

Česká zemědělská univerzita v Praze



Fakulta agrobiologie, potravinových a přírodních zdrojů

Katedra veterinárních disciplín

Buněčná lokalizace kalcineurinu během aktivace prasečího  
oocytu

Diplomová práce

Autor práce: Bc. Michal Tokár

Vedoucí práce: Ing. Lenka Tůmová, PhD.

2012

### **Prohlášení**

Prohlašuji, že jsem diplomovou práci na téma Buněčná lokalizace kalcineurinu během aktivace prasečího oocyty, vypracoval samostatně a použil jen pramenů, které cituji a uvádím v přiložené bibliografii.

V Praze, dne 12. 4. 2012

Bc. Michal Tokár

## **Poděkování**

Rád bych poděkoval vedoucí své práce Ing. Lence Tůmové, PhD., která mi velmi pomohla odbornými a velmi cennými radami při realizaci a hlavně zpracování této práce. Dále bych rád poděkoval své rodině, že mi na danou práci poskytla dostatek času a především pochopení. V neposlední řadě patří mé poděkování slečně Magdě Klikové, za spolupráci při textové úpravě a jazykovou revizi článku.

## Souhrn

Aktivace savčího oocyty je složitý proces zahrnující zvýšení hladiny intracelulárního vápníku, exocytózu kortikálních granul a výstup z druhého meiotického bloku. Za fyziologických podmínek jsou oscilace hladiny vápenatých iontů vyvolány penetrací spermií do oocyty. Partenogenetická aktivace oocyty je v *in vitro* podmínkách navozována různými umělými stimuly, např. elektrickými pulsy či kalcium ionoforem, které zvyšují hladinu intracelulárního vápníku. Jednou z účinných molekul závislých na vápníku, která by mohla být zapojena do aktivace oocyty, je  $\text{Ca}^{2+}$ /kalmodulin dependentní serin/treonin protein fosfatáza 2B, neboli kalcineurin.

Kalcineurin je heterodimer skládající se ze dvou podjednotek, katalytické podjednotky A a regulační podjednotky B. Jeho přítomnost byla prokázána v mnoha savčích tkáních, kde se účastní buněčné signalizace, genové regulace, regulace iontových kanálů a řady dalších procesů. V oocytech se zatím výskyt kalcineurinu prokázal pouze u mouchy rodu *Drosophila* a žáby rodu *Xenopus*, kde je nutný k výstupu oocyty z metafáze II. V oocytech prasete nebyla přítomnost kalcineurinu dosud detekována.

Cílem práce bylo ověřit hypotézu, zda je kalcineurin přítomen v oocytech prasete, a je-li zapojen do aktivace prasečího oocyty doprovázené exocytózou kortikálních granul. Tato hypotéza byla ověřována na základě sledování lokalizace obou podjednotek kalcineurinu ve zralých oocytech a v oocytech aktivovaných partenogeneticky či spermií během *in vitro* fertilizace. Imunocytochemickou metodou byla prokázána přítomnost obou podjednotek kalcineurinu ve všech sledovaných skupinách oocytů. Metodou analýzy obrazu byla následně stanovena intenzita fluorescence proteinu a jeho případné změny v distribuci během aktivace. Redistribuce kalcineurinu se měnila během aktivace oocyty a dle typu podjednotky proteinu. Kalcineurin byl lokalizován převážně v korové oblasti oocytů, výjimkou byla podjednotka kalcineurinu A u partenogeneticky aktivovaných oocytů, kde byla nejvyšší intenzita fluorescence v oblasti prvojádra. V jádru kalcineurin lokalizován nebyl.

Dle výsledků lze uvažovat o možné úloze kalcineurinu v regulaci procesů spojených s aktivací savčího oocyty a to především s exocytózou kortikálních granul.

**Klíčová slova:** kalcineurin, oocyt, prase, meiotické zrání, aktivace, *in vitro* fertilizace

## Summary

Mammalian oocyte activation involves a sequence of morphological and biochemical events including an increase in intracellular calcium levels, cortical granules exocytosis and release from the 2. meiotic arrest. Under physiological conditions, oscillations of intracellular levels of free  $\text{Ca}^{2+}$  ions are induced by the sperm penetration into the oocyte. Under *in vitro* conditions, various artificial stimuli increase the intracellular calcium levels, e.g., electric pulses, or calcium ionophore are used for parthenogenetic activation of porcine oocytes. One of the calcium-dependent effector molecules that may be important during oocyte activation is the  $\text{Ca}^{2+}$ /calmodulin-dependent serin/threonine protein phosphatase 2B, or calcineurin.

Calcineurin is a heterodimer composed from two subunits, A subunit has a catalytic function, B subunit is a regulatory part of calcineurin protein. Calcineurin is detected in a wide variety of tissues in mammals, and plays an important role in many biological processes including cell signaling transduction, gene regulation, and regulation of ion channels. The data on calcineurin expression, distribution and role in mammalian oocytes is quite limited. It was demonstrated that calcineurin is essential for exit from metaphase II arrest in oocytes of *Drosophila* and *Xenopus*. The presence of calcineurin has not been detected in porcine oocytes, yet.

The aim of this work was to verify the hypothesis, that calcineurin is present in porcine oocytes during the activation and is involved in porcine oocyte activation accompanied by CG exocytosis. This hypothesis was confirmed by immunolocalization of both subunits of calcineurin in matured oocytes in activated oocytes by the sperm during *in vitro* fertilization, or parthenogenetic activated oocytes. Immunocytochemical method showed the presence of both subunits of calcineurin in all examined groups of oocytes. The protein fluorescence intensity and possible changes in the distribution during activation was determined using the method of image analysis. Calcineurin distribution was changed during the activation and by the type of protein subunit. Calcineurin was localized mostly in the oocyte cortex, except for the A subunit of calcineurin in the group of parthenogenetically activated oocytes, where was the highest level of fluorescence in the pronucleus. In nucleoli, there was no calcineurin detected.

The results suggests, that the calcineurin plays a role in the mammalian oocyte activation, especially with the exocytosis of cortical granules.

**Keywords:** calcineurin, oocyte, pig, meiotic maturation, activation, *in vitro* fertilization

## Obsah

1. Úvod.....	1
2. Vědecká hypotéza a cíle práce.....	2
3. Literární přehled .....	3
3.1 Oogeneze.....	3
3.1.1. Růst oocytů a folikulogeneze .....	3
3.1.2. Zrání oocytů.....	6
3.1.3. Aktivace oocytů.....	9
3.1.4. Faktory ovlivňující aktivaci oocytů.....	12
3.2. Kalcineurin .....	17
3.2.1. Struktura .....	18
3.2.2. Izoformy .....	19
3.2.3. Řízení a inhibice .....	19
3.2.4. Funkce v organismu .....	20
3.2.5. Úloha kalcineurinu v oogenezi.....	23
4. Materiály a metody .....	25
4.1. Materiál .....	25
4.1.1. Získávání vaječníků a oocytů .....	25
4.1.2. Kultivační média pro <i>in vitro</i> zrání prasečích oocytů .....	25
4.1.3. Kultivační média pro <i>in vitro</i> fertilizaci prasečích oocytů .....	27
4.1.4. Příprava pracovních roztoků pro imunolokalizaci .....	30
4.2. Metody .....	30
4.2.1. <i>In vitro</i> zrání oocytů prasete .....	30
4.2.2. <i>In vitro</i> fertilizace prasečích oocytů .....	31
4.2.3. Partenogenetická aktivace oocytů prasete .....	32
4.2.4. Imunolokalizace kalcineurinu .....	32
4.2.5. Vyhodnocení experimentů.....	33

4.2.6. Experimentální schéma .....	34
5. Výsledky .....	35
6. Diskuze .....	44
7. Závěr .....	47
8. Seznam literatury .....	48
Přílohy.....	53

## 1. Úvod

V posledních několika dekádách nastal masivní rozvoj a výzkum v oblasti reprodukčních biotechnologií. Jejich cílem je optimalizace užitkových a reprodukčních vlastností a zlepšování aplikace jednotlivých inseminačních technik na základě genové manipulace a genového inženýrství. Oplození *in vitro* nebo partenogenetická aktivace savčího oocyty jsou metody běžně využívané v reprodukčních biotechnologiích např. pro klonování pomocí přenosu jader, nebo pro získání transgenních zvířat. Klíčovým problémem je však nedostatečná znalost mechanismů regulujících aktivaci oocytů.

Aktivace savčího oocyty je složitý proces zahrnující zvýšení hladiny intracelulárního vápníku, exocytózu kortikálních granul a výstup z druhého meiotického bloku se současným vydělením 2. pólového tělíska. Tento děj je kromě intracelulárního vápníku regulován také řadou dalších faktorů, mezi kterými sehrávají významnou úlohu protein kinázy a protein fosfatázy. Úloha a výskyt protein fosfatázy 2B, označované jako kalcineurin, není v regulaci aktivace savčích oocytů detailně prostudována a v oocytech savců zatím nebyla potvrzena.

Kalcineurin byl u savců poprvé detekován v mozkové tkáni Wangem a Desaiem v roce 1976. Od té doby proběhlo mnoho biochemických studií, které potvrdily expresi kalcineurinu v mnoha tkáních u různých druhů, včetně savců. Mimo uvedenou mozkovou tkáň, kde dochází k jeho nejvyšší expresi, se vyskytuje např. v srdci, ledvinách, játrech, B a T lymfocytech, placentě, v kosterní svalovině, hladké svalovině a štítné žláze, ale i kančích spermích. Jeho biologický účinek zahrnuje širokou škálu funkcí, jako je buněčné dělení a apoptóza, plní hlavní roli při přenosu  $Ca^{2+}$  signálů, podílí se na fungování paměti, na transkripci nebo např. řídí motilitu spermii. Tento enzym je zkoumán především kvůli jeho vlivu na imunitní reakci organismu a v konečném výsledku zvyšuje transkripci aktivačních genů T-buněk. U prasete je zapojen do regulace procesů v somatických buňkách a u *Xenopus* a *Drosophila* je nutný k výstupu oocyty z MII bloku. V oocytech savců nebyla přítomnost kalcineurinu doposud prokázána. Z dostupných literárních pramenů lze usuzovat o zapojení kalcineurinu v procesu aktivace oocyty prasete.



## **2. Vědecká hypotéza a cíle práce**

Na základě dostupných údajů z literatury byla stanovena hypotéza, že je fosfatáza 2B, neboli calcineurin, přítomna v meioticky zralých i v aktivovaných oocytech prasete a je zapojena do aktivace prasečího oocytu doprovázené exocytózou kortikálních granul. Cílem této práce je ověření hypotézy pomocí sledování lokalizace calcineurinu ve zralých oocytech a v oocytech aktivovaných partenogeneticky či spermii.

### 3. Literární přehled

#### 3.1 Oogeneze

##### 3.1.1. Růst oocytů a folikulogeneze

Pohlavní buňky se vyvíjejí z primordiálních zárodečných buněk (dále jen PGC - *primordial germ cells*). Tento vývoj oocytu, začínající vznikem prekursorů zárodečných buněk, se nazývá oogeneze (Voronina a Wessel, 2003). U savců začíná oogeneze relativně brzy ve fetálním vývoji a končí u pohlavně dospělých jedinců, o měsíce až roky později. Vývoj samičích pohlavních buněk začíná zformováním PGC a zahrnuje sérii po sobě jdoucích buněčných přeměn. První je přeměna z PGC na oogonie (u plodu), druhou je transformace oogonií na oocyty (u plodu) a třetí je fáze meiotického zrání oocytu (Wassarman, 1988).

Jak bylo již zmíněno, gamety mají původ v PGC. Ty vznikají přibližně 3 týdny po oplození a migrují améboidními pohyby z epitelu žloutkového vaku přes pojivovou tkáň prvostřeva do genitální lišty (Smitz a Cortvrindt, 2002). Jakmile je gonáda složena ze somatických a zárodečných buněk, zárodečné buňky se začínají diferencovat a množit. Zpočátku mají PGC potenciál zahájit buď spermatogenezi, nebo oogenezi. Tato diferenciací je řízena prostřednictvím gonád, PGC se v samičí genitální liště vyvíjejí v oocyty. V mnoha organizmech se oogonie v gonádách několikrát dělí a tvoří shluky propojených buněk (Voronina a Wessel, 2003). Embryonální gonády jsou u prasat pozorovatelné mezi 24. a 26. dnem po oplození. Naproti tomu je však vyzorováno, že první zárodečné buňky se nacházejí od 18. dne v oblasti zárodečného hřebenu. Mitotické dělení zárodečných buněk je zřejmé od 13. dne embryonálního života, až do doby 7 dní po porodu. Počet zárodečných buněk se značně zvyšuje z počtu 5000 buněk (20 dní po oplození) na počet 1100000 buněk (50 dní po oplození). Poté mitotická aktivita ustává a některé zárodečné buňky podléhají nekróze (Hunter, 2000).

Formování prvních ovariálních folikulů bylo ve studii Bielanské-Osuchovské (2006) pozorováno v nejhlubších částech kůry vaječníku v těsné blízkosti *medully*, a to 56 dní po páření. Z buněk pohlavní lišty se staly buňky folikulární. V nejstarších plodech se primordiální folikuly zformovaly ve vrstvu těsně přiléhající k medulární části vaječníku (Bielanska-Osuchovska, 2006).

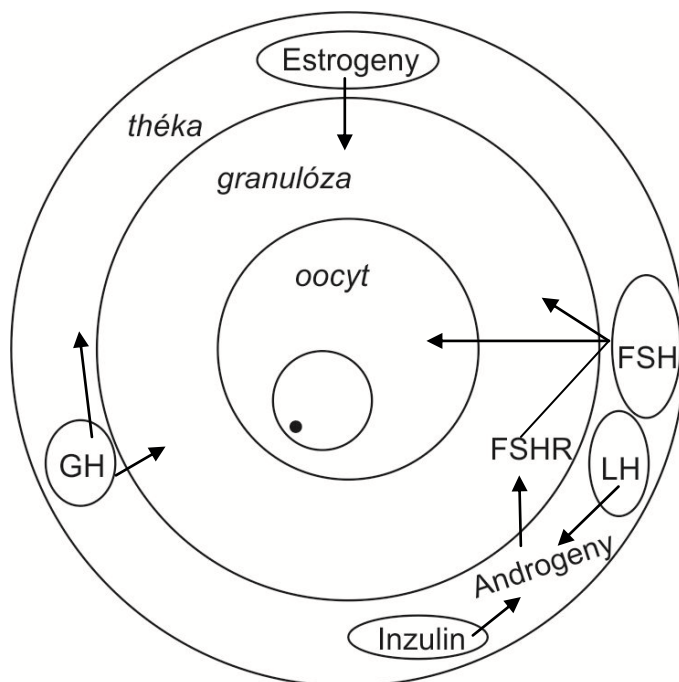
Růst folikulu a jeho následné zrání představuje řadu subcelulárních a molekulárních přeměn různých složek folikulu: oocyt, granulóza, théka. Tyto složky jsou řízeny několika intraovariálními a intrafolikulárními faktory a hormonálními signály, které vedou k sekreci

androgenů a estrogenů (hlavně estradiolu). Primordiální folikuly, které se zformovaly během fetálního vývoje, nebo chvíli po narození, se vyvíjejí ze zásob samice postupně během života až do jejich vyčerpání (Hafez a Hafez, 2000). Oocyt se v primárním folikulu dostává do fáze rozsáhlého růstu a buňky jej obklopující mění tvar na buňky cylindrické (od tohoto momentu se nazývají buňky granulózní) a množí se (Eppig, 2001). Když jsou vyvinuty dvě a více vrstev granulózy, vytvoří se sekundární folikul. Obklopující granulózní buňky se začnou množit a thekální vrstva se rozvíjí kolem granulózy z intersticiálních buněk stromatu. Sekundární folikuly dosahují v průměru 150  $\mu\text{m}$  (kráva), 200  $\mu\text{m}$  (hlodavci, člověk), nebo 300  $\mu\text{m}$  (prase), zatímco velikost jejich oocytu je 60  $\mu\text{m}$  u krávy, 70  $\mu\text{m}$  u hlodavců, 80  $\mu\text{m}$  u lidí, nebo 90  $\mu\text{m}$  u prasat (Hurk a Zhao, 2005).

