzuk MM. 1999. Paracrine actions of growth differentiation factor-9 in the mammalian ovary. *Molecular Endocrinology* **13**:1035-1048.

Entman SS, Maxson WS, Bradley CA, Osteen K, Webster BW, Vaughn WK, Wentz AC. 1987. Follicular fluid transferrin levels in preovulatory human follicles. *Journal of in Vitro Fertilization and Embryo Transfer* **4**:98–102.

- Eppig JJ, Wigglesworth K, Pendola F, Hirao Y. 1997. Murine oocytes suppress expression of luteinizing hormone receptor messenger ribonucleic acid by granulosa cells. *Biology of Reproduction* **56**:976-984.
- Eppig JJ. 1979. FSH stimulates hyaluronic acid synthesis by oocyte-cumulus cell complexes from mouse preovulatory follicles. *Nature* **281**:483-484.
- Eppig JJ. 1982. The relationship between cumulus cell-oocyte coupling, oocyte meiotic maturation and cumulus expansion. *Developmental Biology* **89**:268-272.
- Eppig JJ. 1991. Maintenance of meiotic arrest and the induction of oocyte maturation in mouse oocyte-granulosa cell complexes developed in vitro from preantral follicles. *Biology of Reproduction* **45**:824-830.
- Eppig JJ. 2001. Oocyte control of ovarian follicular development and function in mammals. *Reproduction* **122**:829 - 838.
- Esford LE, Maiti A, Bader SA, Tufaro F, and Johnson P. 1998. Analysis of CD44 interactions with hyaluronan in murine L cell fibroblasts deficient in glycosaminoglycan synthesis: A role for chondroitin sulfate. *J. Cell Sci* **111**: 1021-1029.
- Evans JP. 2002. The molecular basis of sperm-oocyte membrane interactions during mammalian fertilization. *Hum. Reprod. Update* **8**: 297-311.
- Fábryová K, Simon M. 2009. Function Of The Cell Surface Molecules (CD Molecules) In The Reproduction Processes. *Gen. Physiol. Biophys* **28**: 1-7.
- Fair T. 2003. Follicular oocyte growth and acquisition of developmental competence. *Animal Reproduction Science* **78**:203-216.
- Fan H, Tong CH, Chen D, Sun Q. 2002. Roles of MAP kinase signaling pathway in oocyte meiosis. *Chinese Science Bulletin* **47**:1157-1162.
- Fan HY, Huo LJ, Meng XQ, Zhong ZS, Hou Y, Chen DY, Sun QY. 2003. Involvement of calcium/calmodulin-dependent protein kinase II (CaMKII) in oocyte maturation and activation of pig oocytes. *Biology of Reproduction* **69**:1552-64.
- Fan QR, Hendrickson WA. 2005. Structure of human follicle-stimulating hormone in complex with its receptor. *Nature* **433**: 269-277.
- Ferreira EM, Vireque AA, Adona PR, Meirelles FV, Ferriani RA, Navarro PA. 2009. Cytoplasmic maturation of bovine oocytes: structural and biochemical modifications and acquisition of developmental competence. *Theriogenology* **71**:836-848.
- Fox KM, Dias JA, Van Roey P. 2001. Three-dimensional structure of human folliclestimulating hormone. *Molecular Endocrinology* **15**:378-389.

