

Česká zemědělská univerzita v Praze

Fakulta agrobiologie, potravinových a přírodních zdrojů

Katedra veterinárních disciplín



**Biologické modely užívané v reprodukčních
biotechnologiích**

Bakalářská práce

Autor práce: Magdalena Bartáková

Vedoucí práce: prof. Ing. Mgr. Markéta Sedmíková, Ph.D.

© 2016 ČZU v Praze

Čestné prohlášení

Prohlašuji, že svou bakalářskou práci "Biologické modely užívané v reprodukčních biotechnologiích" jsem vypracovala samostatně pod vedením vedoucího bakalářské práce a s použitím odborné literatury a dalších informačních zdrojů, které jsou citovány v práci a uvedeny v seznamu literatury na konci práce. Jako autorka uvedené bakalářské práce dále prohlašuji, že jsem v souvislosti s jejím vytvořením neporušil autorská práva třetích osob.

V Praze, dne 5. dubna 2016

Poděkování

Ráda bych tímto poděkovala paní prof. Ing. Mgr. Markétě Sedmíkové, PhD. za přívětivost a laskavé vedení mé práce.

Ing. Markétě Dvořákové tímto děkuji za trpělivost, ochotu, nespočet cenných rad a pomoc při mé práci a v laboratoři.

Velký dík za všestrannou a neocenitelnou podporu a pomoc při studiu patří mé rodině a Petrovi.

Souhrn

Některé metody reprodukčních biotechnologií, jako jsou oplození *in vitro*, tvorba transgenních organismů, klonování a jiné laboratorní techniky, jsou závislé na dostupnosti plně dozrálých meioticky kompetentních oocytů. Jen takové oocyty jsou schopné dosáhnout metafáze II, být oplozeny a schopny korektního embryonálního vývoje. Každá samice má však takových oocytů v konkrétním čase jen omezené množství, často velmi malé. Zdrojem meioticky kompetentních oocytů ale mohou být i oocyty dosud nedozrálé, kterých na vaječnicích najdeme mnoho. Jejich kultivací a zráním *in vitro* lze získat oocyty meioticky kompetentní a v dostatečném množství. Porozumění mechanismům a regulaci zrání nám může v tomto významně pomoci. Proto je zrání oocytů častým předmětem zkoumání v laboratořích.

Pro vlastní studium meiotického zrání pak lze využívat celou řadu modelových organismů, z nichž každý má své výhody i nevýhody. Volba toho konkrétního závisí na povaze experimentu a jeho účelu.

Cílem této práce bylo shrnout, jaké jsou nejčastěji využívané modely, postihnout pozitiva i negativa využití každého z nich, náročnost chovu modelového organismu. Z dalších vlastností jsou důležité délka zrání, dostupnost oocytů, náročnost *in vitro* kultivace, genetická příbuznost s člověkem a další.

Zdrojem velkého množství oocytů při malých nákladech na chov a jejich zisk je například octomilka. Z hlediska zkoumání vlivu, koncentrací a lokalizace molekul regulujících meiotické zrání jsou velmi vhodné oocyty obojživelníků nebo ryb, protože jsou relativně velké a v případě ryb i průhledné. Pro případné uplatnění výsledků experimentů ve šlechtění a reprodukčních biotechnologiích hospodářských zvířat, je třeba ale dané pokusy vždy ověřovat také na savcích modelech, jako jsou myš domácí a prase. Využít lze ale i modely méně obvyklé, je-li k dispozici dostatečný počet takových oocytů. Z běžných savčích modelů je fyziologicky nejbližší člověku prase domácí, které je i vzhledem k dostupnosti prasečích oocytů vhodným modelem pro účely využití výsledků experimentu v humánní medicíně, konkrétně léčbě neplodnosti.

Vzhledem k šíři problematiky biotechnogických metod, nejen v reprodukci, jsem se ve své práci zaměřila pouze na oocyt, jakožto obecně významný model při studiu regulace buněčného cyklu, a na v praxi nejčastěji využívané modelové organismy. Oocyt je vhodným modelem pro výzkum signálních drah buněčného cyklu pro své relativně velké rozměry a množství proteinů, které jsou tak dostupné v dostatečném množství pro potřeby

biochemických studií. Zároveň je to buňka, se kterou se v laboratorních podmínkách poměrně dobře manipuluje.

Klíčová slova: biologické modely, danio, drápatka, myš, octomilka, oogeneze, prase, reprodukční biotechnologie

Biological models used in reproductive biotechnology

Summary

Some reproductive biotechnology methods such as in vitro fertilization, creation of transgenic organisms, cloning and other laboratory techniques, are dependent on the availability of a fully matured meiotic competent oocytes. Just such oocytes are able to reach metaphase II, and able to be fertilized of correct embryonic development. However, each female has a limited number of oocytes in specific time, often very small. Also immature oocytes, there are many in ovaries, can be the source of meiotic competent oocytes. By their cultivation and maturation in vitro can be obtained meiotic competence oocyte in sufficient quantities. The understanding of mechanisms and regulation of maturing can help significantly. This is the reason why oocyte maturation is a frequent laboratory research subject.

The in vitro maturation itself can be used for studying of variety organisms models, each of which has its advantages and disadvantages. The choice of the most specific model depends on the nature of the experiment and its purpose.

The aim of this bachelor thesis is to summarize what are the most commonly used models, capture the pros and cons of each use, and intensity of model organism breeding. From other attributes are important e.g. the maturation period, oocytes availability, intensity of the in vitro culture, the genetic affinities with a man, and others.

A drosophila is for instance the source of large quantities of oocytes at low cost for breeding and their profit. From the viewpoint of the influence investigation, concentration and localization molecules that regulate meiotic maturation are very suitable oocytes of a amphibian or fish, because they are relatively large and in the case of fish even transparent. For the possible application of the results in breeding experiments and livestock reproduction biotechnology, given attempts always need to be verified on mammalian models, such as mouse and domestic pig. You can also use less common models, if there is a sufficient number of such oocytes. Domestic pig is physiologically the closest to a man among current mammalian models, which is also due to the availability of porcine oocytes, an appropriate model for the purpose of utilizing the results of an experiment in human medicine, namely for the infertility treatment.

Given the breadth of biotechnological methods issues, not only in reproduction, my work focuses solely on the oocyte, as a major general model in the study of cell cycle

regulation, and the most commonly used organism models in practice. The oocyte is a suitable model for studying of cell cycle signaling pathways, because of its relatively large size and number of proteins, which are available in sufficient quantities for the purpose of biochemical studies. It is also the cell which is relatively well handled in laboratory conditions.

Keywords: African Clawed Frog, biotechnology models, fruit fly, mouse, oogenesis, pig, reproductive biotechnology, zebrafish

1 Obsah

2 Úvod.....	1
3 Cíl práce.....	3
4 Literární přehled	4
4.1 Oogeneze	4
4.1.1 Fáze proliferační.....	5
4.1.2 Fáze růstu.....	6
4.1.3 Fáze zrání	9
4.1.4 Faktory regulující průběh meiotického zrání.....	12
4.2 Modelové organismy.....	18
4.2.1 Moucha octomilka (<i>Drosophila melanogaster</i>).....	19
4.2.2 Danio pruhované (<i>Danio rerio</i>)	20
4.2.3 Drápatka vodní (<i>Xenopus laevis</i>)	22
4.2.4 Myš domácí (<i>Mus musculus</i>)	25
4.2.5 Prase domácí (<i>Sus scrofa f. domestica</i>)	27
4.2.6 Ostatní modelové organismy.....	30
5 Závěr	32
Použitá literatura	33

1 Úvod

Studium reprodukčních procesů živočichů má význam nejen v základním výzkumu, ale přináší i řadu praktických poznatků uplatnitelných v oblasti reprodukčních biotechnologií zvířat i lidí. Pod pojmem reprodukční biotechnologie rozumíme v obecném slova smyslu cílené zásahy do reprodukce.

Zjištění molekulárních mechanismů oplození je důležité nejen pro poznání fyziologie tohoto procesu, ale v humánní medicíně zvláště pro identifikaci příčin neplodnosti, následnou přípravu vhodných metodik a nástrojů k léčbě neplodnosti v centrech asistované reprodukce. Zjištění vlivu určitých látek, které se běžně vyskytují v životním prostředí, na reprodukční parametry, expresi genů a reprodukci, je důležité pro studium mechanismů ovlivňující zráním pohlavních buněk a další reprodukční procesy.

V chovech hospodářských zvířat reprodukční biotechnologie umožňují dosahovat vyšší užitkovosti na základě genové manipulace a genového inženýrství. Umožňují účinnější využívání gamet cenných jedinců, výměnu genetického materiálu prostřednictvím zamražených inseminačních dávek, embryí a případně oocytů, realizaci hygienických programů díky přenosu gamet či embryí a zvýšení genetického pokroku v šlechtění.

Některé metody reprodukčních biotechnologií, jako jsou oplození *in vitro*, tvorba transgenních organismů, klonování a jiné laboratorní techniky, jsou závislé na dostupnosti plně dozrálých meioticky kompetentních oocytů. Jen takové oocyty jsou schopné dosáhnout metafáze II, být oplozeny a schopny korektního embryonálního vývoje. Každá samice má však takových oocytů v konkrétním čase jen omezené množství, často velmi malé. Zdrojem meioticky kompetentních oocytů ale mohou být i oocyty dosud nedozrálé, kterých na vaječnicích najdeme mnoho. Jejich kultivací a zráním *in vitro* lze získat oocyty kompetentní a v dostatečném množství. Porozumění mechanismům a regulaci zráním nám může v tomto významně pomoci. Proto je zráním oocytů častým předmětem zkoumání v laboratořích.

Pro vlastní studium meiotického zráním pak lze využívat celou řadu biologických modelů, z nichž nabízí své výhody i nevýhody. Volba toho konkrétního závisí na povaze experimentu a na záměru, s jakým je prováděn. Pro ověřování hypotéz o fyziologii buněk, účinku a lokalizaci regulačních molekul, mitogenů a jiných lze využívat jako modely nižší organismy. Naopak živočichy vyšších řádů geneticky bližších člověku je třeba využít v případech, kdy existuje předpoklad uplatnění poznatků v humánní medicíně.

Z pohledu reprodukčních biotechnologií je oocyt vhodný model pro své relativně velké rozměry, schopnost dalšího vývoje i poměrně snadnou dostupnost, často bez nutnosti

usmrcení donora. Možnost získat a kultivovat oocyty různých druhů v minulosti zásadním způsobem přispěla a stále přispívá k porozumění regulace buněčného cyklu pohlavních i somatických buněk.

Vzhledem k šíři problematiky biotechnogických metod, nejen v reprodukci, jsem se ve své práci zaměřila pouze na oocyt, jakožto obecně významný model při studiu regulace buněčného cyklu, a na v praxi nejčastěji využívané modelové organismy. Oocyt je vhodným modelem pro výzkum signálních drah buněčného cyklu pro své relativně velké rozměry a množství proteinů, které jsou tak dostupné v dostatečném množství pro potřeby biochemických studií. Zároveň je to buňka, se kterou se v laboratorních podmínkách poměrně dobře manipuluje.

2 Cíl práce

Vzhledem k šíři problematiky biotechnogických metod, nejen v reprodukci, jsem se ve své práci zaměřila pouze na oocyt, jakožto obecně významný model při studiu regulace buněčného cyklu, a na v praxi nejčastěji využívané modelové organismy. Oocyt je vhodným modelem pro výzkum signálních drah buněčného cyklu pro své relativně velké rozměry a množství proteinů, které jsou tak dostupné v dostatečném množství pro potřeby biochemických studií. Zároveň je to buňka, se kterou se v laboratorních podmínkách poměrně dobře manipuluje.

Cílem této práce pak je shrnout, jaké modelové organismy jsou využívány v reprodukční biotechnologii a konkrétněji popsat ty, které jsou využívány nejčastěji: octomilka, danio, drápatka, myš a prase. Postihnout pozitiva i negativa využití každého z nich, náročnost chovu nebo v jakém množství a případně v jaké fázi zrání nám jsou schopny oocyty poskytnout. Dále posoudit jejich vhodnost s ohledem na cíl experimentu či výzkumu.

3 Literární přehled

Přestože ovaria byla poprvé rozpoznána a identifikována jako anatomická jednotka už 300 let př. n. l., existence savčího oocyty byla objevena až začátkem 19. století. O dalších padesát let později bylo pak potvrzeno, že pohlavně dospělá samice má během svého života k dispozici jen konečný počet oocytů (Eppig, 1993).

Goette (asi 1875) a Nussbaum (asi 1880) byli jedni z prvních, kteří rozpoznali, že primordiální zárodečné buňky (primordial germ cells, PGCs) vznikají z nediferencovaných buněk lokalizovaných nedaleko pohlavního hřebenu a objevují se před jeho formací. K porozumění následné organogenezi savčího vaječníku došlo poprvé na přelomu první a druhé dekády 20. století (Eppig, 1993; MacLennan *et al.*, 2015).

Později pak byla lépe objasněna problematika vývoje savčího oocyty. Bylo také zjištěno, že funkce vaječníků je pod kontrolou adenohipofýzy a bylo porozuměno i vztahu mezi oogenezí a folikulogenezí. Od šedesátých let 20. století jsou savčí oocyty úspěšně kultivovány v podmínkách *in vitro* (Eppig, 1993; MacLennan *et al.*, 2015).

3.1 Oogeneze

Oogeneze souhrnně označuje proces vzniku a vývoje samičích pohlavních buněk. Začíná již během embryonálního vývoje samice vznikem tzv. primordiálních zárodečných buněk, které se dále transformují v oogonie a primární oocyty, které se později v době pohlavní dospělosti samice dále transformují v oocyty vyšších řádů. Tento proces ustává nástupem klimakteria, po kterém k růstu a meiotickému zrání oocytů již nedochází (Wassarman, 1988).

Proces oogeneze probíhá v parenchymu vaječníku, následně ve folikulu a po jeho opuštění se dokončuje ve vejcovodu. Dělíme jej na fáze proliferační (množení), růstu a meiotického zrání. V poslední fázi pak dochází k redukci počtu chromozómů na haploidní sadu (Wassarman, 1988).

Meiotické dělení je klíčovým dějem gametogeneze, resp. oogeneze. Výsledkem meiotického dělení primordiálních zárodečných buněk je vznik jedné samičí gamety, která se vyznačuje tím, že je haploidní, a dvou nebo výjimečně tří pólových tělísek. Diploidní stav chromozómů je obnoven po oplození vajíčka spermii. Dále se oogeneze vyznačuje typickým zastavením svého průběhu v prvním a druhém meiotickém bloku (MacLennan *et al.*, 2015).

Vývoj samice	Embryonální vývoj	Narození	Postnatální vývoj	Puberta		Ovulace		Oplození
Stádium oogeneze	Množení		Růst	Zrání			Aktivace	
Stádium Meiózy	M I T Ó Z A	Leptotene Zygotene Pachytene Diplotene Dictyate	Zastavení meiózy 1 meiotický blok	Diakineze Metafáze I Anafáze I Telofáze I Metafáze II	2 meiotický blok		Anafáze II Telofáze II	
Vývoj oocytu	PGC	Oogonie	Nezralé vajíčko	GVBD	Dokončení meiózy I	Metafáze II	Dokončení meiózy II	

Obr. 1: Průběh oogeneze savců. Dle: Wassarman, 1988

3.1.1 Fáze proliferační

Formaci primordiálních zárodečných buněk začíná vlastní proces oogeneze. Podle některých starších studií je počet PGCs a tak celkový počet oocytů po narození samice definitivní (Wassarman, 1988). Některé nové studie ale naznačují schopnost mitotického dělení PGCs i po narození a tak možnost vzniku nových oocytů. Podle těchto prací mohou tedy zárodečné kmenové buňky sloužit jako zdroj oogonií i v době dospělosti samice (Johnson *et al.*, 2004).