Růst folikulu zahrnuje hormonálně vyvolané množení a diferenciaci buněk théky a granulózy, vedoucí v konečném důsledku ke zvýšení schopnosti produkovat estradiol a reagovat na gonadotropiny. Produkce estradiolu předurčuje, který folikul získá LH receptory nezbytné pro ovulaci a luteinizaci. Jakmile se vybraný folikul začne vyvíjet, roste až do ovulace, nebo degraduje, což je případ většiny folikulů. Největší folikul je zodpovědný za většinu estrogenu sekretovaného v průběhu říje ve vaječniku. Tato sekrece se rapidně snižuje při LH vrcholu. Poruchy citlivosti granulózy a théky ke gonadotropním signálům vedou k ukončení růstu folikulu a iniciují jeho atrezii (Hafez a Hafez, 2000).

Jednou z nejvýraznějších změn během růstové fáze oocytu je sekrece glykoproteinové membrány, vrstvy *zona pellucida* (ZP – *zona pellucida*), která tvoří ochrannou vrstvu kolem oocytu a skládá se ze tří glykoproteinů, ZP1, ZP2 a ZP3. Na rozdíl od ZP1 a ZP3, se exprese ZP2 vyskytuje již v primordiálních folikulech. Proteiny v ZP jsou nezbytné pro normální vývoj folikulu a jejich expresi zajišťuje transkripční faktor Fig- $\alpha$ . Granulózní buňky se nejen spojí jedna s druhou, ale také utvoří gap-junction spoje na oolemě s oocytem. Tyto gap-junction spoje vytvářejí connexin proteiny, ze kterých je connexin-37 exprimován oocyty ve všech stádiích folikulogeneze. Gap-junction usnadňuje obousměrnou komunikaci a umožňuje přenos živin, metabolických prekurzorů (jako jsou aminokyseliny a nukleotidy), informační molekuly (např. hormony, neurotropiny a růstové faktory), inhibiční a stimulační meiotické signály. Touto cestou, nebo přímým kontaktem buňka-buňka na úrovni buněčného povrchu, mohou aktivně podporovat růst a diferenciaci folikulárních buněk, zatímco granulózní buňky jsou schopny zajistit růst a diferenciaci oocytu. Endokrinní látky, jejichž působení bylo zjištěno na sekundární folikuly, jsou zobrazeny na obr. 1 (Hurk a Zhao, 2005).

**Obrázek 1** Schématický nákres folikulu, a endokrinní faktory ovlivňující jeho vývoj



*Schématický nákres vícevrstevného folikulu, znázorňující endokrinní faktory, které mohou ovlivňovat jeho vývoj. Tyto faktory jsou dodávány cévním systémem thény obklopující oocyt. LH a inzulín stimuluje androgeny thény a vyvolávají formaci FSH receptorů v granulóze. FSH, GH a androgeny mají pozitivní efekt pro pozdější růst a diferenciaci folikulu. (převzato z Hurk, R. van den, Zhao, J. 2005. Formation of mammalian oocytes and their growth, differentiation and maturation within ovarian follicles. Theriogenology, 63 (6), 1717-1751, strana 1728).*

Meióza začíná 40. den embryonálního vývoje a 35. den po narození jedince jsou všechny oogonie v profázi prvního meiotického dělení. Jsou obklopeny vrstvou plochých granulóznic buněk a jejich populace čítá přibližně 500 000 primordiálních folikulů po narození a snižuje se při dosažení puberty na 420 000 primordiálních folikulů (Hunter, 2000).

Společně s obrovským nárůstem RNA a syntézy proteinů, jsou počty ribozomů, mitochondrií a dalších buněčných organel v rostoucích oocytech enormně zvýšeny. Hromadění mnoha rozptýlených membránových vezikulů, glykogenových granul, proteinů, lipidových kapiček a multivezikulárních tělísek svědčí o skladování a molekulárním transportu skrz membránu oocytu. Mnoho organel se transformuje a rozptýlí na okraji oocytu (Hurk a Zhao, 2005). Bylo též prokázáno, že nedostatky v těchto molekulách buněčného

cyklu omezují meiotickou kompetenci a zejména, že koncentrace p34<sup>cdc2</sup> (to je jedna z komponent proteinové kinázy MPF, více v kapitole 2.1.4 Faktory ovlivňující aktivaci oocytů) jsou v malých oocytech preantrálních folikulů limitující. U rostoucích oocytů nedostatek záleží spíše na aktivaci MPF kinázy, než na absolutní koncentraci p34<sup>cdc2</sup> (Hunter, 2000).

Růst savčích oocytů zahrnuje dvě odlišné fáze. V první je růst folikulu a oocytu vzájemný a pozitivně lineární a ve druhé zůstává velikost vajíčka oocytu konstantní i přes pokračování růstu folikulu. Oocyt nemá možnost dokončit první meiotické zrání, dokud nedosáhne velikosti folikulu dospělého. Prasečí oocyty narůstají přibližných velikostí od 30 µm do 120 µm; růst je téměř kompletní ve folikulech o průměru 1,8 mm. Je dokázáno, že somatické buňky pomocí gap junctions komunikují s oocytem a zajišťují podklady pro jeho energetický metabolismus a tím i jeho růst. Rychlost růstu oocytů přímo souvisí s počtem granulóznic buněk v jeho okolí a tyto buňky efektivně zvětšují plochu oocytu. Plocha povrchu oocytu se zvyšuje a tím stoupá i rychlost vstupu malých molekul, díky nimž je zvýšen růst a vývoj. Kromě těchto interakcí zprostředkovaných gap junction, je vývoj oocytu upravován parakrinními signály z granulóznic buněk. A zatímco obnažené oocyty nemohou růst, je určitý vývoj možný v případě, že jsou společně kultivovány s rozpustnými faktory granulóznic buněk. Nicméně přesný signál pro zahájení růstu oocytu u prasat zůstává neznámý a vyžaduje další zkoumání. Komunikace mezi oocytem a granulózní buňkou je obousměrná a prasečí oocyty vylučují faktor, který umožňuje expanzi kumulu (cumulus expansion-enabling factor), v závislosti na rozpustném faktoru, který reguluje tvorbu steroidů v buňkách kumulu, potlačuje luteinizaci a podporuje množení granulóznic buněk v kultuře. Podobné údaje byly také zjištěny u myši a krav a zdá se, že je faktor vylučován v časových intervalech v závislosti na pohlavním cyklu. Potenciální uchazeči jsou různé růstové faktory, včetně GDF-9 a další faktory z β rodiny, aktivátor plazminogenu a faktory ze skupiny interleukinu (Hunter, 2000).

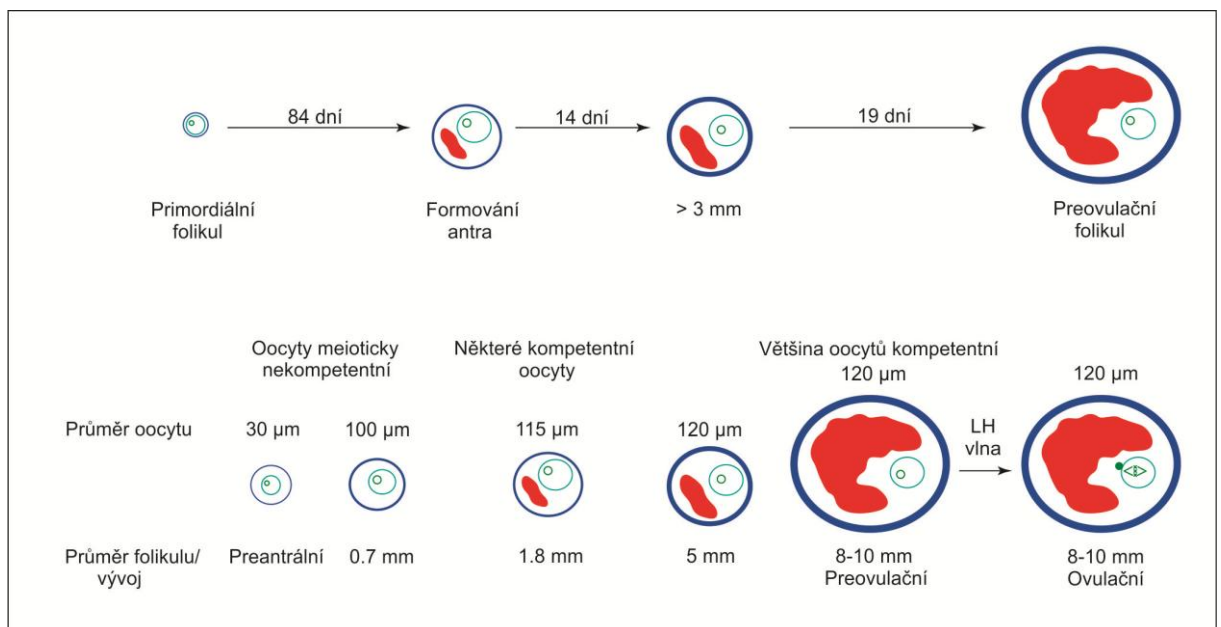
### **3.1.2. Zrání oocytů**

Savčí oocyt podstupuje meiotické zrání již v embryonálním stadiu. Meiotické dělení postoupí do první fáze a poté je vývoj zastaven ve fázi diplotene. Po prvním meiotickém bloku následuje fáze růstu a teprve plně dorostlý oocyt má zárodečný váček. Jádra rostoucích oocytů vypadají jinak. Schopnost projít všemi fázemi od GVBD (GVBD - germinal vesicle breakdown) do MII (metafáze I, anafáze I a telofáze I do stádia metafáze II) se označuje jako

meiotická kompetence oocyty (Ben Yosef a Shalgi, 1998; Hunter, 2000). Po znovuzahájení 1. meiotického dělení nebo po prolomení bloku 1. meiotického dělení v plně vzrostlém oocyty začne chromatin kondenzovat a je zahájena degradace zárodečného váčku (GVBD), organizuje se metafázní vřeténko a je vyloučeno první pólové tělísko (Sun a Nagai, 2003).

Prasečí folikuly s průměrem menším než 0,7 mm obsahují oocyty neschopné dokončení meiotického zrání. V *in vitro* podmínkách jsou schopné zrát oocyty pocházející z folikulů o velikosti 0,8 mm až 1,6 mm, ne však všechny oocyty z folikulů dosahujících v průměru nad 1,7 mm dosáhnou metafáze II po 48 hodinách *in vitro* kultivace. Dokonce i některé folikuly o průměru větším než 3 mm obsahují oocyty, které nejsou schopné zrát ani ve speciálních kulturách (Motlík et al., 1984).

**Obrázek 2 Růst folikulu a oocyty**



*Růst folikulu a oocyty a získávání meiotické kompetence u prasat v in vivo podmínkách (převzato z Hunter, M. G. 2000. Oocyte maturation and ovum quality in pigs. Reviews of Reproduction, 5, 122-130, strana 124).*

V podmínkách *in vivo* je znovuzahájení meiózy podmíněno preovulační LH vlnou a projevuje se jen u těch plně vzrostlých, meioticky kompetentních oocytů pocházejících z dominantních folikulů. V období mezi LH vlnou a ovulací prochází oocyt řadou výrazných změn a to nejen v jádře, ale také v cytoplazmě. Doba zrání je u hospodářských zvířat odlišná, 24 hodin u ovce a krávy, 44 hodin u prasat a 36 hodin trvá zrání u koně. Obnáší dvě po sobě jdoucí M-fáze s absencí replikace DNA, S fáze (Hurk a Zhao, 2005).

Zrání ooplazmy je nutné k zabránění vzniku polyspermie při oplození, dále k dekondukcii proniknuvší spermie a pro zformování prvojádra. Zahnuje rozdělení buněčných organel, migraci mitochondrií do perinukleárního prostoru a akumulaci granul kolem oolemy. Inhibice sekrece LH nebo inaktivace LH receptorů vede k prevenci dozrávání oocyty bez příchodu následné ovulace. Protože v oocytech nebyly detekovány žádné LH receptory, signály spouštějící dozrávání oocytů tak pravděpodobně pochází z folikulárních buněk v jeho okolí. Je dobře známo, že folikuly reagují na vlnu LH posunem produkce steroidů převážně z estrogenů na progesteronové prostředí a produkcí hyaluronu kumulárními buňkami. Navzdory druhovým rozdílům, základní procesy řídící zrání oocyty sdílí jako odpověď na vlnu LH několik regulačních drah, jako je změna fosforylace proteinů, cyklického adenosin monofosfátu (cAMP) a hladiny vápníku (Hurk a Zhao, 2005).

Pro tvorbu nových genových produktů a organel, dále modifikaci a redistribuci těch již existujících, je vyžadována přítomnost komplexní cytoplazmatické organizace. Na rozdíl od myších oocytů, u prasečích je pro kondenzaci chromatinu a rozdělení zárodečných váčků potřeba aktivní transkripce a translace. Prolomení druhého meiotického bloku je doprovázeno a řízeno značným nárůstem aktivity cytozolové kinázy v oocyty. Stěžejním prvkem této aktivity je cyklin B-p34<sup>cdc2</sup>, také nazývaný jako faktor podporující metafázi (MPF – metaphase promoting factor) (Hunter, 2000).

MPF je serin-treonin protein kináza zapojená v regulaci buněčného cyklu a aktivita MPF v prasečích oocytych je hodnocena měřením aktivity histonu H1 kinázy (Hunter, 2000).

Aktivita MPF zůstává vysoká i v metafázi II, kdy se objevuje druhý meiotický blok. Po oplození, nebo partenogenetické aktivaci se aktivita snižuje a meióza II je dokončena. Tento pokles aktivity MPF probíhá současně s koncem metafáze I a II a značí, že inaktivace MPF je pro tento vývoj nezbytná (Hunter, 2000). Více o MPF v kapitole 2.1.4.

Za plně zralý oocyt je považován ten, který má vydělené pólové tělísko (Sun a Nagai, 2003). Zralý oocyt je znovu zablokován v metafázi II a je považován za relativně klidnou buňku s přednastaveným programem vývoje (Ben Yosef a Shalgi, 1998; Hurk a Zhao, 2005).

Co se týče zralých oocytů, uvolňovaných u hospodářských zvířat při říji, kráva ovuluje 1 folikul, který je identifikovatelný podle velikosti asi 3 dny před nástupem říje. V případě ovce, 1 nebo 2 největší folikuly produkují více estrogenů a váží více gonadotropinů ke granulózním buňkám než folikuly malé. U prasnic nábor ovulačních folikulů do ovulační populace pokračuje během folikulární fáze. Tím je i rozvoj malých folikulů spíše podporován, než inhibován folikuly většími. Závěrečný růst folikulu u ovcí, krav a prasnic trvá od 12 do 34 dní; celková doba růstu folikulu je delší než 20 dní a pohybuje se pravděpodobně kolem 6

měsíců. Růst folikulů až do fáze antrálního folikulu není striktně závislý na gonadotropinu. U samic zbavených hypofýzy pokračuje formace preantrálních folikulů ve více méně normální míře. Na stranu druhou, zformování antra a konečný růst jsou zcela závislé na FSH/LH (Hafez a Hafez, 2000).