- Fulop C, Salustri A, Hascall VC. 1997. Coding sequence of a hyaluronan synthase homologue expressed during expansion of the mouse cumulus-oocyte complex. *Arch. Biochem. Biophys* **337**:261-266.
- Ganong WF. 2005. *Přehled lékařské fyziologie, dvacáté vydání*. Galén. Praha.
- Garrington TP, Johnson GL. 1999. Organization and regulation of mitogen-activated protein kinase signaling pathways. *Current Opinion in Cell Biology* **11**:211-18.
- Gosden RG. 2002. Oogenesis as a foundation for embryogenesis. *Molecular and Cellular Endocrinology* **186**:149–153.
- Gosden RG, Bownes M. 1995. *Cellular and molecular aspects of oocyte development, Gametes - The Oocyte*, Cambridge University Press, Cambridge.
- Gulyas BJ. 1979. Cortical granules of mammalian eggs. *International Review of Cytology* **63**:257-392.
- Guraya SS. 1982. Recent progress in the structure, origin, composition and function of cortical granules in animal eggs. *International Review of Cytology* **78**:257–360.
- Guraya SS. 2000. *Comparative Cellular and Molecular Biology of Ovary in Mammals Fundamentals and Applications*. Science Publishers. New Hampshire. USA and Oxford IBH. New Delhi.
- Guraya SS. 2008. *Cellular and Molecular Biology of Human Oogenesis, Ovulation, and Early Embryogenesis*. NewAge International (P) Ltd., Publishers. New Delhi.
- Hafez ESE, Hafez B. 2000. *Folliculogenesis, Egg Maturation, and Ovulation In: Reproduction in Farm Animals*. Lippincott Williams and Wilkins, Philadelphia.
- Han ZB, Lan CG, Wu YG, Han D, Feng WG, Wang JZ, Tan JH. 2006. Interactive effect of granulosa cell apoptosis, follicle size, cumulus-oocyte complexes morphology, and cumulus expansion on the developmental competence of goat oocytes: a study using the well-in-drop culture system. *Reproduction* **132**:749–758.
- Hattori MA, Nishida N, Takesue K, Kato Y, Fujihara N. 2000. FSH suppression of nitric oxide synthesis in porcine oocytes. *Journal of Molecular Endocrinology* **24**:65–73.
- Heytens E, Soleimani R, De Sutter P. 2008. Oocyte activation: The impact of calcium signals on fertilization. *Iranian Journal of Reproductive Medicine* **6**:171-174.
- Horner K, Litera G, Hinckley M, Trknu K, Storm D, Conti M. 2003. Rodent oocytes express an active adenylyl cyclase required for meiotic arrest. *Developmental Biology* **258**:385-96.



- Huo LJ, Liang CG, Yu LZ, Zhong ZS, Yang ZM, Fan HY, Chen DY, Sun QY. 2005. Inducible nitric oxide synthase – derived nitric oxide regulates Terminal vesicle breakdown and first polar body emission in the mouse oocyte. *Reproduction* **129**:403 – 409.
- Hutt KJ, McLaughlin EA, Holland MK. 2006. Kit ligand and c-Kit have diverse roles during mammalian oogenesis and folliculogenesis. *Molecular human reproduction* **12**:61–69.
- Hynes RO. 1992. Versatility, modulation, and signaling in cell adhesion. *Cell* **69**: 11–25.
- Chen H, Kui C, Chan HC. 2013. Ca<sup>2+</sup> mobilization in cumulus cells: role in oocyte maturation and acrosome reaction. *Cell Calcium* **53**:68-75.
- Chen H, Sampson NS. 1999. Mediation of sperm-egg fusion: evidence that mouse egg  $\alpha 6\beta 1$  integrin is the receptor for sperm fertilinbeta. *Chem. Biol.* **6**: 1–10.
- Chen L, Russell PT, Larsen W. 1993. Functional significance of cumulus expansion in the mouse: role for the preovulatory synthesis of hyaluronic acid within the cumulus mass. *Molecular Reproduction and Development* **34**:87–93.
- Chen L, Wert SE, Hendrix EM, Russell PT, Cannon M, Larsen WJ. 1990. Hyaluronic acid synthesis and gap junction endocytosis are necessary for normal expansion of cumulus mass. *Molecular Reproduction and Development* **26**:236–247.
- Chmelíková E, Jeřeta M, Sedmíková M, Petr J, Tůmová L, Kott T, Lipovová P, Jilek F. 2010. Nitric oxide synthase isoforms and the effect of their inhibition on meiotic maturation of porcine oocytes. *Zygote* **18**:235–244.
- Choi T, Fukusawa K, Zhou R, Tessarollo L, Borrer K, Resau J, Vande-Woude G. 1996. The Mos/mitogen protein kinase (MAPK) pathway regulates the size and degradation of the first polar body in maturing mouse oocytes. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA* **93**:7032–7035.
- Inoue M, Naito K, Aoki F, Toyoda Y, Sato E. 1995. Activation of mitogen-activated protein kinase during meiotic maturation in porcine oocytes. *Zygote* **3**:265-271.
- Jablonka-Shariff A, Olson ML. 1997. Hormonal regulation of nitric oxide synthases and their cell- specific expression during follicular development in the rat ovary. *Endocrinology* **138**:460–468.
- Ji TH, Grossmann M, Ji IH. 1998. G protein-coupled receptors I. Diversity of receptorligand interactions. *Journal of Biological Chemistry*, 273, 17299-17302.
- Johnson J, Bagley J, Skaznik–Wikiel M, Lee HJ, Adams GB, Niikura Y, Tschudy KS, Tilly JC, Cortes ML, Forkert R, Spitzer T, Iacomini J, Scadden DT, Tilly JL. 2005. Oocyte generation in adult mammalian ovaries by putative germ cells in bone marrow and peripheral blood. *Cell* **122**:303–315.