PGCs jsou založeny jako populace progenitorových buněk ve velmi časně fázi embryonálního vývoje. Jsou první diferencovanou linií buněk embrya. Původně malý shluk buněk, které se začnou fenotypově odlišovat, začíná intenzivně proliferovat až do počtu několika tisíců buněk. Protože mají PGCs svůj původ mimo oblast vzniku budoucích gonád, patří k jejich fyziologickému vývoji typická migrace z proximálního epiblastu až do mezodermální oblasti (genitální lišta) v dorzální části embrya, kde se již nazývají gonocyty. Tato migrace je dokončena v různě dlouhé době v závislosti na živočišném druhu, u člověka je to asi šest týdnů, u prasete asi třicet dní *post coitum* (Romanovský *et al.*, 1988). Jejich další vývoj pak probíhá v utvářejících se pohlavních orgánech, kde podstupují další změny a stávají se z nich oogonie (v případě samičího plodu), které se od svých prekurzorů liší především morfologií a intenzitou mitotického dělení. Mitotické dělení oogonií u savců trvá jen několik dní a poté ustává (Wassarman, 1988).

Až v době kolonizace genitální lišty se začíná projevovat sexuální determinace PGCs, do té doby se jeví jako sexuálně indiferentní. Vliv na to má nejen vlastní gonozomální založení PGCs, ale i okolních somatických buněk (Ewen *et* Koopman, 2009).

PGCs jsou jedním ze tří základů pro vytvoření pozdějších funkčních gonád – kromě PGCs jsou to také coelomový epitel, budoucí folikulární buňky a Sertoliho buňky, a mezenchym genitální lišty, budoucí intersticiium, thekální a Leydigovy buňky (Kapeller *et* Pospíšilová, 2001).

Asi třináct dní po oplození vajíčka vstupují PGCs do meiotické profáze, čímž je zahájeno meiotické dělení (Wassarman, 1988).

Meiotickou profázi dělíme do pěti dílčích na sebe navazujících částí: *leptotene*, *zygotene*, *pachytene*, *diplotene* a *diakineze*. Ve stádiu *leptotene* vláknité chromozomy začínají kondenzovat. V *zygotene* je chromatin spiralizovaný do chromozómových párů tvořených čtyřmi chromatidami, tvoří tzv. bivalenty. V profázi ve stádiu *pachytene* jsou dobře patrné tzv. tetrády a probíhá crossing-over, který přispívá ke zvýšení genetické variability. Ve stádiu *diplotene* se tetrády rozestupují a jsou patrná chiasmata na chromozómech jako výsledek proběhlého crossing-overu. V této fázi se nachází většina oocytů v době narození samice. Během *diplotene*, v pozdní *diplotene*, zanikají chiasmata, rozpadá se jaderný obal a profáze končí (MacLennan *et al.*, 2015). Během *diakineze* pak dochází k rozchodu chromozómů k protilehlým pólům jádra.

Při porodu je již většina oocytů ve stádiu pozdní *diplotene*, asi pět dní po narození savčí samice jsou v tomto stádiu již všechny oocyty (Wassarman, 1988). V tomto stádiu, které nazýváme prvním meiotickým blokem, tzv. fáze zárodečného váčku (germinal vesicle, GV), zůstávají až do opětovného zahájení meiotického dělení v době pohlavní dospělosti samice (Setiadi, 1998).

Oocyt ve fázi zárodečného váčku je už během prenatálního vývoje lokalizován na vaječniku, kde zůstává bez jakýchkoli signifikantních změn až do puberty. Nezbytným impulsem pro znovuzahájení oogeneze je hormonální stimul v těle dospělé samice (Wassermann, 1988; Yanagimachi, 1988).

3.1.2 Fáze růstu

Během fáze růstu oocyty již neproliferují, zvětšují svůj objem a získávají meiotickou kompetenci, tedy schopnost znovuzahájit a úspěšně dokončit meiotické zrání. U člověka se kompletní výbava budoucích vajíček, která budou dozrávat v období pohlavní dospělosti,

nachází asi v pátém měsíci prenatalního vývoje. V tomto období oogene přestávají proliferovat, zvětšují svůj objem a přecházejí do stádia primárního oocyty. Ten se obaluje jednou vrstvou folikulárních buněk a spolu s nimi tvoří primární folikul. Ještě v době prenatalního vývoje vstupují všechny primární oocyty do meiózy. Oocyt je schopen znovuzahájit meiózu jen ve stavu tzv. meiotické kompetence, která souvisí jak s morfologií, tak s velikostí oocyty (Wassarmann, 1988; Yanagimachi, 1988).

V rostoucím oocyty se zvětšuje především objem cytoplazmy, roste počet mitochondrií a mění se jejich tvar a struktura, zvětšuje se počet organel endoplazmatického retikula (Wassarman, 1988). Rostoucí aktivitu Golgiho aparátu provází rovněž jeho strukturální a tvarové změny. Zmnožení buněčných organel je důležité pro produkci klíčových faktorů meiotického zrání (Wassarmann, 1988; Yanagimachi, 1988). Bez nich oocyt nedosahuje meiotické kompetence, není schopen správného průběhu meiotického dělení a korektní segregace chromozomů (Wassarmann, Albertini, 1994).

Dochází také k intenzivní syntéze *zóny pellucidy*, glykoproteinové membrány tvořící vnější vrstvu oocyty, která odděluje oocyt od folikulárních buněk při zachování vzájemné komunikace mezi nimi. *Zona pellucida* plně dorostlých savčích oocytů je propustná pro makromolekuly a menší viry. Disponuje receptory pro vazbu spermie a vyvolává akrozomální reakci spermie na svém povrchu. Slouží také jako funkční prvek prevence polyspermie, která je u většiny živočichů neslučitelná s dalším vývojem. Po oplození spermií dochází na *zoně pellucidě* k tzv. kortikální reakci, při které enzymy kortikálních granul mění její vlastnosti tak, aby byl znemožněn průnik další spermie (Florman *et al.*, 1984; Wassarman, 1988).

Dále se několikanásobně zvětšuje počet ribozómů i jejich objem (Wassarman, 1988). Tyto změny jsou nezbytné pro dosažení meiotické kompetence, která je charakterizována jako schopnost opětovně zahájit a korektně pokračovat v meiotickém zrání až do stádia metafáze II a vydělení prvního pólocyty (Petr *et al.*, 1996). Naopak fyziologicky meioticky kompetentní nejsou oocyty preantrálních folikulů.

3.1.2.1 Folikulogeneze

In vivo je celý proces oogeneze provázen současně probíhající folikulogenezí, zejména pak fáze růstu oocyty, kdy je průběh folikulogeneze velmi intenzivní.

Primordiální folikul

Během fáze růstu po dosažení stádia zárodečného vaku je oocyt obklopen jednou vrstvou plochých somatických, tzv. pregranulózniých buněk (Picton *et al.*, 1998). S nimi je spojen pomocí desmosómů a buněčných spojů gap junction. Toto spojení slouží k transportu nízkomolekulárních látek (Wassarman, 1988; Bielanska-Osuchowska, 2006). Ze všech původně přítomných zárodečných buněk dosáhne asi jen 40% stádia primordiálního folikulu (Guthrie *et Garrett*, 2001).

Primární folikul

Dalším vývojovým stádiem folikulu je tzv. primární folikul, který je tvořen pouze oocytem a jednou vrstvou granulárních buněk kubického tvaru. Pouze zlomek primárních folikulů na vaječniku prasnice se posléze vyvíjí dále. Nezbytné jsou k tomu hormonální stimuly v podobě působení folikuly stimulačního hormonu (FSH) a modulační faktory původem z granulózniých buněk a buněk *theca interna*, vrstvy buněk, jež jsou součástí *theca folliculi* na povrchu folikulu, a které vykazují endokrinní aktivitu (Manabe *et al.*, 2004; Bielanska-Osuchowska, 2006).

U různých druhů zvířat byly nalezeny různé faktory podílející se na regulaci vývoje primárního folikulu, jako jsou anti-Müllerův hormon (AMH), kostní morfologický faktor (Bone Morphologic Factor, BMP), růstový diferenciacní faktor (Growth Differentiation Factor, GDF-9). U myši (Zhao *et al.*, 2001) a skotu (Hulshof *et al.*, 1997) byl identifikován dále activin A, u skotu (Wandji *et al.*, 1996), koz (Silva *et al.*, 2004) a myši (Eppig *et O'Brien*, 1996) byl nalezen epidermální růstový faktor (Epidermal Growth Factor, EGF). Pro růst raného folikulu jsou nezbytné i faktory Wilmsův tumor protein (Wilms tumor Protein, WT-1) a steroidogenetický faktor (Steroidogenic Factor, SF-1) (Logan *et al.*, 2003).

Sekundární folikul

Třetí stádium folikulogeneze představuje sekundární folikul, který je tvořen oocytem a dvěma a více vrstvami granulárních buněk, který ještě nemá utvořené antrum (Manabe *et al.*, 2004). Jde o tzv. preantrální folikul. Granulózní buňky intenzivně proliferují a jejich vnější vrstvu začínají obklopotvat thékální buňky. Folikul v této fázi vývoje u prasete dosahuje až 300 μm , vlastní oocyt asi 90 μm (Van den Hurk *et al.*, 1997).

Během dalšího růstu folikulu začínají do prostoru mezi thékálními buňkami prorůstat krevní kapiláry, kterými jsou do folikulu transportovány endokrinní faktory, jako jsou luteinizační hormon (LH), folikuly stimulační hormon, gonadotropní hormon (GH), nervový

růstový faktor (NRF) a vazoaktivní intersticiální polypeptid (VIP). Sekundární folikul ještě neprodukuje estrogény (Van den Hurk *et al.*, 2000; Zhao *et al.*, 2000).

Antrální folikul

Posledním stádiem folikulogeneze je terciální neboli Graafův folikul. Terciální folikul již pod vlivem folikuly stimulačního hormonu přeměnou androgenů produkuje estrogény, ty stimulují granulózní buňky k tvorbě sekretů. Jejich hromaděním dochází k separaci granulózních buněk od sebe a vzniku antrální dutiny, jejíž přítomnost je pro Graafův folikul typická (Wassarman, 1988).

Vlastní oocyt je umístěn v místě tzv. vejconosného hrbolku (*cumulus oophorus*), který je tvořený nahromaděnými granulózními buňkami. Ta část kumulárních buněk, která přímo přiléhá k oocytu a komunikuje s ním, se nazývá *corona radiata*. Naopak buňky, které přímo přiléhají k folikulární stěně, nazýváme buňkami murálními (Wassarman, 1988).

Antrální dutina se plynule zvětšuje, granulózní buňky nadále proliferují a celý terciální folikul tak roste. Vlivem produkce folikulární tekutiny se folikul silně vyklenuje nad povrch vaječníku. Jde o poslední stádium vývoje folikulu. Graafův folikul praská při ovulaci, kdy jej opouští oocyt (Wassarman, 1988; Manabe *et al.*, 2004).

Počet současně ovulujících terciálních folikulů v době říje je druhově specifický. U prasete se v průběhu cyklu současně vyvíjí více než padesát folikulů, v souvislosti s poklesem hladiny folikuly stimulačního hormonu se dále vyvíjí jen několik dominantních folikulů, které až do ovulace produkuje značné množství estradiolu a inhibinu, který omezuje schopnost růstu folikulů menších, které později podléhají atrezii (Knox, 2005).

3.1.3 Fáze zrání

Ve fázi meiotického zrání dochází k heterotypickému dělení oocytů, jehož produktem je oocyt haploidní (Romanovská *et al.*, 1988). Jde tedy o transformaci plně dorostlého oocytu z terciálního folikulu v oplození schopné vajíčko (Wassarman, 1988).

Zrání oocytu spočívá ve dvou současně probíhajících dějích: zrání jaderném a zrání cytoplazmatickém. Po jejich korektním průběhu oocyt dosáhne metafáze II, kde je opět jeho vývoj dočasně zablokovan v tzv. druhém meiotickém bloku, Takový oocyt je schopný oplození a zahájení embryonálního vývoje (Setiadi, 1998; Eppig, 1993). *In vivo* je impulsem ke znovuzahájení a dokončení meiózy průnik spermie *zonou pellucidou*, případně spontánní

partenogenetická aktivace (Wassarman, 1998; Yanagimachi, 1988). Tu lze pro účely výzkumu buněčného cyklu uměle navodit také *in vitro*.

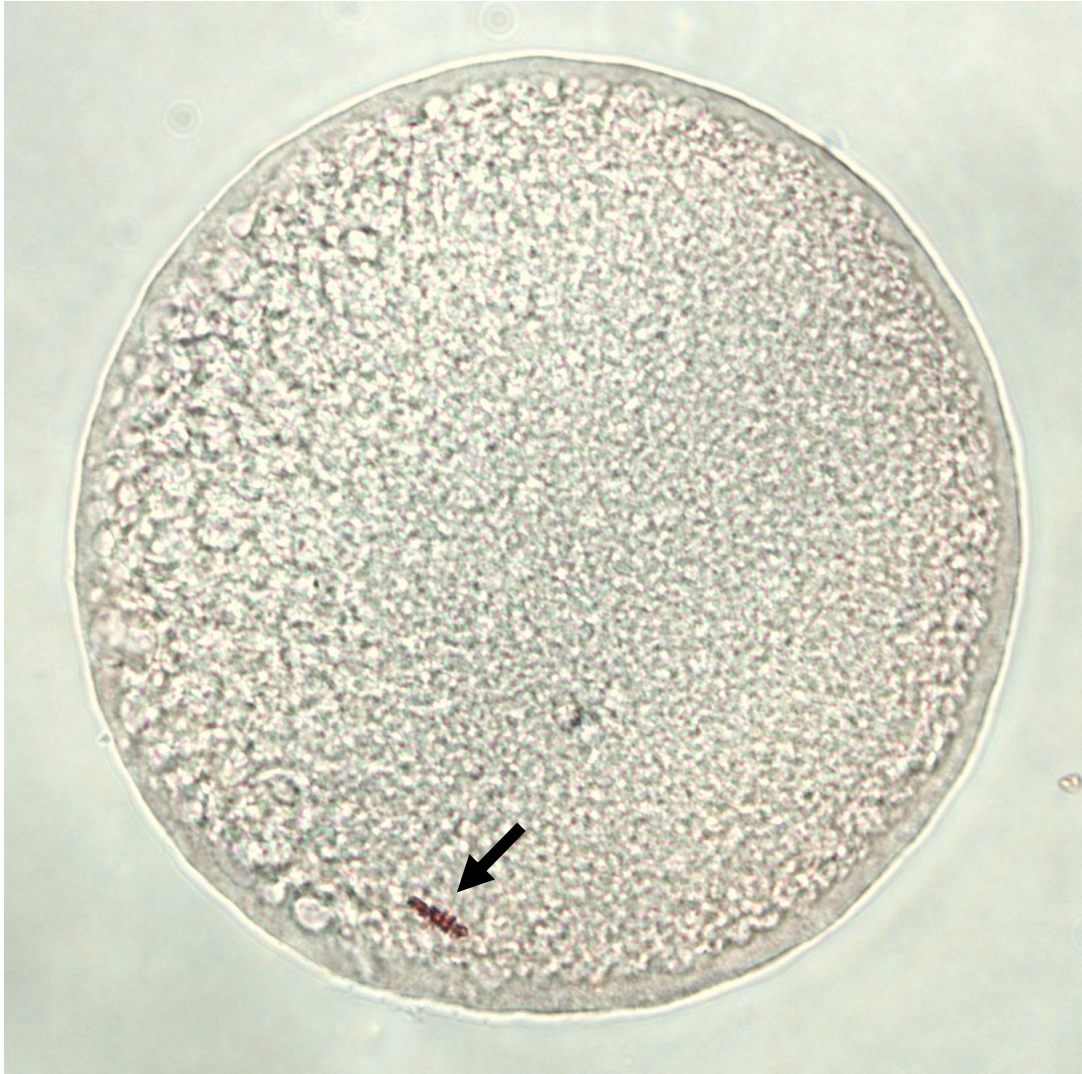
3.1.3.1 Jaderné zrání

Jádro oocyty v první meiotické profázi nazýváme zárodečným váčkem. Jeho rozpad a zdánlivé zmizení při mikroskopickém hodnocení je nejvýraznějším projevem znovuzahájení meiózy. Tento proces nazýváme rozpadem zárodečného váčku (germinal vesicle breakdown, GVBD). V podmínkách *in vivo* je před ovulací navozen náhlým nárůstem hladiny gonadotropinů, luteinizačního a folikuly stimulačního hormonu (Eppig, 1993).