### 3.1.3. Aktivace oocytů

Aktivace oocytu je děj, při kterém překonává oocyt díky spermii druhý meiotický blok a zahajuje sled biochemických dějů, které vedou k dokončení 2. meiotického dělení a k rychlému embryonálnímu mitotickému dělení (Ben Yosef and Shalgi, 1998). Oplození je vícestupňový proces týkající se interakce spermie a vnějších vrstev oocytu, konkrétně vrstvy kumulárních buněk a *zony pellucidy*, penetrace spermie skrze tyto struktury, a eventuelně přímých interakcí mezi spermii a plazmatickou membránou oocytu (Williams, 2002; Ben Yosef a Shalgi, 1998). Spermie prošla akrozomální reakcí penetruje ZP, pronikne do perivitelinního prostoru a spojí se s plazmatickou membránou oocytu. Tato počáteční interakce vyžaduje specifické rozpoznání mezi složkami na postakrozomální oblasti ve středním segmentu hlavičky spermie prošlé akrozomální reakcí a oolemou (Ben Yosef a Shalgi, 1998). Jakmile dojde k těmto membránovým interakcím, je zahájena kaskáda přenosu signálu, která má za následek přeměnu vajíčka na diploidní zygotu schopnou vytvořit nový organismus (Williams, 2002; Ben Yosef a Shalgi, 1998). Fertilizace je spouštěna pomocí změn koncentrací vápníku. U savců tyto přechody vápenných koncentrací mají podobu opakujících se vln, nazývaných oscilace. Tyto oscilace jsou důležité pro uvolnění z meiotického bloku a k přiměnění všech dějů k počátku aktivace oocytu. Oscilace  $Ca^{2+}$  jsou také pozorovány po intracytoplazmatické injekci spermie (ICSI – intracytoplazmatic sperm injection) (Heytens et al., 2008). Tyto děje, odehrávající se uvnitř oocytu při oplození, jsou souhrnně nazývány aktivací oocytu. Zvýšení hladiny kalcia má za následek exocytózu kortikálních granul (CGE - cortical granule exocytosis) umístěných v kortikální oblasti oocytu pod plazmatickou membránou, probíhá brzy při aktivaci a je nezbytný pro další krok, spojení spermie a oocytu (Santella et al., 2004). Tato granula obsahují enzymy, které se uvolňují do perivitelinního prostoru, což má za následek modifikaci ZP, která zabraňuje jiné spermii vazbu na ZP a následný průnik ZP. Tyto změny v *zona pellucida* představují mechanismus, kterým někteří savci, včetně lidí, zabraňují vzniku polyspermie. Dokončení CGE vede ke změně struktury ZP a blokaci polyspermie (Ben Yosef a Shalgi, 1998; Williams, 2002).



Exocytózu CG je v *in vitro* podmínkách též možno vyvolat přidáním kalcium-ionoforu A23187 (Asano a Niwa, 2004). Aktivace oocyty také vede k události zahrnující znovuzahájení meiózy, formaci prvojader a iniciaci syntézy DNA (Ben Yosef a Shalgi, 1998).

Aktivace oocyty zahrnuje velký počet dobře popsaných morfologických a biochemických dějů, z nichž se některé projevují během několika vteřin či minut interakcí spermie s plazmatickou membránou oocyty, a některé se objevují až po uplynutí několika hodin. Jedním z prvních dějů při aktivaci oocyty je nárůst buněčné hladiny vápníku. U savců hladiny vápníků opakovaně oscilují po dobu až několika hodin po fúzi spermie a oocyty. Krátce poté, co dojde k fúzi mezi spermií a oocytem, je narušen jaderný obal spermie a perinukleární théka obalující chromatin je z okolí chromatinu odstraněna. Zdá se, že se tohoto děje aktivně účastní také mikroklky oocyty (Sutovsky et al., 1997; Williams, 2002). Chromatin následovně prochází dekondenzací, která začíná v kaudální části hlavičky spermie a postupuje kraniálně. Kondenzace spermatického chromatinu vyžaduje redukci disulfidických vazeb, které je dosaženo redukcí glutathionu přítomného v cytoplazmě oocyty. Během dekondenzace jsou nahrazeny protaminy, které balily chromatin. Bičík spermie také zasahuje do oplození. Spermatické mitochondrie se sice odloučí od střední části bičíku, ale zůstávají agregované pohromadě v cytoplazmě oocyty (Sutovsky et al., 1996; Williams, 2002). Během spermatogeneze jsou mitochondriální proteiny označeny ubiquitinem, který má za následek zničení těchto organel proteazomy. Důsledkem tohoto děje je, že spermatické mitochondrie nepřetrvávají déle než v preimplantačních embryonálních fázích a dědí se pouze maternální část mitochondrií (Williams, 2002).

Klíčovým momentem aktivace oocyty je prolomení 2. meiotického bloku, ke kterému dochází v době, kdy chromatin spermie dekondenzuje v cytoplazmě oocyty; toto znovuzahájení značí návrat oocyty do buněčného cyklu. Buněčný cyklus je řízen rovnováhou aktivit kináz a fosfatáz, které ovlivňují činnost buněčných proteinů. Morfologické změny pozorované během znovuzahájení meiózy zahrnují rotaci metafázních vřeten (u některých druhů), vstup do anafáze a vyloučení druhého pólového tělíska. V tomto bodě se DNA pocházející ze samičích gamet stává diploidní (Williams, 2002).

Blok 2. meiotického dělení je udržován pomocí aktivního MPF. MPF je modulátor buněčného cyklu zodpovědný za navození shluknutí vřeten, kondenzaci chromatinu a zánik jaderné blány. MPF zůstává aktivní díky přítomnosti cytotatického faktoru, který se skládá alespoň z části z Mos a Emi 1 proteinů. Ty brání degradaci cyklinu B1. Krátce po fúzi spermie a oocyty indukuje zvýšení hladiny vápníku degradaci cyklinu a Mos podléhá ubiquitin-dependentní degradaci v proteazomu. Výsledná ztráta aktivního cytotatického

faktoru a inaktivace MPF umožňuje vstup samičího chromatinu do anafáze II (Lorca et al., 1993; Williams, 2002).

Další protein kinázou důležitou v regulaci meiotického cyklu je MAP kináza. MAP kinázy také fosforylují chromozomální proteiny důležité k udržování chromatinu v kondenzovaném stavu během přechodu z meiózy I do meiózy II, a k zabránění zformování jaderného obalu fosforylací jaderných lamin. Během aktivace oocyty začne MAP kinázová aktivita klesat poněkud později než aktivita MPF a tento pokles je nutný před zformováním obalu prvojádra (Williams, 2002).

Několik hodin po fúzi oocyty a spermie ustává oscilace vápníku, zformuje se samčí a samičí prvojádro a začne syntéza DNA. Za pomoci mikrotubulární sítě, migrují obě prvojádra do středu nově vzniklé jednobuněčné zygoty. Po apozici prvojader v centru zygoty se jejich membrány rozruší, chromozomy podstoupí syngamii a připraví se na první dělení (Williams, 2002).

Oplození u savců probíhá v ampulární oblasti vejcovodů (Ben Yosef a Shalgi, 1998).

### **Funkce *cumulus oophorus* při oplození**

Jelikož jsou kumulární buňky vyšších savců velmi lehce odstranitelné, nezdá se být *cumulus oophorus* nezbytnou součástí oocyty pro interakci gamet. Lze ale s určitou jistotou říci, že přítomnost kumulárních buněk při oplození přináší tomuto ději určité benefity. To může být způsobeno nejméně dvěma typy procesů. Existuje značné množství důkazů, že kumulus řídí vstup spermie do ZP a oocyty. Kumulus působí jako selektivní bariéra zabraňující vstupu spermií, které nepodstoupily kapacitaci, stejně jako spermií s dokončenou akrozomální reakcí. Kumulus může také poskytovat faktory, které regulují funkce spermií, a tím posiluje fertilizaci. Expozice spermie kumulárním buňkám, nebo médiu s nimi, zvyšuje dobu motility, rychlosti a vede k silnějšímu kmitání bičíkem (Florman a Ducibella, 2006).

### **Partenogenetická aktivace oocyty**

Partenogenetickou aktivací je myšleno umělé navození aktivace oocyty bez přítomnosti spermie. Děje se tak např. pomocí kalcium ionoforu (Sedmíková et al., 2003; Asano a Niwa, 2004; Wang et al., 1998), elektrických impulzů (Procházka et al., 1992), thimerosalu (Macháty et al., 1997), protein kinázovou inhibicí (Mayes et al., 1995), 6-dimethylaminopurinem (6-DMAP; Im et al., 2007), nebo donory oxidu dusnatého (Petr et al., 2005). Některé z těchto zmíněných stimulů vyvolávají u oocytů zvýšení hladiny  $\text{Ca}^{2+}$  iontů – elektrické impulzy (Procházka et al., 1992), thimerosal (Macháty et al., 1997), 6-DMAP (Im

et al., 2007), jiné schopnost navodit plnohodnotnou aktivaci oocyty nemají – donory oxidu dusnatého (Petr et al., 2005).

### 3.1.4. Faktory ovlivňující aktivaci oocytů

#### MPF

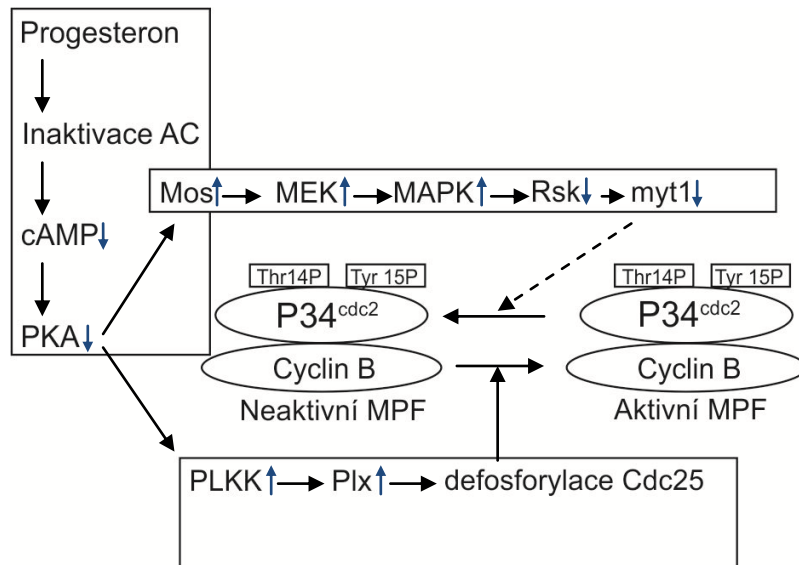
Meiotický blok je charakterizován vysokou úrovní komplexu cyklinuB/cdk1, také známé jako MPF. MPF je zodpovědný za přechod z G2 do M fáze během meiózy a mitózy buněčného cyklu. Jedná se o protein kinázu složenou ze dvou komponent: z p34<sup>cdc2</sup> kinázy (katalytické podjednotky) a cyklinu B (regulační podjednotky) (Mayes et al., 1995; Hurk a Zhao, 2005). Je také zapojen do několika hlavních rysů buněčného dělení, jako je rozklad jádra, kondenzace chromozomů, přestavba cytoskeletu a zastavení transkripční aktivity.

Je dobře známo, že protein, nazývaný MPF je zodpovědný za počátek zrání oocyty, nebo se objeví spolu se zánikem zárodečného váčku. Aktivní MPF je schopné fosforylovat proteiny, které formují jaderný obal, a také ty, které jsou zapojeny do kondenzace chromatinu a cytoskeletální reorganizace. U většiny organismů, plně vzrostlé oocyty obsahují zásobu před-zformovaného cyklinu B-Cdc2 kinázy, která je udržována v inaktivní formě jako pre-MPF inhibiční fosforylací na Thr14 a Tyr 15 z Cdc2. Defosforylace a tím i následná aktivace Cdc2 kinázy vyžaduje Cdc25 fosfatázu (Hurk a Zhao, 2005).

Aktivita MPF v oocyty s meiotickým blokem je regulována cytostatickým faktorem (CSF – cytostatic factor). Během MII bloku brání CSF vyřazení MPF z činnosti udržováním komplexu podporující anafázi (APC – anaphase promoting complex) v nečinnosti. Když je však APC aktivní, vytvořený komplex označí cyklin B a ten je poté degradován ubiquitinovou signální dráhou. Při oplození je nutné, aby došlo k dostatečnému poklesu hladiny MPF k tomu, aby oocyt mohl dokončit kompletní meiotické zrání a zahájit aktivaci (Heytens et al., 2008).

Jak během mitózy, tak meiózy, inaktivace MPF při přechodu z metafáze do anafáze silně koreluje s fosforylací p34<sup>cdc2</sup> kinázy a degradací souvisejících cyklinů. Dokud je aktivita MPF udržována cytostatickým faktorem (CSF), činnost těchto dvou složek zmizí po oplození, aby mohlo dojít ke kompletnímu dokončení meiózy. Udržování aktivity MPF a CSF se zdá být závislé na fosforylaci (Mayes et al., 1995).

**Obrázek 3 Signální dráhy ovlivňující aktivaci MPF**



*Progesteronem aktivované signální dráhy kontrolující aktivaci MPF, konkrétně u oocytů žáby rodu Xenopus. Jedna dráha zahrnuje aktivaci MAPK skrze snížení hladin cAMP/PKA, což má za následek aktivaci Mos a MEK. Aktivace MAPK vyvolává zvýšenou regulaci MPF skrze inhibici myt1, kinázy zodpovědné za inhibiční fosforylace Cdc2 na treonin-14 a tyrozin-15. Druhá signální dráha vede k aktivaci Cdc-25, po které následuje zvýšená regulace MPF pomocí defosforylace Cdc25 na serin-287 (převzato z Hurk, R. van den, Zhao, J. 2005. Formation of mammalian oocytes and their growth, differentiation and maturation within ovarian follicles. Theriogenology, 63 (6), 1717-1751, strana 1737).*

### MAP kinázy

MAP kinázy jsou serin/treoninové kinázy aktivované na počátku buněčného dělení jako odpověď na přítomnost růstových faktorů a je aktivovaná fosforylací tyrozinu. Původním významem bylo, že dokáží fosforylovat MAP (MAP - microtubule-associated protein), zatímco dnes reprezentuje mitogenem aktivovanou protein kinázu (Whitaker, 1996). Mitogenem aktivované protein kinázy (MAPK - mitogen-activated protein kinase) jsou další známé kinázy, zapojené do zrání oocytu (Hurk a Zhao, 2005). Aktivace MAP kinázy je nutná k následné aktivaci p34<sup>cdc2</sup> a blokáce MAP kinázy brání činnosti GVBD. Její činnost zaniká po oplození během prvního mitotického cyklu při formování prvojader. U myších oocytů je zodpovědná za udržování chromatinu v kondenzovaném stavu a potlačování S fáze během druhého meiotického dělení (Whitaker, 1996). V savčích oocytech jsou přítomné dvě

izoformy MAPK, ERK1 a ERK2. MAP-kináza se aktivuje pomocí MEK, specifickou MAP-kinázou, která je v době své aktivity regulována Mos, kinázou specifickou pro zárodečné buňky. Na rozdíl od MPF, načasování aktivace MAPK se během zrání oocytů druhově liší. Například v oocytech velkých domestikovaných druhů se aktivovaná MAPK objeví společně s, nebo po GVBD, zatímco u myších oocytů je MAPK aktivována post-GVBD. MAPK má mnoho molekulárních cílů, které jsou umístěny buď v jádře nebo cytoplazmě, včetně cytoskeletárních proteinů. V průběhu meiotického zrání je aktivita MAPK nezbytná pro zabezpečení činnosti MPF, formování vřeten a zachování MII bloku (Hurk a Zhao, 2005).

### **Cyklický adenosin monofosfát (cAMP)**

Hladina cAMP v oocytu hraje ve zrání oocytu důležitou roli. Farmakologické manipulace vedoucí ke zvýšení hladin cAMP v savcích oocytech, vytváří blokádu meiózy. Vysoká úroveň cAMP v oocytu jej udržuje v meiotickém bloku, pravděpodobně skrze signální dráhu proteinu kinázy A (PKA). Toto je potvrzováno ve studiích používajících injekce PKA inhibiční nebo regulační a katalytické podjednotky PKA v oocytech rodu *Xenopus* a myši. V souladu s touto hypotézou, fosfodiesterázové (PDE) inhibitory blokují zrání oocytu v podmínkách *in vivo* a také *in vitro*. Výsledná ztráta mezibuněčné komunikace v důsledku LH vlny, může být příčinou obnovení meiózy. Může být také zabráněno dávkám cAMP distribuovaných granulózou a snížit tak koncentraci cAMP uvnitř oocytu, který se tímto dovede k inaktivaci PKA signální dráhy (Hurk a Zhao, 2005).