- Johnson J, Canning J, Kaneko T, Pru JK, Tilly JL. 2004. Germline stem cells and follicular renewal in the postnatal mammalian ovary. *Nature* **6979**:145–150.
- Johnson MT. 2007. Oxidative metabolism of pyruvate is required for meiotic maturation of murine oocytes in vivo. *Biology of Reproduction* **77**:2-8.
- Jones KT. 2004. Turning it on and off: M-phase promoting factor during meiotic maturation and fertilization. *Molecular Human Reproduction* **10**:1-5.
- Kanitz W, Brussow K, Becker F, Torner H, Schneider F, Kubelka M, Tomek W. 2001. Comparative aspects of follicular development, follicular and oocyte maturation and ovulation in cattle and pigs. *Archiv fur Tierzucht – Archives of Animal Breeding***44**:9–23.
- Kim AM, Bernhardt ML, Kong BY, Ahn RW, Vogt S, Woodruff TK, O'Halloran TV. 2011. Zinc sparks are triggered by fertilization and facilitate cell cycle resumption in mammalian eggs. *ACS Chemical Biology* **6**:716-23.
- Kim AM, Vogt S, O'Halloran TV, Woodruff T. K. 2010. Zinc availability regulates exit from meiosis in maturing mammalian oocytes. *Nature Chemical Biology* **6**:674-81.
- Kimura N, Konno Y, Miyoshi K, Matsumoto H, Sato E. 2002. Expression of hyaluronan synthases and CD44 messenger RNAs in porcine cumulus-oocyte complexes during in vitro maturation. *Biology of Reproduction* **66**:707–717.
- Kishimoto T. 2003. Cell-cycle control during meiotic maturation. *Current Opinion in Cell Biology* **15**:654-63.
- Kong BY, Bernhardt ML, Kim AM, O'Halloran TV, Woodruff TK. 2012. Zinc Maintains Prophase I Arrest in Mouse Oocytes Through Regulation of the MOS-MAPK Pathway. *Biology of Reproduction* **87**:1-12.
- Krisher R. 2013. *Oocyte Physiology and Development in Domestic Animals*, Wiley, Somerset.
- Lee J, Miyano T, Moor RM. 2000. Localisation of phosphorylated MAP kinase during the transition from meiosis I to meiosis II in pig oocytes. *Zygote* **8**:119 – 25.
- Lee YM, Kim TH, Lee JH, Lee WJ, Jeon RH, Jang SJ, Rho GJ. 2016. Overexpression of Oct4 in porcine ovarian stem/stromal cells enhances differentiation of oocyte-like cells in vitro and ovarian follicular formation in vivo. *Journal of Ovarian Research* **9**(1): 116.
- Li YH, Kang H, Xu YN, Heo YT, Cui XS, Kim NH, Oh JS. 2013. Greatwall Kinase Is Required for Meiotic Maturation in Porcine Oocytes. *Biology of reproduction* **89**:53.
- Liang R, Yu WD, Du JB, Yang LJ, Yang JJ, Xu J, Slang M, Guo J. Z. 2007. Cystathionine synthase participates in murine oocyte maturation mediated by homocysteine. *Reproductive Toxicology* **24**:89-96.

