

ČESKÁ ZEMĚDĚLSKÁ UNIVERZITA V PRAZE
Fakulta agrobiologie, potravinových a přírodních zdrojů
Katedra veterinárních disciplín



Úloha kalcineurinu v růstové fázi oocytu prasete

Disertační práce

Autor: Ing. Tereza Žalmanová

Školitel: doc. Ing. Eva Chmelíková, Ph.D.

Školitel specialista: prof. Ing. Jaroslav Petr, DrSc.

2014

Prohlášení

Prohlašuji, že jsem disertační práci na téma: „Úloha kalcineurinu v růstové fázi oocyту prasete“ vypracovala samostatně a použila jen pramenů, které cituji a uvádím v příložené bibliografii.

V Praze dne

podpis autora práce

Poděkování

Ráda bych poděkovala všem, kteří mi pomáhali při vzniku této práce. Především děkuji své školitelce doc. Ing. Evě Chmelíkové, Ph.D. nejen za odborné vedení a osobní oporu, kterou mi poskytovala po dobu mého studia, ale i za trpělivost, toleranci a pomoc při řešení problémů, se kterými jsem se často potýkala. Děkuji svému školiteli specialistovi, prof. Ing. Jaroslavu Petrovi, DrSc. za nesčetné množství rad a konzultací, za zájem a ochotu, se kterou předává zkušenosti, za nedocenitelnou pomoc při laboratorní práci a osobní podporu. Zvláštní poděkování patří Ing. Kristýně Hoškové, Ing. Lence Křivohlávkové, Ing. Lence Tůmové, Ph.D., Ing. Kateřině Kheilové Ph.D., Ing. Veronice Kučerové-Chrpové a Ing. Janu Nevoralovi za poskytnutou přátelskou i odbornou pomoc. Děkuji i všem ostatním kolegyním a kolegům z katedry, kteří se podílejí na příjemné pracovní atmosféře. Můj dík patří také doc. Dr. Ing. Pavlu Vejlovi a Ing. Tomášovi Kottovi, Ph.D. za ochotnou pomoc nad rámec jejich pracovních povinností.

Seznam zkratek

AKAP – protein ukotvující protein kinázu A (Protein Kinase A Anchoring Protein)
APC/C – komplex podporující anafázi (Anaphase-Promoting Complex/Cyclosome)
APF – faktor podporující stárnutí (Aging Promoting Factor)
ATP – adenosintrifosfát
Bcl-2 – B-cell lymphoma 2 protein
BSA – bovinní sérový albumin
CaM – kalmodulin
CaMKII – kalcium/kalmodulin dependentní kináza II
cAMP – cyklický adenosin monofosfát
cdc2 – cell division cycle 2 kinase
cDNA – komplementární DNA
CG – kortikální granula
cGMP – cyklický guanosin monofosfát
cPKC – klasické protein kinázy C
CSF – cytostatický faktor
DAG – diacylglycerol
DMSO – dimetylsulfoxid
DNA – deoxyribonukleová kyselina
eCG – equinní choriový gonadotropin
eNOS – endotelová izoforma syntázy oxidu dusnatého
Emi 1 – inhibitor mitózy 1 (Early Mitotic Inhibitor 1)
ER – endoplazmatické retikulum
ERK – kináza regulovaná extracelulárním signálem (Extracellular Signal-Regulated Kinase)
FasL – Fas ligand
FITC – fluorescein-5- izothiokyanát
FSH – folikulostimulační hormon
GAPDH – glyceraldehyd-3-fosfát dehydrogenáza
GV – zárodečný váček (Germinal Vesicle)
GVBD – rozpad zárodečného váčku (Germinal Vesicle Breakdown)
hCG – humánní choriový gonadotropin
IBMX – 3-isobutyl-1-metylxantin
iNOS – indukovatelná izoforma syntázy oxidu dusnatého
IP3 – inositol 1,4,5-trifosfát
IP₃R – inositol 1,4,5-trifosfátový receptor
JNK – c-Jun NH₂-terminalní kináza
KSR – supresorová kináza proteinu Ras (Kinase Suppressor of Ras)

LH – luteinizační hormon
MI – metafáze prvního meiotického dělení
MII – metafáze druhého meiotického dělení
MAPK – mitogeny aktivovaná protein kináza (Mitogen-Activated Protein Kinase)
MGB sonda – minor groove binder sonda
MPF – faktor podporující metafázi (Metaphase Promoting Factor)
mRNA – mediátorová ribonukleová kyselina
MTOC – mikrotubuly organizující centrum
NFAT – jaderný faktor aktivovaných T-lymfocytů (Nuclear Factor of Activated T-Cells)
nNOS – neuronová izoforma syntázy oxidu dusnatého
NO – oxid dusnatý
NOS – syntáza oxidu dusnatého
OMI – inhibitor zrání oocyty (Oocyte Maturation Inhibitor)
PBS – fosfátový pufr (Phosphate Buffered Saline)
PDE – fosfodiesteráza
PGCs – primordiální zárodečné buňky (Primordial Germ Cells)
PKA – protein kináza A
PKC – protein kináza C
PKG – protein kináza G
PLC – fosfolipáza C
PP2A, PP2B, PP2C, PP3 – kalcineurin
PS – fosfatidylserin
RNA – ribonukleová kyselina
Rsk2 – ribozomální S6 kináza 2
RT-PCR – reverzně transkripční polymerázová řetězová reakce
RyR – ryanodinový receptor
sGC – solubilní guanylát cykláza
TNF- α – Tumor Necrosis Factor- α

Obsah

1.	ÚVOD	1
2.	LITERÁRNÍ PŘEHLED	2
2.1	Oogeneze	2
2.1.1	Fáze množení	2
2.1.2	Fáze růstu oocyty a tvorba folikulu	4
2.1.3	Meiotická kompetence	8
2.1.4	Fáze zrání	9
2.1.5	Faktory zapojené do regulace oogeneze	12
2.2	Kalcineurin	24
2.2.1	Struktura a izoformy kalcineurinu	25
2.2.2	Aktivace kalcineurinu	27
2.2.3	Substráty a cílové proteiny kalcineurinu	28
2.2.4	Inhibitory kalcineurinu	29
2.2.5	Regulátory kalcineurinu	31
2.2.6	Úloha kalcineurinu v reprodukci	32
3.	HYPOTÉZY A CÍLE PRÁCE	33
4.	MATERIÁL A METODY	34
	Odběr vaječníků	34
	Získávání rostoucích oocytů	34
	Získávání oocytů s ukončeným růstem	34
	Kultivace oocytů rostoucích a oocytů s ukončeným růstem	34
	Barvení a fixace oocytů	35
	Stanovení mRNA metodou RT-PCR	35
	Metoda Western blot	37
	Imunocytochemická analýza	38
	Hodnocení výsledků konfokální mikroskopie	38
	Kultivace oocytů s inhibitory kalcineurinu	39
	Stanovení aktivity kináz MPF a MAPK v oocytech	40
	Statistická analýza	43
	Experimentální schéma	44

Experiment 1: Ověření meiotické kompetence prasečích oocytů v daných laboratorních podmínkách	44
Experiment 2: Exprese mRNA pro jednotlivé izoformy kalcineurinu v oocytech prasete v závislosti na stupni meiotické kompetence	44
Experiment 3: Detekce podjednotek A a B proteinu kalcineurinu v plně meioticky kompetentních prasečích oocytech	44
Experiment 4: Intracelulární lokalizace podjednotek kalcineurinu A a B v prasečích oocytech v závislosti na stupni meiotické kompetence během růstové fáze.	45
Experiment 5: Vliv inhibice kalcineurinu na <i>in vitro</i> zrání prasečích oocytů s rozdílným stupněm meiotické kompetence	45
Experiment 6: Vliv inhibice kalcineurinu na aktivitu vybraných kináz během meiotického zrání oocytů s částečnou meiotickou kompetencí	45
5. VÝSLEDKY	47
Ověření meiotické kompetence prasečích oocytů v daných laboratorních podmínkách	47
Exprese mRNA pro jednotlivé izoformy kalcineurinu v oocytech prasete v závislosti na stupni meiotické kompetence	48
Detekce podjednotek A a B proteinu kalcineurinu v plně meioticky kompetentních prasečích oocytech	49
Intracelulární lokalizace podjednotek kalcineurinu A a B v prasečích oocytech v závislosti na stupni meiotické kompetence během růstové fáze	50
Vliv inhibice kalcineurinu na <i>in vitro</i> zrání prasečích oocytů s rozdílným stupněm meiotické kompetence	55
Vliv inhibice kalcineurinu na aktivitu vybraných kináz během meiotického zrání oocytů s částečnou meiotickou kompetencí	58
6. DISKUSE	60
7. ZÁVĚR	67
8. SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY	68

1. Úvod

Reprodukční biotechnologie jsou vědním oborem, který prochází v současné době prudkým rozvojem. Nové biotechniky a jejich aplikace nacházejí široké uplatnění nejen v humánní medicíně, ale i v chovech hospodářských zvířat. V posledních letech se stále častěji využívá inseminace, *in vitro* oplození, transferu embryí, klonování přenosem jader a tvorby transgenních jedinců. U prasat, na rozdíl od skotu a koz, je efektivita těchto metod zatím bohužel velmi nízká. Vzhledem k tomu, že je prase kromě hospodářského využití také významným modelovým organizmem pro biomedicínský výzkum, je třeba účinnost biotechnologií u tohoto druhu zvýšit. Prasečí oocyt se ve srovnání s často studovaným oocytom myši či skotu svou fyziologií mnohem více podobá oocytu lidskému a současně je vhodným modelem pro sledování buněčného cyklu a vývoje *in vitro*.

Podmínkou pro využití a rozvoj stávajících biotechnologických metod je získání dostatečného množství kvalitních zralých oocytů s ukončenou růstovou fází. Takových oocytů je však ve vaječnicích prasnic pouze velmi omezené množství. Cestou k získání vyššího počtu zralých oocytů mohou být techniky umožňující využití rostoucích oocytů, metody zvyšující jejich vývojovou schopnost *in vitro*. Výzkum procesů řídicích růstovou fází a meiotickou kompetenci samičích pohlavních buněk je předpokladem pro využití větší populace oocytů pro potřeby zemědělství, farmaceutického průmyslu, pro záchranu ohrožených živočišných druhů i pro řešení problémů lidské neplodnosti. Pro zlepšení současných biotechnologických postupů je však nutné tyto mechanismy popsat a objasnit jejich regulační principy. Způsob regulace růstu a zrání oocytů ovlivňuje řada biologicky aktivních látek, jako jsou endogenně produkované plyny, cykliny a enzymy s fosforylačními a defosforylačními schopnostmi, mezi které patří také fosfatáza 2B, kalcineurin.

Kalcineurin byl nalezen ve vaječnicích a raných embryích mouchy rodu *Drosophila* a v oocytech žáby rodu *Xenopus*, kde je nezbytný pro správný průběh oogeneze. Vzhledem k vysoce konzervované struktuře kalcineurinu a analogiím v oogenezi u mnoha druhů, lze předpokládat, že je tento protein s fosfatázovou aktivitou zapojen do regulace růstu a procesu získání meiotické kompetence také u oocytů prasete.

2. Literární přehled

2.1 Oogeneze

Oogeneze zahrnuje vývojové procesy vedoucí k tvorbě samičí pohlavní buňky, oocytu. Oogeneze u savců začíná velmi brzy, již během embryonálního vývoje samice a ustává až na konci její pohlavní aktivity. Celý proces vývoje oocytu je obvykle členěn do tří fází, fáze množení, růstu a zrání. Fáze množení zárodečných buněk zahrnuje diferenciaci primordiálních buněk v oogonie a probíhá v období embryonálního vývoje samice. Fáze růstu oocytů vzniklých z oogonií se odehrává rovněž ve fetálním období, ale pokračuje i po celé reprodukční období samice. Fáze meiotického zrání zahrnuje jaderný vývoj samičí gamety od první meiotické profáze do metafáze druhého meiotického dělení, kdy zároveň probíhají metabolické a cytoplazmatické změny nepostradatelné pro aktivaci oocytu při oplození.

2.1.1 Fáze množení

Primordiální zárodečné buňky (*Primordial Germ Cells* – PGCs) se zakládají extragonadálně již v embryonálním období v průběhu utváření primitivního proužku a následně migrují (Picton *et. al.*, 1998). Nejprve se jedná o pasivní migraci ze stěny žloutkového váčku do epitelu zadního střeva, další migrace zárodečných buněk je zprostředkována chemotaxí a směřuje podél dorzálního mesenteria pohlavní lišty do místa budoucích gonád (Wassarman, 1988). Chemotaxe je závislá na lokální produkci cytokinů a přeměně růstového faktoru $\beta 1$ (Gosden, 1995) a je ovlivněna působením extracelulární matrix, kde dochází ke změnám v distribuci kolagenu IV, fibronektinu a lamininu (Vanderhyden, 2002). Postup PGCs je řízen růstovými faktory, jejichž signalizace vede přes tyrozinkinázové receptory nebo receptory spřažené s G-proteiny (Moore *et al.*, 2008). Dále pohyb PGCs do zárodečné rýhy ovlivňuje c-kit ligand produkovaný somatickými buňkami v místech, kudy PGC migrují (Logan *et al.*, 2003; Hutt *et al.*, 2006). K migraci zárodečných buněk do ovárií dochází u prasete kolem 30. dne vývoje embrya (Eppig *et al.*, 2004). Po dosažení povrchového epitelu gonád vstupují PGCs do korové vrstvy vaječníků společně s podpůrnými epitelovými buňkami, kde tvoří základy pohlavních provazců (Wassarman, 1988). V místě vyvíjejícího se vaječniku, po ztrátě motility, tyto buňky vstupují do mitózy a jsou označovány jako oogonie (Gosden *et Bownes*, 1995).

Oogonie vzájemně komunikují pomocí mezibuněčných spojů, *gap junctions* a dezmozómů. *Gap junctions* umožňují přenos různých látek včetně aminokyselin, metabolitů a nukleotidů (Eppig, 1991). Tato komunikace probíhá také mezi shluky oogónií a přilehlými somatickými buňkami a ovlivňuje jejich dělení i degenerativní procesy (Guraya, 2000).

Původní dogma reprodukční biologie se v minulém století opíralo o tvrzení, že PGCs se množí pouze v období prenatalního vývoje samice, po té ztrácí schopnost dále se dělit a nemohou tedy zvyšovat početnost stávající populace buněk. Zdrojem dospělých samičích zárodečných buněk se pak stávají pouze buňky, které jsou nalézány ve fázi embryonálního vývoje gonád (Wassarman, 1988). V minulém desetiletí však publikovaly skupiny vedené Jonathanem Tillym (Johnson *et al.*, 2004; Johnson *et al.*, 2005; Bukovski *et al.*, 2005) výsledky experimentů, které původní doktrínu zpochybňují. Autoři ve svých pokusech popisují přítomnost specifických buněk v myších ovarii, připomínajících svými vlastnostmi PGCs. Považují je proto za případné kandidáty schopné nahradit populaci oocytů, které zanikají atrézií, případně uměle vyvolanou ztrátou původních zárodečných buněk po podání chemoterapeutika busulfanu. Svá tvrzení opírají především o počty zanikajících a zdravých folikulů v ovarii různých starých myších samic a po vzájemném srovnání docházejí k závěru, že bez dalšího posilování populace zárodečných buněk ze záložních zdrojů by počet oocytů pokryl jen velmi krátké období reprodukčního života. V další publikaci tohoto vědeckého týmu (Johnson *et al.*, 2005) byla u myši identifikována jako zásobárna budoucích oocytů tkáň bez přímé návaznosti na funkci vaječníku, kostní dřeň. Tyto výsledky vzbudily rozruch a řadu diskuzí. Eggan a jeho spolupracovníci (2006) po uskutečnění vlastních experimentů jednoznačně zpochybnili vznik oocytů z buněk kostní dřeně nebo z periferní krve. Naproti tomu další týmy vědců vzápětí potvrdily, že zdrojem zárodečných buněk může být kůže prasete (Dyce *et al.*, 2006; Dyce *et al.*, 2006) i buňky slinivky břišní potkana (Danner *et al.*, 2007). Nedávná studie týmu Jonathana Tillyho prokázala dokonce vznik oocytů z linie mitoticky aktivních zárodečných buněk izolovaných z vaječníků žen v reprodukčním věku (White, 2012).

Oogonie jsou nápadně charakteristickou morfologií, mají kulový tvar, relativně velký objem a sférické jádro s jedním nebo dvěma jádérky, popřípadě několika menšími jádérky (Song *et al.*, 2006) a vykazují vysokou frekvenci po sobě jdoucích mitotických dělení (Wassarman, 1988). Mitóza je rozdělována do pěti stádií. Během profáze dochází ke kondenzaci zreplikovaných chromozómů a vně jádra začíná vznikat mitotické vřeténko. V prometáfázi se rozpadá jaderný obal, což umožňuje navázání chromozómů na mikrotubuly

vřeténka. V metafázi se chromozómy shromáždí v ekvatoriální rovině mitotického vřeténka. Během anafáze se obě sesterské chromatidy od sebe oddělí a jsou taženy mitotickým vřeténkem k opačným pólům buňky. V telofázi se znovu vytváří jaderný obal kolem každé sady chromozómů. Následuje cytokineze, proces, ve kterém je cytoplazma rozdělena na dvě identické části (Nicklas, 1966).

U prasat jsou embryonální gonády pozorovatelné již ve 24. - 26. dni po oplození. Mitotické dělení je prokazatelné od 13. dne embryonálního vývoje do 7. dne po narození. Množství zárodečných buněk se výrazně zvyšuje – z 5 000 ve 20. dni po oplození až na 1 100 000 v 50. dni po oplození. Pak mitotická aktivita klesá a část zárodečných buněk zaniká (Hunter, 2000).

Jakmile jsou oogonie obklopeny podpůrnými buňkami, zahajují replikaci DNA a vstupují do meiózy. V této fázi se již oogonie označují jako oocyty. U prasat dochází ke změně oogonie v primární oocyt před 40. dnem embryonálního vývoje (Picton *et al.*, 1998). Primární oocyty vstupují ještě v prenatálním období do profáze prvního zracího dělení. Na konci profáze, ve stádiu *diplotene*, je meioza poprvé přerušena (Bielanska-Osuchowska, 1973). V tomto stádiu, označovaném jako první meiotický blok, setrvává primární oocyt obklopený jednou vrstvou granulóznic buněk až do období těsně před ovulací (Choi *et Rajkovic*, 2006).

2.1.2 Fáze růstu oocytu a tvorba folikulu

Fáze růstu zahrnuje dlouhé období a trvá až do konce pohlavní činnosti samice. Od začátku pohlavní dospělosti, v průběhu každého ovariálního cyklu, vstupuje do fáze růstu vždy několik primárních oocytů. Na počátku růstové fáze mají savčí oocyty v průměru 12 - 15 μm a musí v průběhu růstové fáze zvětšit svůj průměr 7 - 10x, což znamená 300 násobné zvětšení objemu oocytu. Těmto extrémním nárokům jsou podřízeny všechny aspekty následující růstové fáze (Wassarman, 1988).

Během fáze růstu oocyt syntetizuje molekuly důležité pro jeho další vývoj. Diplotenní oocyt je větší než oogonie a obsahuje více cytoplazmatických organel (Picton, 1998). Kolem oocytu se shlukují podpůrné buňky utvářející folikul, který se zvětšuje během fáze růstu a hraje významnou roli ve vývoji oocytu. Růst oocytů probíhá ve dvou charakteristických fázích. V první fázi růst oocytu a folikulu koreluje, zatímco v druhé fázi průměr oocytu

zůstává konstantní, ale průměr folikulu se rychle zvětšuje. U prasete vzroste velikost oocytu během růstové fáze z 30 na 120 μm (Motlík *et al.*, 1986).

Rostoucí oocyt je obklopen jednou nebo více vrstvami epiteliálních buněk tvořících kolem oocytu folikul. Jednovrstevný epitel vytváří primordiální folikul (Wassarman, 1988; Picton *et al.*, 1998). Primordiální folikuly byly pozorovány ve vaječnicích embryí prasat 56. den po oplození (Bielanska-Osuchowska, 2006). Přeměna primordiálního folikulu na folikul primární nastává transformací plochých pregranulózních buněk na kubické buňky granulózní (Eppig, 2001). Při tvorbě folikulu je nezbytná přítomnost oocytu (Buccione *et al.*, 1990). Soyal *et al.* (2000) a Acevedo (2005) uvádějí, že faktorem nutným pro vznik primordiálního folikulu, by mohl být transkripční faktor FIG- α , který koordinuje i expresi genů, které kódují syntézu proteinů *Zp1*, *Zp2* a *Zp3 zona pellucida*. Dosud nebylo prokázáno, zda je tento transkripční faktor zapojen do přežití oocytu či do regulace interakcí mezi oocytem a granulózními buňkami.

Syntetická aktivita oocytu se intenzivně zvyšuje a granulózní buňky se mitoticky množí. V době, kdy rostoucí oocyt obklopuje více než jedna vrstva granulózních buněk, je folikul označován jako sekundární. Řízenou proliferací folikulárních buněk vzniká několikavrstevný obal oocytu nazývaný se *membrana granulosa* (Hyttel *et al.*, 1999; Eppig, 2001). Z intersticiálních buněk vzniká obal granulózy – *theca folliculi interna a externa* (Wassarman, 1988). Po vytvoření *theca folliculi interna* je folikul označován jako preantrální (Hyttel *et al.*, 1999). V těsné blízkosti oocytu jsou granulózní buňky vyšší, cylindrické a tvoří vrstvu nazývanou *corona radiata*, mezi touto vrstvou a oocytem se začíná vytvářet glykoproteinový ochranný obal *zona pellucida* (Lundy *et al.*, 1999; Eppig, 2001).

Působením luteinizačního hormonu (LH) začnou buňky *theca folliculi interna* produkovat androgeny, které difundují do granulózních buněk. Zde jsou vlivem folikulostimulačního hormonu (FSH) přeměněny na estrogeny a jejich koncentrace se zvyšuje. Estrogeny spolu s FSH stimulují granulózní buňky k produkci sekretu, který odděluje granulózní buňky a vytváří dutinu nazývanou *antrum folliculi*, tak vzniká terciální, neboli antrální folikul. Uvnitř folikulu vytvářejí granulózní buňky v blízkosti oocytu vejconosný hrbolík – *cumulus oophorus*, přičemž samotný oocyt je obklopen granulózními buňkami označovanými jako buňky kumulární (Eppig, 2001). Tyto buňky jsou vnímavé vůči LH a secernují mnoho faktorů, jimiž regulují jaderné a cytoplazmatické zrání oocytu (Cha *et al.*, 1998). Dalším rozšiřováním antrální dutiny se celý folikul zvětšuje a vyklenuje se nad povrch vaječníku. Folikulární buňky se intenzivně dělí a vzniká Graafův folikul, který je

posledním vývojovým stádiem folikulu (Wassarman, 1988). Přítomnost folikulární tekutiny lze pozorovat ve folikulech prasat a skotu o průměru 0,3 - 0,4 mm. Folikulární dutina je u prasat přítomna již od folikulárního průměru 0,5 mm (Motlík *et* Fulka, 1986). První antrální folikuly u prasat lze pozorovat již 70. den po porodu (Oxender *et al.*, 1979).

Ve fázi růstu jsou oocyty charakteristické specifickým uspořádáním cytoplazmy, přičemž dochází ke vzniku nových genových produktů i organel a modifikují a přerozdělují se organely stávající (Schatten, 1994). Oocyty několikanásobně zvětšují svůj objem, zvyšuje se počet organel a probíhá syntéza látek potřebných pro dokončení meiózy, oplození a časný vývoj embrya (Gosden *et al.*, 1997).

Formuje se tzv. Balbianiho žloutkové jádro. Jedná se o shluk buněčných organel soustředěných v okrsku cytoplazmy poblíž jádra, který se v rostoucím oocytu rozšiřuje v ooplasmě směrem k periférii a následně se rozpadá na nepravidelné části (De Smedt, 2000; Guraya, 2008).

Centrioly v průběhu růstové fáze oocytu mizí a jsou získány až od spermie při oplození (Wassarman *et* Josefowicz, 1978). Dochází i ke zvýšení intracelulární koncentrace iontů vápníku, procházejících přes cytoplazmatickou membránu (Murnane *et* DeFelice, 1993).

Spolehlivost a přesnost replikace organel v ooplasmě, zvláště mitochondrií a jejich DNA, hraje klíčovou roli v cytoplazmatické dědičnosti budoucí zygoty (Schatten, 1994). Během růstu oocytu se prudce zvyšuje i počet mitochondrií. Mitochondrie získávají zakulacený, později oválný tvar s výraznými klenutými příčně orientovanými kristami (Wassarman *et* Josefowicz, 1978) a jsou spojeny s endoplazmatickým retikulem (Guraya, 2000). V rostoucím oocytu malého antrálního folikulu jsou mitochondrie asociované s drsným endoplazmatickým retikulem, v oocytu s ukončenou růstovou fází jsou často agregované s hladkým endoplazmatickým retikulem (Sathananthan *et* Trounson, 2000).

Výrazné funkční i metabolické změny prodělává, stejně jako mitochondrie, i Golgiho aparát, umístěný pod plazmatickou membránou rostoucího oocytu. Zde dochází k jeho zvětšování (Sharma *et* Chowdhury, 1998) a přeměně z malých váčků na rozsáhlé dilatované cisterny, které aktivně exportují glykoproteiny do vrstvy *zona pellucida* (Mehlmann *et al.*, 1995). *Zona pellucida* se dotváří v růstové fázi. Má významnou roli při oplození, kde se podílí na akrozomální reakci, vazbě spermie při oplození a následně zabraňuje polyspermii (Yurewicz *et al.*, 1987).

Kortikální granula jsou malé, kulovité, membránou ohraničené organely, připomínající lysozomy. Nalézají se v kortikální oblasti oocyty, kam se dostávají společně s expandujícím Golgiho komplexem. Po proniknutí spermie do cytoplazmy oocyty dojde k fúzi kortikálních granul s oolemou a vylití jejich obsahu do perivitelinního prostoru, čímž se změní funkční vlastnosti *zona pellucida* a zabrání polyspermatickému oplození (Wassarman, 1988).

Rostoucí oocyty jsou charakteristické rozlehlým sférickým jádrem, které se označuje jako zárodečný váček (GV, Germinal Vesicle) a jedním až dvěma menšími jádřky. Zprvu mají granulární, později fibrogranulární charakter, u konce růstové periody jsou výrazně fibrilární a jsou již schopna syntézy RNA (Hyttel *et al.*, 1999). Zvětšování jádra je závislé na velikosti oocyty. Původně dekonduovaný chromatin zárodečného váčku kondenzuje do perinukleárních prstenců nebo jiných odpovídajících struktur v závislosti na živočišném druhu (Tan *et al.*, 2009).

Ukončení růstové fáze oocytů je doprovázeno postupným vytlačением fibrilárních center na periferii jádřka a zvětšováním nukleolárních vakuol. Především u oocytů skotu je nápadná přítomnost centrální vakuoly v jádřku. V konečné fázi transformace jádřka dochází k lokalizaci rDNA mimo jádřko na perinukleolárním chromatinu a jádřko je složeno výlučně z elektrondenzního fibrilárního materiálu. Takovéto kompaktní jádřko lze nalézt v průběhu oogeneze u všech savců, ale jeho vytvoření neprobíhá ve stejné fázi folikulárního vývoje. Zatímco u myši je kompaktní jádřko vytvořeno již před vytvořením folikulárního antra, u prasat a skotu je stejný proces dokončen až v malých antrálních folikulech o průměru 2 - 3 mm. Kompaktní jádřko je vytvořeno u všech studovaných živočišných druhů současně s dosažením finálního průměru oocytů a můžeme ho považovat za společný rys oogeneze savců (Guraya, 2008).

V rostoucím oocyty probíhá syntéza a hromadění proteinů a RNA. Chromozómy, na kterých se v tomto období vytvářejí párové smyčky, se podle svého vzhledu nazývají štetkovité. Smyčky jsou místem masivní produkce RNA (Bachvarova, 1974). Plně dorostlé oocyty obsahují přibližně 60 - 65 % rRNA, 20 - 25 % tRNA a 10 - 15 % mRNA (Bachvarova, 1985; Wassarman, 1988). V časně a střední fázi růstu oocyty dochází ke změnám v ultrastruktuře jádřka a ke zvýšení RNA polymerázové aktivity. S tímto procesem je spojena vysoká míra transkripce rRNA (Moore, 1978). Přibližně 20 % rRNA je vytvořeno v polyzomální formě, zbytek je translačně neaktivní. Její aktivita nastupuje až v průběhu časně embryogeneze (Gosden *et Bownes*, 1995; Guraya, 2000).

Současně s růstem oocyty probíhá i vývoj folikulu. Vzniká druhá vrstva granulóznic buněk, které jsou součástí sekundárního folikulu. Stádium terciárního folikulu je charakterizováno výše zmíněnou diferenciací granulóznic buněk na *theca folliculi interna* a *theca folliculi externa* (Young *et al.*, 2006). V prasečím folikulu velkém 1,8 mm je růst téměř dokončen (Motlík *et Fulka*, 1986). Oocyty zvětšují objem a zůstávají zadrženy v diktyatenním stádiu profáze I (Motlík *et al.*, 1984).

Pro růst oocyty je nezbytná interakce somatických buněk s oocytem prostřednictvím *gap junctions* pro získávání substrátů nepostradatelných pro energetický metabolismus. Somatické buňky jsou důležitým zdrojem nukleotidů, aminokyselin a fosfolipidů a udržují iontovou rovnováhu i stabilitu mRNA v rostoucích oocytech. Rychlost růstu je přímo závislá na počtu granulóznic buněk, které obklopují oocyt (Hunter, 2000).

2.1.3 Meiotická kompetence

Získání meiotické kompetence je proces, při kterém se z oocytů, neschopných znovu zahájit a dokončit meiózu, stávají oocyty plně kompetentní, se schopností projít G2 fází a podstoupit meiotické dělení, přerušené po dosažení druhé meiotické metafáze (Mastroianni *et al.*, 1994). Meiotickou kompetenci nabývají oocyty postupně během růstové fáze. Nejdříve je oocyt schopen znovu zahájit meiotické dělení, projít fází rozpadu zárodečného váčku (GVBD, Germinal Vesicle Break Down) a dosáhnout stádia metafáze I. Poté získává oocyt schopnost dokončit svůj vývoj až do metafáze II (Wassarman, 1988).

Oocyty prasat, skotu, ovcí i koz, izolované z folikulů do průměru 0,5 mm zůstávají po 24 hod. kultivace ve stádiu zárodečného váčku. Stejně tak oocyty myši o průměru 60 μm zůstávají v kultivačních podmínkách ve stádiu meiotické profáze. Tyto oocyty jsou označovány za zcela meioticky nekompetentní (Eppig, 2001).

Oocyty myši, které mají velikost vnitřního průměru do 70 μm a oocyty hospodářských zvířat o velikosti 100-110 μm jsou schopny v podmínkách *in vitro* zahájit kondenzaci chromatinu, rozpustit jadernou membránu, projít procesem rozpadu zárodečného váčku a dosáhnout metafáze prvního meiotického dělení, se nazývají částečně meioticky kompetentní (Schramm *et Bavister*, 1999; Kanayama *et al.*, 2002).

Teprve oocyty s dokončeným růstem jsou meioticky kompetentní, protože jsou schopny vydělit první pólové tělíčko a uspořádat chromozomy do metafázní figury druhého meiotického dělení (Miyano *et Manabe*, 2007).

Prasečí oocyty nabývají meiotickou kompetenci kolem 14. dne od vytvoření antra ve folikulech větších než 3 mm (Motlík *et al.* 1984; Morbeck *et al.* 1992; Hunter, 2000). Plně dorostlé prasečí oocyty o velikosti 120 μm jsou již zcela meioticky kompetentní a po 48 hodinové kultivaci v *in vitro* kultivačních podmínkách dosahují stádia metafáze II (Motlík *et al.*, 1984; Petr *et al.*, 1993).

Na vznik meiotické kompetence má vliv utvoření a velikost folikulární dutiny vzniklé pod vlivem FSH (Fauser *et al.*, 1999; Tevelde *et al.*, 2000). Vzhledem k tomu, že oocyty nemají receptory pro gonadotropiny a steroidy, mají somatické buňky folikulu významnou roli i ve vývoji meiotické kompetence (Moor *et al.*, 1990). Dalším z faktorů, který rozhoduje o meiotické kompetenci oocytů je schopnost organizovat mikrotubuly. Zatímco nekompetentní oocyty mají v cytoplazmě paprscitou síť interfázních mikrotubulů, v meioticky kompetentních oocytech jsou přítomna fosforylovaná mikrotubulární organizační centra (MTOCs), ze kterých vycházejí mnohem kratší, perinukleárně lokalizované mikrotubuly. Mikrotubuly vybíhající z těchto center procházejí mezi fragmenty jaderné membrány do nukleoplazmy (Thibault *et al.*, 1987), kde jsou připojeny na kinetochory každé chromatidy všech chromozómalních homologů (Hafez *et Hafez*, 2000). Důležitým regulátorem funkce mikrotubulů je mitogeny-aktivovaná protein kináza (MAPK) (Fulka *et al.*, 1998; Fan *et Sun*, 2004). Meiotickou kompetenci rostoucích prasečích oocytů lze zvýšit například kultivací oocytů s inhibítorem kalcium dependentní ATPázy (Petr *et al.*, 1999) či s inhibítorem histon deacetylázy (Petr *et al.*, 2009).

2.1.4 Fáze zrání

Meiotické zrání představuje přeměnu plně dorostlého meioticky kompetentního oocytu v oplození schopný oocyt. Jedná se o vývoj od fáze *diktyotene* I do metafáze II (Motlík *et Fulka*, 1986).

Znovuzahájení meiozy *in vivo* je spouštěno LH vlnou. LH signál má za následek eliminaci jednoho nebo více činitelů, například inhibitoru zrání oocytů (OMI, Oocyte Maturation Inhibitor). Eliminace těchto faktorů vede k aktivaci cyklinů, fosfatáz a kináz, které jsou důležité pro docílení úspěšného jaderného zrání (Hunter, 2000). Dostatečným impulzem pro znovuzahájení meiozy *in vitro* je uvolnění oocytu z intrafolikulárního prostředí (Stojkovic *et al.*, 1999; Fan *et al.*, 2002).

V průběhu fáze zrání oocyt vstupuje do metafáze prvního zracího dělení, prochází rozpadem zárodečného váčku, chromozómy kondenzují a je vyděleno první pólové tělísko (Sharma *et* Chowdhury, 1998). Na konci fáze zrání je meioza zastavena v metafázi druhého meiotického dělení. Toto přerušení meiózy v metafázi II je označováno jako druhý meiotický blok (Motlík *et* Kubelka, 1990; Swann, 1993; Lawrence *et al.*, 1997). Fáze zrání zahrnuje dva procesy, zrání jaderné a cytoplazmatické (Wolf *et* Zelinski-Wooten, 2001).