### **Vápník**

Vápník je sekundární buněčný posel u mnoha biologických dějů, jako je růst, diferenciace, transkripční aktivace a apoptóza. Hraje hlavní roli v oplození a je tedy je tedy v organismu přítomen již od jeho raných počátků. Spermie při oplození nedodává jen genetický materiál, ale také vyvolává oscilaci  $Ca^{2+}$  a následně prolamuje meiotický blok oocytu po druhém meiotickém zrání. Zvýšení hladiny  $Ca^{2+}$  je nutné u všech druhů a stačí na dokončení aktivace oocytu a zahájení embryonálního vývoje. U savčích oocytů začínají hladiny  $Ca^{2+}$  oscilovat po vstupu spermie do oocytu. Tyto oscilace jsou zapotřebí k povolení MII bloku a započítí všech dalších událostí spojených s aktivací oocytu, jako je kortikální reakce, vývoj maternální mRNA, rozvoj prvojader a mitotické štěpení (Heytens et al., 2008).

Hladina  $Ca^{2+}$  vzrůstající po oplození je rozhodující signál pro aktivaci oocytů a je zodpovědný za spuštění embryogeneze. Vlna  $Ca^{2+}$  má počátek v místě fúze spermie a oocytu

a šíří se napříč cytoplazmou oocyty (Miyazaki, 2006). Poprvé byla pozorována u oocytů *Oryzias latipes* v roce 1978 ve studii Gilkeyho et al. (1978). První označení jako  $Ca^{2+}$  oscilace bylo popsáno u savčích oocytů v roce 1981 autory Miyazakim a Igusou (1981).

Signální dráhy uvolňující vápenné ionty byly objeveny v polovině 80. let. Byl objeven Ryanodinový receptor a inositol 1,4,5-trifosfát ( $IP_3$ ). Ryanodinový receptor (RyR) byl lokalizován v sarkoplazmatickém retikulu a je aktivován  $Ca^{2+}$  a ryanodinem. Schopností  $IP_3$  je mobilizovat  $Ca^{2+}$  z endoplazmatického retikula u řady buněk (Miyazaki, 2006).

U savčích oocytů, které mají zastavený růst v metafázi meiózy II, je nárůst  $Ca^{2+}$  při oplození využit k inaktivaci cytotatického faktoru – endogenního inhibitoru meiotického dělení, zodpovědného za stabilizaci aktivity MPF. Následné snížení hladiny MPF umožňuje obnovení buněčného cyklu. Hlavním aspektem zrání oocyty je zvýšení citlivosti endoplazmatického retikula (ER) spouštěcím mechanismům  $Ca^{2+}$ . Nárůst senzitivity je spojen s reorganizací endoplazmatického retikula, což u několika druhů má na následek tvorbu clusterů a domén, které korelují s možností vytvářet normální  $Ca^{2+}$  odpověď při oplození (Santella et al., 2004).

Vizualizace pomocí časové osy u rodu *Xenopus* ukázala, že ER zrajících, nebo již vyzrálých oocytů se rapidně pohybuje, což naznačuje, že mobilita endoplazmatického retikula má svou roli v dynamické redistribuci  $IP_3$  receptorů ( $IP_3R$ ) do kortikálního regionu. Bylo též prokázáno, že se  $IP_3R$  zvyšuje a redistribuuje do kortexu v zrajících oocytů, kde umožňuje optimální  $Ca^{2+}$  oscilaci při oplození. U experimentů, při nichž byla použita RNA interference na prevenci zvýšení hladiny  $IP_3R$  typu 1, byl sledován 50% pokles počtu vyvolaných  $Ca^{2+}$  vln pomocí spermií (Santella et al., 2004). Oscilace  $Ca^{2+}$  zabraňují návratu hladin MPF do takových hodnot, aby zabraňovalo aktivaci (Heytens et al., 2008).

Dalším poslem, jehož mechanismus účinku spočívá v podpoře počátečního a lokalizovaného nárůstu  $Ca^{2+}$ , který je poté následován rozšířením  $Ca^{2+}$  oscilací po celé buňce zprostředkovaných pomocí  $IP_3$  je nikotin adenin dinukleotid fosfát (NAADP) (Santella et al., 2004).

## **PLC $\zeta$**

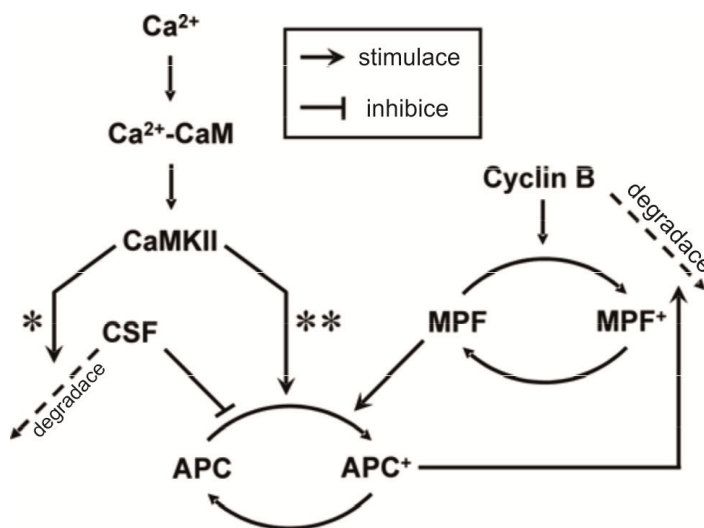
Nějaký čas nebylo známo, jakým faktorem spermie přispívá aktivaci, což bylo zanedlouho objasněno objevením specifické fosfolipázy C, nazvané PLC $\zeta$ . Tato fosfolipáza má vlastnosti faktoru, který aktivuje oocyt. Injekce rekombinantní myši a lidské PLC $\zeta$  RNA do myších oocytů způsobuje nejen navození oscilací  $Ca^{2+}$  shodných s těmi, které indukovala

spermie, ale také podporuje následný embryonální vývoj. Stejný výsledek byl získán při mikroinjekci rekombinantního myšního proteinu PLC $\zeta$  do myších oocytů. Pomocí imunolokalizačních studií bylo prokázáno, že místem lokalizace PLC $\zeta$  u lidských i myších spermií je perinukleární théka (Heytens et al., 2008).

PLC $\zeta$  katalyzuje tvorbu inozitol trifosfátu, který spouští uvolňování Ca<sup>2+</sup> z buněčných rezerv a následně indukce vápenné oscilace v oocytu. Vápník aktivuje kalmodulin dependentní kinázu II (CaMKII), enzym známý svou senzitivitou k frekvenci Ca<sup>2+</sup> oscilací. CaMKII přímo aktivuje APC a také podporuje degradaci CSF (Heytens et al., 2008).

Výsledkem je, že APC je osvobozeno od represí CSF a inhibice MPF je ukončena. Aktivace APC způsobí buněčné odmítnutí aktivity MPF a současně uvolnění z MII bloku (Heytens et al., 2008).

**Obrázek 4 Schematický náčrt účinku vápníku na MII blok oocytu**



*Schéma znázorňující uvolnění z M II bloku a znovuoobnovení buněčného cyklu indukované vápníkem. Osa Ca<sup>2+</sup>-CaM rychle a přímo aktivuje APC (\*\*) a také podporuje degradaci CFS, což je proces s pomalejší kinetikou (\*). Degradace CSF spouští inhibici APC. Aktivované ACP (APC+) podporuje odbourávání Cyklinu B a v důsledku to je deaktivováno MPF. Tento děj vrcholí zrušením M II bloku a znovuoobnovením buněčného cyklu (převzato z Heytens, E., Soleimani, R., Sutter, P. De. 2008. Oocyte activation: The impact of calcium signals on fertilization. Iranian Journal of Reproductive Medicine, 6 (4), 171-174, strana 173).*

### 3.2. Kalcineurin

Kalcineurin (Cn) je heterodimer, skládající se ze dvou podjednotek, katalytické podjednotky CnA (60 kDa) a CnB (19 kDa) (Chan et al., 2005; Liu et al., 2010). Co se týče struktury jeho domény, aktivní dvojjaderné kovové místo kalcineurinu je na podjednotce A, která je u savců velké 57-59 kDa, v závislosti na izoformě. Velikost katalytické podjednotky může být až do 20 % větší u nižších eukaryotů (např. *Saccharomyces cerevisiae* – 63-69 kDa, *Drosophila melanogaster* – 62-65 kDa) (Rusnak a Mertz, 2000; Liu et al., 2010). Kalcineurin B je těsně přiléhající myristoylovaná podjednotka vázající  $\text{Ca}^{2+}$  o velikosti 19 kDa (Chan et al., 2005; Liu et al., 2010). U savců se nacházejí dvě formy genu kódujících kalcineurin B. U jednoho z nich neustále dochází k expresi, zatímco mRNA pro druhý gen byla nalezena pouze ve tkáni varlete. Podjednotka kalcineurinu B je také úsek, který je udržován ve stejné, či podobné podobě po celou evoluci. Lidský kalcineurin B má z 86 % shodnou aminokyselinovou sekvenci jako hmyzí (např. *Drosophila*) a z 54 % shodnou sekvenci s *S. cerevisiae*. Gen pro savčí kalcineurin B je kódován proteinem o velikosti 170 aminokyselin obsahujících čtyři EF-handové modely vázající  $\text{Ca}^{2+}$  (Rusnak a Mertz, 2000). Tyto podjednotky jsou pevně spojeny a mohou být odděleny použitím denaturačních činidel. Klonování tohoto enzymu poskytlo důkazy o tom, že všechny eukaryotické organizmy mají jeden nebo více genů, kódujících každou podjednotku (Rusnak a Mertz, 2000).

I když patří kalcineurin do skupiny proteinových fosfatáz, strukturálně a funkčně se od alkalických a kyselých fosfatáz liší (Bandyopadhyay et al., 2002). Jedná se o fosfoprotein serin/treonin fosfatázu, fyziologicky aktivovanou  $\text{Ca}^{2+}$  kalmodulinem a je také známý jako protein fosfatáza 2B (PP2B) (Hogan and Li, 2005; Klee et al., 1998). Váže se s ním pevně kalmodulin, ale pouze v přítomnosti zvýšené, avšak stále fyziologické hladiny  $\text{Ca}^{2+}$  (Hogan a Li, 2005). Od jiných fosfatáz se kalcineurin A odlišuje třemi doménami na COOH koncích. Tyto domény byly identifikovány jako doména vázající kalcineurin B, kalmodulin vázající doména a autoinhibiční doména, která váže se do štěpu v aktivním místě při absenci  $\text{Ca}^{2+}$ /kalmodulinu a inhibuje činnost enzymu, který má ve spojení s vazným místem kalmodulinu schopnost jeho regulace (Rusnak a Mertz, 2000; Chan et al., 2005). CnB je regulační podjednotka fosfatázy, která váže  $\text{Ca}^{2+}$  (Chan et al., 2005).

Kalcineurin je hlavní protein vázající kalmodulin v mozku a jediná serin/treoninová protein fosfatáza pod kontrolou  $\text{Ca}^{2+}$ /kalmodulinu. Jeho stimulace multifunkčním proteinem, kalmodulinem, zajišťuje koordinovanou regulaci aktivity jeho protein fosfatázy s aktivitami mnoha jiných enzymů, včetně vysokého počtu protein kináz, pod kontrolou  $\text{Ca}^{2+}$  a kalmodulinu. Kalcineurin je ve vysoké míře exprimován v mozku, ale je také detekována



v nejrůznějších tkáních mimo té nervové (Bandyopadhyay et al., 2002; Klee et al., 1998; Saneyoshi et al., 2000;).

### 3.2.1. Struktura

Kalcineurin je heterodimer složený z katalytické a na kalmodulin se vázající podjednotky, kalcineurinu A a těsně se vázající (i za přítomnost jen nanomolárních koncentrací  $\text{Ca}^{2+}$ ) k regulační  $\text{Ca}^{2+}$ -vázající podjednotce, kalcineurinu B (Klee et al., 1998).  $\alpha\beta$  kvartérní struktura kalcineurinu, sledovaná u savců, je udržována evolučně již od nižších eukaryotů (Rusnak a Mertz, 2000). Tato dvoujednotková struktura jedinečná mezi fosfatázami, se nachází od kvasinek až po člověka a je esenciální. Totéž platí o vysoce konzervativních AMK sekvencích katalytických a regulačních domén izoform kalcineurinu A u různých organismů (Klee et al., 1998).

Jeho struktura tvaru činky, je podobná struktuře kalmodulinu se dvěma laloky, z nichž každá je složena ze dvou přilehlých smyček spojených pružnou šroubovicí. Jak se dá předpokládat z jeho sekvence, váže 4 moly z  $\text{Ca}^{2+}$ , jeden s vysokou afinitou a tři s afinitou mikromolárního rozsahu (Klee et al., 1998).

Rusnak a Mertz (2000) ve své práci uvádějí informaci o tzv. fosfodiesterázovém modelu, který netvoří strukturu pouze protein fosfatázy 1, 2A a kalcineurinu, ale i mnoha dalších enzymů, zapojených do štěpení fosfodiesterových vazeb, včetně kyselých a alkalických fosfatáz, bakteriálních nukleáz, diadenozin tetrafosfatáz, 59-nuklotidáz, fosfodiesteráz, sfingomyelin fosfodiesteráz, fosfatáz v bakteriofágu  $\alpha$  a  $\alpha$  protein fosfatáz. Čtyři ze zbytků ve fosfoesterázovém modelu, jsou ligandy k dinukleárnímu kovovému kofaktoru u PP1 a kalcineurinu. Navzdory těmto odlišnostem má fosfoesterázový model stejný  $\beta$ - $\alpha$ - $\beta$ - $\alpha$ - $\beta$  záhyb umožňující pojímat dvoujádrové kovové centrum. (Rusnak a Mertz, 2000).

U kalcineurinu se nachází v předchozích částech popsána přítomnost fosfoesterázového modelu jako  $\beta$ - $\alpha$ - $\beta$ - $\alpha$ - $\beta$  a poskytuje skelet aktivnímu místu dvoujáderného kovového centra. Tři  $\beta$ -vlákna tohoto modelu tvoří paralelně složený list, na jehož vrcholu intervenuje  $\alpha$ -šroubovice. Dva kovové ionty jsou umístěny na vrcholu tohoto kovového centra. Čtyři z kovových ligandů jsou poskytovány zbytky mezi smyčkami  $\beta$ -listů a  $\alpha$ -šroubovic (Rusnak a Mertz, 2000).

Celková struktura katalytické podjednotky má tvar elipsy a skládá se ze směsi  $\alpha$ -šroubovic a  $\beta$ -listů. Vázací doména kalcineurinu B je evidentní v tomto uspořádání jako  $\alpha$ -

šroubovice, která vyčnívá z molekuly, tvořící vazebné místo pro podjednotku kalcineurinu B (Rusnak a Mertz, 2000).

Podjednotka kalcineurinu B vytváří komplex s kalcineurinem A skrze vazebnou šroubovici kalcineurinu B. Čtyři  $\text{Ca}^{2+}$ , jsou navázány na EF-hand domény podjednotky kalcineurinu B. Terminální skupina  $\text{NH}_2$  myristoylové skupiny kalcineurinu B se nachází v hydrofobní štěrbině mezi dvěma amfipatickými šroubovicemi, které jsou nedílnou součástí obou EF-hand. Na rozdíl, rentgenové struktury nemyristoylovaných proteinů ukazují prvních pět zbytků  $\text{NH}_2$  konce kalcineurinu B jako chybové struktury, což svědčí o zvýšené mobilitě  $\text{NH}_2$  konců ve vztahu k acylovaným proteinům. A tak se myristoylová skupina zdá být ukotvena pomocí hydrofobních kontaktů a může přispět k celkové strukturální stabilitě enzymu a může také vysvětlit, proč acylované proteiny zvyšují teplotní stabilitu ve srovnání s nemodifikovaným enzymem (Rusnak a Mertz, 2000).