- Lisle RS, Anthony K, Randall MA, Diaz FJ. 2013. Oocyte-cumulus cell interactions regulate free intracellular zinc in mouse oocytes. *Reproduction* **145**:381-90.
- Lucas X, Martínez EA, Roca J, Vázquez JM, Gil MA, Pastor LM, Alabart JL. 2002. Relationship between antral follicle size, oocyte diameters and nuclear maturation of immature oocytes in pigs. *Theriogenologi* **58**:871 – 885.
- Luciano AM, Lodde V, Franciosi F, Tessaro I, Corbani D, Modina S. 2012: Large-scale chromatin morpho-functional changes during mammalian oocyte growth and differentiation. *European Journal of Histochemistry* **56**:37.
- Luttrell LM, Lefkowitz RJ. 2002. The role of  $\beta$ -arrestins in the termination and transduction of G-protein-coupled receptor signals. *J. Cell Sci* **115**:455–465.
- Marchal R, Vigneron C, Perreau C, Bali-Papp A, Mermillod P. 2002. Effect of follicular size on meiotic and developmental competence of porcine oocytes. *Theriogenology*, **57**:1523–1532.
- Marteil G, Richard-Parpaillon L, Kubiak JZ. 2009. Role of oocyte quality in meiotic maturation and embryonic development. *Reproductive biology* **9**:203 – 224.
- Matsuda S, Kosako H, Takenaka K, Moriyama K, Sakai H, Akiyama T, Gotoh Y, Nishida E. 1992. Xenopus MAP kinase activator – identification and function as a key intermediate in the phosphorylation cascade. *Embo Journal* **11**:973-982.
- Mattioli M, Gioia L, Barboni B. 1998. Calcium elevation in Wheel cumulus-oocyte complexes after luteinising hormone stimulation. *Molecular Reproduction and Development* **50**:361-69.
- Mehlmann LM, Terasaki M, Jaffe LA, Kline D. 1995. Reorganization of the endoplasmic reticulum during meiotic maturation of the mouse oocyte. *Developmental Biology* **17**:607 – 615.
- Menon KMJ, Menon B. 2012. Structure, function and regulation of gonadotropin receptors – A perspective. *Molecular and Cellular Endocrinology* **356**:88–97.
- Miller BJ, Georges-Labouesse E, Primakoff P, Myles DG. 2000. Normal fertilization occurs with eggs lacking the integrin  $\alpha 6\beta 1$  and is CD9-dependent. *J. Cell Biol.* **149**: 1289–1295.
- Miyano T. 2005. In vitro growth of mammalian oocytes. *Journal of Reproduction and Development* **51**:169–176.
- Miyoshi T, Otsuka F, Inagaki K, Otani H, Takeda M, Suzuki J, Goto J, Ogura T, Makino H. 2007. Differential regulation of steroidogenesis by bone morphogenetic proteins in

granulosa cells: involvement of extracellularly regulated kinase signaling and oocyte actions in follicle-stimulating hormone-induced estrogen production. *Endocrinology* **148**:337-45.

Moore H, Udayashankar R, Aflatoonian B. 2008. Stem cells for reproductive medicine. *Molecular and cellular endocrinology* **288**:104–110.

Motlík J, Kubelka M. 1990. Cell-cycle aspects of growth and maturation of mammalian oocytes. *Molecular Reproduction and Development* **27**:368-376.

Murray AW, Kirschner M. 1989. Cyclin synthesis drives the early embryonic cell cycle. *Nature* **339**:276-280.

Murray Jr. R, Mayes PA, Rodwell VW, Granner DK. 2003. *Harper's illustrated biochemistry*. 26th Ed. McGraw-Hill, New York.

Naito K, Fukuda Y, Toyoda Y. 1988. Effects of porcine follicular fluid on male pronucleus formation in porcine oocytes matured in vitro. *Gamete Research* **21**:289-95.

Nakayama T, Inoue M, Sato E. 1996. Effect of oocytectomy on glycosaminoglycan composition during cumulus expansion of porcine cumulus-oocyte complexes cultured in vitro. *Biology of Reproduction* **55**:1299–1304.

Němcová L, Nagyova E, Petlach M, Tomanek M, Prochazka R. 2007. Molecular mechanisms of insulin-like growth factor 1 promoted synthesis and retention of hyaluronic acid in porcine oocyte-cumulus complexes. *Biology of Reproduction* **76**:1016–1024.

Newton AC. 1995. Protein kinase C: Structure, function, and Regulation. *J. Biol. Chem* **270**:28495–28498.

Norris RP, Ratzan WJ, Fredzon M, Mehlmann LM, Krall J, Movsesian MA, Wang H, Ke H, Nikolaev VO, Jaffe LA. 2009. Cyclic GMP from the surrounding somatic cells regulates cyclic AMP and meiosis in the mouse oocyte. *Development* **136**:1:869-78.

Nurse P. 1990. Universal control mechanism regulating onset of M-phase. *Nature* **344**: 504-508.