Jádro, ve stádiu zárodečného váčku, je zpočátku ohraničeno neporušenou jadernou membránou. Po zahájení zrání probíhá rozpad zárodečného váčku, který začíná jemným vlněním jaderné membrány, které postupně zesiluje. Nakonec je membrána rozptýlena do dubletů spojených s endoplazmatickým retikulem, které jsou později využity k tvorbě prvojaderné a jaderné membrány (Wassarman, 1988). Chromozómy ve stádiu *dyktyotene* začínají kondenzovat při vnitřním okraji jaderné membrány, chiasmata se přesunují na konce chromozómů. Při téměř dokončené kondenzaci mají telocentrické bivalenty tvar písmene V a často jsou spojeny se zbytky jaderné membrány. Chromozomy se ve vysokém stupni kondenzace seskupují, svá spojení s fragmenty jaderného obalu ztrácejí a vyrovnávají se do ekvatoriální roviny (Calarco, 1972; Wassarman, 1988)

Během GVBD dochází ke změně morfologie zárodečného váčku, u prasete lze pozorovat pět stádií (Sun *et al.*, 2004). Ve stádiu GV0 je chromatin rozptýlen v celé jaderné oblasti. Ve fázi GV1 začíná kondenzovat a formuje se do prstencovitého nebo podkovovitého útvaru kolem jádra (Motlík *et* Fulka, 1976; Guthrie *et* Garrett, 2000; Sun *et al.*, 2004). Stádium GV2 charakterizují shluky chromatinu v blízkosti jádra. Ve stupni GV3 se podkovovitá struktura rozpadá a vytváří se filamentární síť. V dalším stádiu GV4 není jadérko znatelné a mizí i jaderná membrána (Motlík *et* Fulka, 1976; Tan *et al.*, 2009).

Současně s GVBD a kondenzací chromozómů se objevuje spojení centromer s mikrotubuly a vytvářejí se také další MTOCs, z nichž vybíhají mikrotubuly, které zasahují až do nukleoplazmy (Thibault *et al.*, 1987). Zde se přes kinetochor napojují na každou chromatidu homologních chromozómů a společně s mikrotubuly, které probíhají od pólu k pólu, vytváří první meiotické dělicí vřeténko (Calarco, 1972; Alberts *et al.*, 1998; Miao *et al.*, 2012). Na obou vrcholech dělicího vřeténka oocyty chybí centrioly (Wassarman, 1988). Oblast okolo vřeténka je bohatá na mitochondrie, vakuoly a granula (Motlík *et* Fulka, 1976; Hafez *et* Hafez, 2000).

V průběhu prvního meiotického dělení dochází k rekombinaci genetického materiálu, probíhá meiotický crossing over. Během tohoto procesu se vyměňují homologní segmenty

DNA mezi nesesterskými chromatidami v párech homologních chromozomů, což zajišťuje, že produkované gamety nejsou vzájemně identické (Alberts *et al.*, 1998).

Profáze prvního meiotického dělení, která má počátek již ve fázi množení, je rozdělována do pěti stádií: *leptotene*, *zygotene*, *pachytene*, *diplotene* a *diakineze*.

Následuje metafáze I, ve které se spárované homologní chromozomy seřadí v ekvatoriální rovině s centromerami orientovanými k opačným pólům vřetenka. Jsou stále uspořádány do bivalentů a pohybují se díky depolymeraci kinetochorových mikrotubulů u kinetochoru (Alberts *et al.*, 1998; McGinnis *et al.*, 2012).

Další fáze je označovaná jako anafáze I. Oba homologní chromozomy každého bivalentu se pohybují odděleně a jejich centromery se sesterskými chromatidami jsou taženy k protilehlým pólům buňky v procesu zvaném disjunkce. Počet chromozomů se redukuje na polovinu a každý buněčný produkt prvního meiotického dělení má haploidní počet chromozomů. Rozdělování bivalentů se děje nezávisle na sobě a původní otcovská a mateřská sada chromozomů vytváří náhodné kombinace. Variabilita genetického materiálu, přenášeného z rodiče na potomka následkem crossing-overu a rekombinací genetického materiálu vzrůstá (Wassarman, 1988; Eppig, 1991).

V průběhu telofáze I se obě haploidní sady chromozomů shluknou v opačných pólech buňky a dojde k vydělení prvního pólového tělíska, které obsahuje polovinu genetického materiálu. První pólové tělísko obsahuje i další buněčné organely, včetně mitochondrií, ribozómů a kortikálních granul (Zamboni, 1970; Wassarman *et al.* Fujiwara, 1978). Po vydělení prvního pólového tělíska se utváří periviteliní prostor (Thibault *et al.*, 1987).

Druhé meiotické dělení není předcházeno stádiem replikace DNA (Motlík *et al.* Kubelka, 1990). Počet chromozomů buňky vstupující do meiózy II je haploidní. Segregace různých paternálních a maternálních alel každého genu probíhá jak v prvním, tak ve druhém meiotickém dělení v závislosti na tom, zda se účastnily crossing-overu a rekombinací (Wassarman, 1988). V metafázi II dochází u většiny savců k druhému zastavení buněčného cyklu. Meioza je dokončena pouze v případě oplození nebo partenogenetické aktivace (Sun *et al.* Nagai, 2003).

Cytoplazmatické zrání vyžaduje syntézu a skladování širokého spektra molekul, jejich modifikaci a později správné využití během zrání, oplození a časně embryogeneze (Lodish *et al.*, 2008). Zahrnuje reorganizaci organel a skladování mRNA, proteinů a transkripčních faktorů, které působí v průběhu celé fáze zrání (Sirard *et al.*, 1993; Brevini-Gandolfi *et al.* Gandolfi, 2001). Při přechodu z fáze GV do metafáze II, se mitochondrie, ribozómy,

Golgiho aparát i endoplazmatické retikulum přeskupují. Jejich pohyb je umožněn prostřednictvím cytoskeletárních mikrotubulů a mikrofilament (Ferreira *et al.*, 2009).

Prasečí oocyty kultivované *in vitro* podmínkách mohou mít nedostatek některých cytoplazmatických faktorů. Tento deficit může být příčinou vývojové nekompetence. Některé procesy cytoplazmatického zrání jsou koordinovány s jaderným zráním a regulovány tak, aby dokončení celého cytoplazmatického a jaderného zrání proběhlo současně (Hunter, 2000). Pokud dojde k zablokování jaderného zrání inhibítorem MG132 během kultivace, cytoplazmatické zrání pokračuje. Po následné stimulaci jaderného zrání pak dochází k jeho akceleraci (Chmelíková *et al.*, 2004).

2.1.5 Faktory zapojené do regulace oogeneze

MPF (M-phase Promoting Factor)

MPF byl objeven v oocytu žáby skokana levhartího (*Rana pipiens*) a byl pojmenován „Maturation Promoting Factor“ (Masui *et al.*, 1971). Vzhledem k tomu, že MPF je však universálním regulačním faktorem mitózy i meiózy, byl jeho název později změněn na M-phase Promoting Factor (Nurse, 1990).

MPF patří mezi protein kinázy. Jedná se o heterodimer, který je složen z katalytické a regulační podjednotky. Katalytickou podjednotku tvoří serin/threonin protein kináza p34^{cdc2} z rodiny tyrosinových cyklin dependentních kináz (Fulka *et al.*, 1998). Regulační podjednotkou je cyklin B (Dunphy *et al.*, 1988; Gautier *et al.* 1988; Gautier *et al.* 1989). V nedávné době bylo prokázáno, že součástí komplexu MPF je také kináza Greatwall (Hara *et al.*, 2012; Dupré *et al.*, 2013).

Základ aktivace MPF spočívá ve spojení obou podjednotek (Gautier *et al.*, 1991; de Vantéry *et al.*, 1997). Tímto způsobem vzniká neaktivní komplex, pre-MPF, který je přítomen ve fázi růstu oocytů. Klíčovým kontrolním bodem k vytvoření komplexu pre-MPF je syntéza a degradace cyklinu B (Murray *et al.*, 1989). Změny hladin cyklinu B ovlivňují vznik pre-MPF a po konečné aktivaci komplexu MPF regulují fáze buněčného cyklu během meiózy (Brunet *et al.*, 2005). Znovuzahájení meiózy vyžaduje aktivaci nahromaděného komplexu pre-MPF v oocytu (Motlík *et al.*, 1990).

Stav aktivity MPF je spojen s mírou fosforylace a aktivní syntézou proteinů v buňce (Procházka *et al.*, 1989; Chen *et al.*, 2000). MPF je fosforylací regulován jak pozitivně, tak negativně. Pomocí inhibiční fosforylace p34^{cdc2} je pre-MPF udržován v neaktivním stavu

(Marlovits *et al.*, 1998). Tato fosforylace probíhá na tyrosinu 15 a threoninu 14. Tyrosin 15 je fosforylován Myt 1 kinázou a threonin 14 Wee 1 kinázou (Touny *et Banerjee*, 2006).

K aktivaci MPF je tedy nutná defosforylace p34^{cdc2} na tyrosinu 15 a na threoninu 14 (Dunphy *et Kumagai*, 1991) prostřednictvím cdc25 fosfatázy (Christmann *et al.*, 1994). Tato fosfatáza je regulována a aktivována polo-like kinázou 1 (Plk1). Plk1 umožňuje přechod cyklinu B z cytoplazmy do jádra, čímž též přispívá k aktivaci MPF (Anger *et al.*, 2003). Plk1 se také podílí na separaci centrozomů a utváření i dynamice dělicího vřeténka (Bahassi *et al.*, 2002). K úplné aktivaci komplexu p34^{cdc2} musí současně s defosforylací dojít i k fosforylaci na threoninu 161 prostřednictvím protein kinázy, která se nazývá cdc-aktivační kináza (CAK) (Clarke, 1995).

Po aktivaci komplexu cyklin B-cdc2 dochází k aktivaci Greatwall kinázy, která potlačuje inhibiční vliv fosfatáz na komplex cyklin B-cdc2 a zajišťuje vytvoření meiotického vřeténka (Hara *et al.*, 2012).

Důležitá je též negativní regulace komplexu p34^{cdc2} zprostředkovaná asociací s proteinovými inhibitory cyklin dependentních kináz, mezi které patří p21 CIP1, p27 KIP1 a p57 KIP2 z rodiny Cip/Kip (CDK Interacting Protein/Kinase Inhibitory Protein) (Garrett, *et al.* 2001; Murray, 2004).

Během meiotického zrání oocytů dochází k charakteristickému poklesu aktivity MPF (Matiloli *et al.*, 1991). Naopak vysoká aktivita MPF byla zaznamenána v metafázi prvního meiotického dělení a její pokles je nutný pro přechod z metafáze do anafáze (Kishimoto *et Kariatani*, 1976; Motlík *et Kubelka* 1990). Za snížení hladiny MPF zde zodpovídá komplex podporující anafázi (Anaphase Promoting Complex, APC) (King *et al.*, 1996). APC umožní navázání ubiquitinu na cyklin B a ten je pak rozpoznán a degradován proteazómem (Glotzer *et al.*, 1991).

K opětovnému zvýšení aktivity MPF dochází v metafázi druhého meiotického dělení prostřednictvím níže popsaného cytotatického faktoru (CSF), který udržuje aktivitu MPF na vysoké úrovni po celou dobu zastavení meiotického zrání v metafázi II (Murray *et Kirschner*, 1989). Aktivní katalytickou složkou CSF je serin/threonin protein kináza Mos (Watanabe *et al.*, 1989; Yew *et al.*, 1992).

K dalšímu prudkému poklesu hladiny MPF i CSF (Lorca *et al.*, 1993) dochází až po aktivaci oocytu (Fulka *et al.*, 1992).

Aktivita MPF je nezbytná pro správný průběh fáze zrání. Řídí děje vedoucí ke zformování funkčního dělicího vřeténka (Hunter, 2000) a hraje důležitou roli při iniciaci segregace chromozomů i v průběhu anafáze (King *et al.*, 1996). Objevuje se krátce před GVBD (Hashimoto *et al.*, 1988) a prostřednictvím fosforylace proteinů jaderné laminy způsobuje GVBD. Podílí se na kondenzaci chromozomů, přeskupení mikrofilament a reorganizaci intermediálních filament (Stojkovic *et al.*, 1999).

MAP kináza (Mitogen Activated Protein Kinase)

MAP kinázy jsou též označovány jako extracelulárně regulované kinázy (ERK) pro jejich zásadní roli v přenosu extracelulárního signálu uvnitř buňky. Patří do skupiny serin/threonin protein kináz (Haccard *et al.*, 1993), u kterých je k jejich plné aktivaci nutná fosforylace threoninových a tyrosinových zbytků (Fan *et al.*, 2002). MAP kinázy vykazují vysokou aktivitu během zrání savčích oocytů (Haccard *et al.*, 1993). Schaeffer a Weber (1999) i Davis (2000) řadí všechny ERK do jedné skupiny, a tak rozdělují rodinu MAP kináz pouze na tři podrodiny: ERK, JNK a p38 MAP kinázy.

MAP kinázová kaskáda je regulační dráha funkčně obdobná a interagující s MPF při řízení meiotického zrání oocytů (Fan *et al.*, 2004). MAP kináza je aktivována prostřednictvím MAP kinázy kinázy, nazývané také MEK, která fosforyluje katalytické domény MAP kinázy na threoninových a tyrosinových zbytcích. MEK je aktivována také fosforylací členem z rodiny MAPK kináz kináz, produktem protoonkogenů c-mos (Fan *et al.*, 2004), proteinem Mos (Watanabe *et al.*, 1989; Yew *et al.*, 1992). Mos je serin/threonin protein kináza. Na konci této kaskády stojí kináza p90Rsk (ribosomální protein S6-kináza) (Fan *et al.*, 2004).

Aktivovaná p90Rsk inaktivuje kinázu Myt1 a tím přispívá k aktivaci MPF (Palmer *et al.*, 1998). K zahájení meiotického zrání přesto dochází i v oocytech myši s knockoutovaným genem pro c-mos (Hashimoto *et al.*, 1994).

V rostoucích oocytech jsou MAP kinázy lokalizovány výhradně v cytoplazmě a na počátku fáze zrání se přesunují do GV (Stojkovic *et al.*, 1999). Je tedy pravděpodobné, že se MAP kinázy účastní přenosu signálu, indukujícího začátek zrání, z cytoplazmy do jádra (Inoue *et al.*, 1998). Při spontánním zrání myších oocytů jsou MAP kinázy aktivovány 2 hodiny po GVBD (Lu *et al.*, 2001). U oocytů drápatky je aktivace MAP kináz prokázána ještě před stádiem GVBD (Kosako *et al.*, 1994), stejně tak i u oocytů prasete (Josefsberg *et al.*, 2003). Na rozdíl od výsledků pokusů provedených u oocytů drápatky (*Xenopus*) nemá

narušená aktivita MAP kináz vliv na zahájení meiózy v prasečích oocytech (Josefsberg *et al.*, 2003). Bylo prokázáno, že ke GVBD u prasat dochází i v případě, že je aktivita MAP kináz zablokována prostřednictvím inhibitoru MEK (Tong *et al.*, 2003). Přesto podle Josefsberga (2003) aktivní MAP kinázy injikované do GV oocytů prasat prokazatelně urychlují jeho rozpad.

Názory na dobu aktivace MAPK v prasečích oocytech se liší. Bylo doloženo, že dochází k současné aktivaci MPF a MAP kináz (Goudet *et al.*, 1998). V další studii ovšem bylo popsáno, že dochází nejdříve k aktivaci MPF a poté k aktivaci MAP kináz (Inoue *et al.*, 1998). Kubelka (2002) uvádí, že MAP kinázy jsou aktivovány později než MPF. Řada autorů zastává názor, že k aktivaci MAP kináz dochází před GVBD a před aktivací MPF (Inoue *et al.*, 1998; Wehrend *et Meinecke*, 2001; Villa-Diaz *et Miyano*, 2004). Na rozdíl od MPF vykazují MAP kinázy vysokou aktivitu v průběhu celé fáze zrání. Tato aktivita klesá až po oplození nebo partenogenetické aktivaci (Sun *et al.*, 2001; Zhang *et al.*, 2012).

MAP kinázy kontrolují úroveň hladin cyklinu B (Abrieu *et al.*, 2000). Dále se účastní přenosu signálu pro zrání z cytoplazmy do jádra a indukují znovuzahájení meiózy u oocytů drápatky (Stojkovic *et al.*, 1999). Významně se podílejí na regulaci dynamiky mikrotubulů (de Vantéry *et al.*, 1997), vytvoření dělicího vřeténka (Sun *et Nagai*, 2003) a regulují velikost a extruzi prvního pólového tělíska (Choi *et al.*, 1996). Roli hrají při zastavení meiózy v metafázi II (Villa-Diaz *et Miyano*, 2004).

U prasečích oocytů jsou MAP kinázy fosforylovány v průběhu GVBD a udržují kondenzaci chromozómů (Li *et al.*, 2002). Po GVBD fosforylují cytoskeletární proteiny a proteiny jaderné laminy, což zabraňuje jejich předčasnému spojení (Peter *et al.*, 1990).

CSF (Cytostatic Factor)

Přítomnost CSF byla prokázána poprvé v oocytech obojživelníků, kdy bylo zjištěno, že vliv CSF se objevuje během metafáze II a jeho aktivita krátce po oplození mizí. CSF je tedy charakterizován aktivitou komplexu faktorů přítomných v cytoplazmě, která potlačuje přechod z metafáze II do anafáze II (Masui *et Markert* 1971; Clarke *et al.*, 1988) a ovlivňuje i průběh oplození nebo partenogenetickou aktivaci (Schmidt *et al.*, 2006). Mos je aktivní katalytická součást CSF, jedná se o serin/threonin kinázu, produkt proto-onkogenu *c-mos*. Mos kináza je nezbytná jak pro aktivaci MPF v průběhu meiózy I a II, tak pro meiotický blok oocytů v MII (Yew *et al.*, 1992; Hunt, 1992).

Jednou z hlavních funkcí CSF je inhibice APC. APC prostřednictvím degradace cyklinu B reguluje hladinu MPF a podílí se tak na uvolnění z metafázního bloku (Stojkovic *et al.*, 1999). Činnost CSF je spojena s Mos, která je součástí jeho aktivní katalytické složky (Watanabe *et al.*, 1989; Yew *et al.*, 1992). První studie, které prokázaly souvislost mezi Mos a CSF byly provedeny u myši (Colledge *et al.*, 1994; Hashimoto *et al.*, 1994). Jak již bylo zmíněno, Mos reguluje hladinu MPF (Tunquist *et Maller*, 2003) a stimuluje aktivitu MAP kinázy přes MEK (Verlhac *et al.*, 1994). MAP kináza dále fosforyluje p90Rsk (ribozomální protein S6-kináza), která aktivuje protein Bub1. Aktivovaný Bub1 prostřednictvím proteinů Mad1 a Mad2 inhibuje APC. Tím je zablokována schopnost APC umožnit degradaci cyklinu B v proteazómech a proto nedojde k poklesu hladiny MPF (Yamano *et al.*, 2004).

Velkou roli sehrál i objev bílkovin rodiny Emi/Erp, které souvisí s inhibicí APC. Mezi její členy se řadí proteiny Erp1/Emi2 a Emi1. Jejich aktivita nastupuje během meiotického zrání. Fosforylace Emi1 pomocí p90rsk posiluje vazbou na APC deaktivaci Cdc20 a tím přispívá k inhibici APC při zastavení meiotického zrání (Dumont *et al.*, 2005). Erp1/Emi2 má také přímý vliv na inhibici APC a následné přerušení zastavení buněčného cyklu v metafázi II. Regulovaná degradace Erp1/Emi2 po oplození přispívá k dokončení meiózy (Schmidt *et al.*, 2006).

Další možný způsob inhibice APC je zajištěn pomocí komplexu cyklin E/Cdk2. Hladina koncentrace tohoto komplexu je v nezralých oocytech nízká, ale prudce stoupá během zrání až do metafáze II. Inaktivace cyklin E/Cdk2 přispívá k uvolnění z CSF bloku (Liu, 2006).

Význam CSF spočívá v udržení druhého meiotického bloku. Zadržení oocyty v metafázi II pomocí CSF lze odůvodnit i tím, že CSF inhibuje činnost mikrotubulárních motorů a tak udržuje neporušené dělicí vřeténko (Shiina *et al.*, 1992). Protein Bub1 spojený s funkcí CSF je totiž součástí komplexu proteinů kontrolního bodu dělicího vřeténka, který zajišťuje stabilitu genomu pozdržením anafáze do doby, než se všechny chromozomy trvale připojí na mikrotubuly prostřednictvím kinetochor (Perera *et al.*, 2007).

Cyklické nukleotidy

Mezi významné faktory podílející se na regulaci meiotického zrání patří i cyklické mononukleotidy, především cyklický adenosinmonofosfát (cAMP) (Schultz *et al.*, 1983) a guanosinmonofosfát (cGMP) (Ratner, 1976).

Expres cAMP byla zjištěna v kumulárních buňkách, ze kterých se do oocyty dostává pomocí mezibuněčných spojů. Syntéza cAMP byla prokázána i přímo v oocytech (Epigg, 1982). cAMP vzniká z ATP cyklizační reakcí činností adenylátcyklázy (AC). AC, lokalizovaná na plazmatické membráně, je aktivována některými hormony (Lebedeva *et al.*, 2009; Miyoshi *et al.*, 2013).

Degradace cAMP je v oocyty zprostředkována aktivní fosfodiesterázou (PDE-3A), která odbourává cAMP produkovaný adenylátcyklázou a udržuje tak hladinu cAMP konstantní (Dekel *et al.*, 1988).

cAMP stimuluje aktivitu protein kinázy A (PKA). PKA je schopna fosforylovat cdc25c. Tato vazba negativně reguluje cdc25c, která z tohoto důvodu nemůže aktivovat CDK1. Těsně před GVBD dochází k poklesu hladiny cAMP a tím i k poklesu aktivity PKA. Tímto snížením aktivity PKA je umožněna aktivace CDK1/cyklinu B. Dále bylo pomocí mikroinjekce katalytické podjednotky PKA prokázáno, že aktivní PKA inhibuje translaci c-mos a též inhibuje Mos zprostředkovanou aktivaci MAPK. Aktivovaná PKA má tedy na meiotické zrání inhibiční vliv (Lazar *et al.*, 2002).

cAMP ovlivňuje také tok vápenatých iontů. Zvýšená hladina cAMP zvýší transport Ca^{2+} iontů dovnitř buňky a ovlivňuje distribuci Ca^{2+} iontů uvnitř buňky ve prospěch jejich akumulace v cytosolu. Tok vápenatých iontů do buněk iniciuje jednak fosforylaci proteinů a jednak přímo ovlivňuje K^+ kanály, což vede k depolarizaci membrány (Blumenthal *et Kaczmarck*, 1992; Hofmann *et al.*, 1994; Lebedeva *et al.*, 2009).

Po uvolnění oocyty z prostředí folikulu dojde k poklesu cAMP, může tedy dojít k znovuzahájení meiózy (Mehlmann *et al.*, 2005). Aktivní AC inhibuje GVBD u oocytů zbavených kumulu a kultivovaných v *in vitro* podmínkách. Bylo prokázáno, že syntéza cAMP v oocytech v *in vivo* podmínkách je nutná pro meiotický blok v profázi. Tato vysoká hladina cAMP v oocytech blokuje znovuzahájení meiózy inhibicí MPF. Zároveň inhibuje aktivaci MAP kinázy (Fan *et al.*, 2002).

Koncentraci cAMP může zvyšovat cyklický guanosinmonofosfát (cGMP). Tímto způsobem dochází rovněž k inhibici meiotického zrání (Ratner, 1976). cGMP je produkován guanylát cyklázou (sGC), která katalyzuje přeměnu necyklického guanosin trifosfátu (GTP) na cGMP. cGMP působí na funkci iontových kanálů, aktivitu proteinkinázy G a fosfodiesteráz. Koncentrace cGMP klesá průběžně se zráním oocytů. cGMP se v oocytech podílí na udržení meiotického bloku aktivací cGMP-dependentní kinázy a inhibicí cAMP

fosfodiesterázy, čímž udržuje vysokou hladinu cAMP (Ratner, 1976; Hubbard *et al.*, 1988; Törnell *et al.*, 1990; Vaccari *et al.*, 2009).

Oxid dusnatý (NO)

Oxid dusnatý patří spolu s oxidem uhelnatým a sirovodíkem do skupiny mediátorů označovaných jako gasotransmittery (Wang, 2002). Tyto malé molekuly plynů, které jsou schopny volně difundovat přes buněčné membrány, se účastní buněčné signalizace způsobem nezávislým na receptorech. Jsou produkovány endogenně a rychle degradovány. Mají velice specifické cílové molekuly a spolupracují mezi sebou na mnoha úrovních (Pae *et al.*, 2009). V roce 1980 objevil a popsal Robert Furchgott biologický účinek endoteliálního relaxačního faktoru (EDRF) a v roce 1987 bylo zjištěno, že EDRF je identický s oxidem dusnatým. Poté byl NO identifikován jako mediátor účastnící se relaxace cév a aktivace makrofágů a stal se během minulého desetiletí jednou z nejsledovanějších molekul s biologickým účinkem. Enzymy syntetizující NO z L-argininu v savčích tkáních se nazývají NO syntázy (NOS).

NOS má několik izoform: nervová NOS (nNOS), indukovatelná NOS (iNOS) a endoteliální NOS (eNOS) (Lamas *et al.*, 1992; Lowenstein *et al.*, 1992).

Nervová NO - syntáza (nNOS) je označována též jako typ I, NOS-I a NOS1, se vyskytuje hlavně v nervové tkáni (Bredt *et al.*, 1990). Tato izoforma syntetizuje pouze malá množství oxidu dusnatého. Je exprimována konstitutivně a je aktivována vzestupem intracelulární hladiny vápníku (Janssens *et al.*, 1992). Podobně jako u zbylých izoform, byla prokázána exprese mRNA pro nNOS a nNOS v prasečích oocytech v růsové fázi s rozdílným stupněm meiotické kompetence (Chmelíková *et al.*, 2009). nNOS byla detekována v prasečích oocytech s jednou vrstvou kumulárních buněk (Kim *et al.*, 2005). Přítomnost proteinu nNOS byla potvrzena v prasečích oocytech a jejich kumulárních buňkách během meiotického zrání *in vitro* (Chmelíková *et al.*, 2010).

Indukovatelná NO – syntáza (iNOS) také známá jako typ II, NOS-II, NOS2, byla poprvé nalezena v makrofágu myši. Je však exprimována celou řadou buněk různých tkání včetně hepatocytů, buněk hladké svaloviny, buněk Langerhansových ostrůvků slinivky břišní, epiteliálních buněk, fibroblastů, neutrofilních granulocytů, keratinocytů, chondrocytů a buněk respiračního epitelu (Nathan *et Xie*, 1994; Hattori *et al.*, 2000). iNOS byla detekována také ve folikulu vaječníků savců (Jablonka-Shariff *et Olson*, 1997). iNOS vždy obsahuje pevně navázaný kalmodulin, proto je aktivita této izoformy často označována jako Ca²⁺ independentní (Rosselli *et al.*, 1998; Alderton, 2001). nNOS a eNOS jsou konstitutivní

enzymy, které produkují pouze malá množství NO. iNOS produkuje na rozdíl od konstitutivních izoform větší množství oxidu dusnatého po delší čas (Ignarro, 1999; Hattori *et al.*, 2000). Jednou z cest regulace hladiny NO je destabilizace mRNA pro iNOS, kterou je schopen vyvolat specifický inhibitor kalcineurinu cyklosporin (Hämäläinen *et al.*, 2009). U prasete byla nalezena též izoforma iNOS v granulózních buňkách (Grasselli *et al.*, 2001). Kim *et al.* (2005) prokázali expresi iNOS v oocytech s jednou vrstvou kumulárních buněk z malých folikulů. Přítomnost mRNA pro iNOS a proteinu iNOS byla potvrzena v rostoucích prasečích oocytech a v jejich kumulárních buňkách (Chmelíková *et al.*, 2009). Tato izoforma byla nalezena i během meiotického zrání prasečích oocytů *in vitro*. Obdobně jako eNOS také iNOS se vyskytovala v nejvyšší koncentraci v oocytech ve stádiu GV (Chmelíková *et al.*, 2010).

Endoteliální NO - syntáza (eNOS) známá jako typ III, NOS-III, NOS3 byla poprvé objevena v endotelových buňkách cév (Bredt *et al.*, 1990; Alderton, 2001). Obdobně jako u výše zmíněných izoform nNOS a iNOS, byla exprese eNOS popsána v řadě dalších tkání. eNOS byla detekována mimo jiné i ve folikulech vaječníků savců (Jablonka-Shariff *et al.*, 1997). Stejně jako izoforma nNOS je Ca^{2+} dependentní (Janssens *et al.*, 1992). eNOS byla nalezena v oocytech, endoteliálních buňkách, thékálních buňkách a v kumulárních buňkách prasete (Tao *et al.*, 2004). Později byla nalezena také v prasečích oocytech a granulózních buňkách během vývoje folikulů (Kim *et al.*, 2005). Jak exprese mRNA pro eNOS, tak vlastního proteinu eNOS, byla zaznamenána v rostoucích oocytech prasete s různým stupněm meiotické kompetence (Chmelíková *et al.*, 2009). Dále byla u prasete izoforma eNOS nalezena v oocytech a kumulárních buňkách ve stádiích GV, MI a MII během meiotického zrání oocytů *in vitro*. Nejvyšší exprese eNOS byla prokázána u oocytů ve stádiu GV a v průběhu meiotického zrání její hladina klesala (Chmelíková *et al.*, 2010).

NO se nezastupitelně účastní řízení regulace reprodukce samic. Na úrovni hypotalamu reguluje uvolňování gonadotropin releasing hormonu (GNRH), který spouští vyplavení gonadotropinů aktivací nNOS v hypofýze (Rosselli *et al.*, 1994). Ve vaječniku NO navozuje ovulaci a indukuje luteolýzu (Yang *et al.*, 2003), podílí se i na relaxaci hladké děložní svaloviny (Mc Cann *et al.*, 2003). V oocytu je NO syntetizován během celého procesu oogeneze, od folikulogeneze až po časný embryonální vývoj (Jablonka-Shariff *et al.*, 1997) a významně zasahuje i do regulace meiotického zrání (Van Voorhis *et al.*, 1995; Yamauchi *et al.*, 1997; Jablonka Shariff *et al.*, 1997; Olson *et al.*, 2000), především prostřednictvím regulace syntézy cyklických nukleotidů (Törnell *et al.*, 1984; Törnell *et al.*,

1990; Törnell *et al.*, 1991; Jablonka-Shariff *et Olson*, 2000). NO je rovněž zapojen do mechanismu aktivace oocytů (Kuo *et al.*, 2000; Petr *et al.*, 2005a), kde ovlivňuje množství volných vápníkových iontů v oplozeném oocytu pomocí regulace vápníkových kanálů a pump (Berridge *et al.*, 2000; Petr *et al.*, 2005b). NO-dependentní aktivace prasečích oocytů je závislá na mobilizaci intracelulárních vápníkových zásob pomocí RyR a nezávisí na IP₃R. Přesto jsou funkční IP₃R nezbytné pro správný průběh aktivace savčích oocytů (Petr *et al.*, 2005b). Úloha cGMP-dependentní signální kaskády je zřejmě specifická pro partenogenetickou aktivaci prasečích oocytů donory NO (Petr *et al.*, 2006).

Vápník

Významnou roli v buněčných signálních drahách hrají ionty vápníku. Zastávají funkci přenašečů mnoha různorodých intracelulárních signálů. Účastní se regulace řady fyziologických procesů, ke kterým patří mimo jiné kontrakce a relaxace svalového vlákna, membránová excitabilita, buněčná motilita, buněčný a mitochondriální metabolismus, proteosyntéza, průběh buněčného cyklu a apoptóza. Vápník hraje klíčovou roli i v průběhu meiotického zrání (Homa *et al.*, 1993) a oplození oocytů (Yanagimachi, 1981, 1994; Miyazaki, 1991).

V cytozolu buněk je koncentrace vápenatých iontů udržována na velmi nízké úrovni, jelikož vápník je uložen v depozitech, která představují endoplazmatické retikulum, mitochondrie a někdy i další organely (Clapham, 1995; Nader *et al.*, 2012). V prasečím oocytu se hlavní depozita vápenatých iontů nalézají v mitochondriích, karyoplazmě, vakuolách, na povrchu lipidových granul, v cytoplazmě a jádrech kumulárních buněk (Petr *et al.*, 2001).

Koncentrace vápenatých iontů uvnitř buněk je regulována koordinací protichůdných mechanismů, iontovými kanály specifickými pro Ca²⁺ a Ca²⁺-transportujícími ATPázami. Přejít vápníku do cytozolu je způsoben otevřením Ca²⁺ kanálů, které umožňují především dvě signální kaskády. Jedná se o dráhu využívající inositol 1,4,5 – trifosfátové receptory (IP₃R) a dráhu využívající ryanodinové receptory (RyR) (Clapham, 1995; Petr *et al.*, 2002). Opačným směrem probíhá transport vápníku pomocí ATPázových SERCA pump (Pozzan *et al.*, 1994).

Na počátku inositolfosfolipidové signalizace IP₃R dráhy stojí membránový protein fosfolipáza C (PLC). Jedná se o enzym s hydrolytickou aktivitou, který štěpí fosfatidylinositol - 4,5 - bisfosfát (PIP₂) v místě fosfodiesterové vazby mezi glycerolem a fosfátovou skupinou.

Produkty hydrolýzy katalyzované PLC jsou dvě signální sloučeniny, inositol-1,4,5-trifosfát (IP₃) a 1,2-diacylglycerol (DAG). IP₃ opouští plazmatickou membránu a volně difunduje cytozolem. Po dosažení endoplazmatického retikula se naváže na svůj receptor IP₃R a otevře iontové kanály pro vápník. Ionty Ca²⁺ proudí otevřenými kanály ven do cytozolu, čímž dojde k prudkému nárůstu cytozolové koncentrace volných Ca²⁺, která je jinak v buňce pomocí homeostatických mechanismů udržována na velmi nízké úrovni. Náhlý vzrůst koncentrace vápenatých iontů vede k asociaci enzymu protein kinázy C (PKC) s vnitřní stranou membrány, kde se dostává se do kontaktu se vzniklým DAG s již navázaným Ca²⁺ a fosfatidylserinem. Takto modifikovaný DAG následně PKC aktivuje (Sun, 2003). Dráha využívající inositol 1,4,5-trifosfátové (IP₃) receptory umožňuje oscilace vápníku během zrání oocyty u ježovky (Clapper *et al.*, 1985), myši (Carrol *et al.*, 1992), křečka (Miyazaki *et al.*, 1992), skotu (Yue *et al.*, 1995; He *et al.*, 1997) i prasete (Machaty *et al.*, 1997). Je také rozhodující pro perzistenci oscilace vápenatých iontů během oplození (Miyazaki *et al.*, 1992; Fissore *et al.*, 1995). V případě zrání prasečích oocytů se exprese IP₃R nemění, dynamický vývoj má jejich fosforylace (Ito *et al.*, 2010).

Další dráha, zodpovědná za zvýšení hladiny vápenatých iontů v cytozolu, vede přes RyR. Pomocí membránově vázaného glykoproteinu ADP ribozyl cyklázy a NAD⁺ (oxidovaná forma nikotinamid adenin dinukleotidu) vzniká cyklická adenosindifosfát ribóza (cADPR), která působí na RyR endoplazmatického retikula a zvyšuje uvolňování Ca²⁺ (Berridge *et al.*, 2000; Roderick *et al.*, 2003). Vyplavení vápníku, zprostředkované dráhou využívající RyR bylo zaznamenáno v oocytech skotu (Yue *et al.*, 1995), člověka (Sousa *et al.*, 1996), myši (Carrol *et al.*, 1992; Ayabe *et al.*, 1995) a prasete (Machaty *et al.*, 1997; Petr *et al.*, 2002).