### 3.2.2. Izoformy

U savců jsou z oddělených genů exprimovány tři izoformy katalytické podjednotky ( $\text{A}\alpha$ ,  $\text{A}\beta$  a  $\text{A}\gamma$ ) a dvě izoformy regulační podjednotky (B1 a B2) (Hogan a Li, 2005; Liu et al., 2010). U savců se nacházejí dvě izoformy kalcineurinu B, CnB1, původně objeven ve spojení s kalcineurinem A  $\alpha$  a  $\beta$  a CnB2, k jehož expresi dochází pouze ve varletech; pouze jedna forma byla popsána u octomilek a kvasinek (Klee et al., 1998)

S výjimkou variabilních N- a C- terminačních konců, jejichž funkčnost není objasněna, vykazují tři enzymy 83 – 89% identity v dalších 90% jejich sekvence. Zachovaným prvkem  $\beta$  izoformy je N-terminální polyprolinový model, zatímco několik dalších základních reziduí na C-terminálním konci je zodpovědných za vysoké pI (Klee et al., 1998).

### 3.2.3. Řízení a inhibice

Kalcineurin může být v *in vitro* podmínkách fosforylován protein kinázou C, kasein kinázou I a II. A i když je možné fosforylaci blokovat pomocí  $\text{Ca}^{2+}$ /kalmodulinu, kinetické vlastnosti fosforylovaného a defosforylovaného kalcineurinu jsou stejné (Rusnak a Mertz, 2000).

Jeho rezistence vůči endogennímu inhibitoru fosfatázy 1 a 2, dále vůči účinným inhibitorům protein fosfatázy 1 a 2A, kyselině okadaové, kalyculinu a mikrocystinu, z něho

udělala obtížně zkoumatelný objekt až do doby, dokud nebyl označen jako cíl imunosupresiv, FK506 a cyklosporinu A (CsA) (Klee et al., 1998).

Klasickou cestou, jakou je kalcineurin *in vivo* regulován jsou změny nitrobuněčné koncentrace  $\text{Ca}^{2+}$ . Tudíž v buňce ve fázi klidu, kde je  $\text{Ca}^{2+}$  v nízké koncentraci, není kalcineurin schopný vázat kalmodulin a enzym setrvává v neaktivní formě. V signálních drahách vedoucích k nárůstu nitrobuněčné hladiny  $\text{Ca}^{2+}$ , má  $\text{Ca}^{2+}$  vazující na kalmodulin důsledky vedoucí ke konformačním změnám. Ty následně umožňují navázání se na kalcineurin a aktivování fosfatázové aktivity.  $\text{Ca}^{2+}$ , které se váže s kalcineurem B pravděpodobně hraje též určitou roli (Rusnak a Mertz, 2000).

Činnost kalcineurinu se zdá být ovlivněna fosfolipidy a to buď aktivací, nebo inhibicí, v závislosti na fosfolipidu a substrátu. Byl také objeven rekombinantní diktyostelinní kalcineurin aktivovaný kyselinou arachidonovou a nenasycenými mastnými kyselinami s dlouhým řetězcem. Tyto účinky mohou být fyziologicky významné s ohledem na to, že kalcineurin se nachází během frakcionace v membránovém spojení (Rusnak a Mertz, 2000).

Regulace kalcineurinu je možná i pomocí redoxních reakcí aktivního místa kovových iontů. Předchozí studie prokázaly, že kalcineurin je citlivý vůči redoxním regulacím v *in vitro* podmínkách při procesu, který se může též vyskytnout také v podmínkách *in vivo*. Též bylo potvrzeno, že činnost kalcineurinu může být ovlivněna extracelulárními oxidanty, zejména pomocí  $\text{H}_2\text{O}_2$ . A tak má expozice buněk vůči mikromolárním koncentracím  $\text{H}_2\text{O}_2$  za následek inhibici NF-AT zprostředkovaných procesů a zdá se být zprostředkován kalcineurem. Mechanizmy regulace se mohou nacházet v aktivním redoxním místě  $\text{Fe}^{3+}$  aktivního binukleárního aktivního místa, který může přepínat mezi redukcí ( $\text{Fe}^{2+}$ ) a oxidací ( $\text{Fe}^{3+}$ ) (Rusnak a Mertz, 2000).

### **3.2.4. Funkce v organismu**

Kalcineurin je součástí řady biochemických a fyziologických procesů v organismu a hraje klíčovou roli v mnoha biologických procesech. Jsou jimi např. vývoj kardiovaskulárního a kosterního svalstva, apoptóza buněk a také plní hlavní roli při spojování  $\text{Ca}^{2+}$  signálů a buněčné odpovědi, v mozku má svou roli při fungování paměti, hormonální kontrole, genové regulaci a regulaci iontových kanálů. V játrech řídí fosforylaci proteinů a ochranu jater a řídí i např. motilitu spermií a interakci integrinu a fibronektinu. (Chan et al., 2005; Klee et al., 1998).

Nejstudovanější rolí kalcineurinu je jeho účast na imunitní reakci, kdy defosforyluje a podporuje jadernou lokalizaci jaderného faktoru aktivovaných T buněk (NFAT - nuclear factor of activated T cells) transkripčních faktorů, které zvyšují transkripci aktivačních genů T-buněk (Chan et al., 2005; Rusnak a Mertz, 2000). Ovlivňuje také programovanou buněčnou smrt B a T lymfocytů. V *in vitro* modelech se využívá při vyhledávání signálních drah zodpovědných za ligaci buněk receptorů T-buněk s CD3 komplexem, což má za následek apoptózu u hybridomů T-buněk (Rusnak a Mertz, 2000).

Jeho biologické účinky jsou rozmanité, závisí při nich na buněčných souvislostech. U savců přispívá např. k regulaci enzymů a iontových kanálů, chemotaxe, nakládání s membránovými vezikuly, vývoj srdečních chlopní a osteoklastů, a genetickým programům aktivace lymfocytů a diferenciaci kosterního svalstva (Hogan a Li, 2005).

Kalcineurin je přítomen ve všech zkoumaných eukaryotech, kromě vyšších rostlin. Je hojně distribuován v tkáních a nejvyšší hladiny jsou nalezeny v mozku. Kromě toho, podjednotky kalcineurinu A a B byly pozorovány např. v osteoklastech kostí (Awumey et al., 1999), srdci (Ding et al., 1999), zadním mozku a míše, ledvinách (Aperia et al., 1992), játrech (Farghali a Masek, 1998), placentě (Pallen et al., 1985), B a T lymfocytech (Chanter et al., 1985), v tukové tkáni, buňkách nadledvin, krevních destičkách, sítnici, kosterních svalech, hladké svalovině, plicích, slinivce břišní, slezině, varlatech a spermiích, brzlíku a štítné žláze (revided in Rusnak a Mertz, 2000). Kalcineurin může mít hlavní roli při nitrobuněčné signalizaci i při nízkých hladinách, jak je potvrzeno u T-lymfocytů a kosterních svalů. U pučících kvasinek má kalcineurin roli v koordinaci přizpůsobení k zátěži životního prostředí, a to jak skrze kalcineurin-Crz1p transkripční dráhu, tak skrze posttranslační mechanismy (Hogan a Li, 2005).

Ukázalo se tedy, že kalcineurin hraje důležitou roli v aktivaci T-buněk. Důkaz o tom, že FK506 a CsA, navázány na jejich vazebné proteiny, FKBP12 a cyklophilin A, jsou specifickými inhibitory kalcineurinu poskytující nástroje potřebné k odhalení mnoha dalších rolí v transdukci signálu  $Ca^{2+}$ . (Klee et al., 1998).

Hraje klíčovou roli v mnoha biologických dějích včetně signální transdukce T-buněk. Kalcineurin je přítomný v brzkých událostech probíhajících při aktivaci T-buněk. U lymfoidních buněk, vede stimulace receptorů T-buněk k jaderné translokaci jaderného faktoru aktivovaných T-buněk (NF-AT - nuclear factor of activated T-cell) prostřednictvím aktivace kalcineurinu, což aktivuje imunitní odpověď genů, jako je interleukin-2. Bylo prokázáno, že imunofiliny, cyklophilin a na FK506 se vážající protein (FKBP – FK506 binding protein), které fungují jako specifické receptory pro CsA a FK506, komunikují s kalcineurinem a inhibují

jeho aktivitu, což má za následek inhibici jaderné translokace u NF-AT. Nedávno bylo objeveno, že signální cesta Cn-NFAT se zapojuje v nelymfoidních buňkách a tkáních. To naznačuje, že signální cesta kalcineurinu má celou řadu rolí jak v imunitních, tak neimunitních systémech (Saneyoshi et al., 2000).

Saneyoshi et al. (2000) se ve své studii zabývá charakteristikou role kalcineurinu během raného vývoje. Naklonoval podjednotku CnA u rodu *Xenopus* (XCnA) exprimovanou v jejich oocytech a zkoumal expresní vzor u raně se vyvíjejících se jedinců. Uvedl následující výsledky. Sekvence nukleotidů XCnA obsahuje předpokládaný ATG start kodon, kterému předcházela 373 bp (bp – base pair – páry báze) dlouhá 5'-doprovodná sekvence, samotný otevřený čtecí rámec kódovaný 508 aminokyselinami a 906 bp dlouhou 3'-nepřekládanou sekvencí (Saneyoshi et al, 2000).

Vzhledem k tomu, že proteinové proteolýzy neodhalily stabilní proteinové domény genu DSCR1, Chan et al (2005) se ve své studii zabýval otázkou strukturální organizace tohoto genu pro výrobu proteinových fragmentů, které by mohly být dostatečné pro interakci s kalcineurinem. Fragmenty odpovídající regionům kódovanými různými exony genu DSCR1 byly exprimovány jako GST fúzní proteiny. Tyto proteiny byly imobilizovány pomocí glutathion-sefarózové pryskyřice a inkubovány s kalcineurinem. Po promytí od pryskyřice byly navázané proteiny analyzovány SDS-PAGE. Kalcineurin byl rozrušen exonem DSCR1, ale nestalo se tomu tak v přítomnosti pouze GST, což naznačuje, že přítomnost GST partikulí nezasahuje do interakcí s kalcineurinem. Překvapivě, fragmenty DSCR1 postrádají konzervovaný model FLISPPXSPP exonu 6, zachovávající schopnost vázat kalcineurin. Kromě toho, exon 7 sám o sobě je schopný se navázat na kalcineurin, vzhledem k tomu, že chybějící exon 7 u DSCR1 fragmentů je neschopný se angažovat při vyřazení kalcineurinu. Tyto výsledky poukazují na fakt, že úsek, který je kódován exonem 7 je nezbytný a postačující pro navázání kalcineurinu. (Chan et al, 2005)

### **Endogenní regulátory**

Kromě syntetických a přírodních inhibitorů kalcineurinu existuje množství endogenních buněčných proteinů, které se ukázaly jako potenciální inhibitory protein fosfatázové aktivity kalcineurinu a tedy vhodně regulátory jeho *in vivo* funkcí. Jako jeden z prvních byl objeven AKAP79 (79-kDa protein kinase A anchoring protein). Ten spojuje regulační podjednotku cAMP dependentní protein kinázy. Zajímavé je, že AKAP79 obsahoval doménu homologní k FKBP, o které se vedla hypotéza, že to může být vazebná

doména kalcineurinu. Syntetický peptid založený na této sekvenci byl nekompetitivním inhibitorem kalcineurinu. Další studie naznačuje, že AKAP79 spolupracuje s kalcineurinem skrze místo odlišné od FKBP homologní oblasti (Rusnak a Mertz, 2000).

Dalším možným regulačním proteinem kalcineurinu je cain/cabin 1, 2220 - reziduální fosfoprotein izolovaný použitím hybridních kvasinek využitím sekvencí hipokampů z cDNA knihoven myši a potkanů. Cain/cabin 1 se váže na kalcineurin a inhibuje ho v nekompetitivní formě. Interakce mezi cain/cabin 1 a kalcineurinem závisí na aktivaci protein kinázy C, a nadměrná exprese inhibuje aktivaci transkripce genu pro interleukin 2 a zabraňuje defosforylaci transkripčního faktoru NF-AT (Rusnak a Mertz, 2000).

Nicméně, klasickým mechanismem regulace aktivity kalcineurinu je skrze  $\text{Ca}^{2+}$ /kalmodulin. Je zajímavé uvažovat, že tyto a případně další proteiny mohou interagovat s kalcineurinem za účelem regulace subcelulárního cílení a/nebo činnosti se specifickými substráty novými, zatím nedefinovanými drahami (Rusnak a Mertz, 2000).

### 3.2.5. Úloha kalcineurinu v oogenezi

Mochida a Hunt (2007), stejně tak jako Nishiyama et al. (2007) uvádějí, že kalcineurin je nezbytný pro výstup z metafáze II u oocyty rodu *Xenopus*. Konkrétně je nutný pro prolomení bloku způsobeného Mos-MAP kinázové signální dráhy. Kalcineurin je přechodně aktivován po přidání  $\text{Ca}^{2+}$  k oocytům, zatímco inhibitory kalcineurinu, jako je např. cyklosporin A, pozdrží destrukci cyklinů, fosforylaci specifických metafázních fosfoproteinů a obnovu plně funkčního jaderného obalu. Studie prokázala, že se druhá vlna fosfatázové aktivity namířená na mitotické fosfoproteiny objevuje až po nárůstu aktivity kalcineurinu. Tato aktivita ustala, jakmile se vzorek dostal do metafáze a objevil se opět na konci dělení (Mochida a Hunt, 2007; Nishiyama et al., 2007).

Pomocí experimentů bylo zjištěno, že nadměrná exprese proteinů MCIP (Modulatory calcineurin-interacting protein) vede k inhibici aktivity kalcineurinu, avšak činnost v *in vivo* organizmech není úplně jasná. Takeo et al. (2006) ve své práci ukázal, že je u *Drosophily* MCIP Sarah (sra) nezbytným pro meiotickou progresi u oocytů. Oocyty z matek těchto mušek byly zastaveny v anafázi meiózy I a tato fenotypová ztráta se projevovala specificky u samičí linie. Sra se fyzicky pojí s katalytickou podjednotkou kalcineurinu a jeho nadměrná exprese potlačuje konstitučně aktivovaný kalcineurin, což se projevuje např. ztrátou křídelních žilek, nebo hrubým okem. Hyperaktivace kalcineurinu se podepsala na meioticky blokováném

fenotypu, což mohlo být také způsobeno vyšší expresí Sra. Všechny tyto výsledky podporují hypotézu, že Sra reguluje samičí meiózu řízením aktivity kalcineurinu (Takeo et al, 2006).

Takeo et al. (2006) využil se své práci prázdnou mutaci genu Sra. Zjistil, že homozygoté byly během larvární fáze semiletální. Kromě toho, samice  $sra^{KO}$  byly sterilní a nastávalo u nich k abnormálním ovulacím. Tím dokázal, že je sra zodpovědný za abnormality v  $sra^{KO}$  populaci, konkrétně za defekty u obou pohlaví, hlavně ovulace a sterility u samičího pohlaví. U  $sra^{KO}$  neexistuje žádná morfologická změna na utváření vaječnicků a z jejich oocytů nebyly schopné se vylíhnout larvy. Oproti tomu, oocyty divokých linií *Drosophila* po 2 hodinách depozice dokončily meiózu a podrobily se synchronnímu mitotickému jadernému dělení (Takeo et al., 2006).