Ohashi Y, Hoshino Y, Tanemura K, Sato E. 2013. Distribution of protein disulfide isomerase during maturation of pig oocytes. *Animal Science Journal* **84**:15–22.

Ohta N, Saito H, Kuzumaki T, Takahashi T, Ito MM, Saito T, Nakahara K, Hiroi M. 1999. Expression Of CD44 In Human Cumulus And Mural Granulosa Cells Of Individual Patients In In-Vitro Fertilization Programmes. *Molecular Human Reproduction*.**5**:22–28.

Olijve W, De Boer W, Mulders JW, Van Wezenbeek PM. 1996. *Molecular biology and biochemistry of human recombinant follicle stimulating hormone (Puregon)*. NV Organon, Oss, The Netherlands: Molecular human reproduction 371-382.

Opiela J, Katska-Ksiazkiewicz L. 2004. Characterization of mammalian oocyte competence to undergo fertilization and embryonic development. I. Nuclear maturation and molecular aspects of its regulation. *Biotechnologia* **66**: 107–118.

Ozawa M. 2010. Cumulus cell-enclosed oocytes acquire a capacity to synthesize GSH by FSH stimulation during in vitro maturation in pigs. *Journal of Cellular Physiology* **222**: 294–301.

Pae HO, Lee YCh, Jo EK, Chung HT. 2009. Subtle Interplay of Endogenous Bioactive Gases (NO, CO and H<sub>2</sub>S) in Inflammation. *Archives of Pharmacal Research* **32**:1155-1162.

Peng J, Li Q, Wigglesworth K, Rangarajan A, Kattamuri C, Peterson RT, Eppig JJ, Thompson TB, Matzuk MM. 2013. Growth differentiation factor 9: Bone morphogenetic protein 15 heterodimers are potent regulators of ovarian functions. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **110**:776-85.

Picton H, Briggs D, Gosden R. 1998. The molecular basis of oocyte growth and development. *Molecular and Cellular Endocrinology* **145**:30–38.

Picton HM 2001. Activation of follicle development: the primordial follicle. *Theriogenology* **55**:1193-121.

Piersma D, Themmen AP, Look MP, Klijn JG, Foekens JA, Uitterlinden AG, Ap Pols H, Berns EM. 2007. GnRH and LHR gene variants predict adverse outcome in premenopausal breast cancer patients. *Breast Cancer Research*, **9**.

Pincus G, Enzmann EV. 1935. The comparative behaviour of mammalian eggs in vivo and in vitro. *J. exp. Med* **62**:655-675.

Ramaro CS, Myles DG, White JM, Primakoff P. 1996. Initial evaluation of fertilin as an immunocontraceptive antigen and molecular cloning of the cynomolgus monkey fertilin  $\beta$  subunit. *Mol. Reprod. Dev.* **43**: 70–75.

Richards JS, Russell DL, Ochsner S, Hsieh M, Doyle KH, Falender AE, Lo YK, Sharma SC. 2002. Novel signalling pathways that control ovarian follicular development, ovulation, and luteinization. *Recent Progress in Hormon Research* **57**:195-220.

Rolaki A, Coukos G, Loutradis D, DeLisser HM, Coutifaris C, Makrigiannakis A. 2007. Luteogenic hormones act through a vascular endothelial growth factor-dependent mechanism to up-regulate  $\alpha(5)\beta(1)$  and  $\alpha(v)\beta(3)$  integrins, promoting the migration and survival of human luteinized granulosa cells. *American Journal of Pathology* **170**:1561-1572.

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

Roux PP, Blenis J. 2004. ERK and p38 MAPK-Activated Protein Kinases: a family of protein kinases with diverse biological functions. *Microbiology and Molecular Biology Reviews* **68**:320-344.

Russel DL. 2016. Bidirectional communication between cumulus cells and the oocyte: Old hands and new players? *Theriogenology*, **86**: 62-68.

Sadler TW, Langman J. 2004. *Langman's Medical Embryology*. Lippincott Williams & Wilkins.

Salustri A, Camaioni A, Di Giacomo M, Fulop C, Hascall VC. 1999. Hyaluronan and proteoglycans in ovarian follicles. *Hum. Reprod. Update* **5**:93-301.

Salustri A. 2000. Paracrine actions of oocytes in the mouse pre-ovulatory follicle. *International Journal of Developmental Biology* **44**:591-97.