Buněčné proteiny vázající vápník mění svou konformaci a náboj po připojení kationtu vápníku. Tyto vazebné proteiny obsahují typický EF-hand motiv polypeptidického řetězce, který váže Ca²⁺ a tak moduluje konformaci příslušné bílkoviny. Mezi bílkoviny obsahující EF doménu se řadí troponin C, lehký řetězec myosinu, kalpain, kalbindin, kalcineurin a kalmodulin.

Kalmodulin (CaM) je přítomný ve všech eukaryotických buňkách. Jedná se o malý, acidický protein, složený ze 148 aminokyselin, s molekulovou hmotností 17 kDa. Aminokyselinová sekvence CaM je vysoce konzervovaná a obsahuje čtyři EF-hand domény. Vazba vápníku moduluje konformaci CaM a komplex Ca²⁺-kalmodulin je poté schopen odlišné interakce se svými cílovými proteiny. Schopnost CaM zároveň specificky regulovat různé proteinové cíle není dosud detailně objasněna. Do mechanismu jsou pravděpodobně

zapojeny domény s různou vazebnou afinitou pro Ca^{2+} . Meziprodukty tvoří neaktivní komplexy CaM/cílový protein, komplexy přechodové a komplexy plně aktivní. Hromadění různě aktivních komplexů umožňuje přednostní aktivaci některých cílů na úkor ostatních. Rozdíly v aktivitě substrátů narůstají se snižující se koncentrací kalmodulinu, neboť dochází ke zvýšení kompetice mezi cílovými proteiny (Slavov *et al.*, 2013). K proteinům tvořícím funkčně změněný komplex pomocí navázání komplexu Ca^{2+} -kalmodulin patří kalmodulin dependentní proteinkinázy (CaMK) a proteinfosfatázy (Tunquist *et Maller*, 2003), dále adenylát cyklázy, NO syntázy, cAMP fosfodiesteráza, iontové kanály a receptory. Významnou roli ve vývoji oocytů hraje kalmodulin dependentní kináza CaMK II. Pomocí vápenatých iontů aktivovaná CaMK II se účastní iniciace degradace cyklinu B, který je součástí MPF (Lorca *et al.*, 1993).

Schopnost uvolnit vápník z vnitrobuněčných zásob se postupně vyvíjí během zrání oocytu a je nezbytná pro zahájení vývoje embrya po oplození oocytu. Na počátku meiotického zrání je tato schopnost poměrně malá. Během zrání roste a maxima dosahuje při zastavení meiózy ve stádiu metafáze II (Carroll *et al.*, 1994; Mehlmann *et Kline*, 1994). Vliv vápenatých iontů se uplatňuje jak ve fázi zrání oocytů, tak po oplození (Yanagimachi, 1994). Vápenaté ionty hrají roli především v časně fázi iniciace výstupu z meiotického bloku v profázi I (Wassarman, 1988). Podílí se na znovuzahájení meiotického zrání (Kaufman *et Homa*, 1993; Carroll *et al.*, 1994) a řídí výstup z metafáze prvního meiotického dělení. Při kultivaci prasečích oocytů s blokátory vápníkových kanálů dochází k zastavení meiotického zrání v metafázi I (Kaufman *et Homa*, 1993; Rozinek *et al.*, 2003). Nejdetailněji byla úloha vápníku popsána během výstupu z metafáze II, při oplození a aktivaci (Miyazaki, 1991; Kline *et Kline*, 1992). Nezastupitelnou úlohu má uvolnění vápníku z depozit a jeho pulzace při aktivaci a oplození. Během aktivace oocytu spouští spermie opakované pulzy vápenatých iontů. Naváže se na cytoplazmatickou membránu oocytu a pomocí enzymu spermie-specifické fosfolipázy C zeta (PLC ζ) spustí oscilaci vápenatých iontů trvající několik minut, tudíž vyvolá i okamžitý vzrůst jejich koncentrace a aktivuje APC (Jones, 2005). PLC ζ pocházející ze spermie je i v malém množství schopna přes IP_3 indukovat mobilizaci vápníkových iontů z depozit. Je pravděpodobné, že po indukci mobilizace vápníkových iontů PLC ζ , se na dalším průběhu uvolňování vápníkových iontů spolupodílejí i ostatní izofomy PLC přítomné v oocytu (Igarashi *et al.*, 2007). Periodické kolísání koncentrace volného intracelulárního vápníku je typickou reakcí savčích oocytů na oplozující spermii a je rozhodující pro změny probíhající během aktivace oocytu (Kline *et Kline*, 1992; Swann

et Ozil, 1994; Nader et al., 2012). V důsledku vyvolaných oscilací Ca^{2+} dochází k vyloučení obsahu kortikálních granul, znovuzahájení a dokončení meiozy a ke zformování prvojádra (Jones, 2005). Bylo prokázáno, že pro plnohodnotnou aktivaci oocyty je nezbytná také přesná frekvence i amplituda jednotlivých oscilací vápníkových iontů (Vitullo *et Ozil, 1992*). Oocyty vystavené abnormálně vysokým nebo nízkým amplitudám oscilací vápníkových iontů nejsou schopny zformovat prvojádro. Pokud je trvání oscilací krátké, oocyty nejsou schopny dokončit druhé meiotické dělení. Zároveň bylo prokázáno, že i vysoká četnost a dlouhá doba trvání jednotlivých oscilací má na aktivaci oocytů negativní vliv a může vést k jejich zániku (Gordo *et al., 2000*). Vyplavení vápenatých iontů vyvolané průnikem spermie během oplození způsobí pokles MAP kinázové aktivity, která je klíčová pro dokončení meiozy (Lorca *et al., 1993*). Stimulační vliv vápníku na kinázovou aktivitu během zrání byl naznačen, avšak interakce mezi vápníkem a MAPK dosud nebyla prokázána (Homa, 1995). Možným propojením mezi hladinou Ca^{2+} iontů a aktivitou MAP kináz je CaMKII, která je aktivována vápníkem a kalmodulinem a zapojuje se do regulace meiotického cyklu a do tvorby meiotického vřeténka. Její vliv se zřejmě uplatňuje prostřednictvím regulace aktivity MPF (Ito *et al., 2004*) a MAPK v průběhu meiotického zrání a aktivace oocyty prasete (Fan *et al., 2003*).

Protein fosfatázy

Protein fosfatázy jsou enzymy, schopné defosforylovat široké spektrum substrátů prostřednictvím hydrolýzy monoesteru kyseliny fosforečné na fosfátové ionty a molekuly s volnou hydroxylovou skupinou. Protein fosfatázy se významně uplatňují v regulaci mitotického i meiotického buněčného cyklu (Wang *et al., 2004; Mochida et al., 2010; Domingo-Sananes et al., 2011; Mochida et Hunt, 2012*). Řada studií prokázala, že pro správný průběh meiotického zrání oocytů je nutná synchronní spolupráce mnoha protein fosfatáz a protein kináz (Smith *et al., 1998; Swain et al., 2003; Wang et al., 2004; Adhikari et al., 2012*).

Mezi hlavní fosfatázy participující v meiotickém buněčném cyklu se řadí protein fosfatáza 1 (PP1) a protein fosfatáza 2A (PP2A). Myšičí oocyty ve stádiu GV obsahují jak PP1, tak PP2A. PP1 je lokalizována v jádru a PP2A v cytoplasmě oocytů (Smith *et al., 1998; Swain et al., 2003*). Fosforylace PP1 je zvýšena během GVBD myšičích oocytů (Wang *et al., 2004*). V somatických buňkách je PP1 inaktivována kinázou CDK1, která PP1 fosforyluje na threoninu 320 (Dohadwala *et al., 1994; Kwon et al., 1997*). Tyto výsledky naznačují, že by

mohla být CDK1 zodpovědná za nezbytnou fosforylaci PP1 při GVBD také u myších oocytů (Adhikari et al., 2012). Okadaová kyselina funguje jako společný inhibitor syntézy PP1 a PP2A (Cohen, 1989). U myších oocytů, ošetřených látkami zabraňujícími aktivaci MPF a spontánnímu zahájení meiózy, vyvolá inhibice zprostředkovaná okadaovou kyselinou GVBD (Rime et Ozon, 1990; Schwartz et Schultz, 1991; Alexandre et al., 1991; Gavin et al., 1994). Nedávná studie provedená na myších oocytech s vyblokovanou CDK1 potvrdila, že CDK1 hraje významnou roli během GVBD, kde fosforyluje PP1 (Adhikari et al., 2012). Ve fázi GV nízká hladina CDK1 udržuje hypofosforylaci a vysokou aktivitu PP1, což napomáhá udržení meiotických fosfoproteinů v hypofosforylovaných stavech (Adhikari et al., 2012). Proteinem inhibujícím aktivitu PP2A je již výše zmíněná Greatwall kináza. Tento enzym neinhibuje PP2A přímo, nýbrž prostřednictvím fosforylace dvou funkčně úzce spjatých proteinů, endosulfínu α a c-AMP-regulovaného fosfoproteinu-19, podporuje jejich vazbu na PP2A a tedy i inhibici PP2A. Inhibice PP2A pak podporuje aktivitu komplexu MPF. Nejnovější experimenty prokázaly, že Greatwall kináza působící cestou inhibice PP2A je nepostradatelná jak pro meiotické zrání, tak pro udržení druhého meiotického bloku v oocytech prasete (Li et al., 2013).

Mezi další klíčové regulátory meiotického zrání savčích oocytů a raného embryonálního vývoje patří výše uvedené cdc25 fosfatázy, které aktivují cyklin dependentní kinázy odstraněním inhibiční fosforylace. Identifikovány byly tři izoformy cdc25: cdc25A, cdc25B a cdc25C. cdc25A se podílí na regulaci přechodu z G1 do S fáze, cdc25B je zapojena jak do přechodu z G2 fáze do M fáze, tak do progresu S fáze, cdc25C též podporuje přechod G2/M (Oh *et al.*, 2010). V prasečích oocytech se cdc25 nachází především v jaderné oblasti a má zásadní význam pro průchod přes pozdní diakinezi (Dai *et al.*, 2000).

Nedávné studie prokázaly, že mezi fosfatázy, které se podílí na regulaci oogeneze, patří také fosfatáza 2B, kalcineurin.

2.2 Kalcineurin

Kalcineurin byl poprvé detekován v bovinní mozkové tkáni Wangem a Desaiem v roce 1976 (Wang *et Desai*, 1976). Následující biochemické studie provedené v průběhu 80. let prokázaly expresi kalcineurinu v různých tkáních rozdílných druhů a také potvrdily význam kalcineurinu pro celou řadu fyziologických funkcí. Je klíčovým členem mnoha procesů, které ovlivňují buněčnou odpověď prostřednictvím Ca^{2+} dependentní signalizace,

regulace iontových kanálů a změn v transkripci genů (Rusnak *et* Mertz, 2000). K plnění širokého spektra biologických funkcí kalcineurinu je nutná jeho interakce s početnou skupinou substrátů a partnerských proteinů. Kalcineurin je jediná známá fosfatáza, k jejíž aktivaci je nutná přítomnost jak Ca^{2+} , tak také kalmodulinu (Kingsbury *et* Cunningham, 2000).

2.2.1 Struktura a izoformy kalcineurinu

Kalcineurin, označovaný též jako protein fosfatáza 2B (PP2B) či protein fosfatáza 3 (PP3), patří do rodiny serin/threonin protein fosfatáz 2. typu, jejichž cílem jsou fosfoserin a fosfothreonin. Závislost na dvojmocných iontech různých prvků vedla k rozlišení protein fosfatáz 2. typu na enzymy PP2A, PP2B a PP2C (Cohen, 1989). Ačkoli se tyto fosfatázy vzájemně liší citlivostí vůči inhibitorům i substrátovou specifitou, PP1, PP2A a kalcineurin obsahují homologní aminokyselinové sekvence a vykazují evoluční spojitost (Shenolikar *et* Nairn, 1991).

Kalcineurin je heterodimerická molekula specificky aktivovaná vápenatými ionty a kalmodulinem, která přednostně defosforyluje peptidy s bazickými aminokyselinami na N-konci a bez acidických aminokyselin na C-konci polypeptidického řetězce substrátu (Yamashita *et al.*, 2000). Aktivní katalytické centrum obsahuje železo a zinek. Heterodimer kalcineurinu se skládá z katalytické podjednotky, kalcineurinu A a regulační podjednotky, kalcineurinu B (Klee *et al.*, 1988).

Kalcineurin A se u savců vyskytuje ve třech různých izoformách $\text{CnA}\alpha$, $\text{CnA}\beta$, $\text{CnA}\gamma$, k jejichž expresi dochází na třech různých genech PPP3CA, PPP3CB a PPP3CC (Kincaid, 1993). Molekulární hmotnost podjednotky A se u savců pohybuje mezi 57-59 kDa v závislosti na izoformě (Rusnak *et* Mertz, 2000). Geny kódující polypeptid katalytické domény jsou homologní v celé rodině serin/threonin protein fosfatáz, od kterých se kalcineurin A odlišuje třemi dalšími regulačními doménami na COOH konci. Jedná se o helikální, kalcineurin B vázající doménu, dále doménu vázající kalmodulin a autoinhibiční doménu (Hashimoto *et al.*, 1990), která se v nepřítomnosti Ca^{2+} /kalmodulin váže do aktivního místa kalcineurinu A (Kissinger *et al.*, 1995).

Kalcineurin B byl prokázán ve dvou různých izoformách označovaných jako izoforma B1 a B2 o molekulové hmotnosti 18 kDa až 19 kDa (Chan *et al.*, 2005). Tyto izoformy jsou produktem dvou různých genů PPP3R1 a PPP3R2. Isoforma kalcineurinu B1 byla detekována ve spojení s izoformou kalcineurinu $\text{A}\alpha$ a $\text{A}\beta$, izoforma kalcineurinu B2 ve spojení

s izoformou kalcineurinu A γ (Kincaid, 1995). Podjednotka kalcineurinu B má schopnost vázat vápenaté ionty. Gen pro kalcineurin B kóduje i specifická vazebná místa pro Ca²⁺. Jedná se o čtyři EF-hand motivy polypeptidového řetězce, které po navázání Ca²⁺ modulují konformaci kalcineurinu B. Dvě z těchto vazebných míst se vyznačují nižší afinitou k vápenatým iontům. Jejich obsazení je závislé na vzestupu intracelulární hladiny vápenatých iontů, plní tedy regulační úlohu. Stimulují aktivitu kalcineurinu a umožňují vazbu kalmodulinu do cílového místa kalcineurinu A v závislosti na přítomnosti Ca²⁺ (Kakalis, 1995; Yang *et al.*, 2000). Zbylá dvě vazebná místa vykazují vyšší afinitu k vápenatým iontům a jsou vždy obsazena. Slouží ke stabilizaci heterodimerické struktury kalcineurinu a jsou proto označována jako místa strukturální (Gallagher *et al.*, 2001).

Každá z izoform obou podjednotek má v tkáních odlišnou distribuci. Nejvyšší exprese kalcineurinu A α byla zaznamenána v mozku (Chang *et al.*, 1992.). Exprese této izoformy byla zjištěna i řadě dalších tkání různých druhů organismů (Awumey *et al.*, 1999). Izoforma kalcineurinu A- β je přítomna jak v mozku a podobně jako izoforma A- α i v mnoha jiných tkáních, například osteoklastech, srdeční svalovině a ledvinách (Awumey *et al.*, 1999; Heineke *et al.*, 2006; Moz *et al.*, 2004). Exprese mRNA pro kalcineurin A- γ byla zjištěna v mozku, ale její výskyt byl také potvrzen v dalších tkáních, například krvi (Murata *et al.*, 2008). Exprese vlastního proteinu kalcineurinu A- γ byla poprvé prokázána ve tkáni varlete a je proto též označována jako izoforma specifická pro tuto tkáň - testis specific isoform (Muramatsu *et al.*, 1992; Kincaid, 1992). Izoforma B1 kalcineurinu B je přítomna v mnoha typech buněk a váže se na α a β izoformy kalcineurinu A. Naproti tomu izoforma B2 kalcineurinu B byla detekována pouze ve varlatech, kde se váže na izoformu γ kalcineurinu A, jak bylo uvedeno výše (Ueki *et al.*, 1992).

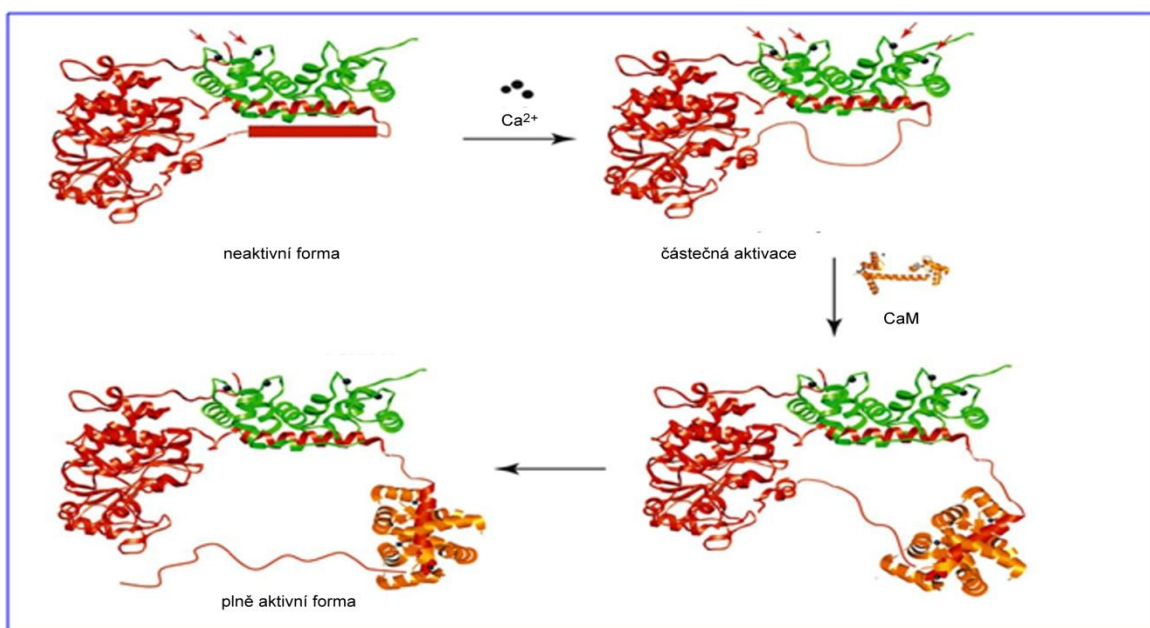
Nejvyšší koncentrace kompletního heterodimeru kalcineurinu byly nalezeny v mozku. Přítomnost obou podjednotek kalcineurinu byla prokázána i v tukové tkáni, v buňkách nadledvinek, v osteoklastech, srdci, zadním mozku a v míše, v ledvinách, játrech, v B i T lymfocytech, v plicích, v buňkách slinivky břišní, v placentě, krevních destičkách, v sítnici, v kosterních svalech, ve slezině, v brzlíku, štítné žláze, ve varlatech a spermiích savců (shrnuto v Li *et al.*, 2011). U prasete byl kalcineurin nalezen také v mnoha typech somatických buněk, například v lymfocytech, cévách, kosterním i hladkém svalstvu (Chantler, 1985; Hamada *et al.*, 2010; Depreux *et al.*, 2010) a v samčích gametách (Tash *et al.*, 1988).

2.2.2 Aktivace kalcineurinu

Aktivace kalcineurinu je proces spojený s řadou nezbytných konformačních změn. Tyto změny jsou iniciovány vazbou vápenatých iontů na kalcineurin B. Tato vazba usnadňuje disociaci kalmodulin vázající oblasti kalcineurinu A z vazebné oblasti kalcineurinu B (Yang *et al.*, 2000). Vzniklá konformace pak umožňuje navázání kalmodulinu, které vede k přemístění autoinhibičního peptidu a k nástupu fosfatázové aktivity (Stemmer *et al.*, 1994; Yang *et al.*, 2000), jak znázorňuje schéma na obrázku 1. Některé studie uvádí možnost přemístění autoinhibičního peptidu na základě interakce kalmodulinu s jinými částmi regulační oblasti kalcineurinu A (Shen *et al.*, 2008).

Základní mechanismus, kterým je regulována aktivita kalcineurinu *in vivo* je zprostředkován pomocí změny intracelulární hladiny Ca^{2+} . Při nízké koncentraci vápenatých iontů není kalcineurin schopen vázat CaM a zůstává v neaktivní formě. Signální dráhy, které vedou ke zvýšení intracelulárního Ca^{2+} , umožní vápenatým iontům vytvořit vazbu s kalmodulinem, která vyvolá konformační změny ve struktuře CaM. CaM je pak schopen vazby na kalcineurin. Zvýšení hladiny Ca^{2+} je nutné i pro navázání Ca^{2+} na podjednotku B. Na fosfatázovou aktivitu kalcineurinu mají vliv i další faktory, mezi které patří koncentrace volných hořečnatých iontů a koncentrace CaM. Výsledek signalizace prostřednictvím kalcineurinu v buňce závisí i na rychlosti refosforylace substrátu antagonistickými kinázami (Li *et al.*, 2011).

Obrázek 1: Mechanismus aktivace kalcineurinu (upraveno dle Li *et al.*, 2011)



červená – kalcineurin A, zelená – kalcineurin B, oranžová – kalmodulin, černá – Ca^{2+}

2.2.3 Substráty a cílové proteiny kalcineurinu

NFAT (Nuclear Factor of Activated T-cells)

Významný impulz pro studium kalcineurinu představovalo zjištění, že je tento protein cílem léků s imunosupresorovými vlastnostmi, cyklosporinu A a takrolimu (FK506), které jsou široce využívány v transplantační medicíně. Cyklosporin A a takrolimus vytváří komplexy s kalcineurinem a inhibují jeho fosfatázovou aktivitu, která je nutná pro defosforylaci některých peptidů a bílkovinných substrátů (Liu *et al.*, 1991). Působení těchto imunosupresiv zabraňuje defosforylaci transkripčních faktorů z rodiny NFAT (Nuclear Factor of Activated T-cells) v T buňkách imunitního systému (Shaw *et al.*, 1995).

Detailně popsána je Ca^{2+} signální dráha, která vede v organismu k imunitní odpovědi T-lymfocytů. Signalizace iniciovaná po přijetí signálu antigenovým receptorem, nacházejícím se na T buňkách, vyvolá uvolnění Ca^{2+} z endoplazmatického retikula. Vyčerpání zásob Ca^{2+} je zaznamenáno N-koncem EF domény proteinu STIM 1 (Single Pass ER Membrane Protein Stromal Interaction Molecule), který aktivuje iontové kanály CRAC (Calcium Release Activated Calcium Channels) v plazmatické membráně. Vápník vstupující prostřednictvím CRAC kanálů aktivuje CaM a kalcineurin. Aktivovaný kalcineurin zahájí defosforylaci fosfoserinových reziduí v regulační oblasti NFAT, jejímž důsledkem jsou konformační změny NFAT, které vedou k translokaci NFAT do jádra a aktivaci transkripce cílových genů NFAT (Hogan *et al.*, 2010). Kalcineurin, jako hlavní aktivátor NFAT, musí být neustále aktivován (Crabtree, 2001). NFAT je totiž rychle z jádra exportován zpět do cytoplazmy, což je spjata s fosforylací zmíněných serinových míst. Do tohoto procesu zasahují kinázy PKA (protein kinase A) a GSK-3 (Glycogen Synthase Kinase-3) (Zhou *et al.*, 2002). Kalcineurin/NFAT signální kaskáda převádí Ca^{2+} signály do genové exprese a ovlivňuje tak řadu rozmanitých biologických procesů v závislosti na typu somatické buňky, tedy nejen v buňkách imunitního systému (Li *et al.*, 2011). Poruchy v kalcineurin/NFAT signalizaci mohou souviset se srdeční hypertrofií (Heineke *et al.*, 2006), autoimunitními onemocněními (Sundrud *et al.*, 2007), osteoporózou (Takayanagi, 2007), Alzheimerovou nemocí (Berridge, 2010), Downovým syndromem (Arron *et al.*, 2006) či rakovinou (Ryeom *et al.*, 2008).

„Scaffold“ proteiny

Mezi „scaffold“ proteiny se řadí například c-Jun NH_2 -terminální kináza-interacting protein (JIP), β -arrestin, filamin, JLP, protein 1 asociovaný s aktivovanou SAPK (JSAP1),

MP1, OSM, POSH, SKRP1 (Yoshioka, 2004). S funkcí kalcineurinu jsou spojeny „scaffold“ proteiny KSR (Kinase Suppressor of Ras) a AKAP (Protein Kinase A Anchoring Protein).

KSR je členem skupiny „scaffold“ proteinů, která spolupracuje s klíčovými součástmi ERK, patří tedy k důležitým modulátorům MAP kinázové dráhy. KSR napomáhá aktivaci ERK, usnadňuje signalizaci Ras/ERK a zajišťuje rozhodující prostorovou i časovou kontrolu signalizačních výstupů této kaskády v somatických buňkách. U savců existují dvě izoformy KSR: KSR1 a KSR2. Obě izoformy komunikují se složkami ERK kaskády a mají společnou funkci při podpoře ERK signalizace. Kalcineurin selektivně reaguje s izoformou KSR2. Po zvýšení hladiny Ca^{2+} kalcineurin defosforyluje KSR2 na konkrétních místech a tak reguluje lokalizaci i aktivitu KSR2. KSR2 pak jednoznačně přispívá k ERK signalizaci zprostředkované Ca^{2+} /kalcineurin dráhou (Dougherty *et al.*, 2009).

Protein zakotvující proteinkinázu A je multivalentní molekula, která umožňuje zakotvení určitých proteinů na specifické buněčné lokality, často v sousedství vstupu vápenatých iontů v blízkosti L-typu Ca^{2+} kanálu a N-methyl-D-aspartátu (NMDA) receptoru. Cíly AKAP jsou PKA, PKC a kalcineurin. Kalcineurin ukotvený na AKAP je pravděpodobně enzymaticky neaktivní (Lai *et al.*, 1998). Dosud však nebylo jednoznačně prokázáno, zda vytvoření komplexu AKAP/ kalcineurin zabraňuje aktivaci kalcineurinu vápenatými ionty.

V prasečích oocytech bylo zjištěno několik nových způsobů signalizace prostřednictvím AKAP. Nejvyšší exprese v prasečích oocytech byla zaznamenána u izoformy AKAP 1, která je schopna změnit lokalizaci PKA a tak podpořit znovuzahájení meiotického zrání i v přítomnosti vysoké koncentrace cAMP. Vyblokování AKAP1 naopak prokázal inhibiční účinky jak na znovuzahájení meiotického zrání prasečích oocyů, tak na jeho průběh (Nishimura *et al.*, 2013).

2.2.4 Inhibitory kalcineurinu

K inhibitorům kalcineurinu patří imunosupresiva, často využívaná v humánní medicíně, mezi která se řadí cyklosporin A a takrolimus. Cyklosporin A tlumí reakce zprostředkované buňkami, na buněčné úrovni tlumí tvorbu a uvolňování lymfokinů včetně interleukinu-2. Na rozdíl od cytostatik nesnižuje cyklosporin hemopoézu a neovlivňuje funkci fagocytů. Takrolimus inhibuje zejména tvorbu cytotoxických T lymfocytů, které jsou hlavně zodpovědné za odhojení štěpů. Potlačuje nejen aktivaci T lymfocytů a proliferaci B lymfocytů, ale také tvorbu lymfokinů a expresi receptorů interleukinu-2. Další skupinu

významných inhibitorů kalcineurinu tvoří dosud využívané účinné insekticidy, pyrethroidy II. typu.

Cyklosporin A

Cyklosporin A je lipofilní cyklický undekapeptid, který byl poprvé izolován z vláknité houby *Tolypocladium inflatum*. V současné době je již známa řada dalších producentů cyklosporinu. Cyklosporin se váže na intracelulární plazmatický lipoprotein cyklofilin. Takto vytvořený proteinový komplex cyklofilin/cyklosporin se naváže na kalcineurin a zamezí tak přístupu substrátů kalcineurinu (Liu *et al.*, 1991). Tento způsob inhibice je vysoce specifický (Griffith *et al.*, 1994).

Takrolimus

Takrolimus, označovaný také jako FK 506 byl izolován z houby *Streptomyces tsukubaensis*. Princip působení takrolimu v organismu je obdobný jako u cyklosporinu. Takrolimus se váže na intracelulární protein FK506 vázající protein (FKBP) a vzniklý komplex po vazbě na kalcineurin blokuje místo pro navázání substrátu (Liu *et al.*, 1991). Inhibice kalcineurinu pomocí takrolimu i výše zmíněného cyklosporinu znemožní jadernou translokaci řady transkripčních faktorů nutných pro aktivaci T-lymfocytů i produkci cytokinů a je proto často využívána v transplantační medicíně a při léčbě autoimunitních chorob (Kelly *et al.*, 1995; Hultsch *et al.*, 2005).

Pyrethroidové inhibitory kalcineurinu

Pyrethroidy patří od 70. let 20. století k důležitým insekticidům používaných k hubení hmyzu. Jedná se o vysoce aktivní syntetické deriváty přírodních pyrethrinů přítomných v rostlině řimbabě starčkolisté *Chrysanthemum cinerariaefolium* (Soderlund *et al.*, 2002). Toxické efekty pyrethroidů jsou obvykle spojovány s jejich účinkem na iontové kanály nervových buněk (Soderlund, 2010)

Pyrethroidy se rozdělují do dvou základních kategorií. Každá skupina se vyznačuje jinými toxickými účinky, jinými neurofyziologickými, chemickými a biologickými vlastnostmi a rozdílnými proteinovými cíly (Anadón *et al.*, 2009). První třídu tvoří pyrethroidy typu I, které neobsahují ve své molekule kyanidovou skupinu. Mezi zástupce pyrethroidů typu I patří například permethrin, phenothrin, resmethrin, allethrin a cismethrin.

Druhou kategorii tvoří pyrethroidy typu II, které obsahují kyanidovou skupinu na α pozici. K pyrethroidům typu II se řadí cypermethrin, fenvalerát, deltamethrin a mnoho dalších. Pyrethroidy typu II jsou obecně považovány za silné specifické inhibitory kalcineurinu (Enan *et al.*, 1992), které jsou využívány jak v ochraně rostlin v zemědělské výrobě, tak k ochraně zvířat před hmyzími škůdci, pro kontrolu hmyzích vektorů přenášejících infekční choroby i pro hubení hmyzu v domácnostech (Soderlund *et al.*, 2002). *In vitro* byly negativní účinky cypermethrinu, deltamethrinu a fenvalerátu prokázány nejen u různých typů savčích somatických buněk (Prasanthi *et al.* 2005; Patel *et al.*, 2007), ale také u spermií (Yuan *et al.*, 2010). Vliv na samičí pohlavní buňky oocyty nebyl dosud detailně studován.

2.2.5 Regulátory kalcineurinu

RCAN (Regulators of Calcineurin) proteiny nazývané též MCIP (Modulatory Calcineurin-Interacting Proteins), DSCR (Down's Syndrome Critical Region) či kalcipresiny tvoří rodinu endogenních regulátorů kalcineurinu, které mají nepostradatelnou roli v průběhu normálních kalcineurinových signálních drah. Kalcipresiny mají schopnost regulovat aktivitu kalcineurinu vazbou na katalytickou podjednotku B. Přestože není přesný princip signalizace prostřednictvím kalcineurinu *in vivo* dosud detailně popsán, byl prokázán vliv kalcipresinů na některé biologické pochody, zahrnující progresi nádorů (Ryeom *et al.*, 2008; Baek *et al.*, 2009) nebo embryonální vývoj obratlovců (Li *et al.*, 2011).

Nezastupitelná funkce jednoho z členů rodiny regulátorů kalcineurinu, proteinu Sra, byla prokázána v oocytech mouchy *Drosophila*. Zvýšená exprese Sra potlačuje fenotypy vzniklé nadměrnou aktivací kalcineurinu, ke kterým patří poruchy žilkování křídel a vývoje očí. Naopak hyperaktivace kalcineurinové signalizace prostřednictvím vyblokování genu genovým knockoutem Sra vede v zárodečných buněčných liniích drozofily k meiotickému bloku, oocyty nemají schopnost vývoje za stádium anafáze prvního meiotického dělení. Studie prokázala, že protein Sra má funkci inhibitoru kalcineurinu a kalcineurin se významně podílí na správném průběhu meiózy. K jeho expresi dochází v ováriích a u raných embryí drozofily (Takeo *et al.*, 2006). Další studie představila obdobné výsledky experimentů a prezentovala i možnost zapojení Sra v procesu aktivace oocytů drozofily (Horner *et al.*, 2006). Následující experimenty potvrdily funkci Sra u drozofily a zároveň prokázaly další princip regulace Sra pomocí GSK-3 β . Sra fosforylovaný prostřednictvím GSK-3 má schopnost aktivitu kalcineurinu zvýšit (Takeo *et al.*, 2010; Takeo *et al.*, 2012). Naopak schopnost účinně inhibovat kalcineurin byla prokázána u DSCR1, lidského kalcipresinu 1.

Jedná se zde o kompetitivní inhibici, která využívá odlišné mechanismy než inhibice, na jejichž základě fungují například cyklosporin A a takrolimus (Chan, 2005).

2.2.6 Úloha kalcineurinu v reprodukci

Vliv kalcineurinu na fyziologii reprodukčních funkcí není doposud objasněn. Jak již bylo zmíněno, Takeo *et al.* (2006) popsali funkci regulátoru kalcineurinu a signalizace prostřednictvím kalcineurinu v průběhu meiózy oocytů mouchy rodu *Drosophila*. Práce dalších vědeckých týmů (Nishiyama *et al.*, 2007; Mochida *et al.*, 2007) prokázaly významnou roli kalcineurinu v regulaci meiózy oocytů drápatky *Xenopus laevis*. Mochida a Hunt (2007), stejně tak jako Nishiyama *et al.* (2007) uvádějí, že přítomnost kalcineurinu je nezbytná pro výstup z metafáze II. Pro iniciaci raného embryonálního vývoje oocytů drápatky je nezbytná aktivace kalcineurinu (Nishiyama *et al.*, 2007). U drápatky dochází při oplození k přechodnému zvýšení hladiny Ca^{2+} , které vede k uvolnění z druhého meiotického bloku. Ca^{2+} aktivuje vápníkem a kalmodulinem aktivované kinázy (CaMKII), které prostřednictvím fosforylace Erp1 inaktivují cytostatický faktor a umožní ubikvitinizaci cyklinu a securinu, proteinů, které se podílí na udržení buněčného cyklu v interfázi. Avšak zvýšení koncentrace Ca^{2+} přechodně aktivuje i fosfatázovou aktivitu kalcineurinu. Inhibitory kalcineurinu naopak zabrání destrukci cyklinu, defosforylaci proteinů specifických pro M-fázi a znovuvytvoření plně funkční jaderné membrány. Mochida a Hunt (2007) prokázali, že druhá vlna fosfatázové aktivity, řízená mitotickými fosfoproteiny nastupuje až po aktivaci kalcineurinu. Tato aktivita zaniká po vstupu do M-fáze a opět se objevuje na jejím konci. Inhibice kalcineurinu umožňuje vstup do M-fáze buněčného cyklu a aktivace včasný návrat do interfáze. Kalcineurin přeruší druhý meiotický blok, který je udržován pomocí Mos/MAPK kaskády. Klíčový regulátor APC signální dráhy Fizzy/Cdc20 je pro kalcineurin velmi vhodným substrátem (Mochida *et al.*, 2007).