Sra patří u skupiny *Drosophila* mezi (MCIP), což je, jak bylo již výše zmíněno, skupina endogenních regulátorů kalcineurinu. Genom *Drosophila* obsahuje 3 geny, kódující CnA podjednotku ( CanA1, Pp2B-14D a CanA-14F) a 2 geny, kódující podjednotkou CnB (CanB a CanB2). Předpokladem práce Takea et al. (2006) bylo, že sra působí u *Drosophila* jako endogenní regulátor. Analýzy exprese však ukázaly, že všechny CnA a CnB geny jsou aktivní jak u larev, tak u dospělých jedinců, ale přesto jenom Pp2B-14D, CanA-14F a CanB2 byly exprimovány u raných embryí a ve vaječnicích. Sra vytváří komplex s CnA a CnB podjednotkami. MCIP působí jako inhibitor kalcineurinu tím, že se váže přímo na podjednotku CnA. Bylo také prokázáno, že podjednotky kalcineurinu jsou stabilnější v případě, že vytvoří komplex (Takeo et al., 2006).

## 4. Materiály a metody

### 4.1. Materiál

#### 4.1.1. Získávání vaječníků a oocytů

Vaječníky byly odebírány z prasniček v neznámé fázi estrálního cyklu poražených na jatkách. Do 1 hodiny od poražení byly vaječníky dopraveny ve fyziologickém roztoku (0,9% NaCl) při 38°C do laboratoře. Z 2-5 mm velkých folikulů byly aspirací získávány plně dorostlé oocyty (120  $\mu$ m). Pro další studium byly vybrány pouze oocyty s neporušeným a kompaktním kumulem.

#### 4.1.2. Kultivační média pro *in vitro* zrání prasečích oocytů

##### NCSU-37

Pro zrání prasečích oocytů v *in vitro* podmínkách bylo používáno kultivační médium NCSU-37. Skládá se z řady komponent, uvedených v tabulce 1. Jednotlivé složky byly přidány do 100 ml redestilované H<sub>2</sub>O v daném pořadí. Takto připravený roztok je skladovatelný 2 týdny při teplotě 4°C a jeho pH musí být kolem hodnoty 8.

**Tabulka 1 Složení zásobního média NCSU-37**

Sloučenina	Molekulární váha	Koncentrace (mM)	g/100 ml
NaCl	58,45	108,73	0,63553
NaHCO <sub>3</sub>	84,00	25,07	0,21059
KCl	74,55	4,78	0,03563
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	136,09	1,19	0,01619
MgSO <sub>4</sub> · 7H <sub>2</sub> O	246,50	1,19	0,02933
CaCl <sub>2</sub> · 2H <sub>2</sub> O	147,00	1,70	0,02499
glukóza	180,20	5,55	0,10000
glutamin	146,10	1,00	0,01461
D-sorbitol	182,20	12,00	0,21864
penicilin G			0,00650
streptomycin			0,01250



Pro *in vitro* zrání oocytů bylo 100 ml zásobního roztoku NCSU-37 obohaceno o:

- 100 ml zásobního roztoku NCSU-37
- 0,0069g cysteinu
- 100  $\mu$ l  $\beta$ -merkapt ethanolu
- 10  $\mu$ l insulinu

Tento roztok je možné skladovat pouze po dobu 1 týdne při teplotě 4°C.

K obohacenému kultivačnímu médiu NCSU-37 byla v den kultivace přidána prasečí folikulární tekutina, dibutyryl cyklický adenosin monofosfát (dbcAMP), eCG:hCG (PG 600, Intervet Boxmeer, Holandsko).

### **Tabulka 2 Složení obohacující NCSU-37**

Sloučenina	Koncentrace
folikulární tekutina	10% (v/v)
dbcAMP	1mM
eCG	13,4 IU/ml
hCG	6,6 IU/ml

### **Roztoky pro *in vitro* zrání prasečích oocytů**

#### **$\beta$ -merkapt ethanol**

35 $\mu$ l z komerční nádoby  $\beta$ -merkapt ethanolu se rozpustí v 9,65ml destilované H<sub>2</sub>O. Roztok se nadávkuje na 100 $\mu$ l dávky a uchovává se při -20°C (až po dobu několik měsíců).

#### **Insulin**

Komerční baňka o velikosti 50mg se rozpustí v 990 $\mu$ l destilované H<sub>2</sub>O a 10  $\mu$ l HCl 1N. Vytvoříme 10 $\mu$ l dávky a uchováváme v -20°C až do doby použití (až po několik měsíců).

#### **Prasečí folikulární tekutina**

Prasečí folikulární tekutina se získává z vaječnicků aspirací povrchových folikulů o průměru 3-6 mm. Následně se centrifuguje roztok při 3000 otáčkách za minutu a po dobu 30 minut při 4°C. Odsaje se supernatant a dvakrát se přefiltruje. Poprvé je nutné odstranit

epitelie, podruhé se filtruje skrze filtr o menších rozměrech (0,22  $\mu\text{m}$ ). Vytvoří se 1 ml zkumavky a uchovávají se při  $-20^{\circ}\text{C}$  (až po několik měsíců).

#### Dibutyryl cyklický AMP (dbcAMP)

100 mg dávky se rozpustí ve 4 ml redestilované vody. Vytvoří se dávky po 45  $\mu\text{l}$  a uchovávají se při  $-20^{\circ}\text{C}$  (opět možné po několik měsíců.)

#### Tabulka 3 Složení a koncentrace jednotlivých sloučenin v médiu pro *in vitro* zrání oocytů

Sloučenina	Finální koncentrace v médiu NCSU-37
cystein	0,57 mM
$\beta$ -merkptoethanol	5 $\mu\text{M}$
inzulin	5 mg/l
prasečí folikulární tekutina	10% (v/v)
dbcAMP	1 mM
PMSG	10 UI/ml
HCG	10 UI/ml

#### 4.1.3. Kultivační média pro *in vitro* fertilizaci prasečích oocytů

##### TALP

Pro zrání prasečích oocytů v *in vitro* podmínkách bylo používáno kultivační médium TALP. Skládá se z řady komponent, uvedených v tabulce 5. Jednotlivé složky byly přidány do 100 ml redestilované  $\text{H}_2\text{O}$  v daném pořadí. Takto připravený roztok je po přefiltrování (filtr 0,22 $\mu\text{m}$ ) skladovatelný 2 týdny při teplotě  $4^{\circ}\text{C}$  a jeho pH musí být kolem hodnoty 7,2.

#### Tabulka 4 Složení média TALP

Sloučenina	Molekulární váha	Koncentrace (mM)	g/100 ml
NaCl	58,45	114,06	0,6660
KCl	74,55	3,20	0,0240
$\text{MgCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$	203,31	0,50	0,0100
laktát sodný	112,06	10,00	0,24 ml

NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> * H <sub>2</sub> O	138,00	0,35	0,0048
glukóza	180,20	5,00	0,0900
NaHCO <sub>3</sub>	84,01	25,07	0,2100
kofein	194,20	2,00	0,0388
kalcium laktát . 5H <sub>2</sub> O 4°C	308,30	8,00	0,2466
PVA		1 mg/ml	0,1000
kanamycin)	582,60	0,17	0,0100
červený fenol	334,38	0,003	0,0001

Před samotnou *in vitro* fertilizací se médium obohatí o pyruvát sodný a albumin. Alespoň 3 hodiny před použitím je nutná ekvilibrace v inkubátoru.

Pro *in vitro* fertilizaci oocytů bylo 100 ml zásobního roztoku TALP obohaceno o:

- 100 ml roztoku NCSU-37
- 0,3 g BSA
- 0,012 g pyruvátu sodného

### **Percoll**

Tento roztok se v experimentu využíval pro selekci živých spermií od mrtvých, pomocí sloupcového gradientu.

Na 10 ml Percollu nutné připravit roztoky následující molarity:

### **Tabulka 5 Roztoky pro přípravu Percollu**

Sloučenina	Molarita	Poměr vážení
KCl	1 M	0,745 g / 10 ml
NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	0,1 M	0,138 g / 10 ml
CaCl	1M	1,470 g / 10 ml
MgCl <sub>2</sub>	0,1M	0,203 g / 10 ml

Následovala příprava zásobního roztoku. Sloučeniny uvedené v tabulce 6 se při daném pořadí doplnily do 100 ml redestilované vody. Takto připravený roztok je uchovatelný po dobu 1 měsíce při 4°C.

**Tabulka 6 Zásobní roztok pro přípravu Percollu**

Sloučenina	Množství
NaCl	4,675 g
HEPES	2,380 g
roztok KCl	3,1 ml
roztok NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	2,9 ml
H <sub>2</sub> O	60,0 ml

Konečná příprava 90% roztoku Percollu je uvedena v Tab. 7.

**Tabulka 7 Roztoky pro přípravu 90% Percollu**

Sloučenina	Množství
NaHCO <sub>3</sub>	25 mg
roztok CaCl 1 M	50 µl
roztok MgCl <sub>2</sub> 0,1 M	100 µl
laktát sodný	92 µl
zásobní roztok	2,5 ml
Percoll	22,5 ml

## **BTS**

Pro přípravu BTS je nutné do 100 ml redestilované vody přimíchat následující komponenty:

**Tabulka 8 Složení roztoku BTS**

Sloučenina	g / 100 ml
glukóza	0,00002
Na <sub>2</sub> EDTA . 2H <sub>2</sub> O	0,336
NaHCO <sub>3</sub>	1,50
citrát sodný	2,00
KCl	0,50

#### **4.1.4. Příprava pracovních roztoků pro imunolokalizaci**

##### **PBS (Phosphate Buffered Saline)**

Pro přípravu roztoku fosfátového pufru se rozpustí 1 tableta PBS (Sigma, Německo) ve 200 ml redestilované vody.

##### **2,5% paraformaldehyd v PBS**

2,5 g paraformaldehydu (Sigma, Německo) rozmícháme v 50 ml redestilované vody a při míchání zahříváme. Teplota nesmí přesáhnout 70°C, vznikne mírně zakalený roztok, ve kterém se rozpustí většina paraformaldehydu. Poté se nechá roztok vychladnout. Dalším krokem je přikápnutí 3 kapek 1 N NaOH za stálého míchání. Za několik minut se roztok začne čerit. Nestane-li se tak, přikápneme další 2-3 kapky. Výsledkem je 5% roztok paraformaldehydu, který po ochlazení smícháme v poměru 1:1 s PBS (5 ml 5% paraformaldehydu s 5 ml PBS). Roztok je nutné pokaždé připravovat čerstvý.

##### **5% roztok BSA**

Příprava 5% roztoku BSA je následující. 1 g BSA se rozpustí v 20 ml redestilované H<sub>2</sub>O.

## **4.2. Metody**

### **4.2.1. *In vitro* zrání oocytů prasete**

Vybrané oocyty byly kultivovány v médiu NCSU 37 po dobu 20-22 hodin v inkubátoru při teplotě 39 °C ve směsi 5% CO<sub>2</sub> se vzduchem. Po následném oplachu byly oocyty přeneseny do čerstvého média bez přídavku dbcAMP a hormonů a kultivovány dalších 20-22 hodin do metafáze II.

#### 4.2.2. *In vitro* fertilizace prasečích oocytů

Pro *in vitro* fertilizaci byly používány chlazené inseminační dávky kančího semene z inseminační stanice (PROAGRO Nymburk a.s., Nová Ves). Do laboratoře byly inseminační dávky přepraveny v chlazeném boxu a chráněné před světlem. Byla provedena kontrola motility spermií pod mikroskopem při zvětšení 100x-400x. Tato kontrola se při IVF technice provádí 3x. Ihned po obdržení inseminační dávky, poté po přidání média TALP a naposledy po samotném provedení IVF. Pro selekci živých spermií od mrtvých byl používán sloupcový gradient Percoll (Sigma-Aldrich, Německo). Do zkumavky se nalije 2ml 90% Percollu, na něj se pomalu po stěně zkumavky navrství 2 ml 45% Percollu a opět po stěně se nakonec navrství 0,5 ml semene. Takto připravená zkumavka se vloží do centrifugy a nechá se po dobu 30 minut centrifugovat při 2100 otáčkách za minutu bez brzdy. Poté se plastovou pasterkou odsaje supernatant a přidá se 5 ml média TALP. Tentokrát se médium přidává nikoliv pro separaci, ale kvůli promytí spermií od Percollu a pro navození kapacity. Opět se centrifuguje, ale po dobu 10 minut při 2100 otáčkách za minutu a s brzdou na konci. Následuje hemocytometrický výpočet koncentrace spermií. Do melanžéru se nasaje semeno po značku 1 pro ředění 100:1 (příp. 0,5 – při ředění 200:1) a dále se melanžér doplní Hayemem po značku 101. Poté je nutné melanžér po dobu 1 minuty protřepat a následně se suspenze umístí pod krycí sklíčko Bürkerovy komůrky. V komůrce se spočítají spermie v 10 polích, počet se vynásobí počtem 1600 (při ředění 200:1 se násobí číslem 3200) a získá se koncentrace spermií v 1 ml. Konečná koncentrace pro IVF byla upravena na  $1 \times 10^5$  spermií/ml.

Pro *in vitro* fertilizaci byly používány oocyty nacházející se v metafázi 2. meiotického dělení. Po 40 – 44 hodinách *in vitro* kultivace byly zralé oocyty mechanicky zbaveny kumulárních buněk a opláchnuty ve fertilizačním médiu TALP. Poté byly inkubovány společně se spermii ve fertilizačním médiu TALP po dobu 15-20 minut. Objem použitého média odpovídá hodnotě 500  $\mu$ l na 50 inkubovaných oocytů.

IVF probíhala v kultivační misce NUNC se 4 jamkami. Po uplynutí inkubační doby byly oocyty opláchnuty od přebytečných spermií, které nebyly navázány na ZP. A dále kultivovány po dobu 18-20 hodin do stádia prvojader.

#### 4.2.3. Partenogenetická aktivace oocytů prasete

Z *in vitro* zralých oocytů byly mechanicky pomocí tenkostěnné kapiláry odstraněny kumulární buňky. Následně byly ošetřeny 25  $\mu$ M kalcium ionoforem A 23187 (Sigma-Aldrich, Německo) po dobu 5 minut při teplotě 39°C ve směsi 5% CO<sub>2</sub>. Poté byly oocyty krátce opláchnuty v médiu bez kalcia a 2 hodiny kultivovány *in vitro* s inhibitorem protein kináz, 6-dimethylaminopurinem (6-DMAP; Sigma-Aldrich, Německo), o koncentraci 2  $\mu$ M. Následovalo opláchnutí v čistém médiu a 22 hodinová kultivace do stadia prvojader.

#### 4.2.4. Imunolokalizace kalcineurinu

Získané oocyty či zygoty bez kumulárních buněk byly zbaveny v prostředí 0,1% pronázy v PBS *zony pellucidy* a opláchnuty ve třech kapkách 0,1% BSA v PBS. Následuje fixace oocytů bez ZP v 2,5% paraformaldehydu v PBS po dobu 30 minut, kdy je nutné roztok vyměnit, a dalších 30 minut, opět při laboratorní teplotě. Fixované oocyty byly permeabilizovány 0,5% (v/v) Tritonem X-100 v PBS. Permeabilizace oolemy trvá minimálně 2 hodiny při laboratorní teplotě a je vhodné během této doby dvakrát vyměnit roztok. Poprvé po 5 minutách, podruhé po hodině praní. Poté byly oocyty krátkodobě opláchnuty v 0,1% (v/v) Tweenu 20 v PBS. Následně byly oocyty inkubovány v inkubačním médiu (0,1% (w/v) BSA a 0,01% (v/v) Tween 20 v PBS) s primární protilátkou myší anti-kalcineurin (Sigma-Aldrich, Německo), ředěnou v poměru 1:100 a inkubovány přes noc v délce 14 - 16 hodin při teplotě 4°C a ve vlhkém prostředí. Pro odstranění nadbytečné nenavázané protilátky byly oocyty promyty v roztoku 0,1% (v/v) Tweenu 20 v PBS. Toto praní se provádí 3x, a to vždy po 10 minutách. Následovala druhá inkubace, která byla provedena v (0,1% (w/v) BSA s anti-myší IgG konjugovanou s fluorescein-5-izothiokyanátem (FITC; Sigma-Aldrich, Německo) při ředění 1:100. Tato inkubace trvá 1 hodinu a je prováděna při laboratorní teplotě a ve tmě. Dalším krokem je opět praní oocytů, a to v 0,1% (v/v) Tweenu 20 v PBS, které se opakuje 3x, vždy po dobu 10 minut. Při následujícím praním se oocyty nechají v roztoku 0,1% (w/v) BSA v PBS po dobu 10 minut. Pro vizualizaci chromatinu bylo použito barvivo 4,6-diamino-2-fenylindol (DAPI), a montování oocytů na podložní sklíčka. Byl používán Slowfade kit (Invitrogen/Molecular Probes). Oocyty se opláchnou ve 3 kapkách ekvilibračního pufu. Oocyty byly na podložní sklíčko montovány v kapce glycerolu v PBS a přikryty krycím sklíčkem. Následovalo hodnocení pod konfokálním mikroskopem. Vzorky byly snímány

pomocí laserového konfokálního mikroskopu (Leica SPE, Německo) – FITC při vlnové délce (emisní) 520nm. DNA (DAPI) byla stanovována při vlnové délce 410 nm. Oocyty v kontrolní skupině byly ošetřeny stejně jako ve skupině experimentální, pouze s tím rozdílem, že při první inkubaci nebyla v inkubačním médiu rozpuštěna primární protilátka.