Sanz-Rodriguez F, Guerrero-Esteo M, Botella LM, Banville D, Vary C, PH, Bernabéu C. 2004. Endoglin Regulates Cytoskeletal Organization through Binding to ZRP-1, a Member of the Lim Family of Proteins. *Journal of Biological Chemistry* **279**: 32858–32868.

Sasseville M, Coté N, Gagnon MC, Richard FJ. 2008. Upregulation of 3'5'-cyclic guanosine monophosphate-specific phosphodiesterase in the porcine cumulus-oocyte complex affects steroidogenesis during in vitro maturation. *Endocrinology* **149**:5568-76.

Sato E, Itami N, Tasaki H, Takeo S, Kuwayama T, Iwata H. 2014. Relationship between mitochondrial DNA copy number and SIRT1 expression in porcine oocytes. *PLoS One* **9**:1-8

Sela-Abramovich S, Edry I, Galiani D, Nevo V, Dekel N. 2006. Disruption of gap junctional communication within the ovarian follicle induces oocyte maturation. *Endocrinology* **147**:2280-6.

Sengoku K, Takuma N, Horikawa M, Tsuchiya K, Komori H, Sharifa D, Tamate K, Ishikawa M. 2001. Requirement of nitric oxide for murine oocyte maturation, embryo development, and trophoblast outgrowth in vitro. *Mol. Reprod. De.* **58**:262 – 268.

Shenoy SK, Lefkowitz RJ. 2003. Multifaceted roles of betaarrestins in the regulation of seven-membrane-spanning receptor trafficking and signalling. *Biochem. J* **375**:503–515.

Shoji S, Yoshida N, Amanti M, Ohgishi M, Fukui T, Fujimoto S, Nakano Y, Kajikawa E, Perry ACF. 2006. Mammalian Emi2 mediates cytostatic arrest and transduces the signal for meiotic exit via Cdc20. *Embo Journal* **25**:834-845.

Schmidt A, Rauh NR, Nigg EA, Mayer TU. 2006. Cytostatic factor: an activity that puts the cell cycle on hold. *Journal of Cell Science* **119**:1213-1218.

Siguiria K, Su YQ, Diaz FJ, Pangas SA, Sharma S, Wigglesworth K, O'Brien MJ, Matzuk MM, Shimasaki S, Eppig JJ. 2007. Oocyte-derived bmp15 and fgfs cooperate to promote glycolysis in cumulus cells. *Development* **134**:2593-2603.

Simoni M, Gromoll J, Nieschlag E. 1997. The follicle-stimulating hormone receptor: biochemistry, molecular biology, physiology, and pathophysiology. *Endocrine Reviews* **18**:739-73.

Simoni M, Gromoll J, Nieschlag E. 1997. The follicle-stimulating hormone receptor: Biochemistry, molecular biology, physiology, and pathophysiology. *Endocrine Reviews* **18**:739-773.

Sirard MA, Richard F, Blondin P, Robert C. 2006. Contribution of the oocyte to embryo quality. *Theriogenology* **65**:126-136.

Sirard MA. 2001. Resumption of meiosis: mechanism involved in meiotic progression and its relation with developmental competence. *Theriogenology* **55**:1241-1254.

Smith GD. 2001. Control of oocyte nuclear and cytoplasmic maturation. In: WOLF D. P., ZELINSKI-WOOTEN M. (eds.). *Contemporary endocrinology: assisted fertilization and nuclear transfer in mammals*. Humana Press inc. Totowa, New Jersey, USA.

Stamenkovic I, Aruffo A, Amiot M. 1991. The hematopoietic and epithelial forms of CD44 are distinct polypeptides with different adhesion potentials for hyaluronate-bearing cells. *EMBO J.* **10**: 343-347.

Stojkovic M, Machado SA, Stojkovic P, Zakhartchenko V, Hutzler P, Goncalves PB, Wolf E. 2001. Mitochondrial distribution and adenosine triphosphate content of bovine oocytes before and after in vitro maturation: correlation with morphological criteria and developmental capacity after in vitro fertilization and culture. *Biology of Reproduction* **64**:904-909.

Stojkovic M, Motlik J, Kölle S, Zakchartchenko V, Albertio R, Sinowatz F, Wolf E. 1999. Cell-cyclo control and oocyte maturation: Review of literature. *Reproduction in Domestic Animals* **24**:336-342.