V samičích pohlavních orgánech byl kalcineurin nalezen pouze v ováriích a raných embryích mouchy *Drosophila* a v oocytech drápatky *Xenopus*, kde reguluje meiotické zrání, oplození i aktivaci. Vzhledem k vysoce konzervované struktuře kalcineurinu a analogiím v oogenezi u mnoha druhů lze předpokládat obdobnou funkci této fosfatázy i u prasečích oocytů. Dosud však nebyla žádná izoforma kalcineurinu nalezena v oocytech savců a není známo, zda má kromě meiotického zrání vliv také na růstovou fázi oogeneze. O expresi kalcineurinu v oocytech savců a funkci kalcineurinu při regulaci oogeneze savčích oocytů nejsou doposud v odborné literatuře žádné údaje.

3. Hypotézy a cíle práce

Na základě dostupných informací z odborné literatury byla stanovena hypotéza, podle které se fosfatáza 2B, kalcineurin, vyskytuje v oocytu prasete a je zapojena do regulace jeho růstové fáze a procesu zisku meiotické kompetence.

Pro ověření této hypotézy byly stanoveny dílčí cíle:

Ověřit meiotickou kompetenci prasečích oocytů v našich laboratorních podmínkách.

Prokázat přítomnost mRNA pro známé izoformy obou podjednotek kalcineurinu v prasečích oocytech v závislosti na stupni meiotické kompetence

Detekovat expresi obou podjednotek vlastního proteinu kalcineurinu v plně meioticky kompetentních prasečích oocytech

Posat změny v intracelulární lokalizaci obou podjednotek kalcineurinu v prasečích oocytech v závislosti na stupni meiotické kompetence během růstové fáze.

Sledovat vliv specifických inhibitorů kalcineurinu na vývoj prasečích oocytů s různou meiotickou kompetencí

Popsat vliv inhibice kalcineurinu na aktivitu významných kináz regulujících průběh oogeneze.

4. Materiál a metody

Odběr vaječnicků

Vaječnický byly získávány na jatkách od prepubertálních prasniček z blíže neurčených chovů. Vaječnický byly z jatek do laboratoře transportovány v termolahvích s fyziologickým roztokem (0,9 % chlorid sodný) o teplotě 39 °C.

Získávání rostoucích oocytů

Rostoucí oocyty byly získávány z povrchové části vaječnicků z tenkých pruhů korové vrstvy ovariální tkáně. Oocyty byly následně izolovány pod stereomikroskopem protrháváním folikulů menších než 2mm pomocí jehly. Získané oocyty byly roztríděny pod stereomikroskopem s okulárovým mikrometrem do čtyř skupin podle velikosti vnitřního průměru, to je bez vrstvy *zona pellucida* a přenášeny do kapek modifikovaného média M199, obohaceného o HEPES, laktát sodný, pyruvát sodný, gentamicin a bovinní sérový albumin. Přesné složení je uvedeno v tabulce 1. První skupina obsahovala oocyty o velikosti 80 - 89 μm, ve druhé byly oocyty o velikosti 90 - 99 μm, do třetí skupiny byly zařazeny oocyty o velikosti 100 - 110 μm a čtvrtou skupinu tvořily oocyty o velikosti 120 μm.

Získávání oocytů s ukončeným růstem

Oocyty s ukončeným růstem byly získávány z folikulární tekutiny aspirované jehlou 20G z folikulů o průměru 2-5 mm. Pod stereomikroskopem byly oocyty skleněnou pipetou odsávány ze získané folikulární tekutiny a přenášeny do kapek modifikovaného média M199, složení je uvedeno v tabulce 1. Pro experimenty byly použity pouze oocyty s neporušenou cytoplazmou a kompaktním obalem kumulárních buněk.

Kultivace oocytů rostoucích a oocytů s ukončeným růstem

Pro manipulaci s prasečími oocyty bylo použito uvedené modifikované médium M199. Zásobní roztok média byl připravován každý týden čerstvý a sterilizovaný uchováván při teplotě 4°C v prostředí směsi 5% CO₂ se vzduchem.

Tabulka 1: Složení modifikovaného média M199 pro manipulaci s prasečími oocyty

Chemikálie	Množství ve 100 ml média M199
Laktát sodný (Sigma-Aldrich, Německo)	60 mg
Pyruvát sodný (Sigma-Aldrich, Německo)	25 mg
HEPES (Sigma-Aldrich, Německo)	150 mg
Gentamicin (Sigma-Aldrich, Německo)	2,5 mg
Bovinní sérový albumin (Sigma-Aldrich, Německo)	50 mg

Kultivace oocytů probíhala ve 4-jamkových Petriho miskách (Nunc, Roskilde, Dánsko) v 1 ml modifikovaného média M199 bez bovinního sérového albuminu, s přídavkem eCG/hCG (PG 600, Intervet Boxmeer, Holandsko) 13,4 : 6,6 IU/ml. Oocyty byly kultivovány 24 hodin do stádia první meiotické metafáze nebo 48 hodin do stádia druhé meiotické metafáze.

Barvení a fixace oocytů

Po odstranění kumulárních buněk byly oocyty přeneseny na podložní sklo a překryty krycím sklíčkem umístěným na vazelínové proužky. Fixovány byly pomocí roztoku kyseliny octové s ethanolem v poměru 1:3 po dobu minimálně 24 hodin a poté barveny 1% orceinem (Sigma Aldrich, Německo). Pro vyhodnocení fáze zrání byl použit mikroskop s fázovým kontrastem (zvětšení 400x). Fáze meiotického zrání, respektive stádium zárodečného vajíčku (GV), pozdní diakinese (LD), metafáze I (MI), anaphase I (AI), telophase I (TI), nebo metafáze II (MII), byly hodnoceny v souladu s kritérii popsány Motlíkem a Fulkou (1976). Abnormální konfigurace chromatinu, která neodpovídala uvedeným kritériím, byla hodnocena jako degenerativní.

Stanovení mRNA metodou RT-PCR

Každý vzorek obsahoval 50 oocytů o dané velikosti vnitřního průměru v 50 µl izolačního pufru. Následující izolace RNA probíhala pomocí NucleicAcid PrepStation 6100 (Applied Biosystems, USA). Celková RNA byla přepsána do cDNA (komplementární DNA)

s využitím High-Capacity cDNA Achieve kitu (Applied Biosystems, USA). Vzorek o konečném objemu 10 μ l byl zamražen na -20 °C. Sekvence primerů a TaqMan MGB sond navržených podle známých sekvencí pro izoformy kalcineurinu prasete jsou uvedeny v tabulce 2.

Tabulka 2: Sekvence navržených primerů a MGB TaqMan sond

Kalcineurin A	Izoforma α	„Forward“ primer:	5'-CCCTATATCGCTAATTGCCATTTT-3'
		Reverzní primer	5'-AGTTTGTTTGTGCCATGGTTCA-3'
		TaqMan sonda:	5'-TACATAAAACAAAGTGCCTGAA-3'
	Izoforma β	„Forward“ primer:	5'-GGCAGCGGAACCATCTATTG-3'
		Reverzní primer:	5'-TCCAACCTAGACAGGAGACCATACA-3'
		TaqMan sonda:	5'-TTTGCCAGAAAGTGCACC-3'
	Izoforma γ	„Forward“ primer:	5'-CATCAGAGGGTTTTCGCTTCA-3'
		Reverzní primer:	5'-CCAGACCTCGGGCTTCTTC-3'
		TaqMan sonda:	5'-CACAGGATCCGCAGTT-3'
Kalcineurin B	Izoforma B1	„Forward“ primer:	5'-AGGTGCCAAGAACCTTTTCTCA-3'
		Reverzní primer:	5'-GCAGGGTTGCCAGCTAGCT-3'
		TaqMan sonda:	5'-CCACACCTTGGAGTAGG-3'
	Izoforma B2	„Forward“ primer:	5'-CAGGGCGATGATGGTTTTG-3'
		Reverzní primer:	5'-GGTGGGAGACAACCTGAAAGAC-3'
		TaqMan sonda:	5'-CCACCAGCTGCTGTAA-3'

RT-PCR proběhla dle standardního TaqMan PCR kit protokolu pomocí přístroje Fast Real-Time PCR System 7500 (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA). Každá PCR reakce probíhala ve třech opakováních v celkovém objemu 10 μ l reakční směsi obsahující primery o koncentraci 500 nM a TaqMan MGB sondy o koncentraci 200 nM v 5 μ l Fast TaqMan Universal Master Mixu 2x koncentrovaný (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA), 1 μ l cDNA a doplněno do konečného objemu vodou neobsahující nukleázy. Parametry

nastavení termocykleru byly : počáteční denaturace při 95°C po dobu 20s, 40 cyklů při 95°C na 2s a 60°C na 20s.

Relativní kvantifikace exprese mRNA pro každou z izoform kalcineurinu byla stanovena pomocí srovnávací $\Delta\Delta Ct$ metody, jako endogenní kontrola byl použit provozní housekeepingový gen pro glycerinaldehyd 3-fosfát dehydrogenázu (GAPDH).

Metoda Western blot

Oocyty byly zbaveny kumulárních buněk. Následoval oplach oocytů ve třech 200 μ l kapkách fosfátového pufru PBS (Sigma-Aldrich, Německo), poté byly oocyty vloženy do mikrozkušavky s 7 μ l koncentrovaného vzorkového pufru s dodecylsulfátem sodným (SDS), povařeny po dobu 3 min ve vodní lázni a poté zamraženy. Kumulární buňky odstraněné z oocytů byly centrifugovány v 1ml PBS po dobu 3 min při 5000 otáčkách a následně vloženy do 7 μ l koncentrovaného SDS vzorkového pufru a povařeny po dobu 3 min a zamraženy. Vzorky byly skladovány nejdéle 14 dní při teplotě -20°C a před elektroforetickou separací naředěny 13 μ l redestilované vody. Jako pozitivní kontrola byl použit čistý protein kalcineurin (Sigma-Aldrich, Německo).

Proteiny byly elektroforeticky separovány nejprve v zaostřovacím 4% polyakrylamidovém gelu s přídavkem dodecylsulfátu sodného (SDS-PAGE) a poté v 12,5% separačním SDS-PAGE gelu. Po rozdělení proteinů v gelu podle molekulové hmotnosti byly proteiny přetištěny na nitrocelulózovou membránu (Hybond, Amersham Pharmacia Biotech, USA). Pro ověření přetištění proteinů na membránu a jejich následnou identifikaci byl použit hmotnostní marker prestained molecular weight bovine standard (Bio-Rad, Montreal, Kanada, 161-0318). Membrána byla přes noc blokována v 2% roztoku netučného mléka v PBS s přídavkem 0.1% Tween 20. Dále byla membrána inkubována 2 hod s primární anti-kalcineurin A (Sigma-Aldrich, Německo, C-1956) nebo anti-kalcineurin B protilátkou (Sigma-Aldrich, Německo, C-0581) v koncentracích 1:10 000 (anti-kalcineurin A) a 1:3 000 (anti-kalcineurin B). Následně byly membrány promyty a inkubovány se sekundární myší protilátkou (Amersham GE Healthcare, Life Sciences, Velká Británie, NIF825) o koncentraci 1:30 000. Primární i sekundární protilátky byly rozpuštěny v 2% odtučněném mléce. Přenesené proteiny s navázanou protilátkou byly vizualizovány pomocí ECL Advance Western Blotting Detection Kit (Amersham Pharmacia Biotech, UK), za použití přístroje C-DiGit Blot Scanner (LI-COR Biosciences, USA).

Imunocytochemická analýza

Po izolaci oocytů s různým stupněm meiotické kompetence byly z jejich povrchu mechanicky odstraněny kumulární buňky nasáváním skrz úzkou tenkostěnnou skleněnou kapiláru. Pomocí 0,1% pronázy (Sigma-Aldrich, Německo) v PBS byly oocyty zbaveny vstvy *zona pellucida* a opláchnuty ve třech kapkách 0,1% roztoku BSA v PBS. Následně byly oocyty fixovány v 2,5% roztoku paraformaldehydu v PBS při laboratorní teplotě po dobu 60 minut, po 30 minách byl vyměněn fixační roztok za čerstvý. Fixované oocyty byly permeabilizovány 0,5% roztokem Tritonu X-100 v PBS po dobu 2 hodin při laboratorní teplotě. Následně byly oocyty opláchnuty v 0,1% roztoku Tweenu 20 v PBS a inkubovány v inkubačním médiu (0,1% BSA a 0,01% Tween 20 v PBS) s primární myší protilátkou anti-kalcineurin A (Sigma-Aldrich, Německo, C-1956) nebo anti-kalcineurin B protilátkou (Sigma-Aldrich, Německo, C-0581) ředěnou v poměru 1:100, přes noc ve vlhkém prostředí při teplotě 4°C. Poté byly oocyty třikrát promyty v roztoku 0,1% Tween 20 v PBS při laboratorní teplotě. Následně byly oocyty inkubovány v inkubačním médiu se sekundární protilátkou anti-myší IgG konjugovanou s fluorescein-5-izothiokyanátem (FITC; Jackson ImmunoResearch, INC., USA) 1 hodinu ve tmě při laboratorní teplotě. Po oplachu v 0,1% roztoku Tween 20 v PBS byly oocyty promyty v 0,1% roztoku BSA v PBS po dobu 10 minut. Pro vizualizaci DNA byly oocyty barveny barvivem DAPI (4',6-diamidino-2-fenyl indol dihydrochlorid) (Sigma Aldrich, Německo, 861405). Po opláchnutí v ekvilibračním pufru byly oocyty montovány v kapce glycerolu v PBS na podložní skla. V kontrolní skupině byly oocyty ošetřeny stejně jako ve skupině experimentální, pouze v první inkubaci nebyla přítomna primární protilátka.

Vzorky byly analyzovány pomocí laserového konfokálního mikroskopu (Leica SPE, Německo) ve Fyziologickém ústavu Akademie věd ČR v Praze 4. Fluorescence FITC byla stanovována při emisní vlnové délce 520 nm. Úroveň laseru byla u všech experimentálních skupin nastavena stejně. Fluorescence barviva Hoechst 33258 byla stanovena při emisní vlnové délce 410 nm.

Hodnocení výsledků konfokální mikroskopie

Hodnocení výsledků získaných z konfokálního mikroskopu bylo prováděno metodou analýzy obrazu (NIS Elements 2003, Laboratory Imaging, Česká republika). Ve spolupráci s firmou Laboratory Imaging s.r.o. bylo vytvořeno makro pro stanovení průměrné intenzity signálu fluorescence FITC v oblasti jádra, v cytoplasmě oocytu a v oblasti korové. V případě

jádra uloženého na periferii oocyty, byla fluorescence měřená v této oblasti považována za signál v oblasti jádra a nikoliv signál korové oblasti. V oocytech ve stádiu I. a II. meiotické metafáze byla intenzita fluorescence měřena v perichromozomální oblasti, místě meiotického vřeténka. Data z jednotlivých oblastí oocyty byla porovnávána vzhledem k celkové intenzitě fluorescence FITC v oocyty a byla stanovena relativní intenzita fluorescence v jednotlivých oblastech oocyty (jádro, korová oblast, cytoplazma). Počty objektů, binární plocha a suma intenzit fluorescence byly přepočítány na měřenou plochu jádra nebo perichromozomální oblasti, cytoplazmy či membrány. Intenzita signálu byla vyjádřena jako „relativní intenzita“ získaná poměrem mezi naměřenou průměrnou hodnotou intenzity v oocytech v dané skupině a průměrnou hodnotou intenzity oocytů ve stádiu GV. Suma intenzit fluorescence přepočtená na měřenou plochu je dále označována jako intenzita fluorescence plochy. Průměrná intenzita fluorescence byla přepočítána na měřenou plochu jádra či perichromozomální oblasti, cytoplazmy a membrány. Maximální intenzita fluorescence hodnocena nebyla.

Kultivace oocytů s inhibitory kalcineurinu

Pro studii vlivu inhibice kalcineurinu na oocyty v rozdílných vývojových stádiích byly použity inhibitory ze skupiny pyrethroidů: cypermethrin, deltamethrin a fenvalerát (Sigma-Aldrich, Německo) a nepyrethroidové inhibitory: cyclosporin A a hymenistatin I (Sigma-Aldrich, Německo).

Inhibitory v zásobních roztocích byly rozpuštěny v DMSO. Obsah DMSO v kultivačním médiu nepřesáhl koncentraci 0,2%. Předběžné kontrolní experimenty prokázaly, že DMSO použité při kultivaci oocytů v koncentracích, v jakých byly rozpuštěny zkoumané inhibitory ve finálních koncentracích, neměly na zrání prasečích oocytů v podmínkách *in vitro* kultivace statisticky průkazný efekt.

Na začátku 44 hodinové kultivace byly do média pro kultivaci oocytů přidány alikvotní části zásobního roztoku tak, aby výsledná koncentrace pyrethroidů byla 0, 10, 25, 50 nebo 100 μM . V případě nepyrethroidových inhibitorů se jednalo o koncentrace 0, 0,1, 1, 4 a 8 μM .

Fáze meiotického zrání, byly hodnoceny v souladu s kritérii popsanými Motlíkem a Fulkou (1976). Abnormální konfigurace chromatinu, která neodpovídala uvedeným kritériím, byla hodnocena jako degenerativní. Životoschopnost kultivovaných oocytů byla hodnocena barvením trypanovou modří. Padesát oocytů z každé kategorie, tedy plně meioticky kompetentní oocyty, rostoucí oocyty s částečnou meiotickou kompetencí a rostoucí

meioticky nekompetentní oocyty, bylo hodnoceno po ukončení inkubace s příslušnými inhibitory.

Stanovení aktivity kináz MPF a MAPK v oocytech

Kinázová aktivita byla zjišťována metodou dle Kubelky *et al.* (2000). Oocyty s částečnou meiotickou kompetencí byly kultivovány s přidavkem cyklosporinu A po dobu 48 hodin. Vzorky pro analýzu aktivity MPF a MAPK byly odebrány před počátkem kultivace, po 24 hodinové kultivaci a po 48 hodinové kultivaci. Jednotlivé vzorky pro analýzu aktivity MPF a MAPK byly připraveny z 10 oocytů zbavených kumulárních buněk a promytých v 5 200 μ l kapkách modifikovaného transfer média, složení je uvedeno v tabulce 3.

Tabulka 3: Složení modifikovaného média pro přípravu vzorků pro analýzu kinázové aktivity MPF a MAPK

Chemikálie	Množství v 1 l destilované vody
NaCl	6,4 g
KCl	0,4 g
CaCl ₂ .2H ₂ O	0,3 g
KH ₂ PO ₄	0,07 g
MgSO ₄ .7H ₂ O	0,097 g
Glukóza	2 g
HEPES	2 g
PVA	1 g
NaHCO ₃ 7,5 %	7,5 ml
Penicilin	0,0225 g
Streptomycin	0,0325 g
Amfotericin 25 μ g/ml	2,5 ml
Pyruvát sodný	100 mg

Okamžitě po odsátí přebytečného média bylo k oocytům přidáno 5 μ l extrakčního pufru, složení je uvedeno v tabulce 4.

Tabulka 4: Složení extrakčního pufru pro přípravu vzorků pro analýzu kinázové aktivity MPF a MAPK

Chemikálie	Koncentrace	Množství
MOPS (pH 7,2)	20 mM	80 μ l
β -glycerol fosfát	20 mM	40 μ l
Na ₃ VO ₄	0,1 mM	2 μ l
pNPP	10 mM	20 μ l
NaF	20 mM	80 μ l
DTT	1 mM	40 μ l
EGTA	5 mM	20 μ l
EDTA	0,1 mM	4 μ l
Aprotinin	20 μ g/ml	2 μ l
Leupeptin	20 μ g/ml	2 μ l
Benzamidin	1 mM	2 μ l
AEBSF	1 mM	5 μ l
H ₂ O		703 μ l

Následně byly vzorky zamraženy a skladovány při teplotě -70°C. Před dalším použitím byly vzorky 3x rozmraženy a opět zamraženy. Po té bylo ke vzorkům přidáno 5 μ l reakčního pufru obsahujícího radioaktivní donor ATP (P³²) (SBP-501, Izotop, Institute of isotopes Co. Ltd., Maďarsko). Složení reakčního pufru je uvedeno v tabulce 5.

Tabulka 5: Složení reakčního pufru pro analýzu aktivity MPF a MAPK

Chemikálie	Koncentrace	Množství
MOPS (pH 7,2)	50 mM	80 μ l
β -glycerol fosfát	20 mM	180 μ l
Na_3VO_4	0,5 mM	92 μ l
pNPP	10 mM	48 μ l
MgCl_2	10 mM	48 μ l
DTT	1 mM	32 μ l
EGTA	5 mM	96 μ l
EDTA	0,5 mM	1 μ l
Aprotinin	20 μ g/ml	12 μ l
Leupeptin	20 μ g/ml	12 μ l
Benzamidin	1 mM	4 μ l
PKA inhibitor	0,0025 mM	10 μ l
500 μ Ci/ml ATP	0,3 mM	12 μ l
H_2O		373 μ l

Vzorky byly s přidavkem substrátů histonu H1 (Histon, from calf thymus, type III-S: H5505, Sigma-Aldrich, Německo) a MBP (Myelin basic protein, M1891, Sigma-Aldrich, Německo) inkubovány 30 minut. Po inkubaci bylo ke vzorkům přidáno 12 μ l vzorkového pufru a po té proběhla elektroforetická separace na polyakrylamidovém gelu.

Histon H1 a MBP byly separovány pomocí SDS-polyakrylamidové elektroforézy na 10 % separačním gelu. Gel byl po separaci obarven modří Coomassie Blue R 250 (Brilliant Blue R, 27816, Sigma-Aldrich, Německo) na 30 minut a vysušen. Usušený gel byl uložen do expoziční kazety na IP desku (Imaging plate, BAS-SR, 2025, GE Healthcare Life Sciences, USA). Expozice trvala minimálně 6 hodin. Stanovení výsledků probíhalo v Ústavu experimentální botaniky, Akademie věd ČR pomocí přístroje TyphoonTM FLA-7000, GE

Healthcare Life Sciences, USA. Výsledky byly hodnoceny pomocí programu Multi Gange V3.1. Hodnoty kinázové aktivity MPF a MAPK byly vyjádřeny jako % poměr denzity signálu vzorků pokusných skupin k denzitě signálu vzorků kontrolní skupiny kultivované 24 hod., kdy je předpokládána aktivita obou faktorů nejvyšší (Kubelka *et al.*, 2000).

Statistická analýza

Pro vyhodnocení dat relativní kvantifikace exprese mRNA pro jednotlivé izoformy kalcineurinu byl využit program Statistica 9.0 CZ, jednofaktorová ANOVA. Rozdíly mezi skupinami byly hodnoceny pomocí Scheffeho testu ($p < 0,05$). Každý analyzovaný vzorek obsahoval alikvot jednoho oocytu.

Data získaná pomocí programu NIS Elements byla analyzována za použití jednofaktorové analýzy rozptylu ANOVA s použitím verze 9.0 programu Statistica. Rozdíly mezi experimentálními skupinami oocytů byly stanoveny pomocí Tukey HSD testu. Hodnoty p menší než 0,05 byly považovány za statisticky významné.

V případě kultivace oocytů s inhibitory bylo do každé pokusné skupiny zařazeno 40 oocytů. Všechny experimenty byly provedeny třikrát. Korelace mezi koncentrací pyrethroidů a vlivem na meiotické zrání oocytů byla hodnocena pomocí Spearmanova korelačního koeficientu. Koncentrace pyrethroidů potřebná k inhibici zrání u 50 % oocytů s plnou meiotickou kompetencí a koncentrace pyrethroidů potřebné k indukci zrání 50 % oocytů s částečně vyvinutou meiotickou kompetencí byly vypočteny pomocí nelineární regresní analýzy. Procenta meiotické fáze pro každou koncentraci byly porovnány pomocí χ^2 testu. Hodnoty $p < 0,05$ byly považovány za statisticky významné.

Pro vyhodnocení výsledků změn aktivity MPF a MAPK byl použit obecný lineární model v programu SAS 9.1 (Institut Inc., USA). Statistická významnost rozdílů mezi jednotlivými skupinami byla ověřována pomocí t-testu, $p < 0,05$. Každý experiment byl opakován minimálně třikrát.

Experimentální schéma

Experiment 1: Ověření meiotické kompetence prasečích oocytů v daných laboratorních podmínkách

Cílem tohoto experimentu bylo ověřit meiotickou kompetenci prasečích oocytů v našich kultivačních podmínkách. Získané oocyty byly rozděleny podle velikosti vnitřního průměru, tj. bez vrstvy *zona pellucida*, do tří skupin (80 – 89 μm , 90 – 99 μm a 100 – 110 μm), čtvrtou skupinu tvořily oocyty s ukončenou růstovou fází (120 μm). Po 48 hodinové kultivaci v čistém modifikovaném médiu M199 byly oocyty zbaveny přilehlých somatických buněk, fixovány a bylo hodnoceno stádium meiotického zrání.

Experiment 2: Exprese mRNA pro jednotlivé izofomy kalcineurinu v oocytech prasete v závislosti na stupni meiotické kompetence

Cílem experimentu bylo prokázat expresi mRNA pro izofomy α , β a γ podjednotky kalcineurinu A a izofomy B1 a B2 podjednotky kalcineurinu B v prasečích oocytech a jejich kumulárních buňkách v průběhu růstové fáze pomocí RT-PCR. Rostoucí oocyty, získané z ovárií, byly opět roztrženy dle velikosti vnitřního průměru do tří skupin (80 – 89 μm , 90 – 99 μm a 100 – 110 μm). Další skupinu tvořily oocyty s ukončeným růstem a dosaženou plnou meiotickou kompetencí o vnitřním průměru 120 μm . Z každé skupiny oocytů a jejich kumulárních buněk byla izolována mRNA. Každý vzorek obsahoval 50 oocytů. Kumulární buňky byly analyzovány odděleně. Jako referenční gen byl zvolen gen *GAPDH* (Kuijk *et al.*, 2007). Výsledky byly hodnoceny metodou relativní kvantifikace a vztaženy k hodnotám oocytů s ukončeným růstem a dosaženou plnou meiotickou kompetencí a referenčního genu.

Experiment 3: Detekce podjednotek A a B proteinu kalcineurinu v plně meioticky kompetentních prasečích oocytech

Cílem experimentu bylo detekovat podjednotky kalcineurinu A a B a zároveň prokázat specifitu zvolených protilátek. Analyzovány byly vzorky plně meioticky kompetentních prasečích oocytů a jejich kumulárních buněk ve stádiích zárodečného vajíčka a první i druhé meiotické metafáze. Proteiny byly elektroforeticky separovány v polyakrylamidovém gelu s přídavkem dodecylsulfátu sodného. Po rozdělení proteinů v gelu podle molekulové

hmotnosti byly proteiny přetištěny na nitrocelulózovou membránu. Membrána byla následně inkubována s primární (anti-kalcineurin A a B) a sekundární protilátkou (anti-myší IgG) a proteiny byly vizualizovány pomocí metody ECL Advance Western Blotting Detection Kit. Každý vzorek obsahoval 100 oocytů.

Experiment 4: Intracelulární lokalizace podjednotek kalcineurinu A a B v prasečích oocytech v závislosti na stupni meiotické kompetence během růstové fáze.

Cílem experimentu bylo zjistit subcelulární lokalizaci a popsat změny v subcelulární lokalizaci obou podjednotek kalcineurinu během růstové fáze prasečích oocytů. Oocyty byly roztrženy podle velikosti do čtyř výše uvedených kategorií. Lokalizace kalcineurinu A a B byla zjišťována prostřednictvím nepřímé imunofluorescenční metody s využitím konfokální mikroskopie. V jednotlivých kategoriích bylo analyzováno nejméně 15 oocytů.

Experiment 5: Vliv inhibice kalcineurinu na *in vitro* zrání prasečích oocytů s rozdílným stupněm meiotické kompetence

V tomto experimentu byl zjišťován účinek inhibitorů kalcineurinu na růstovou fázi a získání meiotické kompetence prasečích oocytů. Rostoucí oocyty bez meiotické kompetence (o vnitřním průměru menším než 100 μm), s částečnou meiotickou kompetencí (vnitřní průměr 100 – 110 μm) a oocyty s ukončeným růstem (120 μm) byly kultivovány 48 hodin v modifikovaném médiu M199 s přidáním pyrethroidových a nepyrethroidových inhibitorů kalcineurinu. Inhibitory ze skupiny pyrethroidů deltamethrin, cypermethrin a fenvalerát byly použity v koncentracích 0, 10, 25, 50 nebo 100 μM . U nepyrethroidových inhibitorů cyklosporinu A a hymenistatinu I se jednalo o koncentrace 0, 0,1, 1, 4 a 8 μM . Pro každé ošetření bylo použito 120 oocytů.

Experiment 6: Vliv inhibice kalcineurinu na aktivitu vybraných kináz během meiotického zrání oocytů s částečnou meiotickou kompetencí

Cílem tohoto experimentu bylo zjistit vliv inhibice kalcineurinu na hladiny MPF a MAPK na částečně meioticky kompetentní oocyty v průběhu 48 hodinové kultivace. Rostoucí oocyty s částečnou meiotickou kompetencí (vnitřní průměr 100 – 110 μm) byly kultivovány 48 hod v modifikovaném médiu M199 s přidáním specifického inhibitoru

kalcineurinu, cyklosporinu A v účinné koncentraci 8 μ M. Vzorke pro vyhodnocení byly odebrány na počátku kultivace, po 24 hodinové kultivaci a po 48 hodinové kultivaci. Aktivita MPF a MAPK byla zjišťována dle metody publikované týmem Kubelky (2000). Každý vzorek obsahoval 10 oocytů.

5. Výsledky

Ověření meiotické kompetence prasečích oocytů v daných laboratorních podmínkách

Cílem experimentu bylo ověřit meiotickou kompetenci oocytů v našich laboratorních podmínkách.

V našich kultivačních podmínkách jsou skupiny oocytů s vnitřním průměrem 80-89 a 90-99 μm zcela meioticky nekompetentní. Po 48 hodinové kultivaci v čistém médiu byla většina těchto oocytů zastavena ve stádiu GV a oocyty nebyly schopny prolomit první meiotický blok a znovuzahájit meiotické zrání. Skupina oocytů s vnitřním průměrem 100-110 μm zahrnovala oocyty s částečně vyvinutou meiotickou kompetencí. Většina těchto oocytů během 48 hodin znovu zahájila meiózu, jejich jádro prošlo rozpadem zárodečného váčku a dosáhla stádia první meiotické metafáze. V tomto stádiu bylo meiotické zrání zastaveno a oocyty nebyly schopny dosáhnout druhé meiotické metafáze. Oocyty s průměrem 120 μm jsou v našich podmínkách zcela meioticky kompetentní, po 48 hodinách v *in vitro* kultivaci dospěly do stádia druhé meiotické metafáze. Výsledky shrnuje tabulka 6.

V experimentu bylo potvrzeno, že oocyty získávají schopnost projít meiotickým zráním během růstové periody kontinuálně v závislosti na velikosti svého vnitřního průměru.

Tabulka 6. Ověření meiotické kompetence prasečích oocytů s různou velikostí vnitřního průměru po 48 hodinách kultivace *in vitro*

Stádium meiotického zrání	% oocytů v daném stádiu meiotického zrání			
	80 – 89 μm	90 – 99 μm	100 – 110 μm	120 μm
GV	97.8 \pm 2.2 ^A	88.5 \pm 6.0 ^A	12.8 \pm 5.4 ^B	6.2 \pm 6.1 ^B
MI	1.5 \pm 1.0 ^A	9.9 \pm 4.7 ^A	87.2 \pm 5.4 ^B	6.9 \pm 4.8 ^A
MII	0.7 \pm 0.7 ^A	1.6 \pm 1.2 ^A	0.0 \pm 0.0 ^A	86.9 \pm 5.7 ^B

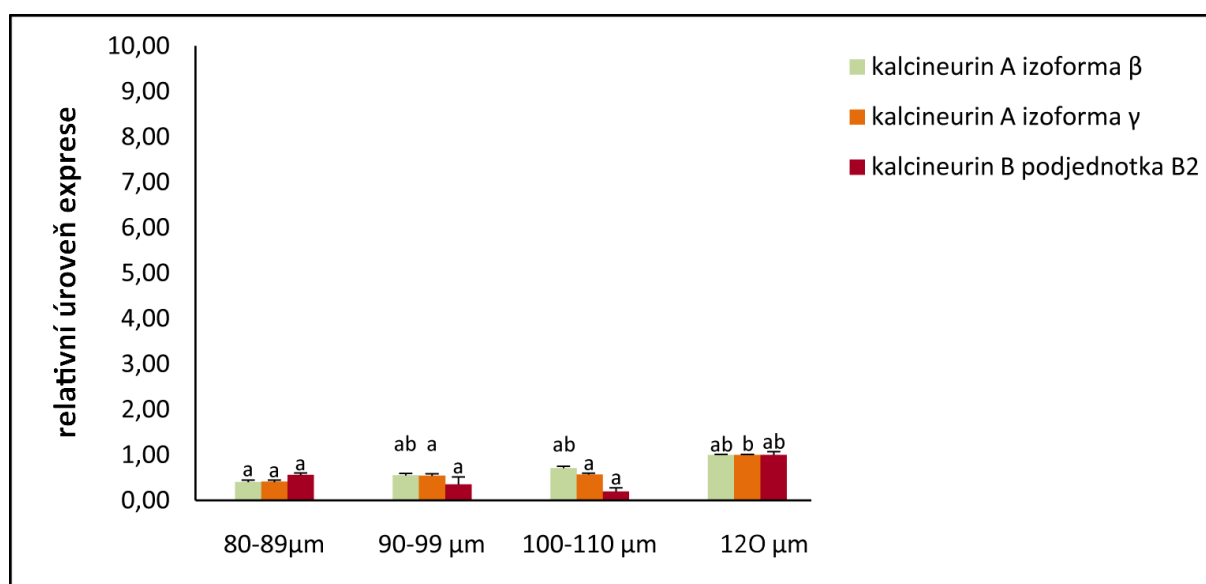
Statisticky významné rozdíly ($P < 0,05$) v procentech oocytů v daném stádiu (mezi sloupci) jsou označeny odlišnými superskripty (^{A,B}) GV – stádium zárodečného váčku, MI- stádium metafáze I, MII – stádium metafáze II,

Expresse mRNA pro jednotlivé izoformy kalcineurinu v oocytech prasete v závislosti na stupni meiotické kompetence

Cílem experimentu bylo prokázat přítomnost mRNA pro izoformy α β a γ podjednotky kalcineurinu A a izoformy B1 a B2 podjednotky kalcineurinu B v prasečích oocytech a jejich kumulárních buňkách v průběhu růstové fáze.