#### **4.2.5. Vyhodnocení experimentů**

##### **Analýza obrazu**

Fotografie získané z konfokálního mikroskopu byly hodnoceny pomocí analýzy obrazu (NIS Elements 2003, Laboratory Imaging, Česká republika). V oblasti prvojádra, korové oblasti a v oblasti cytoplazmy oocyty byla stanovena průměrná intenzita signálu fluorescence FITC. Pro rozlišení intenzity signálu byl používán 2 stupňový klasifikátor. V oocytech ve stádiu metafáze II byla intenzita fluorescence měřena v oblasti meiotického vřeténka místo prvojádra. Data z jednotlivých oblastí oocyty byla porovnávána vzhledem k celkové intenzitě fluorescence FITC v oocyty a byla tak stanovena relativní intenzita fluorescence v jednotlivých oblastech oocyty (prvojádro, korová oblast, cytoplazma) a byla zpracována v programu Microsoft Excel.

##### **Statistická analýza**

Statistická analýza byla prováděna v programu STATISTICA, verze 9.0. Použita byla metoda jednofaktorová ANOVA, Sheffeho test. Nulová hypotéza ( $H_0$ ) byla zamítána na hladině významnosti  $\alpha = 0,05$ .



#### 4.2.6. Experimentální schéma

V tomto experimentu byla lokalizována protein fosfatáza 2B neboli calcineurin během aktivace oocytů. Oocyty byly rozděleny do 3 experimentálních skupin:

- 1) Oocyty ve fázi metafáze II (MII)
- 2) Oocyty aktivované spermií během *in vitro* fertilizace (IVF)
- 3) Oocyty partenogeneticky aktivované (PA)

V každé skupině byla lokalizována podjednotka calcineurinu A i B. Průměrný počet oocytů ve skupině byl 15 oocytů, minimální počet byl 4 oocyty.

## 5. Výsledky

### Buněčná lokalizace kalcineurinu během aktivace prasečích oocytů

Cílem této práce byla buněčná lokalizace proteinové fosfatázy, kalcineurinu, během aktivace prasečího oocytu. Imunolokalizační hodnocení prokázalo přítomnost obou podjednotek kalcineurinu A a B, ve zralých i aktivovaných oocytech.

#### Kalcineurin A

U oocytů v metafázi II byl kalcineurin A lokalizován v cytoplazmě, v okolí meiotického vřeténka a zejména v korové oblasti (Obr. 5). Zralé oocyty vykazovaly nejvyšší intenzitu fluorescence v korové oblasti. Naopak nejnižší intenzita signálu kalcineurinu byla zaznamenána v perichromozomální oblasti.

Oocyty *in vitro* aktivované spermií vykazovaly přítomnost kalcineurinu jak v prvojádře, tak v korové oblasti a cytoplazmě. Intenzita fluorescence kalcineurinu v této skupině byla nejvyšší v korové oblasti, nejmenší naměřená průměrná hodnota byla v oblasti prvojader, i když v cytoplazmě v těsné blízkosti prvojádra byl znatelný nárůst intenzity (Obr. 6). Ve srovnání se skupinou MII bylo naměřeno statisticky významné snížení fluorescence v cytoplazmě celého oocytu.

Partenogeneticky aktivované oocyty měly nejvyšší hodnotu fluorescence naměřenou v oblasti prvojádra, nejnižší v korové oblasti. Obě podjednotky kalcineurinu byly opět lokalizovány jak v prvojádře, tak v korové oblasti a cytoplazmě nikoliv však v oblasti jádérka (Obr. 7).

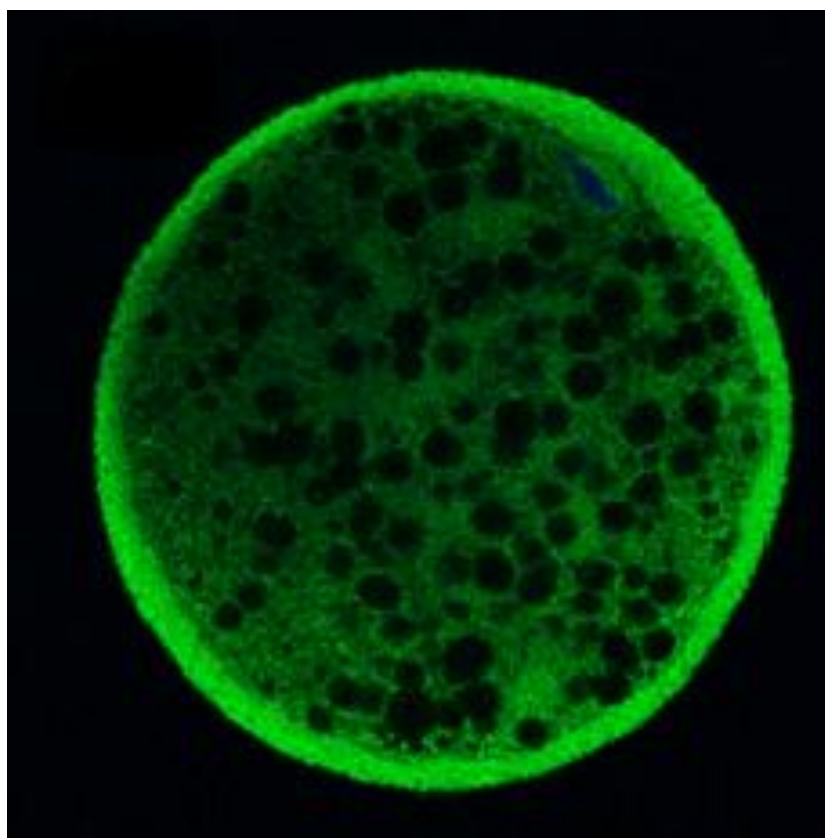
Všechny hodnocené skupiny kalcineurinu A vykazovaly přítomnost kalcineurinu ve všech zkoumaných oblastech. Co se týče perichromozomální oblasti/prvojádra, nejvyšší hodnoty fluorescenčního signálu byly naměřeny u partenogeneticky aktivovaných oocytů, zatímco nejnižší hodnoty se vyskytovaly u MII oocytů. Nejvyšší hodnoty intenzity fluorescence v cytoplazmě byly pozorovány u MII oocytů a nejnižší u partenogeneticky aktivovaných oocytů. Korová oblast vykazovala nejvyšší intenzitu u oocytů ve skupině IVF, avšak vůči skupině MII nebyl zaznamenán statistický pokles, naproti tomu nejnižší byly hodnoty naměřené u oocytů partenogeneticky aktivovaných (Tab. 9).

**Tabulka 9 Relativní intenzita fluorescence kalcineurinu A ve zralých a aktivovaných oocytech prasete**

Skupina	N	perichr.obl./prvojádro	korová oblast	cytoplazma
		$x \pm SD$	$x \pm SD$	$x \pm SD$
<b>MII</b>	10	$0,78 \pm 0,12^{aA}$	$1,13 \pm 0,12^{aB}$	$1,09 \pm 0,10^{aB}$
<b>IVF</b>	19	$0,82 \pm 0,13^{aA}$	$1,23 \pm 0,16^{aB}$	$0,96 \pm 0,08^{bC}$
<b>PA</b>	4	$1,22 \pm 0,14^{bA}$	$0,87 \pm 0,07^{bB}$	$0,91 \pm 0,08^{bB}$

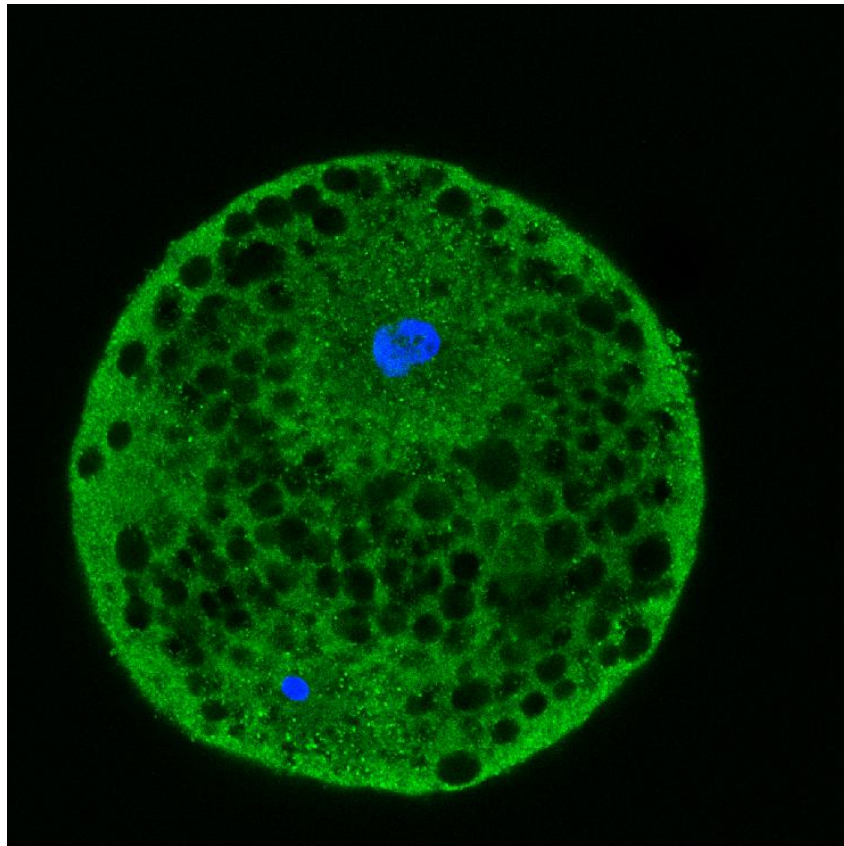
*MII – oocyty ve stádiu metafáze II, IVF – oocyty po in vitro fertilizaci, PA – partenogeneticky aktivované oocyty, N – počet oocytů ve skupině, x – průměr, SD – směrodatná odchylka. Signifikantní rozdíly na hladině  $P < 0,05$  mezi jednotlivými skupinami (sloupce) jsou označeny superskripty <sup>a, b</sup> a mezi kompartmenty oocyty (jádro, korová oblast, cytoplazma) v jednotlivých vývojových stádiích oocyty (řádky) jsou označeny superskripty <sup>A, B, C</sup>.*

**Obrázek 5 Buněčná lokalizace kalcineurinu A v oocytu v metafázi II**



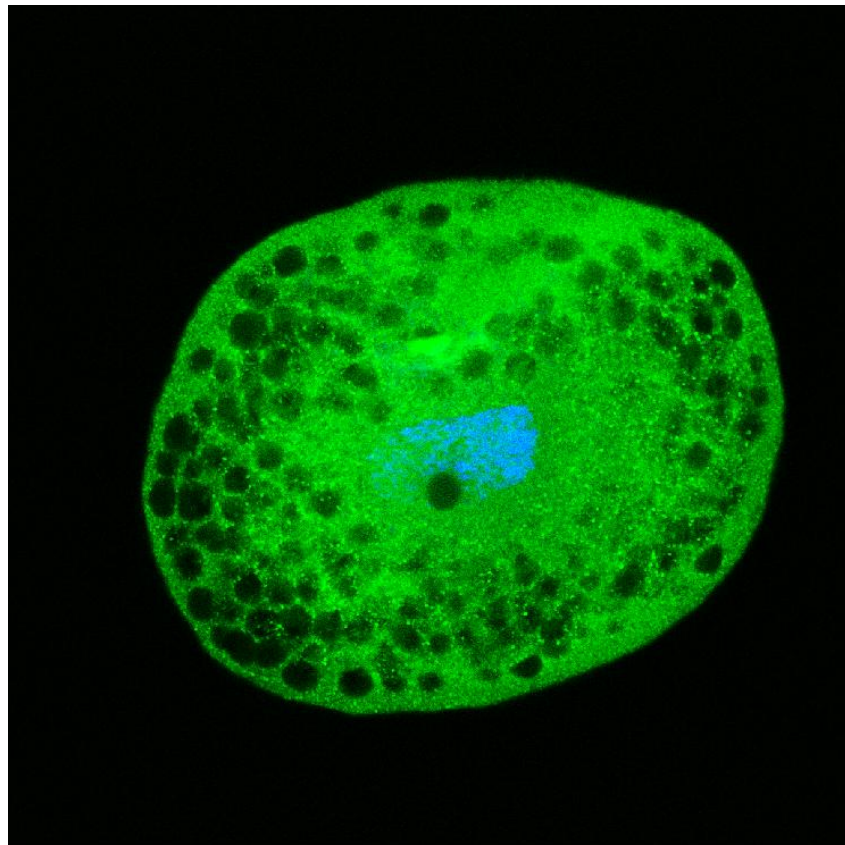
*Kalcineurin A byl lokalizován pomocí nepřímé imunofluorescence použitím protilátky anti-kalcineurin  $\alpha$  ve zralých oocytech. Zeleně je značen protein pomocí FITC, modře chromatin pomocí DAPI. Oocyt byl snímán v rovině metafázní figury. Zvětšení 400x.*

**Obrázek 6** Buněčná lokalizace kalcineurinu A v oocytu aktivovaném během *in vitro* fertilizace



*Kalcineurin A byl lokalizován pomocí nepřímé imunofluorescence použitím protilátky anti-kalcineurin  $\alpha$  ve zralých oocytech. Zeleně je značen protein pomocí FITC, modře chromatin pomocí DAPI. Oocyt byl snímán v rovině prvojádra. Zvětšení 400x.*

**Obrázek 7** Buněčná lokalizace kalcineurinu A v partenogeneticky aktivovaném oocytu



*Kalcineurin A byl lokalizován pomocí nepřímé imunofluorescence použitím protilátky anti-kalcineurin  $\alpha$  ve zralých oocytech. Zeleně je značen protein pomocí FITC, modře chromatin pomocí DAPI. Oocyt byl snímán v rovině prvojádra. Zvětšení 400x.*

## Kalcineurin B

U zkoumaných oocytů v metafázi II byl kalcineurin opět lokalizován v perichromozomální a v korové oblasti a také v cytoplazmě (Obr. 8). Nejvyšší naměřené hodnoty fluorescence se vyskytovaly v korové oblasti, nejnižší pak v cytoplazmě.

Oocyty ve skupině IVF vykazovaly intenzitu fluorescence jak v prvojádře, tak v korové oblasti a cytoplazmě, nikoliv však v jádru. Nejvyšší hodnota intenzity byla naměřena v korové oblasti oocytů, zato v prvojádře byla intenzita nejnižší. Sledovali jsme zde i pokles vůči perichromozomální oblasti MII oocytů (Obr. 9, Tab. 10).

Partenogeneticky aktivované oocyty měly kalcineurin lokalizován opět v prvojádře, korové oblasti a cytoplazmě. Nejvyšší hodnota intenzity byla naměřena v oblasti korové oblasti, nejnižší v prvojádře, se staticky nevýznamným rozdílem ve srovnání s cytoplazmou zkoumaných oocytů. Kalcineurin nebyl opět lokalizován v oblasti jádru (Obr. 10).