Ve stádiu zárodečného váčku je jaderná membrána kompaktní a chromatin dekondenzovaný. Typicky nabývá v jádře tvaru kruhu nebo půlkruhu či podkovy (Motlík a Fulka, 1976; Wassarman, 1988).

Na počátku znovuzahájení meiózy probíhá GVBD. Projevuje se zpočátku mírným vlněním jaderné membrány, kdy zanikají jaderné póry. GVBD končí kompletním rozpadem a kompletním rozptýlením jaderné membrány (Wassarman, 1988). Chromatin je plně kondenzovaný a seskupen do shluku. Jde o stádium *diakineze* a u prasete trvá necelou hodinu. U prasete ke GVBD dochází za 12 - 20 hodin od začátku kultivace *in vitro* (Motlík a Fulka, 1976 *et* 1986), celý proces GVBD trvá asi 24 hodin (Wehrend *et* Mainecke, 2001).

Oocyt poté přechází do metafáze I, ve které jsou utvořeny bivalenty. U prasete metafáze I nastává mezi 24. a 33. hodinou kultivace. Chromozómy se přesouvají do ekvatoriální roviny a jsou spojeny metafázním vřeténkem. Následuje anafáze I, která je typická oddělováním homologních chromozómů a jejich rozestupem k opačným pólům jádra. U prasete tato fáze probíhá mezi 30. a 33. hodinou. Posléze, u prasete mezi 33. a 34. hodinou, oocyt vstupuje do telofáze I, kdy je dokončena meióza I (Kanawaga *et al.*, 1991).

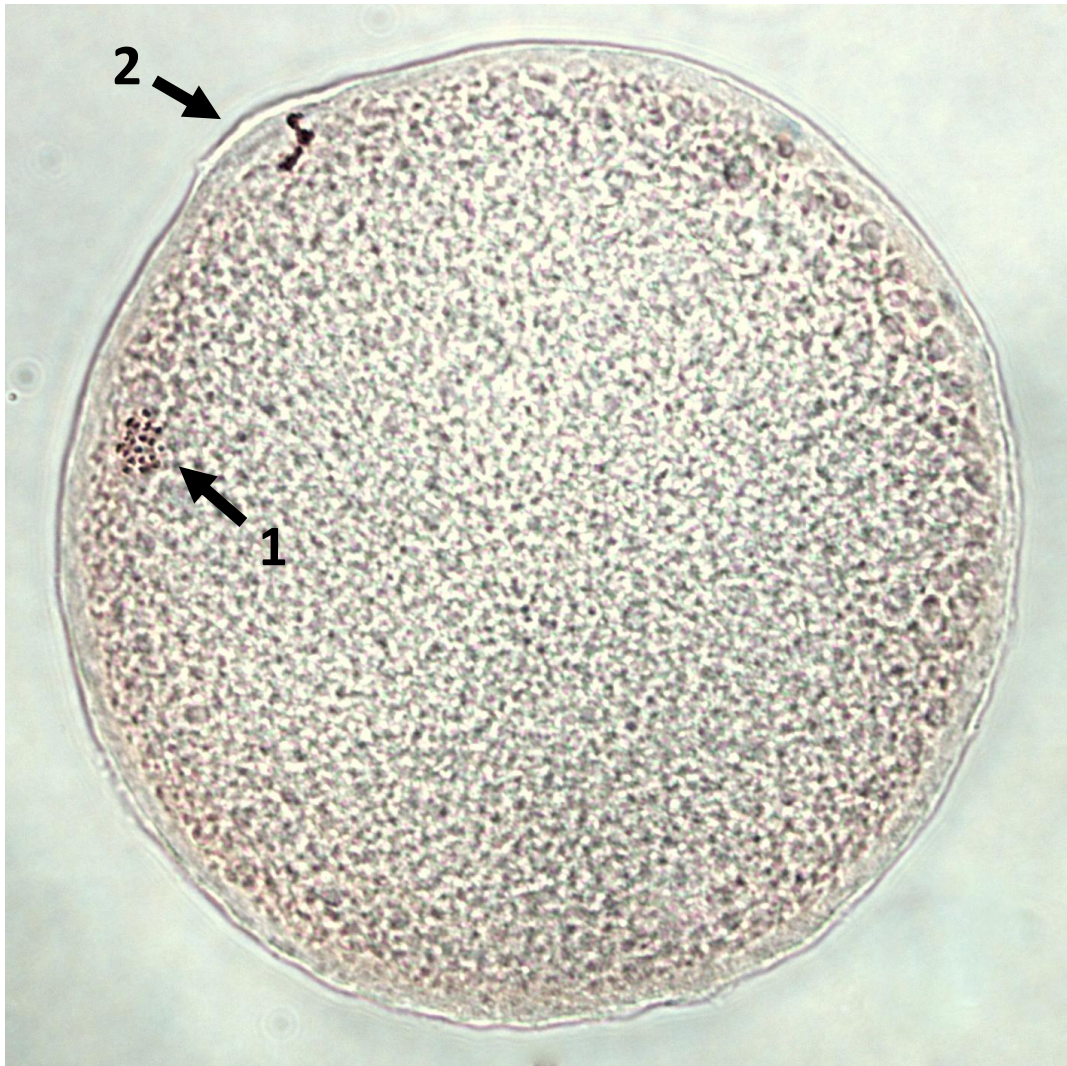


Obr. 2: Prasečí oocyt v meióze I s viditelným uspořádáním chromozómů v ekvatoriální rovině; barveno orceinem. Zvětšeno 400x.

Mezi meiózou I a II probíhá krátká interfáze, tzv. interkineze, kdy syntéza DNA neprobíhá (Kishimoto, 2003).

Následuje relativně rychlá profáze II a po ní poslední stádium, metafáze II, u prasete mezi 34. a 48. hodinou kultivace, která se vyznačuje vydělením prvního pólocytu, obsahujícího haploidní sadu chromozómů. Ty v pozdní telofázi podléhají degeneraci (Wassarman, 1988; Kanawaga *et al.*, 1991), jen ve výjimečných případech se pólocyt rozdělí. Poté je meióza podruhé zastavena v druhém meiotickém bloku (Wassarman, 1988; Kubišta, 1998).

Vliv na průběh zrání *in vitro* má také velikost folikulu, ze kterého byl oocyt získán. Oocyty z folikulů menších rozměrů vyžadují kvůli nižšímu stupni zralosti cytoplazmy delší dobu zrání (Machatkova *et al.*, 2009).



Obr. 3: Prasečí oocyt v metafázi II. (1) haploidní jádro oocytu, (2) vydělený první pólocyt; barveno orceinem. Zvětšeno 400x.

3.1.4 Faktory regulující průběh meiotického zrání

Oocyt schopný prodělat GVBD ještě nemusí být kompetentní k dokončení celého meiotického dělení (Eppig, 1993). GVBD schopnost však může být dosažena i společnou kultivací oocytů se somatickými buňkami a to i když oocyt nekomunikuje se somatickými buňkami pomocí spojů gap junction. Za těchto podmínek oocyt dosahuje GVBD kompetence v čase srovnatelném s vývojem oocytu *in vivo* (Eppig, 1993).

Identifikace a studium molekul podílejících se na regulaci celého meiotického zrání se stalo předmětem zkoumání mnoha experimentů. Mezi ty nejdůležitější, nejvýraznější a dosud známé patří Ca^{2+} , cyklický adenosin monofosfát (cyclic adenosine monophosphate, cAMP), M-fázi podporující faktor (Maturation Promoting Factor, MPF), mitogeny aktivovaná

protein kináza (Mitogen-activated Protein Kinase, MAPK), protein kináza A (Protein kinase A, PKA) a cytotatický faktor. Dále se na znovuzahájení zrání podílejí gonadotropiny.

Lze předpokládat, že konkrétní participující signální dráhy mezidruhově rozdílné nejsou, liší se ale relativní vliv jednotlivých faktorů na udržení oocyty ve fázi zárodečného váčku, resp. indukci GVBD.

3.1.4.1 Gonadotropiny

Pozorování spontánního GVBD u oocytů izolovaných a kultivovaných mimo antrální folikul vedlo k hypotéze, že somatické buňky antrálního folikulu jsou přímo zodpovědné za udržení druhého meiotického bloku až do momentu ovulace, kdy je GVBD indukován působením gonadotropinů. Degenerace vlastního folikulu pak vede k narušení systému udržujícího meiotický blok a zahájení zrání oocyty (Weingartová *et al.*, 2015).

Na znovuzahájení meiotického dělení se podílí zejména hormony folikuly stimulační a luteinizační prostřednictvím kumulárních buněk. Jejich vazbou na buněčné receptory kumulárních buněk je ovlivněno uvolnění druhých buněčných posílů. Jejich působením je následně uvolněn meiotický blok a znovuzahájeno zrání oocyty (Downs *et al.*, 1988, Eppig, 1989).

3.1.4.2 Ca^{2+} ionty

Vápenaté ionty plní úlohu intracelulárního posla, jsou tak důležitou signální a regulační molekulou. Zvýšení koncentrace Ca^{2+} v cytoplazmě buňky stimuluje proces GVBD. Ca^{2+} působí především prostřednictvím kalmodulinu, proteinu, který reguluje aktivitu fosfodiesterázy a ovlivňuje tak nástup GVBD (De Felici es Siracusa, 1982; Bornslaeger *et al.*, 1984).

Na efekt vápenatých iontů a kalmodulinu navazuje účinek calmodulin dependentní kinázy II (Calmodulin-dependent protein kinase II, CaMKII), která je považována za všestranný regulátor meiotického dělení. Působí regulačně na koncentraci cyklinu B, klíčové molekuly kontroly buněčného cyklu, a dalších nezbytných kináz. Její zvýšená aktivita je také schopna vyvolat vydělení prvního pólocyty (Fan *et al.*, 2003)

Z pokusů skutečně vyplývá, že zvýšení koncentrace vápníku v médiu nebo mikroinjekce inositoltrifosfátu (Inositol-tri-phosphate, IP_3), který mobilizuje vnitrobuněčný vápník, indukuje GVBD (Eppig, 1993).

Vápenaté ionty se dále účastní při aktivaci oocyty. Inhibice faktorů mobilizujících intracelulární zásoby vápníku zabraňuje spontánní aktivaci oocyty (Eppig, 1993).

3.1.4.3 cAMP

Cyklický adenosin monofosfát je derivátem adenosintrifosfátu (ATP) a většina buněk, prokaryotických i eukaryotických, ji využívá jako druhého buněčného posla v různých signálních drahách. Je klíčovým faktorem meiotického zrání savčích oocytů, během kterého působí jako inhibitor. Cyklický adenosin monofosfát je syntetizován adenylát-cyklázou, resp. štěpen fosfodiesterázou. Potlačením jejich aktivity, resp. stimulací je regulována vnitrobuněčná koncentrace cAMP (Alberts *et al.*, 1998; Conti, 1998).

Cyklický adenosin monofosfát může pocházet z granulózniých buněk a do oocyty se dostávat pomocí mezibuněčných membránových spojů gap junction, které umožňují difúzi nízkomolekulárních látek mezi buňkami granulózy navzájem a mezi buňkami granulózy a vlastním oocytem. Podobně tedy mohou těmito buněčnými spoji difundovat i jiné látky, které jsou strukturou a velikostí podobné cAMP. Tuto hypotézu podporují i pokusy, kdy bylo zvýšením koncentrace cAMP v kumulárních buňkách dosaženo nárůstu koncentrace cAMP i uvnitř oocyty. Není ale známo, zda tento proces probíhá i za fyziologických podmínek. Je také možné, že granulóza produkuje látky, které stimulují syntézu cAMP uvnitř oocyty. Je zřejmé, že i izolovaný oocyt určité množství cAMP produkuje, pravděpodobně ale ne dostatek pro udržení prvního meiotického bloku. Množství cAMP vyprodukované oocytem samotným je schopno nanejvýš počátek GVBD zpozdít (Eppig, 1993).

Zvýšená koncentrace cAMP v savčím oocyty udržuje setrvání v meiotickém bloku prostřednictvím cAMP-dependentní proteinkinázy A, která potlačuje aktivaci faktorů stimulujících meiotické zrání, nepřímou tedy působí na zrání oocyty inhibičně. Mezi hladinami cAMP a PKA tak existuje úzký vztah (Alberts *et al.* 1998; Conti *et al.*, 2012).

Četná pozorování svědčí o důležitosti udržení určité prahové hodnoty cyklického adenosin monofosfátu v GVBD kompetentních oocytech, zejména oocytech hlodavců. Také analogy cAMP udržují meiotický blok, přičemž oocyty hlodavců jsou na přítomnost takových sloučenin citlivější než oocyty primátů nebo skotu (Eppig, 1993).

Rozdílné výsledky jednotlivých pokusů pravděpodobně souvisí s mezidruhovými rozdíly v době potřebné k proběhnutí GVBD, kdy např. myší oocyty vyžadují výrazně kratší čas zrání než bovinní (Eppig, 1993). Je také nutno počítat s tím, že některé změny vnitrobuněčné koncentrace určitých faktorů (cAMP) mohou být signifikantní z hlediska

fyziologického působení, ale příliš malé na to, aby byly detekovány chemickou analýzou (Eppig, 1993).

3.1.4.4 PKA

Na regulaci buněčného cyklu se podílejí i fosforylační a defosforylační kaskády. Příkladem takového mechanismu je PKA, klíčová kináza podílející se na setrvání oocyty v meiotickém bloku. Ve své neaktivní formě, tedy bez přítomnosti cAMP, existuje jako holoenzym sestávající z několika dílčích podjednotek, které se liší svou lokalizací v buňce a citlivostí k vazbě na cAMP (Wang *et Liu*, 2004; Kovo *et al.*, 2006).

Protein kináza A je schopna inhibovat další faktory podílející se na setrvání v meiotickém bloku, především pak mitogeny aktivované protein kinázy. Mezi substráty Protein kinázy A patří kináza Wee1, která potlačuje aktivitu MPF, podílí se tak na mechanismu setrvání v meiotickém bloku (Shiomaoka *et al.*, 2011). PKA je dále hlavním regulátorem Cdc25, která aktivuje pre-MPF, což je další mechanismus, jímž působí na zrání oocyty inhibičně (Kishimoto, 2003).