Přítomnost mRNA byla prokázána pro obě podjednotky kalcineurinu. mRNA pro podjednotku A byla nalezena v oocytech ve dvou izoformách β a γ . V kumulárních buňkách byla zjištěna přítomnost mRNA pro izoformy β a γ podjednotky A. Expresse mRNA pro izofomu B1 v oocytech nalezena nebyla. mRNA pro izoformu B2 podjednotky B byla detekována jak v oocytech, tak v přilehlých kumulárních buňkách. Výsledky relativní úrovně exprese mRNA jsou uvedeny v grafu 1 a 2.

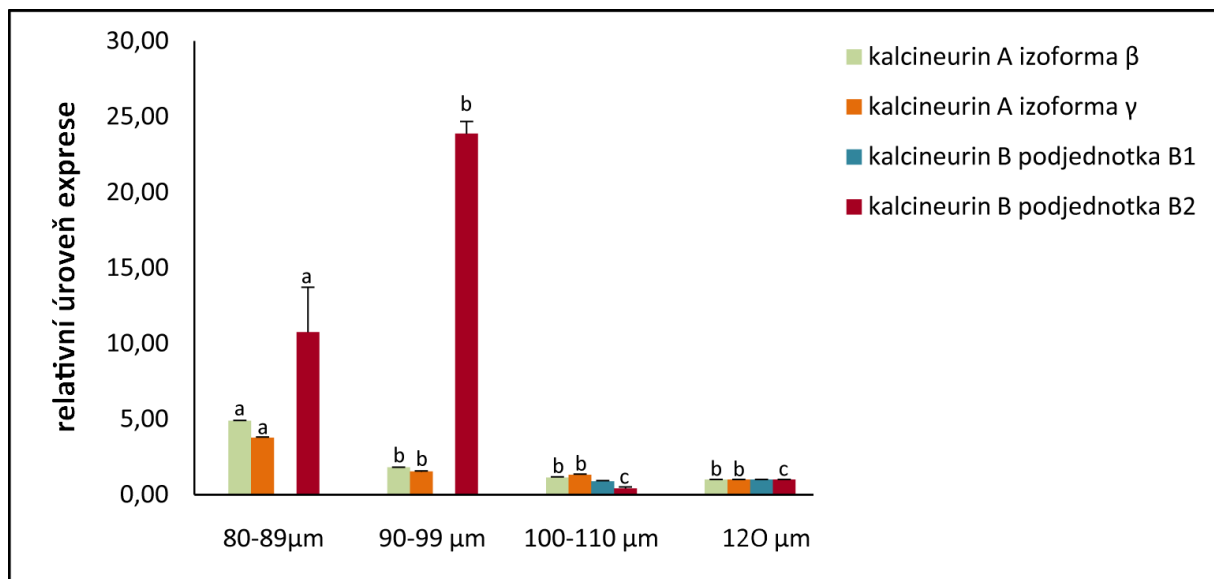
Graf 1: Relativní úroveň exprese mRNA izoform kalcineurinu v prasečích oocytech s různým stupněm meiotické kompetence



^{a,b,c} odlišné superskripty značí statisticky průkazné rozdíly v relativní úrovni exprese mRNA mezi rostoucími oocyty příslušného velikostního stadia a oocyty ve stádiu GV ($P < 0,05$).

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

Graf 2: Relativní úroveň exprese mRNA izoform kalceinurinu v granulózních a kumulárních buňkách oocytů s různým stupněm meiotické kompetence.



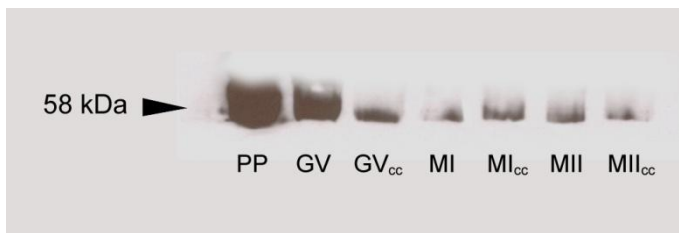
^{a,b,c} odlišné superskripty značí statisticky průkazné rozdíly v relativní úrovni exprese mRNA mezi somatickými buňkami přilehlými k rostoucím oocytům příslušného velikostního stadia a somatickými buňkami přilehlými oocytům ve stádiu GV ($P < 0,05$).

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

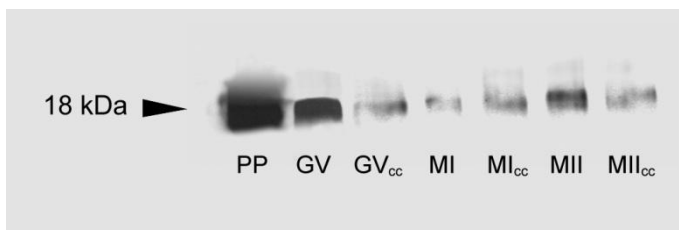
Detekce podjednotek A a B proteinu kalceinurinu v plně meioticky kompetentních prasečích oocytech

Cílem experimentu bylo prokázat přítomnost podjednotek kalceinurinu A a B a zároveň ověřit specifitu použitých protilátek. Pomocí metody Western blot byla prokázána exprese podjednotky A kalceinurinu v oocytech ve stádiu GV, v oocytech kultivovaných 24 hodin do stadia první meiotické metafáze, v oocytech kultivovaných 48 hodin do stadia druhé meiotické metafáze i v kumulárních buňkách získaných z oocytů ve jmenovaných stádiích meiotického zrání. Stejným způsobem byla prokázána přítomnost podjednotky B kalceinurinu. Výsledky znázorňuje obrázek 2 a 3.

Obrázek 2: Detekce podjednotky A kalcineurinu pomocí metody Western blot v plně meioticky kompetentních oocytech



Obrázek 3: Detekce podjednotky B kalcineurinu pomocí metody Western blot v plně meioticky kompetentních oocytech



PP – čistý protein kalcineurin z hovězího mozku 5 ng, GV – oocyty kultivované 0 hodin. MI – oocyty kultivované 24 hodin. MII – oocyty kultivované 48 hodin. Ke každé skupině byla provedena kontrola meiotického zrání (tabulka 1). Kumulární buňky GV_{cc} – kumulární buňky odstraněné z 50-ti oocytů ve stádiu GV. Kumulární buňky MI_{cc} – kumulární buňky odstraněné z 50-ti oocytů ve stádiu MI. Kumulární buňky MII_{cc} – kumulární buňky získané z 50-ti oocytů ve stádiu MII.

Intracelulární lokalizace podjednotek kalcineurinu A a B v prasečích oocytech v závislosti na stupni meiotické kompetence během růstové fáze

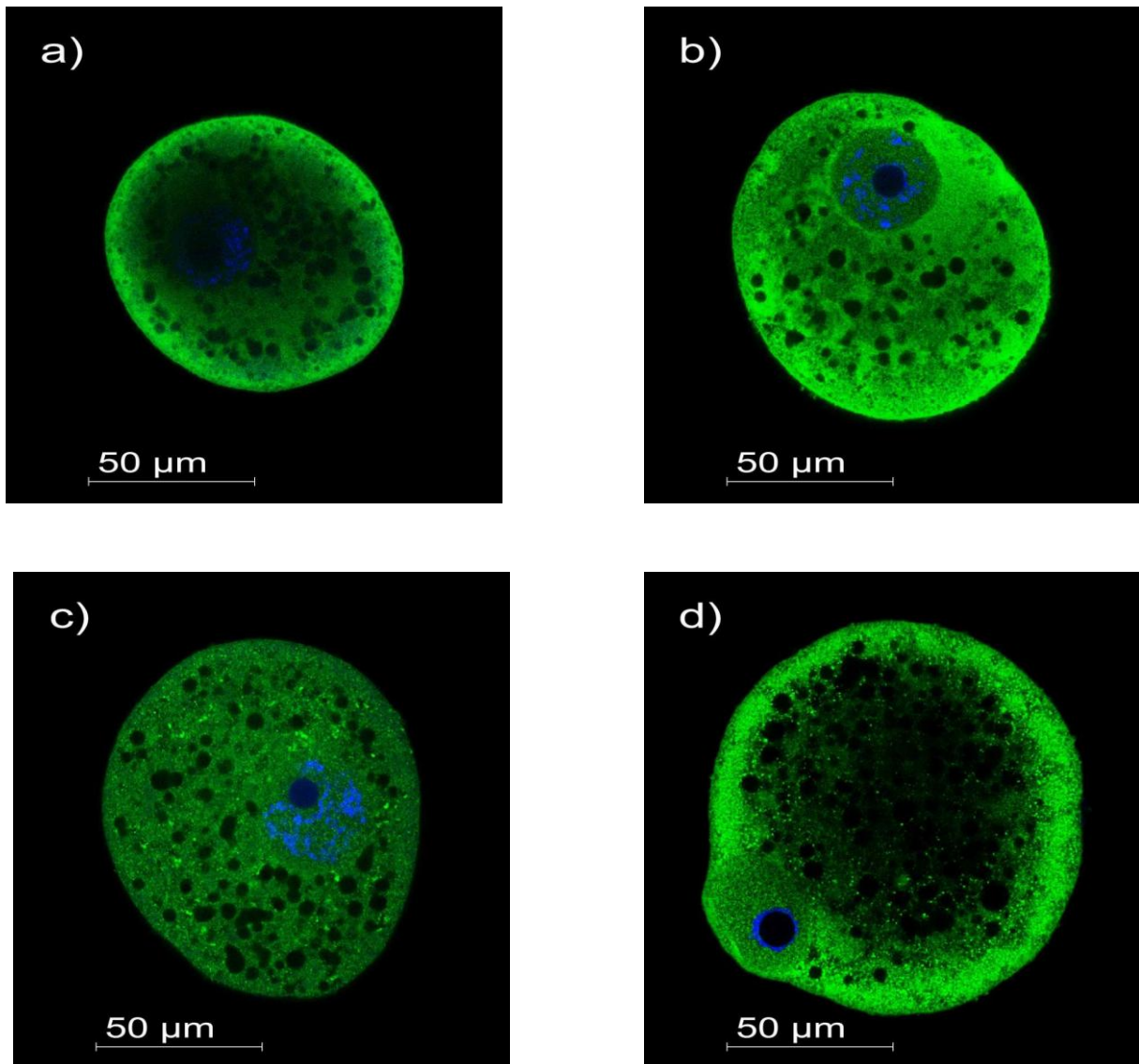
Sledována byla intracelulární lokalizace obou podjednotek kalcineurinu v oocytech ve fázi růstu s rozdílným stupněm meiotické kompetence.

Obě podjednotky kalcineurinu byly lokalizovány ve všech částech oocytu ve všech sledovaných fázích růstu. Během růstové fáze oocytu došlo k redistribuci obou podjednotek kalcineurinu, nejvyšší intenzita fluorescence obou podjednotek byla detekována v korové oblasti ve všech sledovaných oocytech s rozdílným stupněm meiotické kompetence. V průběhu růstu oocytů se distribuce obou podjednotek kalcineurinu měnila z původně homogenní u oocytů meioticky nekompetentních, na rozptýlenou s viditelnými klastry obou podjednotek kalcineurinu, které byly nejvíce patrné u plně meioticky kompetentních oocytů, jak je znázorněno na obrázcích 4 a 5. Hodnoty relativních intenzit fluorescence pro podjednotku A byly ve všech sledovaných kategoriích oocytů vyšší, než pro podjednotku B.

Podjednotka A kalcineurinu byla detekována ve všech analyzovaných velikostních kategoriích oocytů (obr. 4). Nejvyšší relativní intenzita fluorescence podjednotky A kalcineurinu byla zaznamenána v korové oblasti oocytů, nejnižší relativní intenzita fluorescence byla pozorována v oblasti jádra, v oblasti jadérka pak nebyl detekován žádný fluorescenční signál. Hodnoty relativní fluorescence kalcineurinu A v různých oblastech oocytů s rozdílným stupněm meiotické kompetence jsou znázorněny v tabulce 7. Statisticky významný rozdíl v intenzitě fluorescence byl zaznamenán u všech sledovaných kategorií oocytů mezi korovou oblastí a jádrem oocytů.

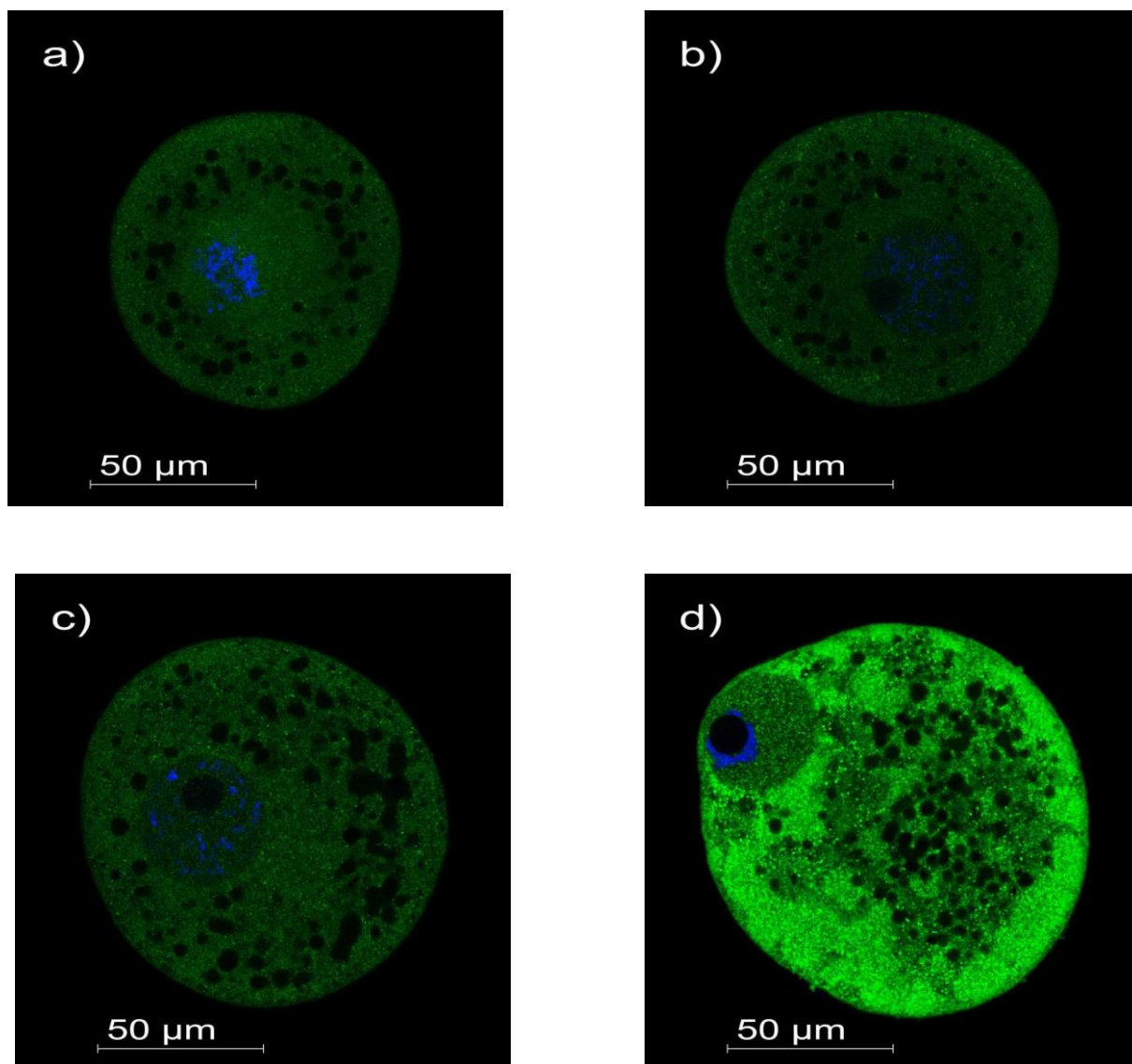
Podjednotka kalcineurinu B byla detekována rovněž ve všech analyzovaných velikostních kategoriích oocytů (obr. 5). Nejvyšší relativní intenzita fluorescence kalcineurinu B byla zaznamenána v korové oblasti oocytů, nejnižší relativní intenzita v oblasti jádra, v oblasti jadérka nebyl pozorován žádný fluorescenční signál, avšak rozdíl intenzit mezi korovou oblastí a jádrem nebyl statisticky významný. Hodnoty relativní fluorescence kalcineurinu B v různých oblastech oocytů s rozdílným stupněm meiotické kompetence jsou znázorněny v tabulce 8.

Obrázek 4: Intracelulární lokalizace podjednotky A kalcineurinu v prasečích oocytech s rozdílným stupněm meioitické kompetence



Podjednotka A kalcineurinu byla lokalizována pomocí nepřímé imunofluorescence v oocytech o velikosti vnitřního průměru: (a), 80-89 μm, (b) 90-99 μm, (c) 100-110 μm a (d) 120 μm. Zeleně je značen protein pomocí FITC, modře chromatin pomocí Hoechst 33528. Oocyty byly snímány v rovině jádra či perichromozomální oblasti. Zvětšení 400x.

Obrázek 5: Intracelulární lokalizace podjednotky B kalcineurinu v prasečích oocytech s rozdílným stupněm meiotické kompetence



Podjednotka B kalcineurinu byla lokalizována pomocí nepřímé imunofluorescence v oocytech o velikosti vnitřního průměru: (a), 80-89 μm , (b) 90-99 μm , (c) 100-110 μm a (d) 120 μm . Zeleně je značen protein pomocí FITC, modře chromatin pomocí Hoechst 33528. Oocyty byly snímány v rovině jádra či perichromozomální oblasti. Zvětšení 400x.

Tabulka 7: Relativní intenzita fluorescence podjednotky A kalcineurinu v prasečích oocytech o rozdílné velikosti vnitřního průměru

Velikost vnitřního průměru oocytů	N	jádro	korová oblast	cytoplasma
80 - 89 μm	14	0.20 ± 0.04 ^{aA}	0.50 ± 0.06 ^{abB}	0.30 ± 0.03 ^{aC}
90 - 99 μm	20	0.23 ± 0.06 ^{aA}	0.46 ± 0.07 ^{abB}	0.31 ± 0.02 ^{aC}
100 - 110 μm	27	0.27 ± 0.07 ^{aA}	0.42 ± 0.08 ^{abB}	0.32 ± 0.02 ^{aC}
120 μm (GV 0)	16	0.26 ± 0.06 ^{aA}	0.43 ± 0.07 ^{abB}	0.31 ± 0.03 ^{aC}

Výsledky jsou uvedeny jako průměr \pm směrodatná odchylka. ^{a,b,c}hodnoty ve sloupci s různými superskripty jsou rozdílné ($P < 0.05$). ^{A,B,C}hodnoty v řádku s různými superskripty jsou rozdílné ($P < 0.05$). Podjednotka A kalcineurinu byla detekována pomocí nepřímé imunofluorescence. Oocyty byly nasnímány na konfokálním mikroskopu a snímky podrobeny analýze obrazu.

Tabulka 8: Relativní intenzita fluorescence podjednotky B kalcineurinu v prasečích oocytech o rozdílné velikosti vnitřního průměru

Velikost vnitřního průměru oocytů	N	jádro	korová oblast	cytoplasma
80 - 89 μm	18	0.27 ± 0.04 ^{aA}	0.44 ± 0.06 ^{abB}	0.29 ± 0.02 ^{aA}
90 - 99 μm	12	0.26 ± 0.04 ^{aA}	0.45 ± 0.05 ^{abB}	0.29 ± 0.02 ^{aA}
100 - 110 μm	15	0.29 ± 0.04 ^{aA}	0.40 ± 0.06 ^{abB}	0.31 ± 0.03 ^{aA}
120 μm (GV 0)	19	0.27 ± 0.05 ^{aA}	0.42 ± 0.08 ^{abB}	0.32 ± 0.03 ^{aAB}

Výsledky jsou uvedeny jako průměr \pm směrodatná odchylka. ^{a,b,c}hodnoty ve sloupci s různými superskripty jsou rozdílné ($P < 0.05$). ^{A,B,C}hodnoty v řádku s různými superskripty jsou rozdílné ($P < 0.05$). Podjednotka A kalcineurinu byla detekována pomocí nepřímé imunofluorescence. Oocyty byly nasnímány na konfokálním mikroskopu a snímky podrobeny analýze obrazu.

Vliv inhibice kalcineurinu na *in vitro* zrání prasečích oocytů s rozdílným stupněm meiotické kompetence

Testován byl vliv inhibitorů kalcineurinu cyklosporinu A, deltamethrinu, cypermethrinu, fenvalerátu a hymenistatinu I na zrání oocytů ve fázi růstu s rozdílným stupněm meiotické kompetence a na zrání oocytů plně meioticky kompetentních.

Účinky inhibitorů kalcineurinu na rostoucí oocyty s částečně vyvinutou meiotickou kompetencí

Pod vlivem inhibitorů stoupal podíl oocytů schopných dozrát do stádia metafáze II a klesal podíl oocytů, které nebyly schopny zahájit meiotické zrání a projít rozpadem zárodečného váčku, jak shrnují tabulky 9-13.

Tabulka 9: Vliv cyklosporinu A na zrání částečně meioticky kompetentních rostoucích oocytů

Stádium jaderného zrání	Koncentrace cyklosporinu A (μM)			
	0	1	4	8
GV (%)	15 ^a	16 ^a	7 ^{ab}	0 ^b
MI – TI (%)	67 ^a	64 ^a	51 ^b	33 ^c
MII (%)	18 ^a	20 ^a	42 ^b	67 ^c

^{a,b,c,d} odlišné superskripty značí statisticky průkazné rozdíly ve sloupcích v rámci jednotlivých koncentrací ($P < 0,05$).

Tabulka 10: Vliv cypermethrinu na zrání částečně meioticky kompetentních rostoucích oocytů

Stádium jaderného zrání	Koncentrace cypermethrinu (μM)			
	0	10	25	50
GV (%)	17 ^a	17 ^a	16 ^a	0 ^a
MI – TI (%)	63 ^a	66 ^a	38 ^b	32 ^b
MII (%)	20 ^a	17 ^a	46 ^b	68 ^c

^{a,b,c,d} odlišné superskripty značí statisticky průkazné rozdíly ve sloupcích v rámci jednotlivých koncentrací ($P < 0,05$).

Tabulka 11: Vliv deltamethrinu na zrání částečně meioticky kompetentních rostoucích oocytů

Stádium jaderného zrání	Koncentrace deltamethrinu (μM)			
	0	25	50	100
GV (%)	14 ^{ab}	20 ^a	6 ^{bc}	0 ^c
MI – TI (%)	68 ^a	62 ^a	47 ^b	42 ^b
MII (%)	18 ^a	18 ^a	47 ^b	58 ^b

^{a,b,c,d} odlišné superskripty značí statisticky průkazné rozdíly ve sloupcích v rámci jednotlivých koncentrací ($P < 0,05$).

Tabulka 12: Vliv fenvalerátu na zrání částečně meioticky kompetentních rostoucích oocytů

Stádium jaderného zrání	Koncentrace fenvalerátu (μM)				
	0	10	25	50	100
GV (%)	18 ^a	14 ^a	13 ^a	7 ^{ab}	0 ^b
MI – TI (%)	65 ^a	66 ^a	49 ^b	42 ^{bc}	37 ^c
MII (%)	17 ^a	20 ^a	38 ^b	51 ^c	63 ^d

^{a,b,c,d} odlišné superskripty značí statisticky průkazné rozdíly ve sloupcích v rámci jednotlivých koncentrací ($P < 0,05$).

Tabulka 13: Vliv hymenistatinu I na zrání částečně meioticky kompetentních rostoucích oocytů

Stádium jaderného zrání	Koncentrace hymenistatinu I (μM)			
	0	2	4	8
GV (%)	18 ^a	8 ^{ab}	0 ^{ab}	0 ^b
MI – TI (%)	65 ^a	63 ^a	68 ^a	44 ^b
MII (%)	17 ^a	29 ^{ab}	32 ^b	56 ^c

^{a,b,c,d} odlišné superskripty značí statisticky průkazné rozdíly ve sloupcích v rámci jednotlivých koncentrací ($P < 0,05$).

Účinky inhibitorů kalcineurinu na oocyty s plně vyvinutou meiotickou kompetencí

Schopnost plně meitoicky kompetentních oocytů s ukončeným růstem dozrát v podmínkách *in vitro* byla narušena testovanými inhibitory a to v závislosti na dávce inhibitoru, jak je uvedeno v tabulkách 14-18

Tabulka 14: Vliv cyklosporinu A na meiotické zrání plně kompetentních oocytů

Stádium jaderného zrání	Koncentrace cyklosporinu A (μM)				
	0	0,1	1	4	8
GV (%)	0 ^a	0 ^a	0 ^a	6 ^a	10 ^a
MI – TI (%)	0 ^a	21 ^b	36 ^c	49 ^{cd}	58 ^d
MII (%)	100 ^a	79 ^b	64 ^b	45 ^c	32 ^c

^{a,b,c,d} odlišné superskripty značí statisticky průkazné rozdíly ve sloupcích v rámci jednotlivých koncentrací ($P < 0,05$).

Tabulka 15: Vliv cypermethrinu na meiotické zrání plně kompetentních oocytů

Stádium jaderného zrání	Koncentrace cypermethrinu (μM)				
	0	5	10	25	50
GV (%)	0 ^a	0 ^a	0 ^a	13 ^a	40 ^b
MI – TI (%)	2 ^a	13 ^a	32 ^b	39 ^b	41 ^b
MII (%)	98 ^a	87 ^a	68 ^b	48 ^c	19 ^d

^{a,b,c,d} odlišné superskripty značí statisticky průkazné rozdíly ve sloupcích v rámci jednotlivých koncentrací ($P < 0,05$).

Tabulka 16: Vliv deltamethrinu na meiotické zrání plně kompetentních oocytů

Stádium jaderného zrání	Koncentrace deltamethrinu (μM)				
	0	10	25	50	100
GV (%)	0 ^a	0 ^a	0 ^a	0 ^a	6 ^b
MI – TI (%)	1 ^a	8 ^a	35 ^b	50 ^c	49 ^c
MII (%)	99 ^a	92 ^a	65 ^b	50 ^c	45 ^c

^{a,b,c,d} odlišné superskripty značí statisticky průkazné rozdíly ve sloupcích v rámci jednotlivých koncentrací ($P < 0,05$).

Tabulka 17: Vliv fenvalerátu na meiotické zrání plně kompetentních oocytů

Stádium jaderného zrání	Koncentrace fenvalerátu (μM)				
	0	10	25	50	100
GV (%)	0 ^a	0 ^a	0 ^a	7 ^a	18 ^b
MI – TI (%)	2 ^a	3 ^a	29 ^b	37 ^b	37 ^b
MII (%)	98 ^a	97 ^a	71 ^b	56 ^c	45 ^c

^{a,b,c,d} odlišné superskripty značí statisticky průkazné rozdíly ve sloupcích v rámci jednotlivých koncentrací ($P < 0,05$).

Tabulka 18: Vliv hymenistatinu I na meiotické zrání plně kompetentních oocytů

Stádium jaderného zrání	Koncentrace hymenistatinu I (μM)				
	0	0,5	2	4	8
GV (%)	0 ^a	0 ^a	0 ^a	0 ^a	7 ^a
MI – TI (%)	0 ^a	9 ^{ab}	20 ^b	35 ^c	38 ^c
MII (%)	100 ^a	91 ^{ab}	80 ^b	65 ^c	55 ^c

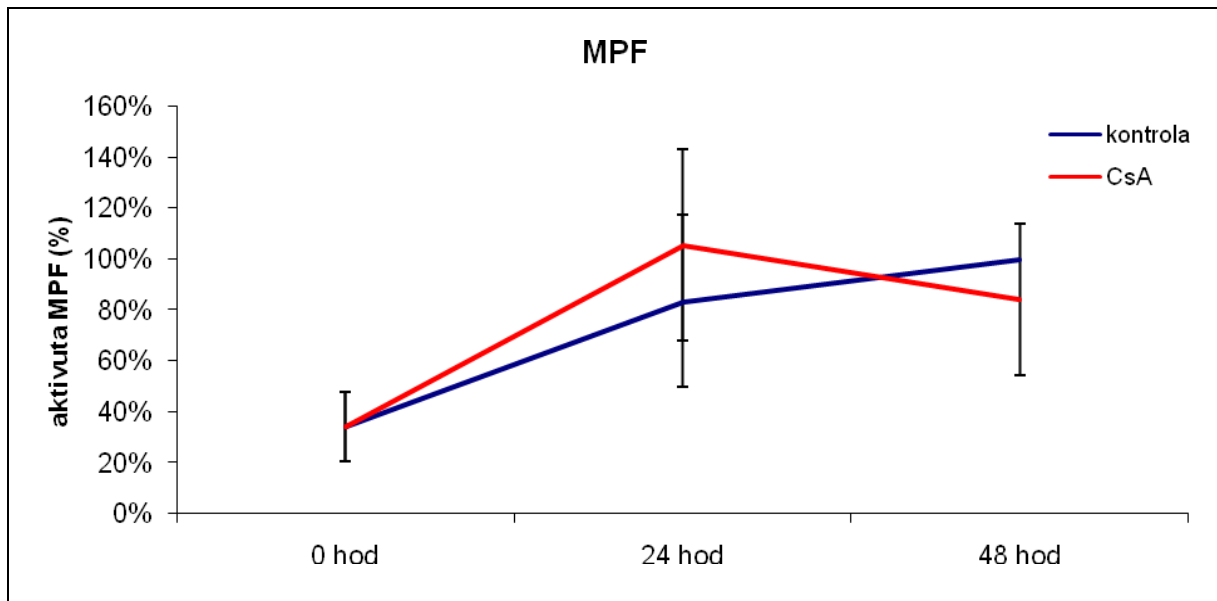
^{a,b,c,d} odlišné superskripty značí statisticky průkazné rozdíly ve sloupcích v rámci jednotlivých koncentrací ($P < 0,05$).

Vliv inhibice kalcineurinu na aktivitu vybraných kináz během meiotického zrání oocytů s částečnou meiotickou kompetencí

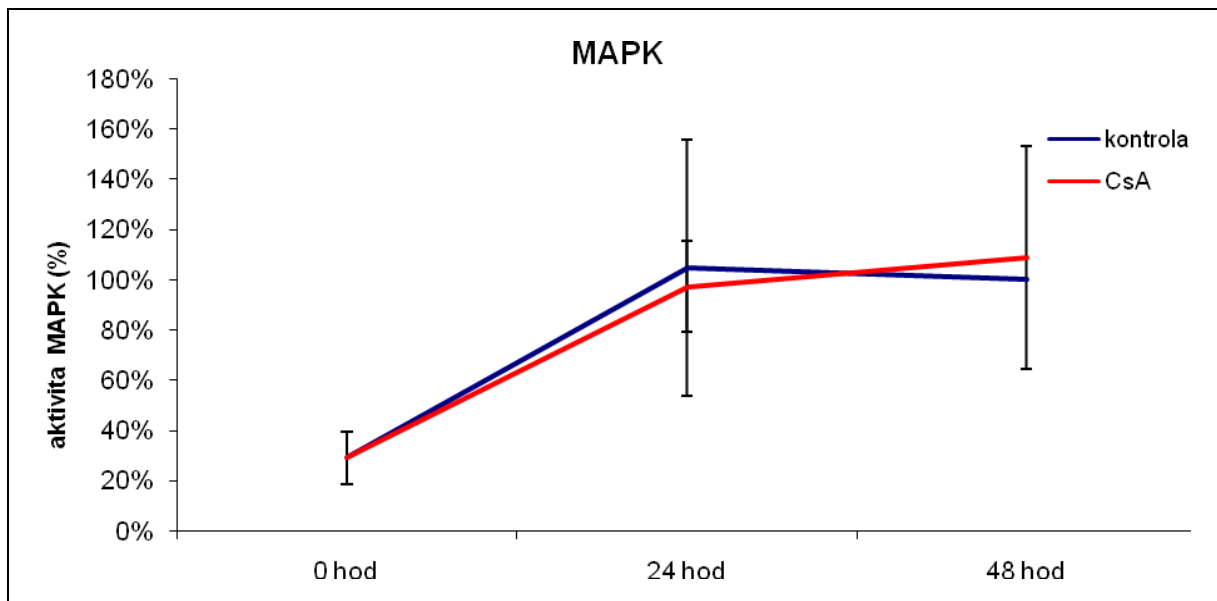
Cílem tohoto experimentu bylo zjistit vliv inhibice kalcineurinu na hladiny MPF a MAPK na částečně meioticky kompetentní oocytů v průběhu 48 hodinové kultivace.

U pokusné skupiny oocytů s částečnou meiotickou kompetencí se hladina aktivity MPF po 24 hodinové kultivaci snížila, tento pokles však nebyl vyhodnocen jako statisticky významný v porovnání s kontrolní skupinou oocytů kultivovaných v čistém médiu bez přídavku cyklosporinu A (Graf 3). V úrovni aktivity MAPK částečně meioticky kompetentních oocytů nebyl rovněž nalezen statisticky významný rozdíl v porovnání s kontrolní skupinou oocytů kultivovaných v čistém médiu bez přídavku cyklosporinu A (Graf 4).

Graf 3: Vliv inhibice kalcineurinu na aktivitu MPF v průběhu *in vitro* kultivace částečně meioticky kompetentních oocytů



Graf 4: Vliv inhibice kalcineurinu na aktivitu MAPK v průběhu *in vitro* kultivace částečně meioticky kompetentních oocytů



6. Diskuse

V naší práci byly analyzovány prasečí oocyty, které se ve srovnání s často studovaným oocytem myši či skotu svou fyziologií více podobají oocytům lidským a jsou proto využívány i jako model pro techniky lidské asistované reprodukce (Shi *et al.*, 2006; Braga *et al.*, 2007; Canovas *et al.*, 2007). V naší studii byl poprvé prokázán výskyt kalcineurinu v oocytech savců. Dále byla potvrzena významná úloha kalcineurinu v regulaci růstové fáze prasečího oocyty a během zisku meiotické kompetence. Analyzovány byly prasečí oocyty čtyř velikostních skupin: oocyty s vnitřním průměrem 80 – 89 μm , 90 – 99 μm , 100 – 110 μm a 120 μm .

U analyzovaných oocytů byla nejprve testována meiotická kompetence. Bylo prokázáno, že v našich laboratorních podmínkách jsou skupiny oocytů s vnitřním průměrem 80 – 89 μm a 90 – 99 μm zcela meioticky nekompetentní, skupina oocytů s vnitřním průměrem 100 – 110 μm zahrnuje oocyty s již částečně vyvinutou meiotickou kompetencí a oocyty s průměrem 120 μm jsou zcela meioticky kompetentní. Bylo potvrzeno, že oocyty nabývají meiotickou kompetenci kontinuálně během růstové fáze.

Mechanismy regulace růstu oocytů a zisku meiotické kompetence dosud nejsou zcela objasněny. Nepostradatelnou úlohu v řízení těchto procesů plní široké spektrum proteinů, mezi které se řadí enzymy, růstové faktory a jejich receptory (Sun *et al.*, 2009), současný výzkum je na jejich studium zaměřen. Aby bylo možné popsat roli těchto molekul v oogenezi, je nutné nejprve určit úroveň exprese jejich mRNA v oocytech (Shimada *et al.*, 2004), zjistit přítomnost mRNA jejich podjednotek (Linfor *et Berger*, 2000) a izoform (Fan *et al.*, 2002; Shimada *et al.*, 2004), podle kterých může vznikat funkční protein. Kalcineurin patří z tohoto hlediska k málo prozkoumaným proteinům, úroveň exprese mRNA pro kalcineurin nebyla v savčích oocytech zatím studována.