Su YQ, Sugiura K, Wigglesworth K, O'Brien MJ, Affourtit JP, Pangas SA, Matzuk MM, Eppig JJ. 2008. Oocyte regulation of metabolic cooperativity between mouse cumulus cells and oocytes: Bmp15 and gdf9 control cholesterolbiosynthesis in cumulus cells. *Development* **135**:111-121.

Sun QY, Miao YL, Schatten H. 2009. Towards a new understanding on the regulation of mammalian oocyte meiosis resumption. *Cell cycle* **8**:2741-7.

Sun QY, Wu GM, Lai L, Park KW, Cabot R, Cheong HT, Day BN, Prather RS, Shatten H. 2001. Translocation of active mitochondria during pig oocyte maturation, fertilization and early embryo development in vitro. *Reproduction* **122**:155–163.

Šutovský P, Flechon JE, Pavlok A. 1994. Microfilaments, microtubules and intermediate filaments fulfil differential roles during gonadotropin-induced expansion of bovine cumulus oophorus. *Reproduction Nutrition Development* **34**:415–425.

Tao JY, Fu Z, Zhang ML, Xia G, Lei L, Wu ZL. 2005. Nitric oxide influences the meiotic maturation of porcine oocytes cultured in hypoxanthine-supplemented medium. *Journal of Animal Physiology and Animal Nutrition* **89**:38–44.

Tao Y, Fu Z, Zhang M, Xia G, Yang J, Xie H. 2004. Immunohistochemical localization of inducible and endothelial nitric oxide synthase in porcine ovaries and effects of NO on antrum formation and oocyte meiotic maturation. *Molecular and Cellular Endocrinology* **222**:93–103.

Themmen APN, Huhtaniemi IT. 2000. Mutations of gonadotropins and gonadotropin receptors: Elucidating the physiology and pathophysiology of pituitary-gonadal function. *Endocrine Reviews* **21**:551–583.

Tienthai P, Kimura N, Heldin P, Sato E, Rodriguez-Martinez H. 2003. Expression of hyaluronan synthase-3 in porcine oviducal epithelium during oestrus. *Reprod. Fertil. Dev* **15**: 99–105.

Tirone E, D'Alessandris C, Hascall VC, Siracusa G, Salustri A. 1997. Hyaluronan synthesis by mouse cumulus cells is regulated by interactions between follicle-stimulating hormone (or epidermal growth factor) and soluble oocyte factor (or transforming growth factor beta1). *J. Biol. Chem.* **272**:4787-4794.

Tirone E, Siracusa G, Hascall VC, Frajese G, Salustri A. 1993. Oocytes preserve the ability of mouse cumulus cells in culture to synthesize hyaluronic acid and dermatan sulfate. *Developmental Biology* **160**:405–412.

Törnell J, Billig H, Hillensjö T. 1991. Regulation of oocyte maturation by cAMP in ovarian levels of cyclic nucleotides. *Human reproduction* **64**:11-22.

Torner H, Brüssow KP, Tomek W, Alm H, Ratky J. 1998. Structural and functional changes in porcine cumulus-oocyte-complexes during preovulatory maturation. *Reproduction in Domestic Animals* **33**:249–253.

Trowbridge IS, Newman RA, Domingo DL, Sauvage C. 1984. Transferrin receptors: Structure and function. *Biochemical Pharmacology* **3**:925–932.