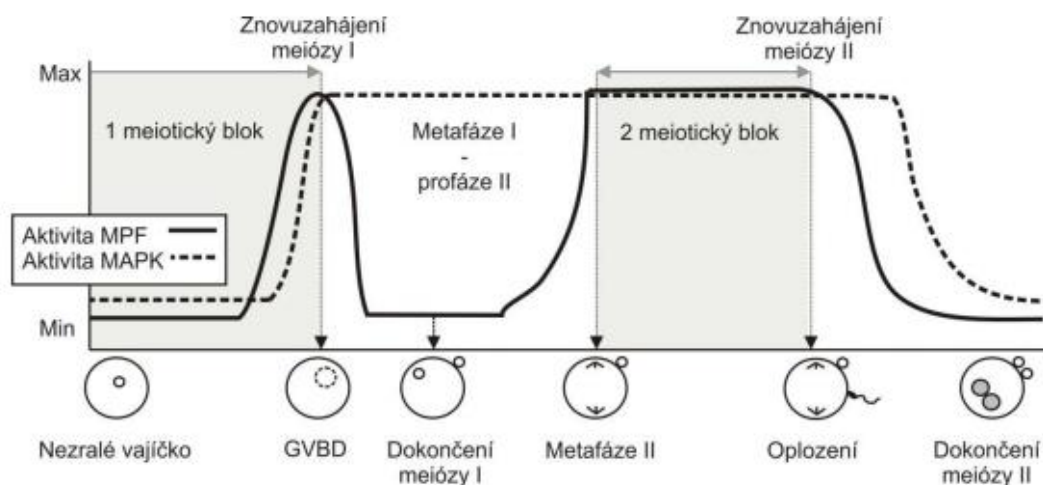
Míra působení protein kinázy A je mezidruhově rozdílná, například ošetření oocyty protein kinázou A má mnohem menší účinek na bovinní než na myší oocyty (Eppig, 1993).

3.1.4.5 preMPF a MPF

Dalším příkladem mechanismu fosforylační a defosforylační kaskády je M-fázi podporující faktor, protein odpovědný za průběh celého zrání oocyty a zejména pak za GVBD (Sorensen *et al.*, 1985; Gordo *et al.*, 2001). Jde o protein sestávající ze dvou podjednotek: regulační, kterou je cyklin B, a katalytické, kterou je serin/threonin kináza. Po jejich spojení je katalytická podjednotka fosforylována inhibičními kinázami Myt1 a Wee1. Vzniká tak pre-MPF, inaktivní forma MPF. Pre-MPF je akumulován v cytoplazmě oocyty během jeho růstu (Norbury *et Nurse*, 1992; Nebreda *et al.*, 1995). Pro znovuzahájení meiózy je třeba, aby byl pre-MPF defosforylován fosfatázou Cdc25 (Trounson *et al.*, 2001), ta je závislá na aktivaci polo-like kinázou 1 (Plk1) (Abrieu *et al.*, 1998; Karaickou *et al.*, 1999).

M-fázi podporující faktor se přímo podílí na rozpadu jaderné membrány a průběhu GVBD. Je také odpovědný za fosforylaci histonů DNA a spiralizaci chromozómů (Alberts *et al.*, 1998). MPF má význam při udržení oocyty ve fázi prvního a druhého meiotického bloku,

během kterých je aktivita MPF nízká. Pro znovuzahájení prvního meiotického dělení je nutný vzestup aktivity MPF (Yanagimachi, 1988; Hampl, 1995; Sugiura *et al.*, 2006).



Obr. 4: Aktivita MPF a MAPK během meiotického zrání savčího oocyty (dle Fan *et Sun*, 2004).

3.1.4.6 MAPK

Mitogeny aktivovaná protein kináza (mitogen-activated protein kinase, MAPK, nebo také extracellular signal-regulated kinase, ERK) patří do skupiny serin/treonin kináz a vyskytuje se v celkem pěti formách, které se mírně liší svým účinkem a substráty (Vila-Diaz *et Miyano*, 2004), z nichž nejčastěji exprimované jsou kinázy u savčích modelů označované jako MAPK1 a MAPK2 (Davis, 1993), souhrnně MAP kinázy. Vyskytují se ve všech eukaryotních buňkách (Fan *et al.*, 2002; Fan *et Sun*, 2004; Tao *et al.*, 2005) a jsou zapojeny do regulace zrání oocyty (Inoue *et al.* 1996).

Jsou regulovány signální kaskádou, která začíná aktivací mitogenem aktivované proteinkinázy kinázy kinázy (mitogen-activated protein-kinase kinase kinase, MAPKKK/Mos), ta aktivuje mitogenem aktivovanou protein kinázu kinázy (mitogen-activated protein kinase kinase, MAPKK/Mek) a ta následně aktivuje MAPK (Roux *et Blenis*, 2004).

Započetí aktivace celé této kaskády stimulují extracelulární stimuly, jako jsou mitogeny nebo cytokiny (Posada *et al.*, 1993; Maruta *et Burgess*, 1994; Li *et al.*, 2002; Tao *et al.*, 2005).

Dalšími stimulatory mohou být hormony, např. růstové faktory, folikuly stimulační hormon, u žab *Xenopus* jako stimulator aktivace MAPKKK působí progesteron (Posada *et al.*, 1993; Maruta *et Burgess*, 1994; Li *et al.*, 2002; Tao *et al.*, 2005).

Mezi konečné substráty aktivované přímo MAP kinázami patří poměrně rozsáhlá skupina kináz MAP kinázami aktivované protein-kinázy (MAPK-activated protein kinases, MAPKAPs/MKs) (Roux *et Blenis*, 2004). Konečný účinek MAP kináz je variabilní, obecně se ale uplatňují v regulaci genové exprese, buněčné proliferaci a diferenciaci a regulaci apoptózy (Tao *et al.*, 2005). Při meiotickém zrání a dělení oocyty jsou MAP kinázy potřebné k udržení chromatinu v kondenzovaném stavu a vydělení pólocyty (Hunter, 2000). Aktivita MAP kináz v granulózních buňkách není zcela objasněna, přispívají ale k omezení toku faktorů inhibujících meiotické zrání z granulózních buněk do oocyty (Sela-Abramovich *et al.*, 2005).

MAP kinázy mají regulační účinek na aktivaci MPF, nejsou pro tento proces však nezbytné (Kishimoto, 2003; Ohashi *et al.*, 2003). Zároveň i MPF působí na aktivitu MAP kináz – po své aktivaci MPF stimuluje maximální aktivitu MAP kináz signálních drah prostřednictvím aktivace MAPKKK (Fan *et al.*, 2002b). To však neplatí u žab *Xenopus*, kde je aktivace MAP kináz plně závislá na MPF. Mechanismus a míra závislosti vzájemného ovlivňování MAP kináz a MPF je tak druhově rozdílná (Gotoh *et Nishida*, 1995 in Ohashi *et al.*, 2003). V prasečích oocytech aktivita MAP kináz vzrůstá společně s MPF, později ale na rozdíl od MPF zůstává vysoce aktivní i v době poklesu aktivity MPF v době vydělení prvního pólocyty (Sun *et al.*, 2001).

3.1.4.7 Cytostatický faktor

Cytostatický faktor (CSF) je definován jako jako aktivita probíhající ve zrajících oocytech, která působí blokaci mitózy buněk během raného embryonálního vývoje. Brání degradaci cyklinu B a tím udržuje vysokou aktivitu M-fázi podporujícího faktoru. Inaktivace cystostatického faktoru je podmínkou inaktivace MPF a tedy i uvolnění oocyty z meiotického bloku MII v době oplození nebo partenogenetické aktivace. Hlavním prostředníkem inhibice cystostatického faktoru je CaMKII, která je Ca²⁺ dependentní. Jejím vlivem je degradována regulační složka MPF a inaktivována katalytická složka MPF (Masui *et al.*, 1971; Lorca *et al.*, 1993; Reimann *et Jackson*, 2002).

3.2 Modelové organismy

Předpokladem *in vitro* kultivace je získání oocytů ve fázi prvního meiotického bloku v podmínkách *in vitro*. Obecně je snaha při *in vitro* kultivaci maximálně napodobit fyziologické podmínky, což se nedaří zcela dokonale vzhledem k tomu, že nejsou dosud bezezbytku popsány a prozkoumány veškeré faktory zrání oocytů *in vivo*. Jde tedy vždy o určitý kompromis toho, co je možné zajistit, a toho, co zrající oocyt k vlastní korektní maturaci potřebuje. Při všech pokusech je třeba mít stále na paměti to, že podmínky *in vitro* kultivace jsou vždy více či méně odlišné od fyziologických podmínek.

Vývoj savčího oocytu je v době ovulace zastaven v metafázi druhého meiotického dělení a jeho zrání je dokončeno po jeho spontánním uvolnění z folikulu. Fyziologicky dochází k ovulaci oocytů ve fázi zárodečného váčku jen u psovitých šelem. Dozrání lze iniciovat i *in vitro* aspirací oocytu z folikulu a jeho kultivací. Dynamika a podmínky průběhu jaderného zrání jsou však druhově specifické. *In vitro* a *in vivo* oocyt morfologicky dozrává totožně, rozdíl je ale patrný po jejich oplození, kdy u oocytů dozrálých *in vitro* pozorujeme změny v oplozeníschopnosti a schopnosti korektního raného embryonálního vývoje (Setiadi, 1998).

Volba správné techniky a technologie experimentu má zásadní vliv na jeho úspěšnost. Jedním ze zásadních momentů je právě volba vhodného modelového organismu.

Jako modelové organismy pro účely studia regulace buněčného cyklu a oogeneze v praxi využíváme různé druhy živočichů, savce, obojživelníky, ryby i hmyz. Mezi ty v praxi nejvyužívanější patří octomilka (*Drosophila sp.*), danio pruhované (*Danio rerio*), drápatka vodní (*Xenopus laevis*), Myš domácí (*Mus musculus*), Prase domácí (*Sus scrofa f. domestica*). Využit lze ale oocyty prakticky jakéhokoliv druhu. Relativně často využívaný modelový organismus je také tur domácí (*Bos primigenius f. taurus*).

Z možných modelových organismů každý poskytuje svá pozitiva i negativa, volba toho konkrétního závisí na povaze experimentu a jeho účelu. Obecně od modelových organismů vhodných k využití ke studiu oogeneze vyžadujeme jejich snadný chov, vysokou úroveň reprodukce a tedy možnost průběžného získávání oocytů v dostatečném množství.

Hlavní výhodou oocytů ryb a obojživelníků je možnost získávat je průběžně v příznivém množství. Velkou výhodou je také jejich velikost, patří totiž mezi ty největší, a také jejich relativní nenáročnost na podmínky kultivace. Relativně nenáročný je i chov těchto živočišných druhů. Naopak nevýhodou je jejich genetická vzdálenost člověku, proto je problematická aplikace poznatků takto zjištěných do humánních reprodukčních

biotechnologií. V tomto směru se hodí pro rychlé a účinné ověření platnosti hypotéz funkce jednotlivých regulačních molekul a změn jejich lokalizace v oocyty během jeho zrání a to zejména díky tomu, že je v nich přítomno velké množství proteinů.

Z hlediska genetické příbuznosti člověku je vhodnější hojně využívaná myš domácí. Jde o druh rovněž nenáročný na chov a s vysokou úrovní reprodukce, poskytuje tedy značné množství oocytů. Díky laboratorním chovům myši jde také o organismus s relativně nízkou genetickou variabilitou. Zároveň jde již o savčí model fyziologicky podobnější člověku.

Prase domácí je model méně využívaný, ale obecně velmi vhodný pro výzkumné účely v humánní medicíně, protože je geneticky relativně příbuzný člověku. Má velmi podobnou orgánovou soustavu, jak morfologicky, tak fyziologicky. Jde o druh poměrně náročný na chov, s vysokou spotřebou krmiva, což částečně lze kompenzovat chovem pro tyto účely vyšlechtěných pokusných miniaturních plemen. V reprodukčních biotechnologiích při studiu oogeneze si ale vystačíme s vaječníky, které lze snadno a v relativně velkém množství získat z jatek po porážce prasniček. Celá problematika chovu tak přechází na chovatele v živočišné výrobě, což činí z prasete zdroj pokusného materiálu, který je navíc levný. Z takto získaných vaječníků pak v laboratorních podmínkách můžeme získat celé folikuly v různých stádiích vývoje nebo jen oocyty. Díky přirozené multiparitě prasat z jednoho vaječníku získáme velký počet využitelných oocytů.

3.2.1 Moucha octomilka (*Drosophila melanogaster*)

Drosophila melanogaster, česky octomilka, je hmyz patřící do řádu dvoukřídlí (*diptera*), je oblíbeným tradičním modelem zejména v genetických laboratořích.

Jednou z velkých výhod je snadný chov tohoto druhu. *Drosophila* se laboratorně chová v Erlenmeyerových baňkách při pokojové teplotě nebo v termostatu při stálé teplotě asi 25°C. Na dno baňek se pak nalévá živné médium připravené z kukuřičného šrotu, cukru, agaru a sušených kvasnic, to se následně přikryje filtračním papírem. Baňku s octomilkami je vhodné uzavřít vatovou zátkou tak, aby byl zajištěn přístup kyslíku (Jebavý *et al.*, 2011; Ables, 2015).

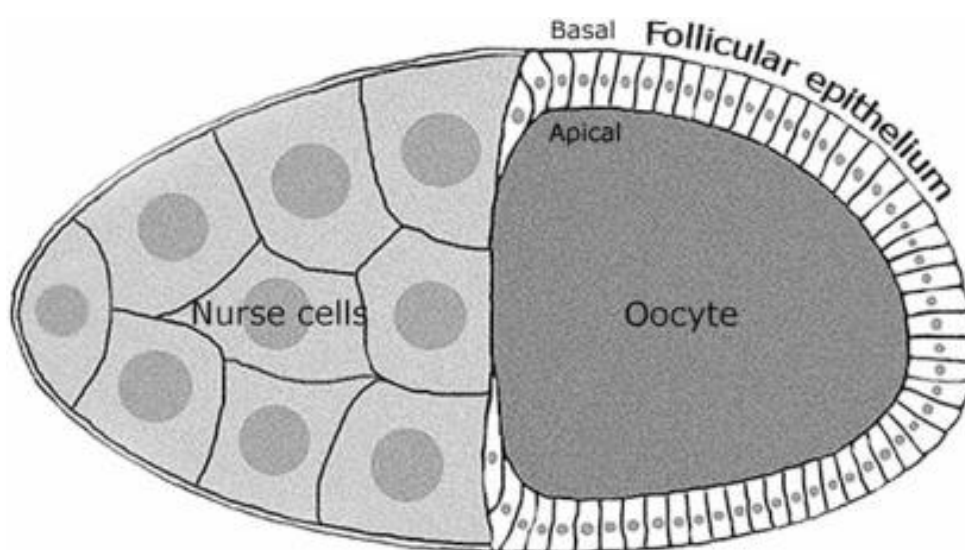
Další výhodou octomilky je její krátká generační doba a početné potomstvo. Vývoj od vajíčka po imago trvá jen čtyřicet až padesát dnů a samičky jsou schopné páření již za dvanáct hodin od vylíhnutí, samečci ještě dříve. Za šest až osm dnů od páření pak samičky kladou až tři sta vajíček (Jebavý *et al.*, 2011). Relativně snadno také lze octomilky sexovat dle podoby zbarvení zadečku.

U octomilek je dále vyšlechtěna celá řada mutantních linií s rozdílnými geneticky založenými znaky, např. barva očí nebo těla, morfologie křídel a jiné (Ables, 2015).

Dalším důvodem, proč je obecně oblíbeným biologickým modelem, je její relativně malý genom. Sestává z osmi chromozómů, z toho dvou metacentrických gonozómů X a Y.

Z výše uvedených důvodů byla od počátku minulého století často využívána a umožnila objasnit mnoho obecných molekulárně-biologických principů (Ables, 2015).