Nejvyšší exprese izoformy A α kalcineurinu byla dosud zaznamenána v mozku (Chang *et al.*, 1992.). Expese této izoformy byla zjištěna i řadě dalších tkání různých druhů organismů (Awumey *et al.*, 1999). Izoforma kalcineurinu A- β byla detekována v mozku a podobně jako izoforma A- α i v mnoha jiných tkáních, například osteoklastech, srdeční svalovině a ledvinách (Awumey *et al.*, 1999; Heineke *et Molkenin*, 2006; Moz *et al.* 2004). mRNA pro kalcineurin A- γ je přítomna v mozku, ale její výskyt byl také potvrzen v dalších tkáních, například krvi (Murata *et al.*, 2008). Izoforma B1 kalcineurinu B je přítomna v

mnoha typech buněk a váže se na α a β izoformy kalcineurinu A. Naproti tomu izoforma B2 kalcineurinu B byla detekována pouze ve varlatech, kde bylo zároveň prokázáno, že se váže na izoformu γ kalcineurinu A (Ueki *et al.*, 1992).

V naší studii byla pomocí relativní kvantifikace metody RT-PCR prokázána přítomnost transkriptu genů pro kalcineurin u oocytů s rozdílným stupněm meiotické kompetence a jejich přilehlých kumulárních buněk. Detekována byla exprese mRNA katalytické i regulační podjednotky kalcineurinu. mRNA pro podjednotku A byla nalezena ve dvou izoformách, izoformě $A\beta$ a $A\gamma$, jak v oocytech, tak v buňkách oocyty obklopujících. V oocytech ani v kumulárních buňkách nebyla nalezena mRNA pro izoformu α A podjednotky kalcineurinu.

mRNA podjednotky B kalcineurinu byla detekována pro obě známé izoformy, B1 i B2 v granulózních buňkách rostoucích oocytů. V oocytech byla prokázána pouze přítomnost mRNA pro podjednotku B2, přítomnost izoformy B1 v oocytech zjištěna nebyla.

Je možné, že oocyt pro řízení své růstové fáze a meiotické kompetence vyžaduje pouze izoformy β a γ , nikoliv izoformu α a není pro něj rovněž nezbytná izoforma B1. Další možností je, že mRNA pro podjednotku A v izoformě α byla v časných fázích růstu oocyty degradována a proto ji nebylo možné detekovat.

Ve tkáni varlat vytváří kompletní dimer kalcineurinu vazba izoformy B2 s izoformou $A\gamma$ (Ueki *et al.*, 1992). V naší práci bylo prokázáno, že obě tyto izoformy mRNA, označované dosud jako specifické pro varletní tkáň, jsou přítomny také v oocytech prasete a jejich kumulárních buňkách. Tyto výsledky naznačují, že přítomnost dimeru složeného z izoformy B2 a izoformy $A\gamma$ není specifická pouze pro samčí varletní tkáň, ale vyskytuje se i v samičích pohlavních buňkách, oocytech. Výsledky kvantifikace mRNA pro tyto izoformy naznačují, že takto složený dimer kalcineurinu může hrát významnou roli během oogeneze.

Vysoká exprese mRNA podjednotky B2 v buňkách obklopujících oocyty s průměrem 80 - 90 a 90 - 100 μm naznačuje možný význam kalcineurinu pro ranější fáze folikulogeneze, kdy se somatický kompartment folikulu vyznačuje intenzivním buněčným dělením (van den Hurk *et Zhao*, 2005) a oocyt nabývá meiotickou kompetenci. Možná je i souvislost s přípravou komplexu oocyt-kumulus k procesům meiotického zrání, pro které je u kumulárních buněk typická schopnost syntézy velkého množství extracelulární matrix - kyseliny hyaluronové, během kumulární expanze (Eppig, 2001). Jelikož kalcineurin sehrává významnou úlohu jak při regulaci transkripce v somatických buňkách (Crabtree, 2001), tak

při řízení mitotického buněčného cyklu (Dougherty *et al.*, 2009), je pravděpodobné, že může být do procesu folikulogeneze významně zapojen. Vysoké množství traskriptů v kumulárních buňkách také naznačuje možné zapojení kalcineurinu do procesu nabývání meiotické kompetence oocyty a přípravou na fázi zrání, ve které je oocyt již transkripčně neaktivní (Matzuk *et Lamb*, 2002). Na konci růstové fáze však množství mRNA pro podjednotku B2 v somatických buňkách obklopujících oocyt výrazně klesá. Tento jev může vysvětlovat vysoká úroveň translace a nutná přítomnost proteinu pro udržení či výstup z prvního meiotického bloku. Kontakt mezi oocytem a okolními buňkami je zajišťován mezibuněčnými spoji gap junctions. Přes tyto spoje mohou procházet malé signální molekuly (Wigglesworth *et al.*, 2013). Současná studie bovinních oocytů však prokázala, že aktivním trasportem pomocí gap junction se do oocyty dostávají i molekuly výrazně hmotnějších proteinů a dlouhé mRNA i nekódující RNA. Přenos genových transkriptů pomocí gap junction rozšiřuje maternální zásoby mRNA v oocyty nebo dochází k translaci a protein je využit ještě v průběhu meiotického cyklu (Macaulay *et al.*, 2014). Je možné, že námi detekovaná vysoká úroveň exprese izoformy B2 kalcineurinu v kumulárních buňkách oocytů meioticky nekompetentních a výrazný pokles exprese této izoformy v dalším stádiu růstu úzce souvisí s nabýváním meiotické kompetence oocyty v následujícím průběhu oogeneze. V souladu s touto domněnkou je i detekované zvýšení exprese mRNA pro podjednotku B2 v oocytech s ukončenou růstovou fází.

Vzhledem k tomu, že některé mRNA syntetizované během růstové fáze oocyty jsou využity až po reaktivaci embryonálního genomu (Tadros *et Lipshitz*, 2009), je možné, že detekovaná mRNA pro jednotlivé izoformy kalcineurinu je nutná nejen pro správný průběh růstové fáze oocytů, ale i v následujících krocích oogeneze a následně pro embryonální vývoj. Nepostradatelná role kalcineurinu při regulaci transkripce v průběhu embryogeneze již byla potvrzena řadou studií (Guo *et al.*, 2002; Graef *et al.*, 2003; Cho *et al.*, 2014). Vysoká konzervovanost sekvencí mRNA pro kalcineurin je také předpokladem analogické funkce a zapojení kalcineurinu nejen do průběhu oogeneze u prasete, ale i u dalších druhů savců.

Řada klíčových procesů souvisejících se získáním meiotické kompetence se však odehrává v rostoucím oocyty na translační a posttranslační úrovni (de Vantéry *et al.*, 1997), proto bylo v naší studii dále zjišťováno, zda podle mRNA pro kalcineurin, jejíž přítomnost jsme v prasečích oocytech prokázali, vzniká i vlastní funkční protein. Doposud byl výskyt proteinu kalcineurinu v oocytech popsán pouze u mouchy rodu *Drosophila* (Takeo *et al.*, 2006; Takeo *et al.*, 2010; Takeo *et al.*, 2012), žáby drápatky *Xenopus laevis* (Nishiyama *et al.*,

2007; Mochida *et al.*, 2007) a vajíčcích sumky (Levasseur *et al.*, 2013). Naše práce jako první potvrdila výskyt proteinu kalcineurinu v samičích pohlavních buňkách savců. Podařilo se prokázat přítomnost obou podjednotek kalcineurinu, kalcineurin A i B byl v oocyty prasete přítomen v průběhu i na konci růstové fáze a během meiotického zrání. Je tedy vysoce pravděpodobné, že kalcineurin hraje důležitou roli právě v regulaci meiotického cyklu u oocytů savců podobně jako v meióze bezobratlých (Takeo *et al.*, 2006; Takeo *et al.*, 2010), nebo nižších obratlovců (Nishima *et al.*, 2007; Mochida *et al.*, 2007).

V průběhu růstové fáze oocytů dochází ke změnám v lokalizaci a funkci klíčových proteinů (Fair, 2003). Zisk meiotické kompetence oocytů souvisí se změnami lokalizace významných proteinů a s jejich translokací do specifických oblastí oocytu (Mitra *et al.*, 1996). Všechny tyto procesy jsou regulovány souhrou aktivit protein kináz a protein fosfatáz (Huang *et al.*, 1996; Qian *et al.*, 2001; Hörmanseder *et al.*, 2013) a lze předpokládat, že během oogeneze dochází i k expresi námi detekované fosfatázy kalcineurinu ve specifických oblastech oocytu. Tuto domněnku potvrdily experimenty, ve kterých jsme sledovali relativní intenzitu fluorescenčního signálu podjednotek kalcineurinu A a B v průběhu růstové fáze v oblasti dělicího vřeténka, kúry a cytoplazmy oocytu prasete.

Během růstové fáze byla pro oocyty typická nejvyšší hladina fluorescence kalcineurinu A v korové oblasti oocytu. Nejnižší intenzita fluorescence byla naopak zaznamenána v jádře. Také kalcineurin B byl stejně jako kalcineurin A lokalizován zejména v cytoplazmě a v korové oblasti rostoucích oocytů. Nejnižší intenzita fluorescence byla v jádře, na rozdíl od kalcineurinu A se však rostoucí oocyty nelišily intenzitou fluorescence kalcineurinu B v cytoplazmě a jádře. Relokalizace kalcineurinu do korové oblasti u oocytů s ukončenou růstovou fází může souviset s funkcí kalcineurinu v různých oblastech oocytu. V somatických buňkách je kalcineurin spojován s proteiny cytoskeletu (Goto *et al.*, 1985), kde se může podílet na správné funkci mikrotubulů. Zatímco nekompetentní oocyty mají v cytoplazmě paprscitou síť interfázních mikrotubulů, v meioticky kompetentních oocytech jsou přítomna fosforylovaná mikrotubulární organizační centra (Thibault *et al.*, 1987). Námi zaznamenaný výskyt obou podjednotek kalcineurinu v celé cytoplazmě oocytů v průběhu růstové fáze také naznačuje možnou asociaci kalcineurinu s těmito proteiny i v samičí pohlavní buňce, oocyty. Distribuce kalcineurinu v korové části oocytu může souviset i s lokalizací Golgiho komplexu, který se u rostoucích oocytů nachází v blízkosti oolemy (Rozinek *et al.*, 1991), kde se účastní vzniku kortikálních granul (Wassarman, 1988). V oocytech plně meioticky kompetentních dochází k redistribuci Golgiho komplexu zpět do

oblasti zárodečného váčku (Rozinek et al., 1991). Tomu nasvědčuje i nami popsaná distribuce kalcineurinu B v plně meioticky kompetentních oocytech. Dynamika aktivity kalcineurinu popsaná v somatických buňkách naznačuje, že v různých buněčných kompartmentech se kalcineurin reguluje odlišné cílové proteiny (Mehta et al., 2014). Námi sledovaná relokalizace kalcineurinu může také souviset s jeho odlišnou funkcí v různých oblastech oocyty. Jako regulátor transkripční aktivity může být kalcineurin zapojen do signalizace v jádru v časných stádiích růstové fáze. Pozdější distribuce do korové oblasti oocyty může souviset se získáním meiotické kompetence a potřebou kalcineurinu pro cílové proteiny uložené v povrchové oblasti oocytů, či s exportem proteinů do vznikající vrstvy *zona pellucida*.

Průběh oogeneze je kontrolován řadou specifických meiotických proteinů (shrnutí v Marston et Amon, 2004). Základním regulačním mechanismem je aktivita komplexu MPF, cyklin dependentní kinázy 1 (CDK1) asociované s cyklinem B. Výstup z metafáze I je umožněn částečnou inaktivací MPF. K té může dojít vazbou MPF na separázu (Gorr et al., 2006) nebo po částečné destrukci cyklinu B prostřednictvím anaphase promoting komplexu (APC) (Yu et al., 2002). APC/C je významným regulátorem aktivity MPF (Pesin et Orr-Weaver, 2008), který během meiózy spouští degradaci mnoha substrátů, mezi které se řadí například separáza a kohezín (Terret et al., 2003). Fosforylace proteinu Cdc20/Fzy inhibuje schopnost aktivovat APC/C v průběhu kontrolního bodu meiotického vřetena spindle checkpoint arrest (Yudkovsky et al. 2000; Chung et Chen 2003; Tang et al. 2004). Schopnost inhibovat APC/C a udržet tak CSF blok má protein Emi 2, který je závislý na MAP kinázové signalizaci. Nishiyama a jeho kolegové (2007b) prokázali, že Emi 2 je efektorovým proteinem v Mos/MAPK/p90RSK signalizaci v CSF bloku. Kalcineurin defosforyluje základní podjednotku APC/C a protein Cdc20/Fzy (Mochida et Hunt, 2007; Nishiyama et al., 2007b) a dokáže přerušit meiotický blok, který je pomocí Mos/MAPK/p90RSK kaskády udržován. Není známo, zda kalcineurin reguluje aktivitu APC přímo prostřednictvím Emi 2 (Nishiyama et al., 2007b) či jinými mechanismy (Mochida et Hunt, 2007), avšak shoda panuje v obou studiích v popisu účinků inhibice. Inhibice kalcineurinu způsobuje zpomalení degradace cyklinu B2 a brání defosforylaci proteinů specifických pro M-fázi, zamezuje znovuvytvoření plně funkční jaderné membrány a výstupu z druhého meiotického bloku (Mochida et Hunt, 2007; Nishiyama et al., 2007b). Defosforylace Cdc20/Fzy zprostředkovaná kalcineurinem má tedy významnou roli při výstupu z druhého meiotického bloku u obojživelníků (Mochida et Hunt, 2007). V souladu s těmito poznatky jsou i studie u oocytů mouchy rodu *Drosophila* (Horner et al., 2006; Sartain et Wolfner, 2013) a vajíčcích sumky (Levasseur et al., 2013),

kteře prokázaly klíčovou roli kalcineurinu v regulaci meiózy. Všechny popsané procesy jsou regulovány komplexním působením protein kináz a protein fosfatáz a lze proto předpokládat, že inhibice kalcineurinu, jenž má aktivitu serin/threonin fosfatázy, může průběh oogeneze výrazně ovlivnit.

Pro detailnější objasnění úlohy kalcineurinu v regulaci růstové fázi oocyty a procesu získu meiotické kompetence byl v naší studii dále sledován vliv inhibice kalcineurinu na vývoj prasečích oocytů s rozdílným stupněm meiotické kompetence. Výsledný efekt se v závislosti na stupni meiotické kompetence oocytů lišil. Zrání rostoucích meioticky nekompetentních oocytů nebylo v rozsahu testovaných koncentrací významně ovlivněno. Zrání u oocytů s ukončeným růstem a plnou meiotickou kompetencí bylo zpomaleno. Nejvýraznější efekt měla inhibice kalcineurinu na zrání částečně meioticky kompetentních oocytů, které bylo indukováno, a oocyty dosáhly stádia druhé meiotické metafáze.

Nulový efekt inhibice kalcineurinu na meioticky nekompetentní rostoucí oocyty není překvapivý. Tyto oocyty mají nedostatek cyklinu B a CDK1. Tento deficit je natolik významný, že brání pokračování meiotického cyklu (Mitra *et al.*, 1996; Kanatsu-Shinohara *et al.*, 2000). Inhibice kalcineurinu nedostatek podjednotek MPF zřejmě nedokázala nahradit.

Molekulární mechanismus, kterým je zpomaleno zrání oocytů s ukončeným růstem a plnou meiotickou kompetencí v přítomnosti inhibitorů kalcineurinu nebyl objasněn. Kalcineurin se podílí na regulaci funkcí vápníkových (Yakel, 1997), sodíkových (Murphy *et al.*, 1993) a draslíkových kanálů (Roepert *et al.*, 1997), výsledný efekt tedy může být důsledkem změn v regulaci iontových kanálů. Po inhibici L-type vápníkových kanálů u prasečích oocytů s ukončeným růstem a plnou meiotickou kompetencí bylo popsáno podobné zpomalení zrání, jaké bylo patrné v naší studii po vystavení oocytů inhibitorům kalcineurinu (Rozinek *et al.*, 2003).

Překvapivý efekt měla inhibice kalcineurinu na zrání rostoucích oocytů s částečně vyvinutou meiotickou kompetencí. U těchto oocytů bylo po inhibici pozorováno významné zvýšení podílu oocytů schopných v podmínkách *in vitro* dokončit zrání a dosáhnout stádia metafáze II. Blok zrání v metafázi I u oocytů s částečně vyvinutou meiotickou kompetencí je dán jejich neschopností inaktivovat alespoň částečně MPF, jehož pokles je nezbytný pro výstup z metafáze I a vstup do anafáze I (Hampl *et al.*, 1995). Protein fosfatázy včetně kalcineurinu mohou sehrávat v mechanismu udržování prvního meiotického bloku

u meioticky neúplně kompetentních oocytů v metafázi I významnou roli. Inhibice kalcineurinu může přispět k inaktivaci MPF a dokončení zrání oocytu.

Pro studium zapojení kalcineurinu do signalizace v rostoucím oocytu byla sledována i aktivita klíčových faktorů meiotického zrání, MPF a MAPK. Mezi skupinou částečně meioticky kompetentních oocytů zrajících *in vitro* po ošetření inhibitorem kalcineurinu a kontrolní skupinou nebyl nalezen statisticky významný rozdíl v aktivitě MPF či MAPK. Avšak u oocytů ošetřených inhibitorem kalcineurinu byl detekován sestupný trend aktivity MPF v kritickém bodě meiotického zrání, v první meiotické metafázi, kde u kontrolní skupiny zůstávala hladina aktivity MPF stále na vysoké úrovni. Nelze vyloučit, že tento mírný pokles aktivity MPF přispěl ke zvýšení meiotické kompetence takto ošetřených oocytů.

V ováriu se dospělých samic savců se nachází početná populace oocytů na různé úrovni meiotické kompetence (Wickramasinghe *et al.*, 1991; Volarcik, 1998; Marchal *et al.*, 2002). Mnohé z těchto oocytů zanikají spontánně apoptózou (Reynaud *et Driancourt*, 2000), přičemž populace oocytů s ukončeným růstem a plnou meiotickou kompetencí je průběžně doplňována nábořem rostoucích oocytů, které meiotickou kompetenci postupně získávají během růstové fáze (McGee *et Hsueh*, 2000). V naší studii bylo prokázáno zapojení kalcineurinu do složitě regulovaného úseku oogeneze prasete, kterým je fáze růstu oocytů a proces zisku meiotické kompetence.

7. Závěr

Průběh růstové fáze oocytů je regulován řadou faktorů, jejichž aktivita je často závislá na stavu jejich fosforylace. Reverzibilní fosforylace vyžaduje dokonalou spolupráci fosfatáz a kináz a je pro řízení regulace meiotického buněčného cyklu nepostradatelná. V naší studii byla prokázána poprvé v oocytech savců významná úloha fosfatázy kalcineurinu v regulaci růstové fáze a během procesů spojených se získáváním meiotické kompetence.

Pomocí analýzy mRNA v oocytech i přilehlých somatických buňkách se podařilo prokázat přítomnost mRNA pro jednotlivé izofomy podjednotek kalcineurinu, podle které může být syntetizován funkční protein. Tato mRNA může být využita již v průběhu regulace růstové fáze a během procesů souvisejících se získáním meiotické kompetence, ale i v následujících krocích oogeneze, ve fázi meiotického zrání či v embryonálním vývoji. Zda je kalcineurin zapojen do regulace růstové fáze prasečího oocytu, bylo dále zjišťováno i na úrovni proteinu.

Doposud byl výskyt proteinu kalcineurinu v oocytech popsán pouze u mouchy rodu *Drosophila* žáby drápatky *Xenopus* a vajíčcích sumky. Naše práce jako první potvrdila výskyt proteinu kalcineurinu v samičích pohlavních buňkách savců. Podařilo se prokázat přítomnost obou podjednotek kalcineurinu, kalcineurin A i B byl v oocytu prasete přítomen v průběhu i na konci růstové fáze a na počátku meiotického zrání. Je tedy vysoce pravděpodobné, že kalcineurin hraje důležitou roli právě v regulaci meiotického cyklu u oocytů savců podobně jako v meióze bezobratlých nebo nižších obratlovců.

Intracelulární lokalizace potvrdila přítomnost obou podjednotek kalcineurinu ve všech kompartmentech oocytů s různým stupněm meiotické kompetence. Účast kalcineurinu v procesu nabývání meiotické kompetence byla dále potvrzena po zablokování funkce kalcineurinu pomocí specifických inhibitorů. Po inhibici kalcineurinu došlo k překvapivému získání plné meiotické kompetence u oocytů původně pouze částečně meioticky kompetentních. Dále bylo prokázáno, že nárůst meiotické kompetence není způsoben změnami v aktivitě významných fosfatáz, řídících meiotický cyklus, MPF a MAPK. Otázkou zůstává, jakým mechanismem je kalcineurin schopen regulovat složitě kontrolovaný proces získání meiotické kompetence a jakými drahami je jeho vlastní aktivita v oocytu regulována. K objasnění přesného zapojení kalcineurinu do oogeneze prasete je nutné provést další experimenty, které osvětlí úlohu kalcineurinu nejen v průběhu růstové fáze prasečího oocytu, ale v meiotickém zrání, aktivaci a časném embryonálním vývoji.

8. Seznam použité literatury

- Abrieu, A., Doree, M., Fisher, D. 2000. The interplay between cyclin Bcdc2 kinase (MPF) and MAP kinase during maturation of oocytes. *Journal of Cell Science*. 114. p. 257–267.
- Acevedo, N., Smith, G. D. 2005. Oocyte-specific gene signaling and its regulation of mammalian reproductive potential. *Frontiers In Bioscience-Landmark*. 10. p. 2335–2345.
- Adhikari, D., Liu, K., Shen, Y. 2012. Cdk1 drives meiosis and mitosis through two different mechanisms. *Cell Cycle*. 11 (15). p. 2763–2764.
- Alberts, B., Bray, D., Johnson, A., Lewis, J., Raff, M., Roberts, K., Walter, P. 1998. *Základy buněčné biologie*. Espero Publishing. Ústí nad Labem. p. 630. ISBN: 8090290620.
- Alderton, K. W., Cooper, Ch. E., Knowles, G. R. 2001. Nitric oxide synthases: structure, function and inhibition. *Biochemistry*. 357. p. 593–61.
- Alexandre, H., Van Cauwenberge, A., Tsukitani, Y., Mulnard, J. 1991. Pleiotropic effect of okadaic acid on maturing mouse oocytes. *Development*. 112 (4). p. 971–980.
- Anadón, A., Martínez-Larrañaga, M. R., Martínez, M. A. 2009. Use and abuse of pyrethrins and synthetic pyrethroids in veterinary medicine. *The Veterinary Journal*. 182 (1). p. 7–20.
- Anger, M., Kues, W. A., Klima, J., Mielenz, M., Kubelka, M., Motlík, J., Esner, M., Dvořák, P., Carnwath, J. W., Niemann, H. 2003. Cell Cycle Dependent Expression of Plk1 in Synchronized Porcine Fetal Fibroblasts. *Molecular Reproduction and Development*. 65. p. 245–253.
- Arron, J. R., Winslow, M. M., Polleri, A., Chang, C. P., Wu, H., Gao, X., Neilson, J. R., Chen, L., Heit, J. J., Kim, S. K., Yamasaki, N., Miyakawa, T., Francke, U., Graef, I.A., Crabtree, G.R. 2006. NFAT dysregulation by increased dosage of DSCR1 and DYRK1A on chromosome 21. *Nature*. 441 (7093). p. 595–600.

- Awumey, E. M., Moonga, B. S., Sodam, B. R., Koval, A. P., Adebajo, O. A., Kumegawa, M., Zaidi, M., Epstein, S. 1999. Molecular and functional evidence for calcineurin-A α and β isoforms in the osteoclast: novel insights into cyclosporin A action on bone resorption. *Biochemical and biophysical research communications*. 254 (1). p. 248–252.
- Ayabe, T., Kopf, G. S., Schultz, R. M. 1995. Regulation of mouse egg activation: presence of ryanodine receptors and effects of microinjected ryanodine and cyclic ADP ribose on uniseminated and iseminated eggs. *Development*. 121 (7). p. 2233–2244.
- Baek, K. H., Zaslavsky, A., Lynch, R. C., Britt, C., Okada, Y., Siarey, R. J., Ryeom, S. 2009. Down's syndrome suppression of tumour growth and the role of the calcineurin inhibitor DSCR1. *Nature*. 459 (7250). p. 1126–1130.
- Bahassi, E. M., Conn, Ch. W., Myer, D. L., Hennigan, R. F., McGowan, C. H., Sanchez, Y., Stambrook, P. J. 2002. Mammalian Polo-like kinase 3 (Plk3) is a multifunctional protein involved in stress response pathways. *Nature*. 21 (21). p. 6633–6640.
- Bachvarova, R., 1974. Incorporation of tritiated adenosine into mouse ovum RNA. *Developmental Biology*. 40. p. 52–58.
- Bachvarova, R., De Leon, V., Johnson, A., Kaplan, G., Paynton, B. V. 1985. Changes in total RNA, polyadenylated RNA, and actin mRNA during meiotic maturation of mouse oocytes. *Developmental biology*. 108 (2). p. 325-331.
- Berridge, M. J., Lipp, P., Bootman, M. D. 2000. The versatility and universality of calcium signalling. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*. 1. p. 11–21.
- Berridge, M. J. 2010. Calcium hypothesis of Alzheimer's disease. *Pflugers Archiv-European Journal of Physiology*. 459 (3). p. 441-449.
- Bielanska-Osuchowska, Z. 1973. Oogonia and oocytes degeneration and the nutritive macrophages in the process of the development of the ovary in embryos of the domestic pig (*Sus scrofa dom. L.*). *Zeitschrift für Anatomie und Entwicklungsgeschichte*. 142 (1). p. 37–52.

- Bielanska-Osuchowska, Z. 2006. Oogenesis in pig ovaries during the prenatal period: ultrastructure and morphometry. *Reproductive Biology*. 6. p. 161–193.
- Bilodeau-Goeseels, S. 2007. Effects of manipulating the nitric oxide/cyclic GMP pathway on bovine oocyte meiotic resumption. *Theriogenology*. 68 (5). p. 693–701.
- Blumenthal, E. M., Kaczmarek, L. K. 1992. Modulation by cAMP of a slowly activating potassium channel expressed in *Xenopus* oocytes. *The Journal of neuroscience*. 12 (1). p. 290–296.
- Braga, D., Pasqualotto, F. F., Madaschi, C., Bonetti, T.C.D., Rodrigues, D., Iaconelli, A., Borges, E. 2007. Use of pig oocytes for training new professionals in human assisted reproduction laboratories. *Fertility and Sterility* 88. p. 1408–1412.
- Bredt, D. S., Hwang, P. M., Snyder, S. H. 1990. Localization of nitric oxide synthase indicating a neural role for nitric oxide. *Nature*. 347 (6295). p. 768–770.
- Brevini-Gandolfi, T. A. L., Gandolfi, F. 2001. The maternal legacy to the embryo: cytoplasmic components and their effects on early development. *Theriogenology*. 55. p. 1255–1276.
- Brunet, S., Maro, B. 2005. Cytoskeleton and cell cycle control during meiotic maturation of the mouse oocyte: integrating time and space. *Reproduction Review*. 130. p. 801–811.
- 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. p. 21–30.
- Bu, S., Xie, H., Tao, Y., Wang, J., Xia, G. 2004. Nitric oxide influences the maturation of cumulus cell-enclosed mouse oocytes cultured in spontaneous maturation medium and hypoxanthine-supplemented medium through different signaling pathways. *Molecular and cellular endocrinology*. 223 (1). p. 85–93.
- Buccione, R., Schroeder, AC., Eppig, JJ. 1990. Interactions between somatic cells and germ cells throughout mammalian oogenesis. *Biology of Reproduction*. 43. p. 543-547.
- Bukovsky A., Svetlikova M., Caudle, M. 2005. Oogenesis in cultures derived from adult human ovaries. *Reproductive Biology and Endocrinology*. 3. p. 17.

- Calarco, P. G. 1972. The kinetochore in oocyte maturation In: Oogenesis. Eds. Biggers J. D. a Scheultz A. W., Univ. Park., Pennsylvania. p. 65–89.
- Canovas, S., Coy, P., Gomez, E. 2007. First steps in the development of a functional assay for human sperm using pig oocytes. *Journal of Andrology* 28, p. 273–281.
- Carroll, J., Swann, K. 1992. Spontaneous cytosolic calcium oscillations driven by inositol trisphosphate occur during in vitro maturation of mouse oocytes. *Journal of Biological Chemistry*. 267 (16). p. 11196–11201.
- Carroll, J., Swann, K., Whittingham, D., Whitaker, M. 1994. Spatiotemporal dynamics of intracellular Ca²⁺ oscillations during the growth and meiotic maturation of mouse oocytes. *Development*. 120 (12), p. 3507–3517.
- Cho, A., Tang, Y., Davila, J., Deng, S., Chen, L., Miller, E., Wernig, M., Graef, I.A. 2014. Calcineurin Signaling Regulates Neural Induction through Antagonizing the BMP Pathway. *Neuron*. 82. p. 109-124.
- Clapham, D. E. 1995. Calcium signaling. *Cell*. 80. p. 259–268.
- Clapper, D. L., Lee, H. C. 1985. Inositol trisphosphate induces calcium release from nonmitochondrial stores i sea urchin egg homogenates. *Journal of Biological Chemistry*. 260 (26). p. 13947–13954.
- Clarke, H., Rossant, J., Masui, Y. 1988. Suppresion of chromosome condensation during meiotic maturation induces parthenogenetic development of mouse oocytes. *Development*. 104. p. 97–103.
- Clarke, P. R., 1995. Cyclin-Dependent Kinases: CAK-handed kinase activation *Current Biology*. 5 (1). p. 40–42.
- Cohen, P. 1989. The structure and regulation of protein phosphatases. *Annual review of biochemistry*. 58 (1). p. 453–508.
- Colledge, W. H., Carlton, M. B., Udy, G. B., Evans, M. J. 1994. Disruption of c-mos causes parthenogenetic development of unfertilized mouse eggs. *Nature*. 370. p. 65–68.

- Crabtree, G. R. 2001. Calcium, calcineurin, and the control of transcription. *Journal of Biological Chemistry*. 276 (4). p. 2313–2316.
- Dai, Y., Lee, C., Hutchings, A., Sun, Y., Moor, R. 2000. Selective requirement for Cdc25C protein synthesis during meiotic progression in porcine oocytes. *Biology of reproduction*. 62 (3). p. 519–532.
- Danner, S., Kajahn, J., Geismann, C., Klink, E., Kruse, C. 2007. Derivation of oocyte-like cells from a clonal pancreatic stem cell line. *Molecular human reproduction*. 13 (1). p. 11–20.
- Davis, R. J. 2000. Signal transduction by the JNK Group of MAP kinases. *Cell*. 103. p. 239–252.
- De Smedt, V., Szöllösi, D., Kloc, M. 2000. The Balbiani body: asymmetry in the mammalian oocyte. *Genesis*. 26 (3). p. 208–212.
- De Vantéry, C., Stutz, A., Vassalli, J. D., Schorderet-Slatkine, S. 1997. Acquisition of meiotic competence in growing mouse oocyte is controlled at both translational and posttranslational levels. *Developmental Biology*. 187. p. 43–54.
- Dekel, N., Galiani, D., Sherizly, I., 1988. Dissociation between the inhibitory and the stimulatory action of cAMP on maturation of rat oocytes. *Molecular and Cellular Endocrinology*. 56. p. 115–121.
- Depreux, F. F. S., Scheffler, J. M., Grant, A. L., Bidwell, C. A., Gerrard, D. E. 2010. Molecular cloning and characterization of porcine calcineurin- α subunit expression in skeletal muscle. *Journal of animal science*. 88 (2). p. 562–571.
- Dohadwala, M., da Crus, Silva E. D. C., Hall, F. L., Williams, R. T., Carbonaro-Hall, D. A., Nairn, A. C., Berndt, N. 1994. Phosphorylation and inactivation of protein phosphatase 1 by cyclin-dependent kinases. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 91 (14). p. 6408–6412.

- Domingo-Sananes, M. R., Kapuy, O., Hunt, T., Novák, B. 2011. Switches and latches: a biochemical tug-of-war between the kinases and phosphatases that control mitosis. *Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences*. 366 (1584). p. 3584–3594.
- Dougherty, M. K., Ritt, D. A., Zhou, M., Specht, S. I., Monson, D. M., Veenstra, T. D., Morrison, D. K. 2009. KSR2 is a calcineurin substrate that promotes ERK cascade activation in response to calcium signals. *Molecular cell*. 34 (6). p. 652–662.
- Dumont, J., Umbhauer, M., Rassinier, P., Hanauer, A., Verlhac, M. H. 2005. p90Rsk is not involved in cytostatic factor arrest in mouse oocytes. *Journal of Cell Biology*. 169. p. 227–231.
- Dunphy, W., Kumagai, A. 1991. The cdc25 protein contains intrinsic phosphatase activity. *Cell*. 54. p. 423–431.
- Dunphy, W., Brizuela, L., Beach, D., Newport, J. 1988. The *Xenopus* cdc2 protein is a component of MPF, a cytoplasmic regulator of mitosis. *Cell*. 53. p. 423–431.
- Dupré, A., Buffin, E., Roustan, C., Nairn, A. C., Jesus, 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. p. 3916–3926.
- Dyce, P. W., Li, J. 2006. From skin cells to ovarian follicles. *Cell Cycle*. 5 (13). p.1371–1375.
- Dyce, P. W., Wen, L., Li, J. 2006. In vitro germline potential of stem cells derived from fetal porcine skin. *Nature cell biology*. 8 (4). p. 384–390.
- Eggan, K., Jurga, S., Gosden, R., Min, I. M., Wagers, A. J. 2006. Ovulated oocytes in adult mice derive from non-circulating germ cells. *Nature*. 441 (7097). p. 1109–1114.
- Enan, E., Matsumura, F. 1992. Specific-inhibition of calcineurin by type-II synthetic pyrethroid insecticides. *Biochemical Pharmacology*. 43 (8). p. 1777–1784.
- Eppig, J. J. 1982. The relationship between cumulus cell-oocyte coupling, oocyte meiotic maturation and cumulus expansion. *Developmental Biology*. 89. p. 268–272.