- Tsafiriri A, Dekel N, Bar-Ami S. 1982. The role of oocyte maturation inhibitor in follicular regulation of oocyte maturation. *J. Reprod. Fertilization* **64**:541–551.
- Tsafiriri A, Pomerantz SH. 1986. *Clinics in Endocrinology and Metabolism* **15**:157-170
- Tunquist B, Maller JL. 2003. Under arrest: cytosstatic factor (CSF) – mediated mataphase arrest in vertebrate eggs. *Genes & Dev* **17**:683-710.
- Van den Hurk R, Zhao J. 2005. Formation of ovarian follicles and their growth, differentiation and maturation within ovarian follicles. *Theriogenology***63**:1717-1751.
- Vanderhyden BC, Armstrong DT. 1989. Role of cumulus cells and serum on the in vitro maturation, fertilization, and subsequent development of rat oocytes. *Biology of Reproduction* **40**:720-728.
- Vanderhyden BC. 2002. Molecular basis of ovarian development and function. *Front. Biosci* **7**:2006 – 2022.
- Viana KS, Caldas-Bussiere MC, Matta SGC, Faes MR, Paes de Carvalho CS, Quirino CR. 2007. Effect of sodium nitroprusside, a nitric oxide donor, on the in vitro maturation of bovine oocytes. *Animal Reproduction Science* **102**:217-227.
- Viveiros MM, Hirao Y, Eppig J. 2001. Evidence that protein kinase C (PKC) participates in the meiosis I to meiosis II transition in mouse oocytes. *Dev. Biology* **235**:330-342.
- Wang R, He G, Nelman-Gonzalez M, Ashorn CL, Gallick GE, Stukenberg PT, Kirschner MW, Kuang J. 2007. Regulation of Cdc25C by ERK – MAP kinases during the G2/M transition. *Cell* **128**:1119–1132.
- Wang RUI. 2002. Two's company, three's a crowd: can H2S be the third endogenous gaseous transmitter? *The FASEB Journal* **16**:1792–1798.
- Ward JH. 1987. The Structure, Function, and Regulation of Transferrin Receptors. *Investigative Radiology* **22**:74–83.
- Wassarman PM, Albertini DF. 1994. The mammalian ovum, In: Knobil E., Neil J. et al. (ed): *The physiology of reproduction*, 2. vydání, Raven Press. New York.
- Wassarman PM. 1988. The mamalian ovum. In Knobil, E., Neil, J. *The physiology of reproduction*.Raven press. New York.
- Winterhagen E, Kidder GM. 2015. Gap junctions connexins in female reproductive organs: Implications for women's reproductive health. *Human Reproduction Update* **21**:340-352.
- Yamano H, Gannon J, Mahbubani H, Hunt T. 2004. Cell Cycle-regulated recognition of the destruction box of cyclin B by the APC/C in *Xenopus* egg extracts. *Molecular Cell* **16**:2-3.

- Yokoo M, Kimura N, Sato E. 2010. Induction Of Oocyte Maturation By Hyaluronan-CD44 Interaction In Pigs. *Journal Of Reproduction And Development* **56** (1): 15-19.
- Yokoo M, Kimura N, Sato E. 2010. Induction of oocyte maturation by hyaluronan-CD44 interaction in pigs. *Journal of Reproduction and Development* **56**:15–19.
- Yokoo M, Nagahara T, Kimura N, Shimizu T, Matsumoto H, Sasada H, Sato E. 2003. Hyaluronan-CD44 system during cumulus expansion induces oocyte maturation in pig. *Biology of Reproduction* **68**: 325–326.
- Yokoo M, Sato E. 2004. Cumulus–Oocyte Complex Interactions During Oocyte Maturation. *International Review Of Cytology*: 251–291.
- Yokoo M, Shimizu T, Kimura N, Tunjung WAS, Matsumoto H, Abe H, Sasada H, Rodrigez-Martinez H, Sato E. 2007. Role Of The Hyaluronan Receptor CD44 During Porcine Oocyte Mauration. *Journal Of Reproduction And Development* **53** (2): 263-270.
- Yu FQ, Han CS, Yang W, Jin X, Hu ZY, Liu YX. 2005. Activation of the p38 MAPK pathway by follicle-stimulating hormone regulates steroidogenesis in granulosa cells differentially. *Journal of Endocrinology* **186**:85-96.
- Zhang X, Han YB, Sui HS, Miao DQ, Wang JZ, Li KL, Tan JH. 2008. Developmental and hormonal regulation of cumulus expansion and secretion of cumulus expansion-enabling factor (CEEF) in goat follicles. *Molecular Reproduction and Development* **75**:1387–1395.
- Zhuo L, Kimata K. 2001. Cumulus Oophorus Extracellular Matrix: Its Construction and Regulation. *Cell Structure and Function* **26**:189–196.
- Ziyat A, Rubinstein E, Monier-Gavelle F, Barraud V, Kulski O, Prenant M, Boucheix C, Bomsel M, Wolf J.-P. 2006. CD9 controls the formation of clusters that contain tetraspanins and the integrin  $\alpha 6\beta 1$ , which are involved in human and mouse gamete fusion. *J. Cell Sci.* **119**: 416–424.