Jde o model s mnoha výhodami, z pohledu reprodukčních biotechnologií však tento model nemusí být optimální volbou, zejména pro účely uplatnění poznatků v humánní reprodukční medicíně, protože jde o druh relativně nepřibuzný člověku (Ables, 2015).



Obr. 5: Oocyt ve folikulu druhu *Drosophila melanogaster*. *Oocyte* – vlastní oocyt. *Nurse cells* – pomocné buňky. *Follicular epithelium* – folikulární buňky tvořící epitel. (Froldi *et al.*, 2008)

3.2.2 Danio pruhované (*Danio rerio*)

Danio je malá sladkovodní ryba, z čeledi kaprovitých (*Cyprinidae*), třídy paprskoploutvých (*Actinopterygii*). Pochází z oblasti východní Indie a Bengálska, kde obývá přítoky řeky Gangy (Lawrence, 2007).

Danio patří k oblíbeným biologickým modelům a proto se s ním lze v posledních desetiletích často setkat v biologických nebo genetických laboratořích. Důvody jsou například nízká pořizovací cena a snadný a levný chov. Termoneutrální teplota dania je 16,5 až 34°C. V umělém laboratorním chovu se doporučuje jako optimální teplota vody asi 28°C, ale dobře

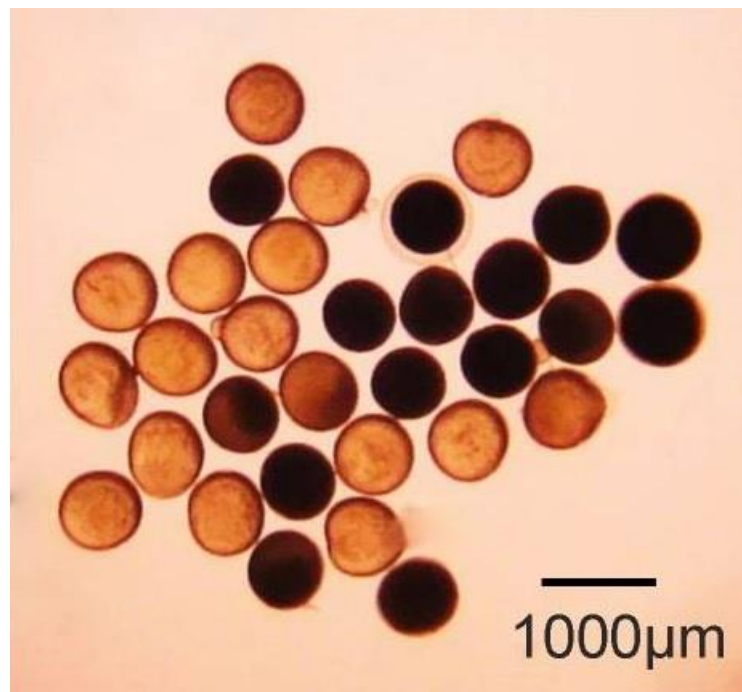
se mu daří při běžných pokojových teplotách a jeho chov tak nevyžaduje mimořádné podmínky. (Lawrence, 2007).

Důležitou vlastností dania je velký počet gamet a embryí, které je schopno poskytnout. Jedna samička je ob den schopna naklást až stovky jiker (Spence *et al.*, 2008). Embrya se vyvíjejí mimotělně a jsou průhledná, což umožňuje jednoduché sledování embryonálního vývoje přímo pod mikroskopem. To nachází své uplatnění zejména ve studiu ontogeneze obratlovců a vývojových poruch plodů (Zapata *et al.*, 2006).

Nespornou výhodou je i krátká generační doba tohoto druhu (Hill *et al.*, 2005).

V roce 2005 byl dokončen projekt přečtení genomu dania, což umožnilo široké množství zkoumání vlivu nejrůznějších molekul na genovou expresi na molekulární úrovni (Scholz *et al.*, 2008).

Z výše uvedeného je zřejmé, že danio je model významný nejen pro účely využití v humánní medicíně ale i v ochraně životního prostředí (Petr, 2007).



Obr. 6: Fotografie oocytů *Dania reria* po třech hodinách kutlivace *in vitro*. Oocyty po proběhlém GVBD jsou světlé, oocyty, které GVBD neprodělaly, zůstávají tmavé až černé. Zvětšeno 10x. (Peyton *et Thomas*, 2011).

3.2.3 Drápatka vodní (*Xenopus laevis*)

Drápatka vodní je bezocasý obojživelník, žába, patřící do rodu pipovití (*Pipidae*). Původním areálem tohoto druhu jsou stojaté i tekoucí vody jižní a východní Afriky, v minulosti byl ale zavlečen i na další kontinenty. Je tolerantní ke zvýšené salinitě i změnám pH. Jde o výlučně vodního živočicha. U drápatky je výrazný pohlavní dimorfismus, nejvýraznějším rozlišovacím znakem je tělesný rámec – samice dorůstají délky až patnáct centimetrů, samci jsou o třetinu menší. Pohlavně dospívá ve věku 8 – 12 měsíců (Dulleman, 1994).

V přirozeném prostředí se drápatky rozmnožují v létě a to až čtyřikrát za rok, samice tak je schopna v jednom roce vyprodukovat až dvacet sedm tisíc vajíček. Dva až tři dny po oplodnění se pak z vajíček líhnou pulci. V zajetí lze drápatky k páření stimulovat zvýšením teploty a aplikací lidského choriového gonadotropinu (human chorion gonadotropin, hCG) do prostředí (Moosová, 2008).

Samice drápatky má párové vaječníky, které vyplňují téměř celou břišní dutinu. Jsou obaleny peritoneem (*theca externa*) a uvnitř rozdělené vnitřní membránou (*theca interna*) na malé váčky, které obsahují vlastní folikuly ve značném množství (Romanovský, 1974).

Mitotické dělení oogonií obojživelníků probíhá celoživotně. Primární oocyty vstupují do meiózy, která je fyziologicky přerušena v *diplotene* profáze I v prvním meiotickém bloku. Oocyt, jehož vývoj je zastaven v prvním meiotickém bloku, intenzivně roste, dochází ke zmnožení počtu organel, akumuluje proteiny a dosahuje meiotické kompetence a uzavírá se v tenkostěnném folikulu, kterým je těsně obklopen. Folikulární buňky komunikují s oocytem přes mezibuněčné spoje gap junction a podílí se na tvorbě žlutku a regulaci meiózy (Browne *et al.*, 1979).

Růst oocyty není plně synchronizován a na obou vaječnicích najdeme oocyty v různých stádiích vývoje. Jednotlivé fáze růstu oocytů lze klasifikovat do pěti nebo šesti stádií (Dumont, 1972).

Plně dorostlý oocyt ve finálním stádiu dosahuje 1,3 mm v průměru s viditelným animálním, tmavým, a vegetativním, světlým, pólem. Nepigmentovaný ekvatoriální pás se nachází mezi těmito póly. Zárodečný váček je situován uprostřed oocyty a obsahuje několik jadérek s velkým množstvím mRNA. Stejně jako u lidských nebo prasečích oocytů, jen plně dorostlé oocyty obojživelníků jsou meioticky kompetentní a schopny znovuzahájit meiózu a dokončit meiotické zrání (Raasar, Hammes, 2006).

Zrání oocytů drápatky vodní je fyziologicky regulováno prostřednictvím epifyzárních gonadotropinů, které podněcují folikulární buňky k tvorbě hormonu progesteronu. Ten lze použít i při *in vitro* kultivaci oocytů. Jen plně dorostlé oocyty reagují *in vitro* na ošetření progesteronem (Smith, Ecker, 1970).

Progesteron se váže na receptory v cytoplazmatické membráně oocytu a na příslušné receptory rozpuštěné v ooplazmě. Tím inhibuje adenylát cyklázu (AC) a snižuje nitrobuněčnou koncentraci cyklického adenosin monofosfátu, který brání znovuzahájení meiózy. Proto je pokles aktivity cAMP-dependentní protein kinázy A zodpovědný za uvolnění prvního meiotického bloku. Nízká aktivita protein kinázy A je adekvátním stimulem ke GVBD (Palmer, Nebreda, 2000).

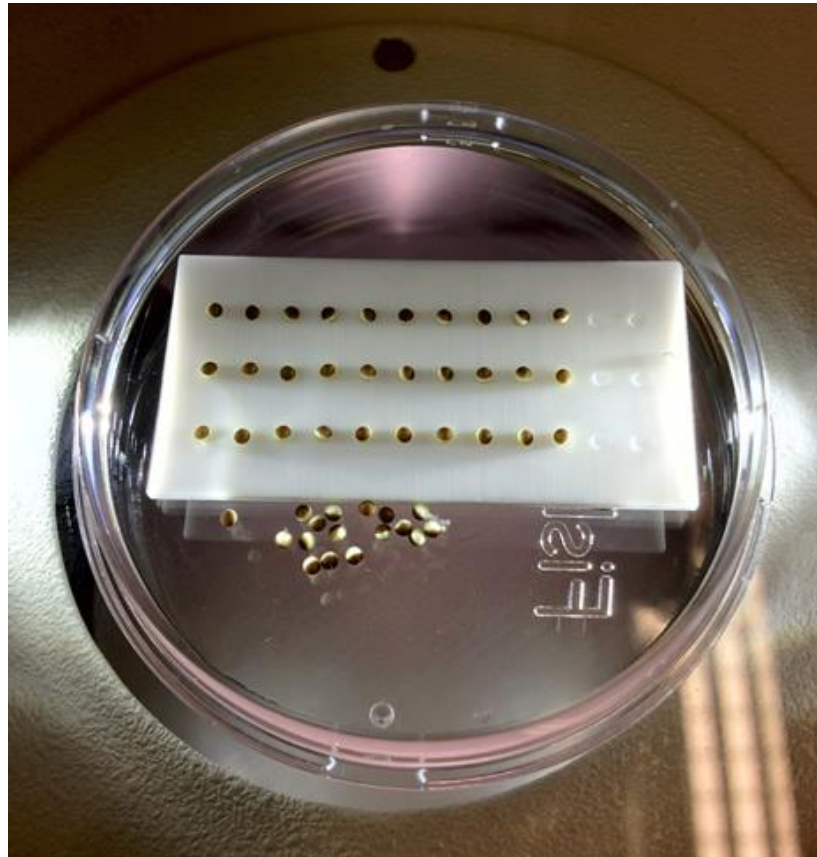
Jedním z membránových progesteronových receptorů jsou receptory spřažené s G-proteiny. Ty jsou schopny zaktivovat faktory vedoucí ke znovuzahájení meiózy – Mos, MEK a následně i mitogenem aktivovanou proteinkinázu. Dráha Mos-MEK-MAPK indukuje aktivitu ribozomálního proteinu p90^{rsk} (Erikson, 1991). Tento protein je zodpovědný za inhibici myelin-transkripčního faktoru 1 (Myelin Transcription Factor 1, MYT1) a defosforilaci Cdc2, katalytické podjednotky MPF (Palmer et al., 1998).

Navíc dochází k aktivaci dalších faktorů regulujících MPF: polo-like kinázy a kinázy Cdc25 (Karaïskou et al., 1998).

Následně dochází ke zvýšení aktivity MPF a MAP kinázy. Aktivace výše zmíněných signálních drah vede ke GVBD a zahájení zrání oocytů. Tuto fázi nazýváme u drápatky také M-fáze.

Zkoumání meiotického dělení oocytů drápatky vodní pomohlo přibližně objasnit biochemické změny M-fázi podporujícího faktoru, ke kterým dochází během oogeneze. Pro rozpad zárodečného váčku je MPF nepostradatelným elementárním faktorem. MAP kináza nezbytná není a její nedostatek může způsobit nanejvýš změnu dynamiky zrání oocytu (Schmitt, Nebreda, 2002).

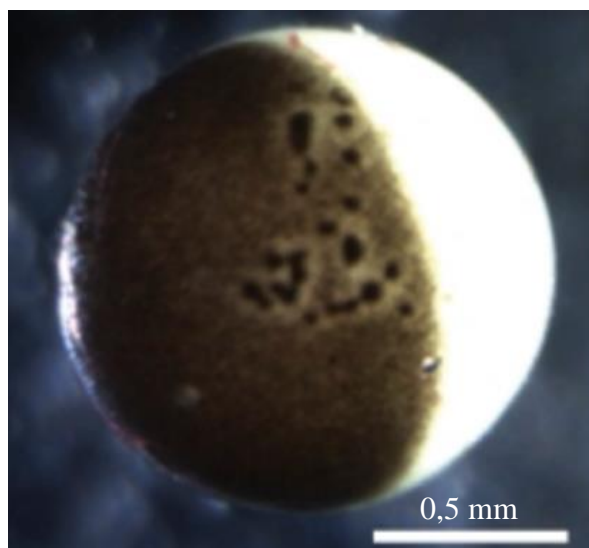
Studium přechodu oocytů drápatky z G-fáze do M-fáze představuje možnost pochopení aktivity a dynamiky působení MPF, což je užitečné pro další studium buněčného cyklu somatických buněk a pro studium meiózy vyšších obratlovců, které jsou svou fyziologií bližší hospodářským zvířatům anebo lidem (Weingartová *et al.*, 2015).



Obr. 7: Oocyty druhu *Xenopus laevis* (Shum, 2012).

Hlavní výhodou užívání drápatky vodní jako modelového organismu je tedy její snadný chov a snadná manipulace, dále rezistence vůči chorobám, krátký generační interval a během kalendářního roku neměnná reaktivita na hormonální stimulaci. Dalším pozitivem je i snadná manipulace s oocyty a folikuly vzhledem k jejich velkému množství a mimořádné velikosti.

Nevýhodou drápatky vodní jako modelového organismu je však její relativně velká genetická nepříbuznost s člověkem a hospodářskými zvířaty, což komplikuje možnost aplikace takto získaných poznatků v reprodukčních biotechnologiích lidí nebo hospodářských zvířat. Klíčové signální dráhy regulující meiotické dělení vykazují u drápatky některé odlišnosti v porovnání s oocyty hospodářských zvířat nebo člověka (Weingartová *et al.*, 2015).



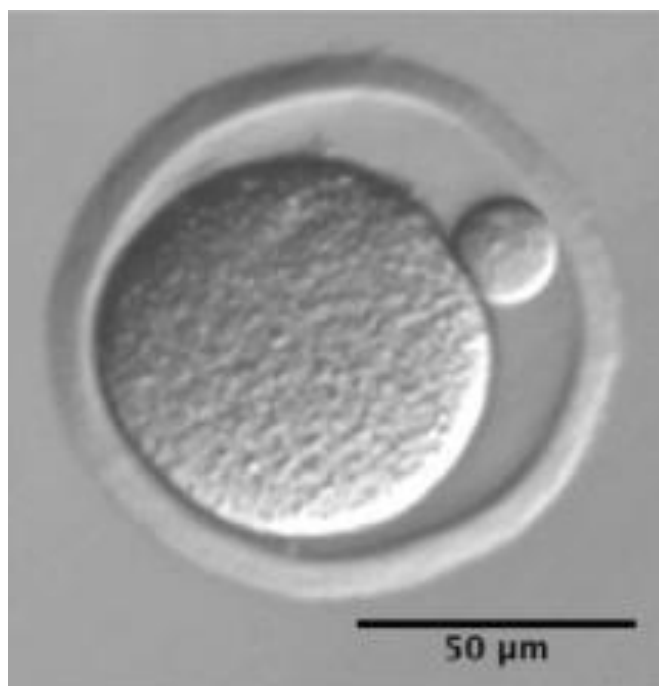
Obr. 8: Oocyt druhu *Xenopus laevis* (O'Connell et al., 2011).