- Eppig, J. J. 1991. Maintenance of meiotic arrest and the induction of oocyte maturation in mouse oocyte-granulosa cell complexes developed in vitro from preantral follicles. *Biology of Reproduction*. 45. p. 824–830.
- Eppig, J. J. 2001. Oocyte control of ovarian follicular development and function in mammals. *Reproduction*. 122. p. 829–838.
- Eppig, J. J., Viveiros, M. M., Bivens, C., De La Fuente, R. 2004. Regulation of Mammalian Oocyte Maturation. In Leung, P., Adashi, E. Y. (eds.). *The Ovary*. Elsevier Academic Press. Amsterdam. P. 113–129.
- Fair, T. 2003. Follicular oocyte growth and acquisition of developmental competence. *Animal Reproduction Science*. 78. p. 203–216.
- Fan, H. Y., Sun, Q. Y. 2004. Involvement of Mitogen-Activated Protein Kinase Cascade During Oocyte Maturation and Fertilization in Mammals. *Biology of Reproduction*. 70. p. 535–547.
- Fan, H. Y., Tong, C., Chen, D. Y., Xia, G. L., Song, X. F., Schatten, H., Sun, Q. Y. 2002. Inhibitory effects of cAMP and protein kinase C on meiotic maturation and MAP kinase phosphorylation in porcine oocytes. *Molecular Reproduction and Development*. 63. p. 480–487.
- Fan, H. Y., Tong, C., Chen, D. Y., Sun, Q. Y. 2003. Roles of protein kinase C in oocyte meiotic maturation and fertilization. *Progress in Natural Science*. 13. p. 401–406.
- Fausser, B. C. J. M., Rutherford, A. J., Strauss, J. F., 1999. *Molecular Biology in Medicine*. The Parthenon Publishing Group. New York and London. ISBN:139781850709947. p. 540.
- Ferreira, E. M., Vireque, A. A., Adona, P. R., Meirelles, F. V., Ferriani, R. A., Navarro, P.A. 2009. Cytoplasmic maturation of bovine oocytes: structural and biochemical modifications and acquisition of developmental competence. *Theriogenology*. 15. 71 (5). p. 836–48

- Fissore, R. A., Pinto-Correia, C., Robl, J. M. 1995. Inositol trisphosphate-induced calcium release in the generation of calcium oscillations in bovine eggs. *Biology of reproduction*. 53 (4). p. 766–774.
- Fulka, J., First, N. L., Moor, R. M. 1998. Nuclear and cytoplasmic determinants involved in the regulation of mammalian oocyte maturation. *Molecular Human Reproduction*. 4. p. 41–49.
- Fulka, J., Jung, T, Moor, R. M. 1992. The fall of biological maturation promoting factor (MPF) and histone H1 kinase activity during anaphase and telophase in mouse oocytes. *Molecular Reproduction and Development*. 32. p. 378–382.
- Gallagher, S. C., Gao, Z. H., Li, S. P., Dyer, B., Trehwella, J., Klee, C. B. 2001. There is communication between all four Ca²⁺-bindings sites of calcineurin B. *Biochemistry*. 40 (40). p. 12094–12102.
- Garrett, S., Barton, W. A., Knights, R., Jin, P., Morgan, D. O., Fisher, R. P. 2001. Reciprocal activation by cyclin-dependent kinases 2 and 7 is directed by substrate specificity determinants outside the T loop. *Molecular and cellular biology*. 21 (1). p. 88–99.
- Gautier, J., Maller, J. 1988. Cyclin B in *Xenopus* oocytes: implications for the mechanism of pre-MPF activation. *The EMBO Journal*. 10. p. 177–182.
- Gautier, J., Maller, J., Langan, T., Lohka, M., Shwnoy, S., Shalloway, D., Nurse, P. 1989. Maturation promoting factor and the regulation of the cell cycle. *Journal of Cell Science (Suppl)*. 12. p. 53–63.
- Gautier, J., Solomon, M. J., Booher, R. N., Bazan, J. F., Kirschner, M. W. 1991. Cdc25 is a specific tyrosine phosphatase that directly activates p34cdc2. *Cell*. 67. p. 197–211.
- Gavin, A. C., Cavadore, J. C., Schorderet-Slatkine, S. 1994. Histone H1 kinase activity, germinal vesicle breakdown and M phase entry in mouse oocytes. *Journal of cell science*. 107 (1). p. 275–283.
- Glotzer, M., Murray, A. W., Kirschner, M. W. 1991. Cyclin is degraded by the ubiquitin pathway. *Nature*. 349. p. 132–138.

- Goldstein, S., Merényi, G. 2008. The chemistry of peroxynitrite: implications for biological activity. *Methods in Enzymology*. 436. p. 49–61.
- Gordo, A. C., Wu, H., He, C. L., Fissore, R. A. 2000. Injection of sperm cytosolic factor into mouse metaphase II oocytes induces different developmental fates according to the frequency of Ca²⁺ oscillations and oocyte age. *Biology of reproduction*. 62 (5). p. 1370–1379.
- Gorr, I. H., Reis, A., Boos, D., Wuhr, M., Madgwick, S., Jones, K. T., Stemmann, O. 2006. Essential CDK1-inhibitory role for separase during meiosis I in vertebrate oocytes. *Nature Cell Biology* 8. p. 1035–1120.
- Gosden, R. G. 1995. Ovulation 1: Oocyte development throughout life. *Gametes - The Oocyte*. Cambridge University Press. Cambridge. p. 119–149.
- Gosden, R. G., Bownes, M. 1995. Cellular and molecular aspects of oocyte development, *Gametes-The Oocyte*. Cambridge University Press. Cambridge. p. 22–53.
- Gosden, R. G., Krapez, J., Briggs, D. 1997. Growth and development of the mammalian oocyte. *Bioessays*. 19 (10). p. 875–882.
- Goto, S., Yamamoto, H., Fukunaga, K., Iwasa, T., Matsukado, Y., Miyamoto, E. 1985. Dephosphorylation of Microtubule-Associated Protein 2, τ Factor, and Tubulin by Calcineurin. *Journal of neurochemistry*, 45(1). p. 276–283.
- Goudet, G., Belin, F., Bezar, J., Gerard, N. 1998. Maturation-promoting factor (MPF) and mitogen activated protein kinase (MAPK) expression in relation to oocyte competence for in vitro maturation in the mare. *Molecular Human Reproduction*. 4. p. 563–570.
- Graef, I., Wang, F., Chiron, F., Chen, L., Neilson, J., Tessier-Lavigne, M.T., Crabtree, G.R. 2003. Neurotrophins and netrins require calcineurin/NFAT signaling to stimulate outgrowth of embryonic axons. *Cell*. 113. p. 657-670.
- Grasselli, F., Ponderato, N., Basini, G., Tamanini, C. 2001. Nitric oxide synthase expression and nitric oxide/cyclic GMP pathway in swine granulosa cells. *Domestic Animal Endocrinology*. 20. p. 241–252.

- Griffith, B. P., Bando, K., Hardesty, R. L., Armitage, J. M., Keenan, R. J., Pham, S. M., Starzl, T. E. 1994. A prospective randomized trial of FK506 versus cyclosporine after human pulmonary transplantation. *Transplantation*. 57 (6). p. 848.
- Gross, A. B., Rossmannith, W., Kabigting, E., Cadd, G., Clifton, D., Steiner, R. 1994. The distribution of hypothalamic nitric oxide synthase mRNA in relation to gonadotropin-releasing hormone neurons. *Journal of Endocrinology*. 140. p. R5–R8.
- Guo, L., Nakamura, K., Lynch, J., Opas, M., Olson, E.N., Agellon, L.B., Michalak, M. 2002. Cardiac-specific expression of calcineurin reverses embryonic lethality in calreticulin-deficient mouse. *Journal of Biological Chemistry*. 277. p. 50776-50779.
- Guraya, S. S. 2000. *Comparative Cellular and Molecular Biology of Ovary in Mammals Fundamentals and Applications*. Science Publishers. New Hampshire. USA and Oxford IBH. New Delhi.
- Guraya, S. S. 2008. *Cellular and Molecular Biology of Human Oogenesis, Ovulation, and Early Embryogenesis*. NewAge International (P) Ltd., Publishers. New Delhi. P. 142. ISBN:8122422497
- Guthrie, H., Garrett, W. M. 2000. Changes in porcine oocyte germinal vesicle development as follicles approach preovulatory maturity. *Theriogenology*. 54 (3). p. 389–399.
- Haccard, O., Sarcevic, B., Lewellyn, A., Hartley, R., Roy, L., Izumi, T., Erikson, E., Maller, J. L. 1993. Induction of metaphase arrest in cleaving *Xenopus* embryos by MAP kinase. *Science*. 262. p. 262–265.
- Hafez, E. S. E., Hafez, B. 2000. *Folliculogenesis, Egg Maturation, and Ovulation. Reproduction in Farm Animals*. Lippincott Williams and Wilkins. Philadelphia. Seventh. p. 509.
- Hamada, N., Miyata, M., Eto H., Shirasawa, T., Akasaki, Y., Nagaki, A., Tei, C. 2010. Tacrolimus-eluting stent inhibits neointimal hyperplasia via calcineurin/NFAT signaling in porcine coronary artery model. *Atherosclerosis*. 208 (1). p. 97–103.

- Hämäläinen, M., Korhonen, R., Moilanen, E. 2009. Calcineurin inhibitors down-regulate iNOS expression by destabilising mRNA. *International immunopharmacology*. 9 (2). p. 159–167.
- Hampl, A., Eppig, J. J. 1995. Analysis of the mechanism(s) of metaphase I arrest maturing mouse oocytes. *Development* 121. p. 925–933.
- Han, T. H., Hyduke, D. R., Vaughn, M. W., Fukuto, J. M., Liao, J. C. 2002. Nitric oxide reaction with red blood cells and hemoglobin under heterogeneous conditions. *Proceedings of the National Academy of Sciences U.S.A.* 99. p. 7763–7768.
- Hara, M., Abe, Y., Tanaka, T., Yamamoto, T., Okumura, E., Kishimoto, T. 2012. Greatwall kinase and cyclin B-Cdk1 are both critical constituents of M-phase-promoting factor. *Nature communications*. 3. p. 1059.
- Hashimoto, N., Kishimoto, T. 1988. Regulation of meiotic metaphase by a cytoplasmic maturation-promoting factor during mouse oocyte maturation. *Developmental Biology* 126. p. 242–252.
- Hashimoto, N., Watanabe, N., Furuta, Y., Tamemoto, H., Sagata, N., Yokoyama, M., Okazaki, K, Nagayoshi, M., Takeda, N., Ikawa, Y. 1994. Parthenogenetic activation of oocytes in c-mos-deficient mice. *Nature*. 370. p. 68–71.
- Hashimoto, Y, Perrino, BA, Soderling, TR. 1990. Identification of an autoinhibitory domain in calcineurin. *Journal of Biological Chemistry*. 265 (4). p. 1924–1927.
- Hattori, M. A., Nishida, N., Takesue, K., Kato, Y., Fujihara, N. 2000. FSH suppression of nitric oxide synthesis in porcine oocytes. *Journal of Molecular Endocrinology*. 24. p. 65–73.
- Hattori, M., Sakamoto, K., Fujihara, N., Kojima, I. 1996. Nitric oxide: a modulator for the epidermal growth factor receptor expression in developing ovarian granulosa cells. *American Journal of Physiology-Cell Physiology*. 270 (3). p. C812–C818.
- He, C. L., Damiani, P., Parys, J. B., Fissore, R. A. 1997. Calcium, calcium release receptors, and meiotic resumption in bovine oocytes. *Biology of reproduction*. 57 (5). p. 1245–1255.

- Heineke, J, Molkentin, J. D. 2006. Regulation of cardiac hypertrophy by intracellular signalling pathways. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*. 7 (8). p. 589–600.
- Hemmens, B., Mayer, B. 1998. Enzymology of nitric oxide synthases. In *Nitric oxide protocols*. Humana Press. p. 1–32.
- Hofmann, F., Biel, M., Flockerzi, V. 1994. Molecular basis for Ca²⁺ channel diversity. *Annual Review of Neurosciences*. P. 399–418.
- Hogan, P. G., Lewis, R. S., Rao, A. 2010. Molecular Basis of Calcium Signaling in Lymphocytes: STIM and ORAI. *Annual Review of Immunology*. 28. p. 491–533.
- Homa, S. T. 1995. Calcium and meiotic maturation of the mammalian oocyte. *Molecular reproduction and development*. 40 (1). p. 122–134.
- Homa, S. T., Carroll, J., Swann, K. 1993. The role of calcium in mammalian oocyte maturation and egg activation. *Human Reproduction*. 8. p. 1274–1281.
- Hörmanseder, E., Tischer, T., Mayer, T. U. 2013. Modulation of cell cycle control during oocyte- to- embryo transitions. *The EMBO journal*. 32 (16). p. 2191-2203.
- Horner, V. L., Czank, A., Jang, J. K., Singh, N., Williams, B. C., Puro, J., Goldberg, M. L. 2006. The drosophila calcipressin sarah is required for several aspects of egg activation. *Current biology*. 16 (14). p.1441-1446.
- Huang, Ch.Y., Ferrell, J.E. 1996. Ultrasensitivity in the mitogen-activated protein kinase cascade. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 93 (19). p. 10078-10083.
- Hubbard, C. J., Price, J. 1988. The Effects of Follicle-Stimulating Hormone and Cyclic Guanosine-3',5'-Monophosphate on Cyclic Adenosine-3',5'-Monophosphate Phosphodiesterase and Resumption of Meiosis in hamster cumulus-oocyte complexes. *Biology of Reproduction*. 39. p. 829–838.
- Hultsch, T., Kapp, A., Spergel, J. 2005. Immunomodulation and safety of topical calcineurin inhibitors for the treatment of atopic dermatitis. *Dermatology*. 211 (2). p. 174–187.
- Hunt, T. 1992. Cell cycle arrest and c-mos. *Nature*. 355. p. 587–588.

- Hunter, M. 2000. Oocyte maturation and ovum quality in pigs. *Reviews of reproduction*. 5 (2). p. 122–130.
- Huo, L. J., Liang, Ch. G., Yu, L. Z., Zhong, Z. S., Yang, Z. M., Fan, H. Y., Chen, D. Y., Sun, Q. Y. 2005. Inducible nitric oxide synthase-derived nitric oxide regulates germinal vesicle breakdown and first polar body emission in the mouse oocyte. *Reproduction*. 129. p. 403–409.
- Hutt, K. J., McLaughlin, E. A., Holland, M. K. 2006. Kit ligand and c-Kit have diverse roles during mammalian oogenesis and folliculogenesis. *Molecular human reproduction*. 12 (2). p. 61–69.
- Hyttel, P., Fair, T., Avery, B., Callesen, H., Greve, T., 1999. Transcriptional activity and ultrastructure in bovine oocytes. *Reproduction in Domestic Animals*. 34. p. 447–454.
- Cha, K. Y., Chian, R. C. 1998. Maturation in vitro of immature human oocytes for clinical use. *Human Reproduction Update*. 4. p. 103–120.
- Chan, B., Greenan, G., McKeon, F., Ellenberger, T. 2005. Identification of a peptide fragment of DSCR1 that competitively inhibits calcineurin activity in vitro and in vivo. *Proceedings of the National of Sciences USA*. 102 (37). p. 13075–13080.
- Chang, C. D., Takeda, T., Mukai, H., Shuntoh, H., Kuno, T., Tanaka, C. 1992. Molecular cloning and characterization of the promoter region of the calcineurin A alpha gene. *Biochemical Journal*. 288. p. 801–805.
- Chantler, P. D. 1985. Calcium-dependent association of a protein complex with the lymphocyte plasma membrane: probable identity with calmodulin-calcineurin. *The Journal of cell biology*. 101 (1). p. 207–216.
- Chen, W., Yang, J., Li, P. 2000. Effect of dexamethasone on the expression of p34cdc2 and cycline B1 in pig oocytes in vitro. *Molecular Reproduction and Development*. 56. p. 74–79.
- Chmelíková, E., Jeřeta, M., Sedmíková, M., Petr, J., Tůmová, L., Kott, T., Lipovová, P., Jílek, F. 2010. Nitric oxide synthase isoforms and the effect of their inhibition on meiotic maturation of porcine oocytes. *Zygote*. 18. p. 235–244.

- Chmelíková, E., Sedmíková, M., Petr, J., Kott, T., Lánská, V., Tůmová, L., Tichovská, H., Jeřeta, M. 2009. Expression and localization of nitric oxide synthase isoforms during porcine oocyte growth and acquisition of meiotic competence. *Czech Journal Of Animal Science*, 54. p. 137–149.
- Chmelíková, E., Sedmíková, M., Rajmon, R., Petr, J., Švestková, D., Jílek, F. 2004. Effect of proteasome inhibitor MG132 on in vitro maturation of pig oocytes. *Zygote*. 12. p. 157–162.
- Choi, T., Fukusawa, K., Zhou, R., Tessarollo, L., Borrer, K., Resau, J., Vande-Woude G. 1996. The Mos/mitogen proteinkinase (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. p. 7032–7035.
- Choi, Y., Rajkovic, A. 2006. Genetics of early mammalian folliculogenesis. *Cellular and molecular life sciences*. 63 (5). p. 579–590.
- Christmann, L., Jung, T., Moor, R. M. 1994. MPF components and meiotic competence in growing pig oocytes *Molecular Reproduction and Development*. 38. p. 85–90.
- Chung, E., Chen, RH. 2003. Phosphorylation of Cdc20 is required for its inhibition by the spindle checkpoint. *Nat Cell Biol*. 5 (8). p. 748-53.
- Igarashi, H., Knott, J. G., Schultz, R. M., Williams, C. J. 2007. Alterations of PLC β 1 in mouse eggs change calcium oscillatory behavior following fertilization. *Developmental biology*. 312 (1). p. 321–330.
- Ignarro, L. J. 1999. Nitric oxide: a unique endogenous signaling molecule in vascular biology. *Bioscience reports*. 19 (2). p. 51–71.
- Inoue, M., Naito, K., Nakazma, T., Sato, E. 1998. Mitogen-activated protein kinase translocates into the germinal vesicle and induces germinal vesicle break down in porcine oocytes. *Biology of Reproduction*. 58. p. 130–136.
- Ito, J., Kawano, N., Hirabayashi, M., Shimada, M. 2004. The role of calcium/calmodulin-dependent protein kinase II on the inactivation of MAP kinase and p34cdc2 kinase during fertilization and activation in pig oocytes. *Reproduction*. 128 (4). p. 409–415.

- Ito, J., Yoshida, T., Kasai, Y., Wakai, T., Parys, J. B., Fissore, R. A., Kashiwazaki, N. 2010. Phosphorylation of inositol 1, 4, 5-triphosphate receptor 1 during in vitro maturation of porcine oocytes. *Animal Science Journal*. 81 (1). p. 34–41.
- Jablonka-Shariff, A., Olson, M. L. 1997. Hormonal regulation of nitric oxide synthases and their cell-specific expression during follicular development in the rat ovary. *Endocrinology*. 138. p. 460–468.
- Janssens, S. P., Shimouchi, A., Quertermous, T., Bloch, D. B., Bloch, K. D. 1992. Cloning and expression of a cDNA encoding human endothelium-derived relaxing factor/nitric oxide synthase. *Journal of biological chemistry*. 267 (21). p. 14519–14522.
- Johnson, J., Bagley, J., Skaznik-Wikiel, M., Lee, H. J., Adams, G. B., Niikura, Y., Tschudy, K. S., Tilly, J. C., Cortes, M. L., Forkert, R., Spitzer, T., Iacomini, J., Scadden, D. T., Tilly, J. L. 2005. Oocyte generation in adult mammalian ovaries by putative germ cells in bone marrow and peripheral blood. *Cell*. 122. p. 303–315.
- Johnson, J., Canning, J., Kaneko, T., Pru, J. K., Tilly, J.L. 2004. Germline stem cells and follicular renewal in the postnatal mammalian ovary. *Nature*. 6979. p. 145–150.
- Jones, K. T. 2005. Mammalian egg activation: from Ca²⁺ spiking to cell cycle progression. *Reproduction*. 130 (6). p. 813–823.
- Josefsberg, L. B., Galiani, D., Lazar, S., Kaufman, O., Seger, R., Dekel, N. 2003. Maturation-promoting factor governs mitogen-activated protein kinase activation and interphase suppression during meiosis of rat oocytes. *Biology of Reproduction*. 68. p. 1282–1290.
- Kakalis, L. T., Kennedy, M., Sikkink, R., Rusnak, F., Armitage, I. M. 1995. Characterization of the calcium-binding sites of calcineurin-B. *Febs Letters*. 362 (1). p. 55–58.
- Kanatsu-Shinohara, M., Schultz, R. M., Kopf, G. S. 2000. Acquisition of meiotic competence in mouse oocytes: Absolute amounts of p34(cdc2), cyclin b1, cdc25C, and wee1 in meiotically incompetent and competent oocytes. *Biology of Reproduction*. 63. p. 1610–1616.

- Kanayama, N, Miyano, T, Lee, J. 2002. Acquisition of meiotic competence in growing pig oocytes correlates with their ability to activate Cdc2 kinase and MAP kinase. *Zygote*. 10 (3). p. 261–270.
- Kaufman, M. L., Homa, S. T. 1993. Defining a role for calcium in the resumption and progression of meiosis in the pig oocyte. *Journal of Experimental Zoology*. 265 (1). p. 69–76.
- Kelly, P. A., Burckart, G. J., Venkataramanan, R. 1995. Tacrolimus: a new immunosuppressive agent. *American journal of health-system pharmacy*. 52 (14). p. 1521–1535.
- Kim, H., Moon, C., Ahn, M., Lee, Y., Kim, S., Ha, T., Jee, Y., Shin, T. 2005. Expression of nitric oxide synthase isoforms in the porcine ovary during follicular development. *Journal of veterinary science*. 6 (2). p. 97–101.
- Kincaid, R. 1993. Calmodulin-dependent protein phosphatases from microorganisms to man - a study in structural conservatism and biological diversity. *Advances in Second Messenger and Phosphoprotein Research*. 27. p. 1–23.
- Kincaid, R. L. 1995. The role of calcineurin in immune system responses. *Journal of allergy and clinical immunology*. 96 (6). p. 1170–1177.
- King, R., Deshaies, R., Peters, J., Kirschner, M., 1996. How proteolysis drives the cell cycle. *Science* 274. p. 1652–1658.
- Kingsbury, T. J., Cunningham, K. W. 2000. A conserved family of calcineurin regulators. *Genes & development*. 14 (13). p. 1595–1604.
- Kishimoto, T., Kanatani, H. 1976. Cytoplasmic factor responsible for germinal vesicle breakdown and meiotic maturation in starfish oocytes. *Nature*. 221. p. 273–274.
- Kissinger, C. R., Parge, H. E., Knighton, D. R., Lewis, C. T., Pelletier, L. A., Tempczyk, A., Kalish, V. J., Tucker, K. D., Showalter, R. E, Moomaw, E. W., Gastinel, L. N., Habuka, N., Chen, X. H., Maldonado, F., Barker, J. E., Bacquet, R., Villafranca, J. E. 1995. Crystal-structures of human calcineurin and the human FKBP12-FK506-calcineurin complex. *Nature*. 378 (6557). p. 641–644.

- Klee, C. B., Draetta, G. F., Hubbard, M. J. 1988. Calcineurin. *Advances in Enzymology and Related Areas of Molecular Biology*. 61. p. 149–200.
- Kline, D., Kline, J. T. 1992. Repetitive calcium transients and the role of calcium in exocytosis and cell cycle activation in the mouse egg. *Developmental biology*. 149 (1). p. 80–89.
- Kosako, H., Gotoh, Y., Nishida, E. 1994. Requirement for the MAP kinase kinase/MAP kinase cascade in *Xenopus* oocyte maturation. *The EMBO Journal*. 13. p. 2131–2138.
- Kubelka, M., Motlík, J., Schultz, R.M., Pavlok, A. 2000. Butyrolactone I reversibly inhibits meiotic maturation of bovine oocytes, without influencing chromosome condensation activity. *Biology of Reproduction*. 62. p. 292–302.
- Kubelka, M., Anger, M., Kalous, J., Schultz, R. M., Motlík, J. 2002. Chromosome condensation in pig oocytes: Lack of a requirement for either cdc2 kinase or MAP kinase activity. *Molecular reproduction and development*. 63 (1). p. 110–118.
- Kuijk, E., du Puy, L., van Tol, H., Haagsman, H., Colenbrander, B., Roelen, B. 2007. Validation of reference genes for quantitative RT-PCR studies in porcine oocytes and preimplantation embryos. *BMC Developmental Biology*. 7 (1). p. 58.
- Kuo, R. C., Baxter, G. T., Thompson, S. H., Stricker, S. A., Patton, C., Bonaventura, J., Epel, D. 2000. NO is necessary and sufficient for egg activation at fertilization. *Nature*. 406. p. 633–636
- Kwon, Y. G., Lee, S. Y., Choi, Y., Greengard, P., Nairn, A. C. 1997. Cell cycle-dependent phosphorylation of mammalian protein phosphatase 1 by cdc2 kinase. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 94 (6). p. 2168–2173.
- Lai, M. M., Burnett, P. E., Wolosker, H., Blackshaw, S., Snyder, S. H. 1998. Cain, a novel physiologic protein inhibitor of calcineurin. *Journal of Biological Chemistry*. 273 (29). p. 18325–18331.
- Lawrence, Y., Whiteker, M., Swann, K. 1997. Spermegg fusion is the prelude to the initial Ca²⁺ increase at fertilization in the mouse. *Development*. 124. p. 233–241.

- Lazar, S., Galiani, D., Dekel, N. 2002. cAMP-Dependent PKA Negatively Regulates Polyadenylation of c-mos mRNA in Rat Oocytes. *Molecular Endocrinology*. 16 (2). p. 331–341.
- Lebedeva, I. Y., Singina, G. N., Ernst, L. K., Golubev, A. K. 2009. Realization pathways of prolactin modulating influence on the cAMP-dependent mechanism of meiosis regulation in bovine oocytes. *Tsitologiya*. 51 (7). p. 559–564.
- Levasseur, M., Dumollard, R., Chambon, J. P., Hebras, C., Sinclair, M., Whitaker, M., McDougall, A. 2013. Release from meiotic arrest in ascidian eggs requires the activity of two phosphatases but not CaMKII. *Development*. 140(22). p. 4583–4593.
- Li, H. M., Rao, A., Hogan, P. G. 2011. Interaction of calcineurin with substrates and targeting proteins. *Trends in Cell Biology*. 21 (2). p. 91–103.
- Li, M. Y., Fan, H. Y., Tong, C. Chen, D., Xia, G., Sun, Q. 2002. MAPK regulates cell cycle progression in pig oocytes and fertilized eggs. *Chinese Science Bulletin*, 47 (10). p. 843.
- Li, Y. H., Kang, H., Xu, Y. N., Heo, Y. T., Cui, X. S., Kim, N. H., Oh, J. S. 2013. Greatwall Kinase Is Required for Meiotic Maturation in Porcine Oocytes. *Biology of reproduction*. 89 (3). p. 53.
- Linfor, J., Berger, T. 2000. Potential role of α 5 and β 1 integrins as oocyte adhesion molecules during fertilization in pigs. *Journal of reproduction and fertility*, 120(1), 65–72.
- Liu, J., Farmer, J D., Lane, W. S., Friedman, J., Weissman, I., Schreiber, S. L. 1991. Calcineurin is a common target of cyclophilin-cyclosporin A and FKBP-FK506 complexes. *Cell*. 66 (4). p. 807–815.
- Liu, J., Grimison, B., Lewellyn, A. L., Maller, J. L. 2006. The anaphase-promoting complex/cyclosome inhibitor *emi2* is essential for meiotic but not mitotic cell cycles. *The Journal of Biological Chemistry*. 281 (46). p. 34736–34741.

- Lodish, H., Berk, A., Kaiser, Ch. A., Krieger, M., Scott, M. P., Bretscher, A., Ploegh, H., Matsudaira, P. 2008. *Molecular Cell Biology*. 6. vydání. W. H. Freeman. N. Y. p. 1150. ISBN: 139780716776017.
- Logan, K. P., McNatty, K. A., Juengel, J. L. 2003. Expression of Wilms' tumor gene and protein localization during ovarian formation and follicular development in sheep. *Biology of Reproduction*. 68. p. 635–643.
- Lorca, T., Cruzalegui, F., Fesquet, D., Cavadore, J., Mery, J., Means, A., Doree, M. 1993. Calmodulin dependant protein kinase II mediates inactivation of MPF and CSF upon fertilization of *Xenopus* eggs. *Nature*. 366. p. 270–273.
- Lu, Q, Smith, G. D., Chen, D. Y., Yang, Z, Han, Z. M., Schatten, H, Sun, Q. Y. 2001. Phosphorylation of mitogen-activated protein kinase is regulated by protein kinase C, cyclic 3 5 -adenosine monophosphate, and protein phosphatase modulators during meiosis resumption in rat oocytes. *Biology of Reproduction*. 64. p. 1444–1450.
- Lundy, T., Smith, P., O'connell, A., Hudson, N. L., McNatty, K. P. 1999. Populations of granulosa cells in small follicles of the sheep ovary. *Journal of Reproduction and fertility*. 115 (2). p. 251–262.
- Macaulay, A. D., Gilbert, I., Caballero, J., Barreto, R., Fournier, E., Tossou, P., Sirard, M. A., Clarke, H. J., Khandjian, E. W., Richard, F. J., Hyttel, P., Robert, C. The Gametic Synapse; RNA Transfer to the Bovine Oocyte. *Biology of Reproduction*. 2014 Aug 20. pii: biolreprod.114.119867. *v tisku*
- Machaty, Z., Funahashi, H., Day, B. N., Prather, R. S. 1997. Developmental changes in the intracellular Ca²⁺ release mechanisms in porcine oocytes. *Biology of reproduction*. 56 (4). p. 921–930.
- 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. p. 1523–1532.
- Marlovits, G., Tyson, Ch. J., Novak, B., Tyson, J. J. 1998. Modeling M-phase control in *Xenopus* oocyte extracts: the surveillance mechanism for unreplicated DNA *Biophysical Chemistry*, 72. p. 169–184.

- Marletta, M. A. 1994. Nitric oxide synthase: aspects concerning structure and catalysis. *Cell*. 78 (6). p. 927-930.
- Marston, AL., Amon, A. 2004. Meiosis: cell-cycle controls shuffle and deal. *Nat Rev Mol Cell Biol*. 5. p. 983–997.
- Mastroianni, L., Coelingh, J.R., Bennink, H. J., Suzuki, S., Vemer, H. M. 1994. Gamete and embryo quality. The Parthenon Publishing Group Ltd, Carnforth. UK. ISBN: 1850705437.
- Masui, Y., Markert, C. 1971. Cytoplasmic control of nuclear behaviour during meiotic maturation of frog oocytes. *Journal of experimental zoology*. 177. p. 129–146.
- Mattioli, M., Galeati, G., Bacci, M. 1991 Changes in maturationpromoting activity in the cytoplasm of pig oocytes throughout maturation. *Molecular Reproduction and Development*. 30. p. 119–125.
- Matzuk, M.M., Lamb. D. J. 2002. Genetic dissection of mammalian fertility pathways. *Nat Cell Biol*. 4. p. 41–49.
- Mc Cann, S. M., Mastronardi, C., Walczewska, A., Karanth, S., Rettori, V., Yu, W. H. 2003. The role of nitric oxide (NO) n control of LHRH release that mediates gonadotropin release and sexual behavior. *Current Pharmacological Design*. 9. p. 381–390.
- McGee, E. A., Hsueh, A. J.W. 2000. Initial and cyclic recruitment of ovarian follicles. *Endocrine Reviews* 21. p. 200–214.
- McGinnis, L. K., Limback, S. D., Albertini, D. F. 2012. Signaling Modalities During Oogenesis in Mammals. *Current topics in developmental biology*. 102. p. 227–242.
- Mehlmann, L. M. Jaffe, L. A. 2005. SH2 domain-mediated activation of an SRC family kinase is not required to initiate Ca²⁺ release at fertilization in mouse eggs. *Reproduction*. 129. p. 557–564.
- Mehlmann, L. M., Kline, D. 1994. Regulation of intracellular calcium in the mouse egg: calcium release in response to sperm or inositol trisphosphate is enhanced after meiotic maturation. *Biology of reproduction*. 51 (6). p. 1088–1098.

- Mehlmann, L. M., Terasaki, M., Jaffe, L. A., Kline, D. 1995. Reorganization of the endoplasmic reticulum during meiotic maturation of the mouse oocyte. *Developmental Biology*. 170. p. 607–615.
- Mehta, S., Aye-Han, N. N., Ganesan, A., Oldach, L., Gorshkov, K., Zhang, J. 2014. Calmodulin-controlled spatial decoding of oscillatory Ca^{2+} signals by calcineurin. *eLife*, 3 e03765. *v tisku*
- Miao, Y. L., Zhang, X., Zhao, J. G., Spate, L., Zhao, M. T., Murphy, C. N., Schatten, H. 2012. Effects of griseofulvin on in vitro porcine oocyte maturation and embryo development. *Environmental and molecular mutagenesis*. 53 (7). p. 561–566.
- Mitra, J., Schultz, R. M., 1996. Regulation of the acquisition of meiotic competence in the mouse: Changes in the subcellular localization of cdc2, cyclin B1, cdc25C and wee1, and in the concentration of these proteins and their transcripts. *Journal of Cell Science* 109. p. 2407–2415.
- Miyano, T, Manabe, N. 2007. Oocyte growth and acquisition of meiotic competence. *Society for Reproduction and Fertility*. 63. p. 531–538.
- Miyazaki, S. 1991. Repetitive calcium transients in hamster oocytes. *Cell Calcium*. 12. p. 205–216.
- Miyazaki, S. I., Shirakawa, H., Nakada, K., Honda, Y., Yuzaki, M., Nakade, S., Mikoshiba, K. 1992. Antibody to the inositol trisphosphate receptor blocks thimerosal-enhanced Ca^{2+} -induced Ca^{2+} release and Ca^{2+} oscillations in hamster eggs. *FEBS letters*. 309 (2). p. 180–184.
- Miyoshi, T., Otsuka, F., Shimasaki, S. 2013. GRK-6 mediates FSH action synergistically enhanced by estrogen and the oocyte in rat granulosa cells. *Biochemical and biophysical research communications* 3. 434 (2). p. 401–406.
- Mochida, S., Hunt, T. 2007. Calcineurin is required to release *Xenopus* egg extracts from meiotic M phase. *Nature*. 449 (7160). p. 336–340.
- Mochida, S., Hunt, T. 2012. Protein phosphatases and their regulation in the control of mitosis. *EMBO reports*. 13 (3). p. 197–203.

- Mochida, S., Maslen, S. L., Skehel, M., Hunt, T. 2010. Greatwall phosphorylates an inhibitor of protein phosphatase 2A that is essential for mitosis. *Science*. 330. p. 1670–1673.
- Moor, R. M., Mattioli, M., Ding, J., Nagai, T. 1990. Maturation of pig oocytes in vivo and in vitro. *Journal of Reproduction and Fertility Supplement*. 40. p. 197–210.
- Moore, G. 1978. RNA synthesis in fixed cells by endogenous RNA polymerase. *Experimental Cell Research*. 111. p. 317–326.
- Moore, H., Udayashankar, R., Aflatoonian, B. 2008. Stem cells for reproductive medicine. *Molecular and cellular endocrinology*. 288 (1). p. 104–110.
- Morbeck, D. E., Esbenshade, K. L., Flowers, W. L., Britt, J. H. 1992. Kinetics of follicle growth in the prepubertal gilt. *Biology of Reproduction*. 47. p. 485–491.
- Motlík, J., Fulka, J. 1976. Breakdown of germinal vesicle in pig oocytes in vivo and in vitro. *Journal of Experimental Zoology*. 198. p. 155–162.
- Motlík, J., Fulka, J. 1986. Factors affecting meiotic competence in pig oocytes. *Theriogenology*. 25. p. 87–96.
- Motlík, J., Crozet, N., Fulka, J. 1984. Meiotic competence in vitro of pig oocytes isolated from early antral follicles. *Journal of Reproduction and Fertility*. 72. p. 323–328.
- Motlík, J., Kubelka, M. 1990. Cell-cycle aspects of growth and maturation of mammalian oocytes. *Molecular Reproduction and Development*. 27. p. 366–375.
- Moz, Y., Levi, R., Lavi-Moshayoff, V., Cox, K. B., Molkentin, J. D., Silver, J., Naveh-Many, T. 2004. Calcineurin A β is central to the expression of the renal type II Na/Pi co-transporter gene and to the regulation of renal phosphate transport. *Journal of the American Society of Nephrology*. 15 (12). p. 2972–2980.
- Muramatsu, T., GiRi, P. R., Higuchi, S., Kincaid, R. L. 1992. Molecular cloning of a calmodulin-dependent phosphatase from murine testis: identification of a developmentally expressed nonneural isoenzyme. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 89 (2). p. 529–533.