3.2.4 Myš domácí (*Mus musculus*)

Jako savčí model je myš domácí fyziologicky podobnější člověku než obojživelníci. Podobně jako drápatka má ale také vysokou schopnost reprodukce a poskytuje řadu možností pro studium vlivu genetických modifikací na reprodukci. Myš je také vhodná k laboratornímu chovu a je snadno manipulovatelná (Weingartová *et al.*, 2015). Dalšími výhodami jsou přirozeně krátký generační interval a multiparita.

Způsobilost oocytů ke GVBD a přechodu z meiózy I do meiózy II je podmíněna věkem a dosažením puberty (Wassarman, 1988).

Během růstu dosahují oocyty průměru 30 μ m v pěti, 60 μ m v patnácti a 80 μ m ve dvaceti jedna dnech věku myši. Jen oocyty, které mají v průměru 60 μ m jsou schopny zahájit meiotické zrání. K rapidnímu nárůstu počtu oocytů schopných prodělat GVBD dochází kolem sedmnáctého dne věku (Sorensen, Wassarman, 1976). Vývoj oocytů o menším průměru je zastaven ve stádiu *dictyate* a tyto oocyty nejsou schopny podstoupit meiotické zrání a dokončit meiózu. Mohou ale *in vitro* podmínkách stavu meiotické kompetence ještě dosáhnout (Fulka jr. *et al.*, 1985).



Obr. 9: Myší oocyt v MII fázi (Jiao *et al.*, 2012).

Plně dorostlý oocyt je udržován ve fázi prvního meiotického bloku prostřednictvím vysoké koncentrace cAMP (Schultz *et al.*, 1983). Molekuly cAMP jsou tvořeny za účasti 3-adenylát-cyklázy (3-AC) v oocytu (Horner *et al.*, 2003) nebo se do oocytu dostávají z folikulárních buněk (Dekel *et al.*, 1981).

cAMP je enzymaticky degradován fosfodiesterázou (PDE) (Shitsukawa *et al.*, 2001). Její aktivita je stimulována fosforylací prostřednictvím protein kinázy (Han *et al.*, 2006). Adenosin monofosfát, produkt degradace cAMP, představuje důležitý regulační faktor AMP-aktivované proteinkinázy (AMPK), podporující GVBD a následné meiotické zrání (Chen *et al.*, 2006).

Tomuto procesu předchází stimulace obnovení meiózy prostřednictvím protein kinázy A, pro kterou je určující dosažení určité koncentrace cAMP v ooplazmě (Chen *et al.*, 2009).

Jedním z cAMP dependentních faktorů regulujících meiózu oocytu je protein kináza A. PKA udržuje vysokou aktivitu WEE1 a MYT1, které jsou zodpovědné za udržení pre-MPF v inaktivní formě. Pokles koncentrace cAMP a pokles aktivity protein kinázy A umožní aktivaci Cdc25, regulační kinázy aktivující MPF (Han, Conti, 2006; Pirino *et al.*, 2009; Oh *et al.*, 2010). Proteosyntéza cyklinu B probíhá nepřerušeně po celou dobu meiotického zrání (Winston, 1997). Výsledkem nárůstu koncentrace MPF je rozpad zárodečného váčku, ke kterému dochází přibližně po třech hodinách od zahájení zrání

(Szöllösi *et al.*, 1972; Jung *et al.*, 1993). S přechodem oocyty z prvního do druhého meiotického dělení aktivita MPF klesá a opětovného maxima dosahuje během meiózy II (Aubrieu *et al.*, 1991).

Vysoká koncentrace cAMP v oocyty ve fázi zárodečného váčku potlačuje aktivitu MAP kinázy. V okamžiku, kdy aktivita MAP kinázy vzroste, stává se nezávislou na dalších změnách koncentrace cAMP (Sun *et al.*, 1999). MAP kináza je kináza nezbytná pro spiralizaci chromozómů, jejich korektní segregaci a reaktivaci MPF ve fázi MII. Není ale nezbytná pro GVBD a vyloučení prvního pólocyty (Araki *et al.*, 1996).

Získat a kultivovat myši oocyty je snadnější než u jiných modelových organismů, zejména prasete domácího nebo skotu, čímž se staly dlouhodobě oblíbeným a vhodným modelem pro studium faktorů majících vliv na aktivaci MPF a znovuzahájení meiózy, například PLK1, MYT1, WEE1 nebo Cdc25. Na druhou stranu se průběh zrání myších oocytů v některých ohledech liší od oocytů bovinních, prasečích a lidských (Araki *et al.*, 1996; Sun *et al.*, 1999).

3.2.5 Prase domácí (*Sus scrofa f. domestica*)

Pro aplikaci výsledků studií do šlechtitelských postupů hospodářských zvířat a metod asistované reprodukce člověka je optimálním modelem savec, například právě prase.

Prase domácí je multiparní savec s vysokou plodností. Prasečí oocyty jsou navíc snadno dostupné, okamžitě po porážce prasničky nebo prasnice je lze aspirovat z vaječnic. Jde o model nejvíce vhodný pro výzkumy a pokusy, jejichž výsledky mají být aplikovány na člověka, nejčastěji v oboru humánních reprodukčních biotechnologií nebo medicíny. Prase je druh velmi podobný člověku fyziologií celého organismu i fyziologií oogeneze. Pro tyto účely je tedy vhodnějším modelem než drápatka nebo myš (Weingartová *et al.*, 2015).

Oocyty prasete jsou ze všech využívaných druhů nejnáročnější na podmínky kultivace, které musí být velmi přesně dodrženy. Nemalou pozornost je rovněž potřeba věnovat tomu, jaké oocyty přenášíme do kultur. Oocyty morfologicky nestandardní nebo s porušeným kumulem vykazují horší úspěšnost zrání při kultivaci. Je proto třeba být při výběru aspirovaných oocytů pro kultivaci velmi striktní.

Časná oogeneze u prasat se podobá oogenezi u myši. Během prenatalního vývoje jedince probíhá ve folikulech na vaječnicích mitotické dělení oogonií, které vstupují do meiózy. Meióza je zastavena v prvním meiotickém bloku v profázi I prvního meiotického dělení, kde je udržována až do dosažení pohlavní dospělosti samice. Ovaria novorozené

prasničky obsahují asi dvě stě deset tisíc nezralých oocytů ve fázi prvního meiotického bloku (Prather, Day, 1998). Oocyty pohlavně dospělých prasniček a prasnic pod vlivem působení hypofyzárních gonadotropinů znovuzahajují meiotické dělení.

Trvání meiotického zrání je v *in vitro* podmínkách poměrně dlouhé, 44 - 48 hodin, proto jsou prasečí oocyty vhodné pro studium procesu GVBD a jednotlivých stádií meiózy. Meiotické zrání plně dorostlých oocytů ve fázi zárodečného váčku, které jsou zadrženy v profázi I a mají průměr 120 - 150 μm , je započato procesem GVBD. Tento proces zahrnuje čtyři jednotlivá stádia: GV I, GV II, GV III a GV IV (Motlík, Fulka, 1976; Meinecke, Meinecke-Tillmann, 1979).

Ve stádiu GV I je nukleoplazma neporušená a chromatin je upořádan do kruhu. Stádium GV II je specifické rozeznatelným viditelným jádrem, které obsahuje heterochromatin, ten již ale není ve formě kruhu. Chromatin ve fázi GV III je rozptýlený a není viditelný. Chromatin oocytu ve fázi GV IV je kondenzovaný a uspořádaný do takzvaných bivalentů a jaderná membrána je rozpadlá a není viditelná. V podmínkách *in vitro* trvá proces GVBD přibližně 16 - 24 h (Motlík, Fulka, 1976; Meinecke, Meinecke-Tillmann, 1979).

In vivo je GVBD navozen působením gonadotropinů folikuly stimulujícím hormonem a luteinizačním hormonem. Gonadotropiny potlačí faktory inhibující meiózu, jako jsou cAMP nebo cAMP dependentní kináza vznikající v kumulárních buňkách (Mattioli *et al.*, 1994) dvěma mechanismy: Zaprvé náhlý nárůst hladiny luteinizačního hormonu v krvi způsobí degradaci folikulu, čímž dojde k narušení komunikace mezi kumulárními buňkami a oocytem, což samo o sobě je stimulem ke GVBD. Za druhé folikuly stimulační hormon a luteinizační hormon se váží na receptory kumulárních buněk a stimulují uvolnění druhých buněčných posílů. Jejich působením je pak uvolněn meiotický blok a je indukováno znovuzahájení zrání oocytu (Downs *et al.*, 1988; Eppig, 1989). *In vitro* lze zrání oocytů indukovat použitím folikuly stimulačního hormonu a luteinizačního hormonu nebo jejich syntetických analogů spolu s proteiny krevního séra a růstovými faktory (Singh *et al.*, 1997; Uhm *et al.*, 1998).

Bezprostředně po GVBD následuje fáze pozdní diakineze a poté fáze MI. V ní chromozómy utváří útvary zvané jako tetrády, v anafázi I se homologní chromozómy rozcházejí a probíhá vlastní segregace chromozomů, které se rozcházejí k opačným pólům jádra (Thibault *et al.*, 1987; Wassarman, 1988). V telofázi je již plně odděleno jádro oocytu a jádro budoucího prvního pólocytu. Meióza I přechází bezprostředně do meiózy II za účasti MAP kináz, které jsou během tohoto přechodu nezbytné pro udržení chromatinu

v kondenzovaném stavu a vydělení prvního pólocytu (Hunter, 2000). V prasečích oocytech aktivita MAP kináz roste společně s MPF, se kterým mají vzájemně regulační účinek, později ale na rozdíl od MPF aktivita MAP kináz zůstává vysoká i v době poklesu aktivity MPF (Sun *et al.*, 2001). V meióze II je poté vyloučeno první pólové tělísko a vývoj se zastavuje v takzvaném druhém meiotickém bloku (v metafázi II). Tehdy je oocyt považován za zralý a připravený k dokončení celého meiotického dělení. K tomu je třeba oocyt aktivovat a to oplozením spermii, kdy jsou z oocytu vyloučeny sesterské chromatidy v podobě druhého pólového tělíška (Thibault *et al.*, 1987; Wassarman, 1988).

Cyklický adenosinmonofosfát je zodpovědný za udržení prvního meiotického bloku v prasečích oocytech. Syntéza cAMP je enzymaticky katalyzována adenylát cyklázou (AC), která je lokalizována v cytoplazmatické membráně oocytu (Liang *et al.*, 2005). Pokles koncentrace cAMP je výsledkem inhibice adenylát cyklázy a současně aktivace fosfodiesterázy, která štěpí cAMP (Mattioli *et al.*, 1994). Kromě cAMP se na regulaci buněčného cyklu podílí i buněčný posel cyklický guanosinmonofosfát (cyclic guanosine monophosphate, cGMP). Klesající množství cGMP v kumulárních buňkách umožňuje aktivaci fosfodiesterázy a snížení koncentrace cAMP v oocytu (La Polt *et al.*, 2003). Koncentrace cAMP se v oocyt poté i nadále snižuje v důsledku přerušení spojení gap junction mezi oocytem a kumulárními buňkami během procesu kumulární expanze (Liang *et al.*, 2007). Počáteční pokles koncentrace cAMP a aktivity protein kinázy A je nezbytný pro znovuzahájení meiózy a průběh GVBD (Racowsky, 1983; Mattioli *et al.*, 1994). Nízká koncentrace cAMP pak přetrvává po celou dobu zrání oocytu (Mattioli *et al.*, 1994).

Současně se snížením koncentrace inhibičních faktorů jsou z inositol trifosfátových receptorů (IP3R) a ryanodinových receptorů (RyR) do cytoplazmy uvolňovány ionty Ca^{2+} (Machaty *et al.*, 1997). Ionty Ca^{2+} aktivují proteinovou calmodulin dependentní kinázu (Fan *et al.*, 2003) a některé izoformy Ca^{2+} dependentních kináz (PKC) (Fan *et al.*, 2002; Fan, Sun, 2004). Kinázy Cdc25 (Taieb *et al.*, 1997), PLK1 (Anger *et al.*, 2004) fosfatidylinositol-3-kináza (phosphatidylinositol 3-kinase, PI3K, inzulinový receptor) stimulována protein kinázou B (Protein kinase B, PKB/AKT) (Kalous *et al.*, 2009), představují faktory regulující aktivitu MPF a MAP kinázy (Motlík, Kubelka, 1990).

Aktivita MPF klesá se vstupem oocytu do fáze AI/TI. Tento pokles je důležitý pro přechod z meiózy I do meiózy II, segregaci chromozómů a korektní vyloučení prvního pólového tělíška (Glotzer *et al.*, 1991). Inaktivace MPF je založena na degradaci cyklinu B, regulační složky MPF. Ubiquitinace prostřednictvím anafázi-podporujícího komplexu/cyklozomu (anaphase-promoting complex/cyclosome; APC/C) je nezbytná pro

proteolýzu cyklinu B prostřednictvím proteazomu S26 (Peters, 2002). Následně znovu vzrůstá aktivita MPF a dosahuje maxima v MII, kde je nenahraditelný pro udržení druhého meiotického bloku (Yanagimachi, 1988).

Signální dráha Mos-MEK-MAP kináza se podílí na zrání oocytů prostřednictvím folikuly stimulačního hormonu (Li *et al.*, 2002), cAMP (Liang *et al.*, 2005) a MPF (Fan *et al.*, 2002b). Wehrend, Meinecke (2001) pozorovali vzrůstající aktivitu MAP kinázy bezprostředně před GVBD indukovaným MPF. Narozdíl od MPF, aktivita MAP kinázy je během celého zrání oocytu téměř neměnná (Lee *et al.*, 2000; Villa-Diaz, Miyano, 2004). Důležitým cílem MAP kinázy je ribozomální S6 kináza p90rsk (Fan *et al.*, 2002b; Kishimoto, 2003; Fan, Sun, 2004; Roux, Blenis, 2004). MAP kináza se také podílí na opětovné syntéze cyklinu B a obnovení aktivity MPF prostřednictvím této cílové molekuly během zrání oocytu (Ohashi *et al.*, 2003). Navíc MAP kináza potlačuje aktivitu MYT1 prostřednictvím PLK1 a brání inhibiční fosforylaci Cdk2 a změně MPF na pre-MPF (Fan *et al.*, 2002b; Kishimoto, 2003; Ohashi *et al.*, 2003). Dále je MAP kináza nezbytná pro udržení stability Cdc25 a tím zajišťuje aktivitu MPF (Kishimoto, 2003).

3.2.6 Ostatní modelové organismy

V laboratořích jsou pro nejrůznější pokusy užíváni zástupci všech skupin živočichů. V reprodukční biotechnologii jde ale obecně o modely méně vhodné z důvodů jako jsou náročný či nákladný chov, etické a legislativní požadavky na chov a genetická nepříbuznost s hospodářskými zvířaty nebo člověkem. Určitou nevýhodou některých z nich může být i omezená možnost získání dostatečného množství gamet (Jebavý *et al.*, 2011).

Vhodným modelem pro studium zárodečných listů jsou lánkovci (*Coelenterata*), například nezmar zelený (*Hydra viridissima*) (Jebavý *et al.*, 2011).

Z ostnokožců (*Echinodermata*) je klasickým a relativně vhodným modelem v embryologii například ježovka dlouhoostná (*Paracentrotus lividus*). Existují i publikované pokusy s oocyty mořské hvězdice (*Asteroidea sp.*) (Jebavý *et al.*, 2011).

Nejvýznamnější živočišnou skupinou z hlediska využití v experimentech jsou však obratlovci, kterých se v České republice týká zákon na ochranu zvířat proti týrání. I proto může být jejich využívání v laboratořích problematické. Patří sem ryby (*Osteichthyes*), z nichž je v reprodukční biotechnologii využíván kromě již zmíněného dania také karas obecný (*Carassius carassius*) a jiní. Z obojživelníků (*Amphibia*) je vhodným modelem pro embryologii, cytologii, transplantační a jiné pokusy axolotl mexický (*Ambystoma*

mexicanum). Ze savců jsou běžně užívanými křeček (*Cricetinae sp.*), pískomil mongolský (*Meriones unguiculatus*), morče domácí (*Cavia aperea f. porcellus*), ovce domácí (*Ovis ammon f. aries*), králík domácí (*Oryctolagus cuniculus f. domestica*), tur domácí (*Bos primigenius f. taurus*) a jiní (Jebavý *et al.*, 2011).

Využit jako modelové organismy lze i primáty, díky bližší příbuznosti a podobnosti s člověkem se hodí zejména úzkonosé opice (*Catarrhina*), konkrétně především makakové (rod *Macaca*), kočkodani (*Cercopithecus*) a paviáni (*Papio*). Problém využívání primátů ale spočívá v tom, že jejich chov v laboratorních podmínkách je velice náročný a nákladný (Jebavý *et al.*, 2011).

4 Závěr

V reprodukčních biotechnologiích lze využívat celou řadu více či méně obvyklých a vhodných modelů. Volba toho konkrétního závisí na povaze prováděného experimentu, tedy co je cílem pokusu a s jakým záměrem je prováděn. Zrání a kultivace oocytů jednotlivých organismů vykazuje určité mezidruhové rozdíly, i proto je vhodné výsledky pokusů ověřovat jejich provedením i na dalších modelech, což může být užitečné pro správné pochopení mechanismů působení jednotlivých molekul.

Drosophila je oblíbeným a tradičním modelem, zejména v molekulárně biologických laboratořích. Je zdrojem velkého množství oocytů při relativně velmi nízkých nákladech na chov, který je zároveň velice snadný. Je vhodným modelovým organismem pro zkoumání biochemických procesů a signálních drah oocyty.

Z hlediska zkoumání vlivu, koncentrací a lokalizace molekul regulujících meiotické zrání jsou velmi vhodné oocyty obojživelníků nebo ryb, protože jsou relativně velké a v případě ryb i průhledné. Jejich chov je rovněž snadný a finančně nenáročný a je zdrojem poměrně velkého množství oocytů. Například oocyty drápatky jsou mimořádně vhodné pro biochemické studie, protože jejich velikost koreluje s množstvím v nich přítomných proteinů.

Pro případné uplatnění výsledků experimentů ve šlechtění a reprodukčních biotechnologiích hospodářských zvířat, je třeba ale dané pokusy vždy přinejmenším opakovat a jejich výsledky ověřovat i na savčích modelech, například na myších nebo prasečích oocytech.

Chov myši je opět finančně nenáročný a snadný. Z běžných savčích modelů je geneticky nejpříbuznější člověku prase domácí, kultivace prasečích oocytů však vyžaduje dobré technické zázemí laboratoře. Výhodou prasete je relativně snadná dostupnost vysokého počtu čerstvých vaječnic z jatek, což řeší problematiku jejich chovu, která tak přechází na chovatele jatečných prasat. Podobně získat lze například i vaječnicí bovinní, ovšem v mnohem nižších počtech.

Prase je modelový organismus velmi vhodný pro účely ověření hypotéz a postupů a využití výsledků experimentu v humánní medicíně, zejména v léčbě neplodnosti. Na tomto poli je prase domácí jednoznačně nejvýznamnějším modelovým organismem.

Využít lze dle konkrétních podmínek i modely méně obvyklé, problémy však může skýtat obtížnost a finanční náročnost chovu či legislativní opatření omezující jejich využívání.

Použitá literatura

- Ables, E. T. 2015. *Drosophila* oocytes as a model for understanding meiosis: an educational primer to accompany "corolla is a novel protein that contributes to the architecture of the synaptonemal complex of *Drosophila*". Genetics Society of America [Online] <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25573011> (accessed Feb 23, 2016).
- Abrieu, A., Brassac, T., Galas, S., Fisher, D., Labbé, J. C., Dorée, M. 1998. The Pololike kinase Plx1 is a component of the MPF amplification loop at the G2/M-phase transition of the cell cycle in *Xenopus* eggs. *Journal of Cell Science*. 111. 1751-1757.
- Abrieu A, Dorée M, Fisher D. 2001. The interplay between cyclin-B-Cdc2 kinase (MPF) and MAP kinase during maturation of oocytes. *Journal of Cell Science*, 114, 257–267.
- Alberts, B., Bray, D., Johnson, A., Lewis, J., Raff, M., Roberts, K., Walter, P. 1998. *Základy buněčné biologie*. Espero Publishing s.r.o., Ústí nad Labem. 630 s. ISBN: 80- 902906-0-4.
- Anger M, Klima J, Kubelka M, Prochazka R, Motlik J, Schultz RM. 2004. Timing of Plk1 and MPF activation during porcine oocyte maturation. *Molecular Reproduction and Development*, 69, 11–16. doi: 10.1002/mrd.20151.
- Araki K, Naito K, Haraguchi S, Suzuki R, Yokoyama M, Inoue M, Aizawa S, Toyoda Y, Sato E. 1996. Meiotic abnormalities of c-mos knockout mouse oocytes: activation after first meiosis or entrance into third meiotic metaphase. *Biology of Reproduction*, 55, 1315–1324. doi: 10.1095/biolreprod55.6.1315.
- Bielańska-Osuchowska, B. 2006. Oogenesis in pig ovaries during the prenatal period: ultrastructure and morphometry. *Reproductive Biology*. 6 (2). 161–193
- Blumer KJ, Johnson GJ. 1994. Diversity in function and regulation of MAP kinase pathways. *Trend in Biochemical Sciences*, 19, 236–240. doi: 10.1016/0968-0004(94)90147-3.
- Bornslaeger, E. A.; Wilde, M. W.; Schultz, R. M. 1984. Regulation of mouse oocyte maturation: involvement of cAMP phosphodiesterase and calmodulin. *Developmental Biology*. 105 (2): 488 – 499.

- Browne CL, Wiley HS, Dumont JN. 1979. Oocyte-follicle cell gap junctions in *Xenopus laevis* and the effects of gonadotropin on their permeability. *Science*, 203, 182–183. doi: 10.1126/science.569364.
- Can A, Semiz O, Cinar O. 2005. Bisphenol-A induces cell cycle delay and alters centrosome and spindle microtubular organization in oocytes during meiosis. *Molecular Human Reproduction*, 11, 389–396. doi: 10.1093/molehr/gah179.
- Conti, M., Andersen, C. B., Richard, F. J., Shitsukawa, K., Tsafirri, A. 1998. Role of cyclic nucleotide phosphodiesterases in resumption of meiosis. *Molecular and Cellular Endocrinology*. 145, 9-14.
- Conti, M., Hsieh, M., Musa Zamah, A., Oh, J. S. 2012. Novel signaling mechanisms in the ovary during oocyte maturation and ovulation. *Molecular and Cellular Endocrinology*. 356, 65-73.
- Davis, R. 1993. The mitogen-activated protein kinase signal transduction pathway. *Journal of Biological Chemistry*. 268. 14553-14556.
- De Felici, M.; Siracusa, G. 1982. Survival of isolated fully grown mouse ovarian oocytes is strictly dependent on external Ca²⁺. *Developmental Biology*. 92 (2), 539 – 543.
- Dekel, N. 1988. Regulation of oocyte maturation. The role of cAMP. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 541, 211–216. doi: 10.1111/j.1749-6632.1988.tb22258.x.
- Dekel, N, Lawrence T. S., Gilula N. B., Beers W. H. 1981. Modulation of cell-to-cell communication in the cumulus–oocyte complex and the regulation of oocyte maturation by LH. *Developmental Biology*, 86, 356–362. doi: 10.1016/0012-1606(81)90193-7.
- Duellman, W; Trueb, E.; Trueb, L. 1994. *Biology of amphibians*. Baltimore: Johns Hopkins University Press, xxi, 670 p. ISBN 08-018-4780-X.
- Dumont, J. N. 1972. Oogenesis in *Xenopus laevis* (Daudin). I. Stages of oocyte development in laboratory maintained animals. *Journal of Morphology*. 136, 153–179.
- Edry, I; Sela-Abramovich, S.; Dekel, N. 2006. Meiotic arrest of oocytes depends on cell-to-cell communication in the ovarian follicle. *Molecular and Cellular Endocrinology*, 252, 102–106. doi: 10.1016/k.mce.2006.03.009.

- Eppig, J. J. 1989. The participation of cyclic adenosine monophosphate (cAMP) in the regulation of meiotic maturation of oocytes in the laboratory mouse. *Journal of Reproduction and Fertility*. 38. 3-8.
- Erikson, R. L. 1991. Structure, expression, and regulation of protein kinases involved in the phosphorylation of ribosomal protein-S6. *Journal of Biological Chemistry*, 266, 6007–6010.
- Ewen, K. A.; Koopman, P. 2009. Mouse germ cell development: From specification to sex determination. *Molecular and Cellular Endocrinology*, vol., no. p. 1-18.
- Fan, H. Y.; Tong, C.; Chen, D. Y.; Sun, Q. Y. 2002a. Protein kinases involved in the meiotic maturation and fertilization of oocyte. *Acta Biochimica et Biophysica Sinica*. 34 (3): 259 – 265.
- Fan, H. Y.; Tong, C.; Chen, D. Y.; Sun, Q. Y. 2002b. Roles of MAP kinase signaling pathway in oocyte meiosis. *Chinese Science Bulletin*. 47 (14): 1157 – 1162
- Fan, H. Y., Huo, L. J, Meng, X. Q., Zhong, Z. S., Hou, Y., Chen, D. Y., Sun, Q. Y. 2003. Involvement of calcium/calmodulin-dependent protein kinase II (CaMKII) in meiotic maturation and activation of pig oocytes. *Biology of Reproduction*. 69. 1552- 1564.
- Fan, H. Y.; Sun, Q. Y. 2004. Involvement of mitogen-activated protein kinase cascade during oocyte maturation and fertilization in mammals. *Biology of Reproduction*. 70 (3): 535 – 547.
- Froldi, F.; Ziosi, M.; Tomba, G.; Parisi, F.; Garoia, F.; Pession, A.; Grifoni, D. 2008. *Drosophila* lethal giant larvae neoplastic mutant as a genetic tool for cancer modeling. [Online] https://openi.nlm.nih.gov/detailedresult.php?img=PMC2679652_CG-9-147_F5&req=4.
- Fulka jr., J.; Motlik, J.; Fulka, J.; Crozet, N. 1985. Inhibition of nuclear maturation in fully grown porcine and mouse oocytes after their fusion with growing porcine oocytes. *Journal of Experimental Zoology*, 235, 255–259. doi: 10.1002/ jez.1402350212.
- Glotzer, M.; Murray, A. W.; Kirschner, M. W. 1991. Cyclin is degraded by the ubiquitin pathway. *Nature*. 349 (6305). 132-138.
- Gordo, A.C.; He, C. L.; Smith, S.; Fissore, R. A. 2001. Mitogen activated protein kinase plays a significant role in metaphase II arrest, spindle morphology, and maintenance of maturation

promoting factor activity in bovine oocytes. *Molecular Reproduction and Development*. 59. 106-14.

Hampl, A.; Eppig, J. J. 1995. Analysis of the mechanism(s) of metaphase I arrest in maturing mouse oocytes. *Development*. 121. 925-933.

Han S. J.; Conti, M. 2006. New pathways from PKA to the Cdc2/cyclin B complex in oocytes – Wee1B as a potential PKA substrate. *Cell Cycle*, 5, 227–231. doi: 10.4161/cc.5.3.2395.

Hill, A. J.; Teraoka, H.; Heideman, W.; Peterson, R. E. 2005. Zebrafish as a model vertebrate for investigating chemical toxicity: *Toxicological Sciences*, v. 86, p. 6-19.

Horner, K.; Livera G.; Hinckley, M.; Trinh, K.; Storm, D.; Conti, M. 2003. Rodent oocytes express an active adenylyl cyclase 16 *Scientia agriculturae bohemia*, 46 (1): 7–20 required for meiotic arrest. *Developmental Biology*, 258, 385–396. doi: 10.1016/S0012-1606(03)00134-9.

Hunt, P. A.; Koehler, K. E.; Susiarjo, M.; Hodges, C. A.; Ilagan, A.; Voigt, R. C.; Thomas, S.; Thomas, B. F.; Hassold, T. J. 2003. Bisphenol A exposure causes meiotic aneuploidy in the female mouse. *Current Biology*, 13, 546–553. doi: 10.1016/S0960-9822(03)00189-1.

Chao, H. H.; Zhang, X. F.; Chen, B.; Pan, B.; Zhang, L. J.; Li, L.; Sun, X. F.; Shi, Q. H.; Shen, W. 2012. Bisphenol A exposure modifies methylation of imprinted genes in mouse oocytes via the *Scientia agriculturae bohemia*, 46 (1): 7–20 15 estrogen receptor signaling pathway. *Histochemistry and Cell Biology*, 137, 249–259. doi: 10.1007/s00418-011-0894-z.

Chen, J; Hudson, E; Chi, M. M.; Chang, A. S.; Moley, K. H.; Hardie, D. G.; Downs, S. M. 2006. AMPK regulation of mouse oocyte meiotic resumption in vitro. *Developmental Biology*, 29, 227–238. doi: 10.1016/j.ydbio.2005.11.039.

Chen, J; Chi, M. M.; Moley, K. H.; Downs, S. M. 2009. cAMP pulsing of denuded mouse oocytes increases meiotic resumption via activation of AMP-activated protein kinase. *Reproduction*, 138, 759–770. doi: 10.1530/REP-08-0535.

Inoue, M.; Naito, K.; Nakayama, T.; Sato, E. 1996. Mitogen-activated protein kinase activity and microtubule organisation are altered by protein synthesis inhibition in maturing porcine oocytes. *Zygote*. 4. 191-198.

- Jebavý, L. *et al.* 2011. Chov laboratorních zvířat, 1st ed.; Česká zemědělská univerzita: Praha.
- Jiao, Z.; Xu, M.; Woodruff, T. K. 2012. Age-associated alteration of oocyte-specific gene expression in polar bodies potential markers of oocyte competence. [Online] 480-486. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3409302/> (accessed Feb 14, 2016).
- Jung, T.; Moor, R. M.; Fulka, J. 1993. Kinetics of MPF and Histone H1 kinase-activity differ during the G2-phase to M-phase transition in mouse oocytes. *International Journal of Developmental Biology*, 37, 595–600.
- Kapeller, K.; Pospíšilová, V. 2001. Embryológia člověka: učebnica pre lekárske fakulty. 3. Vyd. Martin: Osveta. 370 s. ISBN 80-8063-072-0.
- Karaïskou, A.; Cayla, X.; Haccard, O.; Jesus, C.; Ozon, R. 1998. MPF amplification in *Xenopus* oocyte extracts depends on a two-step activation of Cdc25 phosphatase. *Experimental Cell Research*, 244, 491–500. doi: 10.1006/excr.1998.4220.
- Karaïskou, A.; Jesus, C.; Brassac, T.; Ozon, R. 1999. Phosphatase 2A and Polo kinase, two antagonistic regulators of Cdc25 activation and MPF auto-amplification. *Journal of Cell Science*. 112. 3747-3756.
- Kishimoto, T. 2003. Cell-cycle control during meiotic maturation. *Current Opinion in Cell Biology*. 15 (6): 654 – 663.
- Kovo, M.; Kandli-Cohen, M.; Ben-Haim, M.; Galiani, D.; Carr, D. W.; Dekel, N. 2006. An active protein kinase A (PKA) is involved in meiotic arrest of rat growing oocytes. *Reproduction*. 132. 33–43.
- Kubišta V. 1998. Buněčné základy životních dějů. Scientia, spol s r. o., pedagogické nakladatelství, ISBN 80-7183 – 109-3. 97 –115
- LaPolt, P. S.; Leung, K.; Ishimaru, R.; Tafoya, M. A.; Chen, J. Y. 2003. Roles of cyclic GMP in modulating ovarian functions. *Reproductive BioMedicine Online*, 6, 15–23. doi: 10.1016/S1472-6483(10)62051-2.
- Lawrence, C. 2007. The husbandry of zebrafish (*Danio rerio*): A review: *Aquaculture*, v. 269, p. 1-20.