- Muramatsu, T., Kincaid, R. L. 1992. Molecular cloning of a full-length cDNA encoding the catalytic subunit of human calmodulin-dependent protein phosphatase (calcineurin A α). *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Molecular Cell Research*. 1178 (1). p. 1.
- Murata, M., Tsunoda, M., Sumiyoshi, T., Sumiyoshi, C., Matsuoka, T., Suzuki, M., Kurachi, M. 2008. Calcineurin A gamma and B gene expressions in the whole blood in Japanese patients with schizophrenia. *Progress in Neuro-Psychopharmacology and Biological Psychiatry*. 32 (4). p. 1000–1004.
- Murnane, J. M., De Felice, L. J. 1993. Electrical maturation of murine oocytes: an increase in calcium current coincides with acquisition of meiotic competence. *Zygote*. 1. p. 49–60.
- Murphy, B. J., Rossie, S., Dejongh, K. S., Catterall, W., A. 1993. Identification of the sites of selective phosphorylation and dephosphorylation of the rat brain Na⁺ channel alpha subunit by cAMP-dependent protein kinase and phosphoprotein phosphatases. *Journal of Biological Chemistry*. 268. p. 27355–27362.
- Murray, A. W. 2004. Recycling the cell cycle: cyclins revisited. *Cell*. 116. p. 221–234.
- Murray, A. W., Kirschner, M. 1989. Cyclin synthesis drives the early embryonic cell cycle. *Nature*. 339. p. 275–280.
- Na, H. J., Chung, H. T., Ha, K. S., Lee, H., Kwon, Y. G., Billiar, T. R., Kim, Y. M. 2008. Detection and measurement for the modification and inactivation of caspase by nitrosative stress in vitro and in vivo. *Methods in Enzymology*. 441. p. 317–327.
- Nader, N., Kulkarni, R. P., Dib, M., Machaca, K. 2012. How to make a good egg!: The need for remodeling of oocyte Ca²⁺ signaling to mediate the egg-to-embryo transition. *Cell calcium*. 53. p. 41-54.
- Nakamura, Y., Yamagata, Y., Sugino, N., Takayama, H., Kato, H. 2002. Nitric oxide inhibits oocyte meiotic maturation. *Biology of Reproduction*. 67. p. 1588–1592.
- Nathan, C., Xie, Q. W. 1994. Nitric oxide synthases: roles, tolls, and controls. *Cell*. 78 (6). p. 915–918.

- Nicklas, R. B. 1966. A note on orientation in mitosis and meiosis. *Journal of Theoretical Biology*. 12 (1). p. 147–150.
- Nishiyama, T, Ohsumi, K, Kishimoto, T. 2007b. Phosphorylation of Erp1 by p90rsk is required for cytostatic factor arrest in *Xenopus laevis* eggs. *Nature*. 446 (7139). p. 1096-1099.
- Nishimura, T., Sugiura, K., Naito, K. 2013. A-Kinase Anchor Protein 1 (AKAP1) Regulates cAMP-Dependent Protein Kinase (PKA) Localization and Is Involved in Meiotic Maturation of Porcine Oocytes 1. *Biology of reproduction*. 88 (4).
- Nishiyama, T., Yoshizaki, N., Kishimoto, T., Ohsumi, K. 2007. Transient activation of calcineurin is essential to initiate embryonic development in *Xenopus laevis*. *Nature*. 449 (7160). p. 341.
- Nurse, P. 1990. Universal control mechanism regulating onset of M-phase. *Nature*. 344. p. 503–508.
- Oh, J. S., Han, S. J., Conti, M. 2010. Wee1B, Myt1, and Cdc25 function in distinct compartments of the mouse oocyte to control meiotic resumption. *The Journal of cell biology*. 188 (2). p. 199–207.
- Olson, L. M., Jablonka-Shariff, A. Beltsos, A. N. 2000. Ovarian nitric oxide: A modulator of ovulation and oocyte maturation. Reprinted from *Ovulation-Evolving scientific and clinical concepts*. ed Adashi E. Y. Springer-Verlag. New York.
- Oxender, W. D., Colenbrander, B., Van de Wiel D. F. M., Wensing, C. J. G. 1979. Ovarian development in fetal and prepubertal pigs. *Biology of Reproduction*. 21. p. 715–721.
- Pae, H. O., Lee, Y. Ch., Jo, E. K., Chung, H. T. 2009. Subtle Interplay of Endogenous Bioactive Gases (NO, CO and H₂S) in Inflammation. *Archives of Pharmacal Research*. 32 (8). p. 1155-1162.
- Palmer, A, Gavin, A. C., Nebreda, A. R. 1998. A link between MAP kinase and p34(cdc2)/cyclin B during oocyte maturation: p90rsk phosphorylates and inactivates the p34cdc2 inhibitory kinase Myt1. *The EMBO Journal*. 17. p. 5037–5047.

- Patel, S., Bajpayee, M., Pandey, A. K., Parmar, D., Dhawan, A. 2007. In vitro induction of cytotoxicity and DNA strand breaks in CHO cells exposed to cypermethrin, pendimethalin and dichlorvos. *Toxicology in Vitro*. 21 (8). p. 1409-1418.
- Perera, D., Tilston, V., Hopwood, J. A., Barchi, M., Boot Handford, R. P., Taylor, S. S. 2007. Bub1 Maintains Centromeric Cohesion by Activation of the Spindle Checkpoint. *Developmental Cell*. 13. (4). p. 566–579.
- Pesin, JA1, Orr-Weaver, TL. Annu. 2008. Regulation of APC/C activators in mitosis and meiosis. The Meiosis I-to-Meiosis II Transition in Mouse Oocytes Requires Separase Activity. *Annual Review of Cell and Developmental Biology*. 24. p. 475-99. doi: 10.1146/annurev.cellbio.041408.115949.
- Peter, M., Nakagawa, J., Dore'e, M. 1990. In vitro disassembly of the nuclear lamina and M phase-specific phosphorylation of lamins by cdc2 kinase. *Cell*. 61. p. 591–602.
- Petr, J., Chmelíková, E., Kheilová, K., Jílek, F. 2009. Histone deacetylase inhibition improves meiotic competence but not developmental competence in growing pig oocytes. *Zygote*. 17 (04). p. 307–314.
- Petr, J., Rajmon, R., Chmelíková, E., Tománek, M., Lánská, V., Přibáňová, M., Jílek, F. 2006. Nitric-oxide-dependent activation of pig oocytes: the role of the cGMP-signalling pathway. *Zygote*. 14. p. 9–16.
- Petr, J., Rajmon, R., Lánská, V., Sedmíková, M. Jílek, F. 2005b. Nitric-oxide-dependent activation of pig oocytes: the role of calcium. *Molecular and Cellular Endocrinology* 242. p. 16–22.
- Petr, J., Rajmon, R., Rozinek, J., Sedmíková, M., Jeřeta, M., Chmelíková, E., Švestková, D. Jílek, F. 2005a. Activation of pig oocytes using nitric oxide donors. *Molecular Reproduction and Development*. 71. p. 115–122.
- Petr, J., Rozinek, J., Hruban, V., Jílek, F., Sedmíková, M., Vaňourková, Z., Němeček, Z. 2001. Ultrastructural localization of calcium deposits during in vitro culture of pig oocytes. *Molecular Reproduction and Development*. 58. p. 196–204.

- Petr, J., Rozinek, J., Vanourková, Z., Jílek, F. 1999. Cyclopiazonic acid, an inhibitor of calcium-dependent ATPases, induces exit from metaphase I arrest in growing pig oocytes. *Reproduction, Fertility and Development*. 11 (5). p. 235–246.
- Petr, J., Teplá, O., Grocholová, R., Jílek, F. 1993. Inhibition of meiotic maturation in growing pig oocytes by factor (s) from cumulus cells. *Reproduction, Nutrition, Development*. 34 (2). p. 149–156.
- Petr, J., Urbánková, D., Tománek, M., Rozinek, J., Jílek, F. 2002. Activation of in vitro matured pig oocytes using activators of inositol triphosphate or ryanodine receptors. *Animal reproduction science*. 70 (3). p. 235–249.
- Picton, H., Briggs, D., Gosden, R. 1998. The molecular basis of oocyte growth and development. *Molecular and Cellular Endocrinology*. 145. p. 27–37.
- Pozzan, T., Rizzuto, R., Vsipe, P., Meldolesi, J. 1994. Molecular and cellular physiology of intracellular calcium stores. *Physiological Reviews*. 74. p. 595–636.
- Prasanthi, K., Rajini, P. S. 2005. Morphological and biochemical perturbations in rat erythrocytes following in vitro exposure to Fenvalerate and its metabolite. *Toxicology in vitro*. 19 (4). p. 449–456.
- Procházka, R., Motlík, J., Fulka, J. 1989. Activity of maturation promoting factor in pig oocytes after microinjection and serial transfer of maturing cytoplasm. *Cellular Differentiation and Development*. 27. p. 175–181.
- Qian, Y. W. 2001. The polo-like kinase Plx1 is required for activation of the phosphatase Cdc25C and cyclin B-Cdc2 in *Xenopus* oocytes. *Molecular biology of the cell*. 12 (6). p. 1791–1799.
- Ratner, A. 1976. Effects of follicle stimulating hormone and luteinizing hormone upon cyclic AMP and cyclic GMP levels in rat ovaries in vitro. *Endocrinology*. 99 (6). p. 1496–1500.
- Reynaud, K., Driancourt, M. A. 2000. Oocyte attrition. *Molecular and Cellular Endocrinology*. 163. p. 101–108.

- Rime, H., Ozon, R. 1990. Protein phosphatases are involved in the in vivo activation of histone H1 kinase in mouse oocyte. *Developmental biology*. 141 (1). p. 115–122.
- Roderick, H. L., Berridge, M. J., Bootman, M. D. 2003. Calcium-induced calcium release. *Current Biology*. 13 (11). p. 425.
- Roeper, J., Lorra, C., Pongs, O. 1997. Frequency-dependent inactivation of mammalian A-type K⁺ channel K(V)1.4 regulated by Ca²⁺/calmodulin-dependent protein kinase. *Journal of Neuroscience* 17. p. 3379–3391.
- Rosselli, M., Imthurn, B., Macas, E., Keller, P. J., Dubey, R. K. 1994. Circulating nitrite/nitrate levels increase with follicular development: indirect evidence for estradiol-mediated NO release. *Biochemical and Biophysical Research Communications*. 202. p. 1543–1552.
- Rosselli, M., Keller, R. J., Dubey, R. K. 1998. Role of nitric oxide in the biology, physiology and pathophysiology of reproduction. *Human Reproduction Update*. 4 (1). p. 3–24.
- Rozinek, J., Vaňourková, Z., Sedmíková, M., Lánská, V., Petr, J., Rajmon, R., Jílek, F. 2003. Ultrastructural localisation of calcium deposits in pig oocytes maturing in vitro: effects of verapamil. *Zygote*. 11. p. 253–260.
- Rusnak, F., Mertz, P. 2000. Calcineurin: Form and function. *Physiological Reviews*. 80 (4). p.1483–1521.
- Ryeom, S., Baek, K. H., Rioth, M. J., Lynch, R. C., Zaslavsky, A., Birsner, A., Yoon, S. S., McKeon, F. 2008. Targeted deletion of the calcineurin inhibitor DSCR1 suppresses tumor growth. *Cancer Cell*. 13 (5). p. 420–431.
- Sathanathan, A. H., Trounson, A. O. 2000. Mitochondrial morphology during preimplantational human embryogenesis. *Human Reproduction*. 15 (2). p. 148–159.
- Sartain, C. V., Wolfner, M. F. 2013. Calcium and egg activation in *Drosophila*. *Cell calcium*, 53(1), p. 10-15.
- Sela-Abramovich, S., Galiani, D., Nevo, N., Dekel, N. 2008. Inhibition of rat oocyte maturation and ovulation by nitric oxide: mechanism of action. *Biology of Reproduction*. 78 (6). p. 1111–1118.

- Sengoku, K., Takuma, N., Horikawa, M., Tsuchiya, K., Komori, H., Sharifa, D., Tamate, K., Ishikawa, M. 2001. Requirement of nitric oxide for murine oocyte maturation, embryo development, and trophoblast outgrowth in vitro. *Molecular Reproduction and Development*. 58. p. 262–268.
- Sharma, R. K., Chowdhury, S. 1998. Ultrastructure changes in oocytes of caprine antral follicles. *Indian Journal of Animal Sciences*. 68 (4). p. 332–336.
- Shaw, K. T. Y., Ho, A. M., Raghavan, A., Kim, J., Jain, J. N., Park, J. C., Sharma, S., Rao, A., Hogan, P. G. 1995. Immunosuppressive drugs prevent a rapid dephosphorylation of transcription factor nfat1 in stimulated immune cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 92 (24). p. 11205–11209.
- Shen, X. R., Li, H. M., Ou, Y., Tao, W. B., Dong, A., Kong, J. L., Ji, C. N., Yu, S. N. 2008. The secondary structure of calcineurin regulatory region and conformational change induced by calcium/calmodulin binding. *Journal of Biological Chemistry*. 283 (17). p. 11407–11413.
- Shenolikar, S., Nairn, A. C. 1991. Protein phosphatases: recent progress. *Advances in second messenger and phosphoprotein research*. 23. p. 1–121.
- Shi, W.Q., Zhu, S.E., Zhang, D., Wang, W.H., Tang, G.L., Hou, Y.P, Tian, S.J. 2006. Improved development by Taxol pretreatment after vitrification of in vitro matured porcine oocytes. *Reproduction* 131, p. 795–804.
- Shiina, N., Moriguchi, T., Ohta, K., Gotoh, Y., Nishida, E. 1992. Regulation of a major microtubule-associated protein by MPF and MAP kinase. *The EMBO Journal*. 11. p. 3977–3984.
- Shimada, M., Yamashita, Y., Ito, J., Okazaki, T., Kawahata, K., Nishibori, M. 2004. Expression of two progesterone receptor isoforms in cumulus cells and their roles during meiotic resumption of porcine oocytes. *Journal of molecular endocrinology*. 33(1). p. 209–225.

- Schaeffer, H. J., Weber, M. J. 1999. Mitogen-activated protein kinases: specific messages from ubiquitous messengers. *Molecular and cellular biology*. 19 (4). p. 2435–2444.
- Schatten, G., 1994. The centrosome and its mode of inheritance: the reduction of the centrosome during gametogenesis and its restoration during fertilization, *Developmental Biology*. 165. p. 299–335.
- Schmidt, A., Rauh, N. R, Nigg, E. A., Mayer, T. U. 2006. Cytostatic factor: an activity that puts the cell cycle on hold. *Journal of Cell Science*. 119. p. 1213–1218.
- Schramm, R. D., Bavister, B. D. 1999. A macaque model for studying mechanisms controlling oocyte development and maturation in human and non-human primates. *Human Reproduction*. 14. p. 2544–2555.
- Schultz, R. M., Montgomery, R. R., Belanoff, J. R. 1983. Regulation of mouse oocyte meiotic maturation: Implication of a decrease in oocyte cAMP and protein dephosphorylation in commitment to resume meiosis. *Developmental Biology*. 97 (2). p. 264–273.
- Schwartz, D. A., Schultz, R. M. 1991. Stimulatory effect of okadaic acid, an inhibitor of protein phosphatases, on nuclear envelope breakdown and protein phosphorylation in mouse oocytes and one-cell embryos. *Developmental biology*. 145 (1). p. 119–127.
- Sirard, M. A., Dubuc, A., Bolamba, D., Zheng, Y., Coenen, K. 1993. Follicle-oocyte-sperm interactions in vitro and in vitro in pigs. *Journal of reproduction and fertility*. Supplement, 48. p. 3–16.
- Slavov. N., Carey. J., Linse. S. 2013. Calmodulin transduces Ca²⁺ oscillations into differential regulation of its target proteins. *ACS chemical neuroscience*. 4 (4). p. 601–612.
- Smith, G. D., Sadhu, A., Mathies, S., Wolf, D. P. 1998. Characterization of protein phosphatases in mouse oocytes. *Developmental biology*. 204 (2). p. 537–549.
- Soderlund, D. M. 2010. State-dependent modification of voltage-gated sodium channels by pyrethroids. *Pesticide Biochemistry and Physiology*. 97 (2). p. 78–86.

- Soderlund, D. M., Clark, J. M., Sheets, L. P., Mullin, L. S., Piccirillo, V. J., Sargent, D., Stevens, J. T., Weiner, M. L. 2002. Mechanisms of pyrethroid neurotoxicity: implications for cumulative risk assessment. *Toxicology*. 171 (1). p. 3–59.
- Song, J. L., Wong, J. L., Wessel, G. M. 2006. Oogenesis: single cell development and differentiation. *Developmental biology*. 300 (1). p. 385–405.
- Sousa, M., Barros, A., Tesarik, J. 1996. Preimplantation embryology The role of ryanodine-sensitive Ca²⁺ stores in the Ca²⁺ oscillation machine of human oocytes. *Molecular Human Reproduction*. 2 (4). p. 265–272.
- Soyal, S. M., Amleh, A., Dean, J. 2000. FIGalpha, a germ cell-specific transcription factor required for ovarian follicle formation. *Development*. 127 (21). p. 4645–4654.
- Stefanelli, C., Pignatti, C., Tantini, B., Stanić, I., Bonavita, F., Muscari, C., Caldarella, C. M. 1999. Nitric oxide can function as either a killer molecule or an antiapoptotic effector in cardiomyocytes. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Molecular Cell Research*. 1450 (3). p. 406–413.
- Stemmer, P. M., Klee, C. B. 1994. Dual calcium-ion regulation of calcineurin by calmodulin and calcineurin-B. *Biochemistry*. 33 (22). p. 6859–6866.
- Stojkovic, M., Motlík, J., Kölle S., Zakchartchenko, V., Alberio, R., Sinowatz, F., Wolf, E. 1999. Cell-cyclo control and oocyte maturation: Review of literature. *Reproduction in Domestic Animals*. 34. p. 335–342.
- Stuehr, D. J., Griffith, O. W. 1992. Mammalian nitric oxide synthases. *Advances in Enzymology and Related Areas of Molecular Biology*. 65. p. 287–346.
- Sun, Q. Y. 2003. Cellular and molecular mechanisms leading to cortical reaction and polyspermy block in mammalian eggs. *Microscopy research and technique*. 61 (4). p. 342–348.
- Sun, Q. Y., Lai, L., Park, K. W., Kuhholzer, B., Prather, R. S., Schatten, H. 2001. Dynamic events are differently mediated by microfilaments, microtubules, and mitogen-activated protein kinase during porcine oocyte maturation and fertilization in vitro. *Biology of Reproduction*. 64. p. 871–889.

- Sun, Q. Y., Nagai, T. 2003. Molecular mechanisms underlying pig oocyte maturation and fertilization. *Journal of Reproduction and Development*. 49. p. 347–359.
- Sun, Q. Y., Miao, Y. L., Schatten, H. 2009. Towards a new understanding on the regulation of mammalian oocyte meiosis resumption. *Cell Cycle*, 8(17), p. 2741–2747.
- Sun, X. S., Liu, Y., Yue, K. Z., Ma, S. F., Tan, J. H. 2004. Changes in germinal vesicle (GV) chromatin configurations during growth and maturation of porcine oocytes. *Molecular reproduction and development*. 69 (2). p. 228–234.
- Sundrud, M. S., Rao, A. 2007. New twists of T cell fate: control of T cell activation and tolerance by TGF-beta and NFAT. *Current Opinion in Immunology*. 19 (3). p. 287–293.
- Swain, J. E., Wang, X., Saunders, T. L., Dunn, R., Smith, G. D. 2003. Specific inhibition of mouse oocyte nuclear protein phosphatase-1 stimulates germinal vesicle breakdown. *Molecular reproduction and development*. 65 (1). p. 96–103.
- Swann, K. 1993. The soluble sperm osillogen hypothesis. *Zygote*. 1. p. 273–276.
- Swann, K., Ozil, J. P. 1994. Dynamics of the calcium signal that triggers mammalian egg activation. *International review of cytology*. 152. p. 183–222.
- Tadros, W., Lipshitz, H. D. 2009. The maternal-to-zygotic transition: a play in two acts. *Development*. 136. p. 3033-3042.
- Takayanagi, H. 2007. Osteoimmunology: shared mechanisms and crosstalk between the immune and bone systems. *Nature Reviews Immunology*. 7 (4). p. 292–304.
- Takeo, S., Hawley, R. S., Aigaki, T. 2010. Calcineurin and its regulation by Sra/RCAN is required for completion of meiosis in *Drosophila*. *Developmental Biology*. 344 (2). p. 957–967.
- Takeo, S., Swanson, S. K., Nandan, K., Nakai, Y., Aigaki, T., Washburn, M. P., Hawley, R. S. 2012. Shaggy/glycogen synthase kinase 3 β and phosphorylation of Sarah/regulator of calcineurin are essential for completion of *Drosophila* female meiosis. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 109 (17). p. 6382–6389.

- Takeo, S., Tsuda, M., Akahori, S., Matsuo, T., Aigaki, T. 2006. The calcineurin regulator Sra plays an essential role in female meiosis in *Drosophila*. *Current Biology*. 16 (14). p. 1435–1440.
- Tan, J. H., Wang, H., Sun, X., Liu, Y., Sui, H., Zhang, J. 2009. Chromatin configurations in the germinal vesicle of mammalian oocytes. *Molecular Human Reproduction*. 15 (1). p. 1–9.
- Tang, Z., Shu, H., Oncel, D., Chen, S., Yu, H. 2004. Phosphorylation of Cdc20 by Bub1 provides a catalytic mechanism for APC/C inhibition by the spindle checkpoint. *Mol Cell*. 16 (3). p. 387-397.
- Tao, J. Y., Fu, Z., Zhang, M. L., Xia, G., Lei, L., Wu, Z. L. 2005. Nitric oxide influences the meiotic maturation of porcine oocytes cultured in hypoxanthine-supplemented medium. *Journal of Animal Physiology and Animal Nutrition*. 89 (1–2). p. 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 (1-2). p. 93–103.
- Tash, J. S., Krinks, M., Patel, J., Means, R. L., Klee, C. B., Means, A. R. 1988. Identification, characterization, and functional correlation of calmodulin-dependent protein phosphatase in sperm. *The Journal of cell biology*. 106 (5). p. 1625–1633.
- Terret, M. E., Wassmann, K., Waizenegger, I., Maro, B., 2, Peters, JM. Verlhac, MH. 2003. The Meiosis I-to-Meiosis II Transition in Mouse Oocytes. Requires Separase Activity. *Development*. 13 (20). p. 1797-1802.
- Tevelde, E. R., Pearson, P. L., Broekma, F. J. 2000. *Studies in Profertility Series. 9. Female Reproductive Aging*. The Parthenon Publishing Group. New York. p. 316. ISBN: 185070676X.
- Thibault, C., Szollosi, D., Gerard, M. 1987. Mammalian oocyte maturation. *Reprod Nutr Dev*. 27. p. 865–896.

- Tong, C, Fan, H. Y., Chen, D. Y., Song, X. F., Schatten, H., Sun, Q. Y. 2003. Effects of MEK inhibitor U0126 on meiotic progression in mouse oocyte: microtubule organization, asymmetric division and metaphase II arrest. *Cell Research*. 13. p. 375–385.
- Törnell, J., Billig, H., Hillensjö, T. 1990. Resumption of rat oocyte meiosis is paralleled by a decrease in guanosine 3',5'-cyclic monophosphate (cGMP) and is inhibited by microinjection of cGMP. *Acta Physiologica Scandinavica*. 139. p. 511–517.
- Törnell, J., Billig, H., Hillensjö, T. 1991. REVIEW Regulation of oocyte maturation by changes in ovarian levels of cyclic nucleotides. *Human reproduction*. 6 (3). p. 411–422.
- Törnell, J., Brannstrom, M., Hillensjö, T. 1984. Different effects of cyclic nucleotide derivatives upon the rat oocyte-cumulus complex in vitro. *Acta Physiologica Scandinavica*. 122. p. 507–13.
- Touny, L. H., Banerjee, P. P. 2006. Identification of both Myt-1 and Wee-1 as necessary mediators of the p21-independent inactivation of the cdc-2/cyclin B1 complex and growth inhibition of TRAMP cancer cells by genistein. *Prostate*. 66 (14). p. 1542–1555.
- Tunquist, B. J., Maller, J. L. 2003. Under arrest: cytostatic factor (CSF)-mediated metaphase arrest in vertebrate eggs. *Genes Development*. 17. p. 683–710.
- Ueki, K., Muramatsu, T., Kincaid, R. L. 1992. Structure and expression of two isoforms of the murine calmodulin-dependent protein phosphatase regulatory subunit (calcineurin B). *Biochemical and biophysical research communications*. 187 (1). p. 537–543.
- Vaccari, S., Weeks, J. L., Hsieh, M., Menniti, F. S., Conti M. 2009. Cyclic GMP signaling is involved in the luteinizing hormone-dependent meiotic maturation of mouse oocytes. *Biology of reproduction*. 81 (3). p. 595–604.
- van den Hurk, R., Zhao, J. 2005. Formation of mammalian oocytes and their growth, differentiation and maturation within ovarian follicles. *Theriogenology*, 63(6). p. 1717–1751.

- Van Voorhis, B. J., Moore, K., Strijbos, P. J. L., Nelson, S., Baylis, S. A., Grzybicki, D., Weiner, C. P. 1995. Expression and localization of inducible and endothelial nitric oxide synthase in the rat ovary. *European Journal of clinical Investigation*. 96. p. 2719–2726.
- Vanderhyden, B. C. 2002. Molecular basis of ovarian development and function. *Frontiers in Bioscience*. 7. p. 2006–2022.
- Verlhac, M., Kubiak, J., Clarke, H., Maro, B. 1994. Microtubule and chromatin behavior follow MAP kinase activity but not MPF activity during meiosis in mouse oocytes. *Development*. 120. p. 1017–1025.
- Viana, K. S., Caldas-Bussiere, M. C., Matta, S. G., Faes, M. R., de Carvalho, C. S., Quirino, C. R. 2007. Effect of sodium nitroprusside, a nitric oxide donor, on the in vitro maturation of bovine oocytes. *Animal Reproduction Science*. 102. p. 217–227.
- Villa-Diaz, L. G., Miyano, T. 2004. Activation of p38 MAPK During Porcine Oocyte Maturation. *Biology of Reproduction*. 71. p. 691–696.
- Vitullo, A. D., Ozil, J. P. 1992. Repetitive calcium stimuli drive meiotic resumption and pronuclear development during mouse oocyte activation. *Developmental biology*. 151 (1). p. 128–136.
- Volarcik, K., Sheean, L., Goldfarb, J., Woods, L., Abdul-Karim, F. W., Hunt, P. 1998. The meiotic competence of in-vitro matured human oocytes is influenced by donor age: evidence that folliculogenesis is compromised in the reproductively aged ovary. *Human Reproduction*. 13. p. 154–160.
- Wang, J. H., Desai, R. 1976. Modulator binding protein. Bovine brain protein exhibiting the Ca²⁺-dependent association with the protein modulator of cyclic nucleotide phosphodiesterase. *Journal of Biological Chemistry*. 252 (12). p. 4175–4184.
- Wang, R. U. I. 2002. Two's company, three's a crowd: can H₂S be the third endogenous gaseous transmitter? *The FASEB Journal*. 16 (13). p. 1792–1798.

- Wang, X1, Swain, JE, Bollen, M, Liu, XT, Ohl, DA, Smith, GD. 2004. Endogenous regulators of protein phosphatase-1 during mouse oocyte development and meiosis. *Society for Reproduction and Fertility*. p. 493-502.
- Wassarman, P. M. 1988. The Mammalian Ovum In: *The Physiology of Reproduction*. eds. Knobil E. a Neill J., Raven Press Ltd., New York. p. 69–102.
- Wassarman, P. M., Fujiwara, K. 1978. Immunofluorescent anti-tubulin staining of spindles during meiotic maturation of mouse oocytes in vitro. *Journal of Cellular Science*. 29. p. 171–188.
- Wassarman, P. M., Josefowicz, W. J. 1978. Oocyte development in the mouse: an ultrastructural comparison of oocytes isolated at different stages of growth and meiotic competence. *Journal of Morphology*. 156. p. 209–236.
- Watanabe, N., Vandeoude, G., Ikawa, Y., Sagata, N. 1989. Specific proteolysis of the c-mos protooncogene product by calpain on fertilization of *Xenopus* eggs. *Nature*. 342. p. 505–511.
- Wehrend, A., Meinecke, B. 2001. Kinetics of meiotic progression, M-phase promoting factor (MPF) and mitogen-activated protein kinase (MAP kinase) activities during in vitro maturation of porcine and bovine oocytes: species specific differences in the length of the meiotic stages. *Animal reproduction science*. 66 (3). p. 175–184.
- White, Y. A., Woods, D. C., Takai, Y., Ishihara, O., Seki, H., Tilly, J. L. 2012. Oocyte formation by mitotically active germ cells purified from ovaries of reproductive-age women. *Nature medicine*. 18 (3). p. 413–421.
- Wickramasinghe, D, Ebert, K. M., Albertini, D. F. 1991. Meiotic competence acquisition is associated with the appearance of m-phase characteristics in growing mouse oocytes. *Developmental Biology*. 143. p. 162–172.
- Wigglesworth, K., Lee, K. B., O'Brien, M. J., Peng, J., Matzuk M. M., Eppig, J. J. Bidirectional communication between oocytes and ovarian follicular somatic cells is required for meiotic arrest of mammalian oocytes. *PNAS* 2013; 110. p. 3723–3729.

- Wolf, D. P., Zelinski-Wooten, M. 2001. Assisted Fertilization and Nuclear Transfer in Mammals. Human Press. Totowa. New Jersey. p. 320. ISBN:9780896036635.
- Yakel, J. L. 1997. Calcineurin regulation of synaptic function: From ion channels to transmitter release and gene transcription. *Trends in Pharmacological Sciences* 18. p. 124–134.
- Yamano, H., Gannon, J., Mahbubani, H., Hunt, T. 2004. Cell Cycle-regulated recognition of the destruction box of cyclin B by the APC/C in *Xenopus* egg extracts. *Molecular Cell*. 16. 13 (1). p. 2–3.
- Yamashita, M., Katsumata, M., Iwashima, M., Kimura, M., Shimizu, C., Kamata, T., Nakayama, T. 2000. T cell receptor-induced calcineurin activation regulates T helper type 2 cell development by modifying the interleukin 4 receptor signaling complex. *The Journal of experimental medicine*. 191 (11). p. 1869–1880.
- Yamauchi, J., Miyazaki, T., Iwasaki, S., Kishi, I., Kuroshima, M., Tei C., Yoshimura, Y. 1997. Effects of nitric oxide on ovulation and ovarian steroidogenesis and prostaglandin production in the rabbit. *Endocrinology*. 138 (9). p. 3630–3637.
- Yanagimachi, R. 1981. Mechanism of fertilisation in mammals In: *Fertilisation and embryonic development in vitro*. Eds. Mastroianni L. a Biggers J. D., Plenum Press. New York. p. 81–182.
- Yanagimachi, R. 1994. Mammalian fertilisation. *The Physiology of Reproduction*, eds. Knobil E. et Neil J., second edition, Raven Press. New York. p. 189–280.
- Yang, H., Bhat, G. K., Wadley, R., Wright, K. L., Chung, B. M., Whittaker, J. A., Dharmarajan, A. M., Sridaran, R. 2003. Gonadotropin-releasing hormone-agonist inhibits synthesis of nitric oxide and steroidogenesis by luteal cells in the pregnant rat. *Biology of Reproduction*. 68. p. 2222–2231.
- Yang, S. A., Klee, C. B. 2000. Low affinity Ca²⁺-binding sites of calcineurin B mediate conformational changes in calcineurin A. *Biochemistry*. 39 (51). p. 16147–16154.
- Yang, S. J., Zhang, L., Wei, Q. 2000. Activities and properties of calcineurin catalytic domain. *Chinese Science Bulletin*. 45 (15). p. 1394–1399.

- Yew, N, Mellini, M., Vande, Woude G. 1992. Meiotic initiation by the Mos protein in *Xenopus*. *Nature*. 355. p. 649–652.
- Yoshioka, K. 2004. Scaffold proteins in mammalian MAP kinase cascades. *Journal of biochemistry*. 135 (6). p. 657–661.
- Young, B., Paul, R. Wheater, P. R. 2006. Wheater's functional histology: a text and colour atlas. 5. vydání. Churchill Livingstone/Elsevier. p. 437, ISBN: 044306850X, 9780443068508.
- Yu, H. T. 2002. Regulation of APC-Cdc20 by the spindle checkpoint. *Current Opinion in Cell Biology* 14. p. 706–714.
- Yuan, C., Wang, C., Gao, S. Q., Kong, T. T., Chen, L., Li, X. F., Wang, Y. B. 2010. Effects of permethrin, cypermethrin and 3-phenoxybenzoic acid on rat sperm motility in vitro evaluated with computer-assisted sperm analysis. *Toxicology in Vitro*. 24 (2). p. 382–386.
- Yudkovsky, Y, Shteinberg, M, Listovsky, T, Brandeis, M, Hershko, A. 2000. Phosphorylation of Cdc20/fizzy negatively regulates the mammalian cyclosome/APC in the mitotic checkpoint. *Biochem Biophys Res Commun*. 271 (2). p. 299–304.
- Yue, C., White, K. L., Reed, W. A., Bunch, T. D. 1995. The existence of inositol 1, 4, 5-trisphosphate and ryanodine receptors in mature bovine oocytes. *Development*. 121 (8). p. 2645–2654.
- Yurewicz, E. C., Sacco, A. G., Subramanian, M. G. 1987. Structural characterization of the Mr =55,000 antigen (ZP3) of porcine oocyte zona pellucida. Purification and characterization of alpha- and beta-glycoproteins following digestion of lactosaminoglycan with endo-beta-galactosidase. *Journal of Biological Chemistry*. 262 (2). p. 564–71.
- Zamboni, L. 1970. Ultrastructure of mammalian oocytes and ova. *Biology of Reproduction*. 2. p. 44–63.

- Zhang, X., Khimji, I., Shao, L., Safaee, H., Desai, K., Keles, H. O., Demirci, U. 2012. Nanoliter droplet vitrification for oocyte cryopreservation. *Nanomedicine*. 7 (4). p. 553–564.
- Zhou, B., Cron, R. Q., Wu, B. R., Genin, A., Wang, Z. L., Liu, S., Robson, P., Baldwin, H. S. 2002. Regulation of the murine *Nfatc1* gene by NFATc2. *Journal of Biological Chemistry*. 277 (12). p. 10704–10711.