- Lee, J.; Miyano, T.; Moor, R. M. 2000. Localisation of phosphorylated MAP kinase during the transition from meiosis I to meiosis II in pig oocytes. *Zygote*. 8 (2): 119 – 125
- 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). 843- 847.
- Liang, C. G.; Huo, L. J.; Zhong, Z. S.; Chen, D. Y.; Schatten, H.; Sun, Q. Y. 2005. Cyclic adenosine 3',5'-monophosphate-dependent activation of mitogen-activated protein kinase in cumulus cells is essential for germinal vesicle breakdown of porcine cumulusenclosed oocytes. *Endocrinology*. 146 (10): 4437 – 4444.
- Liang, C. G.; Su, Y. Q.; Fan, H. Y.; Schatten, H.; Sun, Q. Y. 2007. Mechanisms regulating oocyte meiotic resumption: roles of Mitogen-activated Protein Kinase. *Molecular Endocrinology*, 21 (9): 2037 – 2055.
- MacLennan, M.; Crichton, J. H.; Playfoot, Ch. J.; Adams, I. R. 2015. Oocyte development, meiosis and aneuploidy. [Online] <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26454098> (accessed March 08, 2016).
- 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, 921–930. doi: 10.1095/biolreprod56.4.921.
- Maruta, H.; Burgess, A. W. 1994. Regulation of the Ras signaling network. *Bioessays*. 16 (7): 489 – 496.
- Mattioli, M.; Galeati, G.; Barboni, B.; Seren, E. 1994. Concentration of cyclic AMP during the maturation of pig oocytes in vivo and in vitro. *Journal of Reproduction and Fertility*, 100, 403–409. doi: 10.1530/jrf.0.1000403.
- Meinecke, B.; Meinecke-Tillmann, S. 1979. Effects of gonadotropin on porcine oocyte maturation and progesteron production by porcine ovarian follicles cultured in vitro. *Theriogenology*, 11, 351–365. doi: 10.1016/0093-691X(79)90059-1.
- Moosová, Z. 2008. Biochemické mechanismy vývojové toxicity u vodních živočichů. Bakalářská práce. Masarykova univerzita, Přírodovědecká fakulta. Vedoucí práce Klára Hilscherová. [Online] http://is.muni.cz/th/184610/prif_b.

- Motlík, J.; Fulka, J. 1976. Breakdown of germinal vesicle in pig oocytes in vivo and in vitro. *Journal of Experimental Zoology*, 198, 155–162. doi: 10.1002/jez.1401980205.
- Motlik, J.; Fulka, J. 1986. Factors affecting meiotic competence in pig oocytes. *Theriogenology*. 25. 87-96.
- Motlík J.; Kubelka M. 1990. Cell-cycle aspects of growth and maturation of mammalian oocytes. *Mol reprod Dev* 27: 336-337.
- Nebreda, A. R.; Gannon, J. V.; Hunt, T. 1995. Newly synthesized protein(s) must associate with p³⁴cdc² to activate MAP kinase and MPF during progesterone-induced maturation of *Xenopus* oocytes. *EMBO Journal*. 14 (22). 5597-5607.
- Norbury, C.; Nurse, P. 1992. Animal cell cycles and their control. *Annual Review of Biochemistry*. 61. 441-470.
- O'Connell, D.; Mruk, K.; Rocheleau, J. M.; Kobertz, W. R. 2011. *Xenopus laevis* oocytes infected with multi-drug-resistant bacteria: implications for electrical recordings. [Online] 271-277. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3149439/> (accessed Feb 14, 2016).
- 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. *Journal of Cell Biology*, 188, 199–207. doi: 10.1083/jcb.200907161.
- Palmer, A.; Gavin, A. C.; Nebreda, A. R. 1998. A link between MAP kinase and p34cdc2/cyclin B during oocyte maturation: p90rsk phosphorylates and inactivates the p34cdc2 inhibitory kinase Myt1. *EMBO Journal*, 17, 5037–5047. doi: 10.1093/emboj/17.17.5037.
- Palmer, A.; Nebreda, A. R. 2000. The activation of MAP kinase and p34cdc2/cyclin B during the meiotic maturation of *Xenopus* oocytes. *Progress in Cell Cycle Research*, 4, 131–143. doi: 10.1007/978-1-4615-4253-7_12.
- Pandey, A. K.; Deshpande, S. B. 2015. Bisphenol A depresses monosynaptic and polysynaptic reflexes in neonatal rat spinal cord in vitro involving estrogen receptor-

- dependent NO-mediated mechanisms. *Neuroscience*, 289, 349-357. doi: 10.1016/j.neuroscience.2015.01.010.
- Peters, J. M. 2002. The anaphase-promoting complex: proteolysis in mitosis and beyond. *Mol. Cell*. 9, 931-943.
- Petr, J.; Teplá, O.; Rozinek, J.; Jílek, F. 1996. Effect of testosterone and dibutyryl cAMP on the meiotic competence in pig oocytes of various size categories. *Theriogenology*. 46 (1). 97–108.
- Peyton, C.; Thomas, P. 2011. Involvement of Epidermal Growth Factor Receptor Signaling in Estrogen Inhibition of Oocyte Maturation Mediated Through the G Protein-Coupled Estrogen Receptor (Gper) in Zebrafish (*Danio rerio*)¹. [Online] 42-50. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3123381/> (accessed Feb 18, 2016).
- Picton, H.; Briggs, D.; Gosden, R. 1998. The molecular basis of oocyte growth and development. *Molecular and Cellular Endocrinology*. 145. 27–37.
- Pirino, G.; Westcott, M. P.; Donovan, P. J. 2009. Protein kinase A regulates resumption of meiosis by phosphorylation of Cdc25B in mammalian oocytes. *Cell Cycle*, 8, 665–670. doi: 10.4161/cc.8.4.7846.
- Posada, J.; Yew, N.; Ahn, N. G.; Vande Woude, G. F.; Cooper, J. A. 1993. Mos Stimulates MAP Kinase in *Xenopus* Oocytes and Activates a MAP Kinase Kinase In Vitro. *Molecular and Cellular biology*. 13(4). 2546 – 2553.
- Prather, R. S.; Day, B. N. 1998. Practical consideration for the in vitro production of pig embryos. *Theriogenology*, 49, 23–32. doi: 10.1016/S0093-691X(97)00399-3.
- Racowsky, C. 1983. Androgenic modulation of cyclic adenosine monophosphate (cAMP)-dependent meiotic arrest. *Biology of Reproduction*, 28, 774–787. doi: 10.1095/biolreprod28.4.774.
- Rasar, M. A.; Hammes, S. R. 2006. The physiology of the *Xenopus laevis* ovary. In: Liu XJ (eds): *Xenopus protocols: cell biology and signal transduction*. Humana Press Inc., Totowa, 17–30.
- Romanovský, A. 1974. *Metody experimentální embryologie*. Praha.

Roux, P. P.; Blenis, J. 2004. ERK and p38 MAPK-Activated Protein Kinases: a Family of Protein Kinases with Diverse Biological Functions. *Microbiology and molecular biology reviews*. 68 (2). 320–344.

Salustri, A.; Petrunaro, S.; De Felici, M.; Conti, M.; Siracusa, G. 1985. Effect of follicle-stimulating hormone on cyclic adenosine monophosphate level and on meiotic maturation in mouse cumulus cell-enclosed oocytes cultured in vitro. *Biology of Reproduction*, 33, 797–802. doi: 10.1095/biolreprod33.4.797.

Sela-Abramovich, S.; Chorev, E.; Galiani, D.; Dekel, N. 2005. Mitogen-activated protein kinase mediates luteinizing hormone-induced breakdown of communication and oocyte maturation in rat ovarian follicles. *Endocrinology*. 146. 1236-1244.

Setiadi, M. A. 1998. Effect of Different Maturation Media on Nuclear and Cytoplasmic Maturation of Porcine Oocytes in Vitro. PhD thesis. Institut für Reproduktionsmedizin der Tierärztlichen Hochschule. Hannover. p. 141.

Shitsukawa, K.; Andersen, C. B.; Richard, F. J.; Horner, A. K.; Wiersma, A.; Van Duin, M.; Conti, M. 2001. Cloning and characterization of the cyclic guanosine monophosphate-inhibited phosphodiesterase PDE3A expressed in mouse oocyte. *Biology of Reproduction*, 65, 188–196. doi: 10.1095/ biolreprod65.1.188.

Shum, A. 2012. An array of oocytes from the frog *Xenopus laevis*. Princeton - Chemical and Biological Engineering. https://www.princeton.edu/cbe/people/faculty/brangwynne/group/image_gallery/ (accessed March 31, 2016).

Schmitt, A.; Nebreda, A. R. 2002. Signalling pathways in oocyte meiotic maturation. *Journal of Cell Science*, 115, 2457–2459.

Scholz, S.; Fischer, S.; Gundel, U.; Kuster, E.; Luckenbach, T.; Voelker, D. 2008. The zebrafish embryo model in environmental risk assessment - applications beyond acute toxicity testing: *Environmental Science and Pollution Research*, v. 15, p. 394-404.

Schultz, R. M.; Montgomery, R. R.; Belanoff, J. R. 1983. Regulation of mouse oocyte meiotic maturation: implication of a decrease in oocyte cAMP and protein dephosphorylation in commitment to resume meiosis. *Developmental Biology*, 97, 264–273. doi: 10.1016/0012-1606(83)90085-4.

- Singh, B.; Meng, L.; Rutledge, J. M.; Armstrong, D. T. 1997. Effects of epidermal growth factor and follicle-stimulating hormone during in vitro maturation on cytoplasmic maturation of porcine oocytes. *Molecular Reproduction and development*. 46 (3). 401 – 407.
- Smith, L. D.; Ecker, R. E. 1970. Regulatory processes in the maturation and early cleavage of amphibian eggs. *Current Topics in Developmental Biology*, 5, 1–38. doi: 10.1016/S0070-2153(08)60051-4.
- Sorensen, R. A.; Wassarman, P. M. 1976. Relationship between growth and meiotic maturation of mouse oocyte. *Developmental Biology*, 50, 531–536. doi: 10.1016/0012-1606(76)90172-X.
- Sorensen, R. A.; Cyert, M. S.; Pedersen, R. A. 1985. Active maturation-promoting factor is present in mature mouse oocytes. *Journal of Cell Biology*. 100 (5). 1637- 1640.
- Spence, R.; Gerlach, G.; Lawrence, C.; Smith, C. 2008. The behaviour and ecology of the zebrafish, *Danio rerio*: *Biological Reviews*, v. 83, p. 13-34.
- Sun, Q. Y.; Lu, Q.; Breitbart, H.; Chen, D. Y. 1999. cAMP inhibits mitogen-activated protein (MAP) kinase activation and resumption of meiosis, but exerts no effects after spontaneous germinal vesicle breakdown (GVBD) in mouse oocytes. *Reproduction, Fertility and Development*, 11, 81–86. doi: 10.1071/RD99038.
- Sugiura, K.; Naito, K.; Endo, T.; Tojo, H. 2006. Study of germinal vesicle requirement for the normal kinetics of maturation/Mphase-promoting factor activity during porcine oocyte maturation. *Biology of Reproduction*. 74. 593-600.
- 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 mitogenactivated protein kinase during porcine oocyte maturation and fertilization in vitro. *Biology of Reproduction*. 64. 871-889.
- Szöllösi, D.; Calarco, P.; Donahue, R. P. 1972. Absence of centrioles in the first and second meiotic spindles of mouse oocytes. *Journal of Cell Science*, 11, 521–541.
- Taieb, R.; Thibier, C.; Jesus, C. 1997. On cyclins, oocytes, and eggs. *Molecular Reproduction and Development*. 48. 397-411.

- Tao, Y.; Zhang, M. J.; Hong, H. Y.; Xia, G. L. 2005. Regulation between nitric oxide and MAPK signal transduction in mammals. *Progress in Natural Science*. 15 (1): 1 – 9.
- Thibault, C.; Szölösi, D.; Féraud, M. 1987. Mammalian oocyte maturation. *Reproduction Nutrition Development*, 27, 865–895. doi: 10.1051/rnd:19870701.
- Trapphoff, T.; Heiligentag, M.; El Hajj, N.; Haaf, T.; EichenlaubRitter, U. 2013. Chronic exposure to a low concentration of bisphenol A during follicle culture affects the epigenetic status of germinal vesicles and metaphase II oocytes. *Fertility and Sterility*, 100, 1758–1767. doi: 10.1016/j.fertnstert.2013.08.021.
- Uhm, S. J.; Chung, H. M.; Seung, K. R.; Kim, N. H.; Lee, H. T.; Chung, K. S. 1998. Interactive effect of epidermal growth factor, transforming growth factor beta and gonadotropin in in vitro maturation of porcine oocytes. *Theriogenology*, 49, 319. doi: 10.1016/S0093-691X(98)90672-0.
- Van der Hurk, R.; Bevers, M. M.; Beckers, J. F. 1997. In vivo and in vitro development of preantral follicles. *Theriogenology* .47. 73–82.
- Villa-Diaz, L. G.; Miyano, T. 2004. Activation of p38 during porcine oocyte maturation. *Biology of Reproduction*, 71, 691–696. doi: 10.1095/biolreprod.103.026310.
- Wang, J.; Liu, X. J. 2004. Progesterone inhibits protein kinase A (PKA) in *Xenopus* oocytes: demonstration of endogenous PKA activities using an expressed substrate. *Journal of Cell Science*. 117 (21). 5107-5116.
- Wassarman, P. M. 1988. The mammalian ovum. In: Knobil E, Neill J (eds): *The physiology of reproduction*. Raven Press, New York, 69–102.
- Wassarman, P. M.; Albertini, D. F. 1994. The mammalian ovum. In: Knobil E, Neill J (eds): *The physiology of reproduction*. 2nd Ed. Raven Press, New York, 79–122.
- Webb, R. J.; Marshall, F.; Swann, K.; Carroll, J. 2002. Folliclestimulating hormone induces a gap junction-dependent dynamic change in (cAMP) and protein kinase A in mammalian oocytes. *Developmental Biology*, 246, 441–454. doi: 10.1006/dbio.2002.0630.
- 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. 175-184.

Weingartová, I. et al. 2015. Back in time: Fish oocyte as a superior model for human reproduction? A review. *Scientia Agriculturae Bohemica* 46 (1), 7–20.

Winston, N. J. 1997. Stability of cyclin B protein during meiotic maturation and the first mitotic cell division in mouse oocytes. *Biology of the Cell*, 89, 211–219. doi: 10.1111/j.1768-322X.1997.tb01009.x.

Yanagimachi, R. 1988. Mammalian fertilization. In: Knobil E, Neill J (eds): *The physiology of Reproduction*. Raven Press, New York, 230–278.