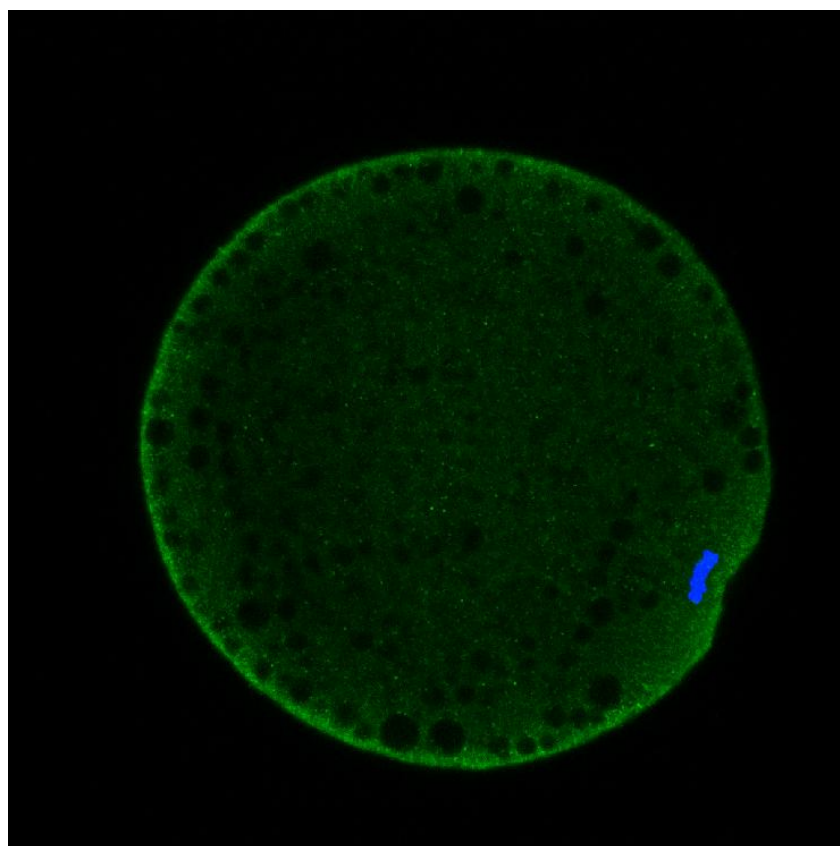
Všechny hodnocené skupiny kalcineurinu B vykazovaly přítomnost kalcineurinu ve všech zkoumaných oblastech oocytu. Co se týče perichromozomální oblasti/prvojádru, nejvyšší hodnoty byly naměřeny u oocytů v metafázi II, zatímco nejnižší hodnoty se vyskytovaly u IVF oocytů. Korová oblast vykazovala nejvyšší intenzitu u oocytů ve skupině IVF, naproti tomu nejnižší byly hodnoty naměřené u oocytů v metafázi II, prakticky však ve všech třech skupinách nebyly rozdíly statisticky významné. Nejvyšší hodnoty intenzity v cytoplazmě byly pozorovány u IVF oocytů a nejnižší u oocytů v metafázi II (Tab. 10).

**Tabulka 10 Relativní intenzita fluorescence kalcineurinu B ve zralých a aktivovaných oocytech prasete**

Skupina	N	perichr.obl./prvojádru	korová oblast	cytoplazma
		$\bar{x} \pm SD$	$\bar{x} \pm SD$	$\bar{x} \pm SD$
<b>MII</b>	23	$0,93 \pm 0,28^{aA}$	$1,36 \pm 0,22^B$	$0,71 \pm 0,15^{aC}$
<b>IVF</b>	21	$0,74 \pm 0,09^{bA}$	$1,43 \pm 0,17^B$	$0,83 \pm 0,10^{bA}$
<b>PA</b>	13	$0,79 \pm 0,04^{abA}$	$1,39 \pm 0,05^B$	$0,80 \pm 0,04^{abA}$

*MII – oocyty ve stádiu metafáze II, IVF – oocyty po in vitro fertilizaci, PA – partenogeneticky aktivované oocyty, N – počet oocytů ve skupině, x – průměr, SD – směrodatná odchylka. Signifikantní rozdíly na hladině  $P < 0,05$  mezi jednotlivými skupinami (sloupce) jsou označeny superskripty <sup>a, b</sup> a mezi kompartmenty oocytu (jádro, korová oblast, cytoplazma) v jednotlivých vývojových stádiích oocytu (řádky) jsou označeny superskripty <sup>A, B, C</sup>.*

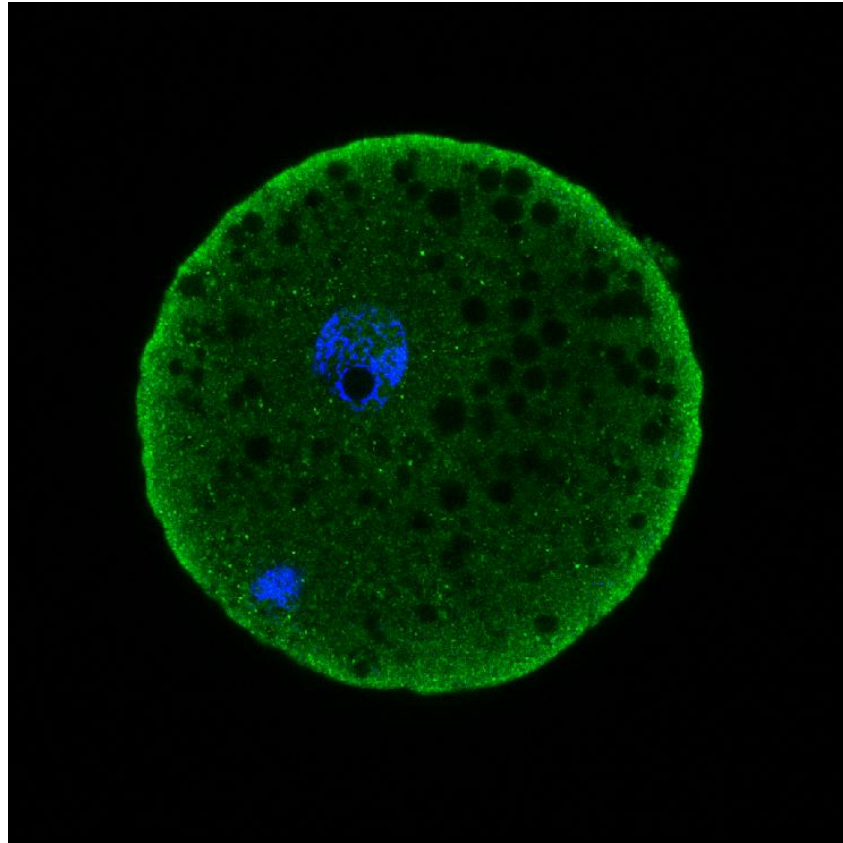
**Obrázek 8 Buněčná lokalizace kalcineurinu B v oocytu v metafázi II**



*Kalcineurin B byl lokalizován pomocí nepřímé imunofluorescence použitím protilátky anti-kalcineurin  $\beta$  ve zralých oocytech. Zeleně je značen protein pomocí FITC, modře chromatin pomocí DAPI. Oocyt byl snímán v rovině metafázní figury. Zvětšení 400x.*

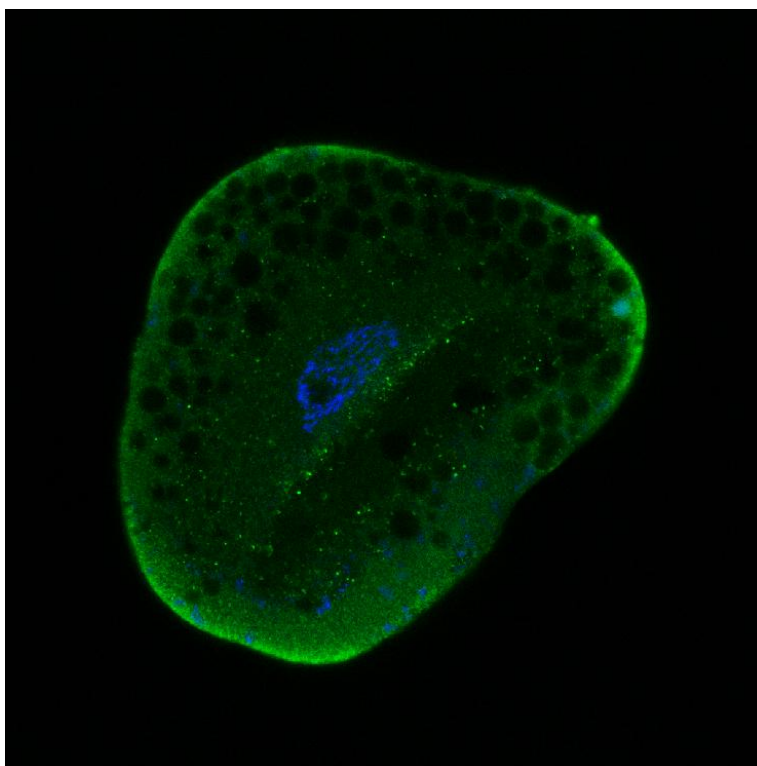


**Obrázek 9** Buněčná lokalizace kalcineurinu B v oocytu aktivovaném během *in vitro* fertilizace



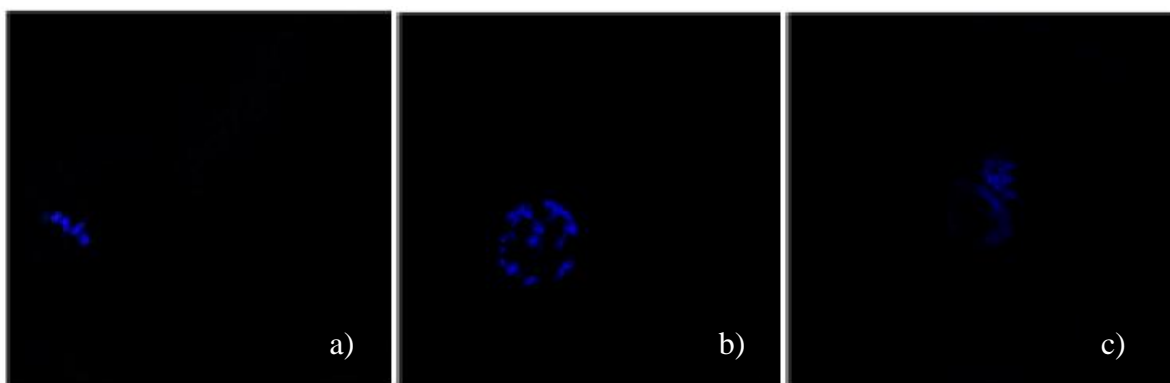
*Kalcineurin B byl lokalizován pomocí nepřímé imunofluorescence použitím protilátky anti-kalcineurin  $\beta$  ve zralých oocytech. Zeleně je značen protein pomocí FITC, modře chromatin pomocí DAPI. Oocyt byl snímán v rovině prvojádra. Zvětšení 400x.*

**Obrázek 10** Buněčná lokalizace kalcineurinu B v partenogeneticky aktivovaném oocytu



*Kalcineurin B byl lokalizován pomocí nepřímé imunofluorescence použitím protilátky anti-kalcineurin  $\beta$  ve zralých oocytech. Zeleně je značen protein pomocí FITC, modře chromatin pomocí DAPI. Oocyt byl snímán v rovině prvojádra. Zvětšení 400x.*

**Obrázek 11** Oocyty z kontrolních skupin pro průkaz kalcineurinu A a B



*U oocytů v metafázi II (a), v partenogeneticky aktivovaných oocytech (b) a v oocytech fertilizovaných in vitro (c) z kontrolní skupiny nebyla použita primární protilátka anti-kalcineurin při první inkubaci. Použitá sekundární protilátka byla konjugovaná s FITC (zeleně) a chromatin byl barven pomocí DAPI (modře). Oocyt byl snímán v rovině metafázní figury nebo prvojádra. Zvětšení 400x*

## 6. Diskuze

Aktivace savčího oocyty je sledem složitých biochemických a morfologických procesů zahrnující zvýšení hladiny intracelulárního vápníku, exocytózu kortikálních granul a výstup z druhého meiotického bloku. Tyto procesy jsou regulovány prostřednictvím řady regulačních faktorů, mezi které patří i oxid dusnatý, kinázy, cykliny a také fosfatázy. Výskyt jedné z nich, fosfatázy 2B, kalcineurinu, však nebyl dosud v savčích oocytech potvrzen. Prozatím se podařilo prokázat výskyt kalcineurinu pouze v oocytech mouchy rodu *Drosophila* (Takeo *et al.*, 2006) a žáby rodu drápatka (*Xenopus*) (Mochida a Hunt, 2007; Nishiyama *et al.*, 2007). U savců byl kalcineurin detekován v mozkové tkáni (Wang a Desai, 1976), a také v kančích spermích (Tash *et al.*, 1988). Kalcineurin je klíčovým členem mnoha fyziologických procesů, které ovlivňují buněčnou odpověď prostřednictvím  $Ca^{2+}$  dependentní signalizace, regulace iontových kanálů a změn v transkripci genů v somatických buňkách (Rusnak a Mertz, 2000) i v oocytech *Drosophily* a *Xenopa* (Takeo *et al.*, 2006; Mochida a Hunt, 2007; Nishiyama *et al.*, 2007). Lze tedy předpokládat, že tato fosfatáza je také zapojena do regulace procesů během aktivace savčích oocytů.

V této práci se podařilo prokázat přítomnost kalcineurinu v oocytech prasete. Pomocí imunocytochemické metody byly lokalizovány obě podjednotky kalcineurinu (CnA, CnB) v oocytech nacházejících se v metafázi druhého meiotického dělení a v oocytech aktivovaných partenogeneticky nebo pomocí spermie během *in vitro* fertilizace. Mochida *et al.* (2007) prokázali významnou úlohu kalcineurinu při regulaci meiotického zrání oocytů žáby rodu *Xenopus laevis*. Je pravděpodobné, že by kalcineurin mohl hrát roli také v regulaci oogeneze u savců. Ve zralých oocytech prasete byl kalcineurin lokalizován v perichromozomální oblasti, v cytoplazmě a zejména v korové oblasti oocyty. V korové oblasti oocyty se nachází membránou ohraničené organely, kortikální granula (CG) (Thibault *et al.*, 1987; Wassarman, 1988). Kortikální granula pod oolemou jsou uchycena pomocí vrstvy aktinových filament (Longo a Chen, 1985). Exocytóza CG je kalcium dependentní proces, do kterého je zapojena i regulační molekula kalmodulin (Ducibella, 1996). Také kalcineurin serin/reonin protein fosfatáza 2B, která je aktivována vápenatými ionty a kalmodulinem (Klee *et al.*, 1988). Inhibice kalcineurinu v oocytech drápatky zabránila degradaci cyklinu a defosforylaci proteinů specifických pro M-fázi a tím prolomení 2. meiotického bloku (Mochida a Hunt, 2007).

Výstup oocyty z druhého meiotického bloku závisí na aktivačním stimulu, který vyvolá degradaci nebo inaktivaci molekul odpovědných za udržování meiotického bloku. Tento

aktivační stimul vnáší do oocyty v průběhu fertilizace spermie (Yanagimachi, 1988). Spermie obsahuje specifickou izoformu zeta fosfolipázy C (PLC $\zeta$ ), která stimuluje produkci diacylglycerolu (DAG) a inositol 1,4,5-trifosfátu (IP $_3$ ) z fosfatidylinositolu 4,5-bifosfátu (PIP $_2$ ) (Berridge a Irvine, 1984). Činnost IP $_3$  na IP $_3$  receptorech (IP $_3$ R) vyvolá během aktivace savčího oocyty zvýšení hladiny intracelulárního vápníku (Miyazaki et al., 1992; Macháty et al., 1997). Oscilace vápníku vyvolají degradaci cyklinu B, pokles hladiny MPF a inaktivují cytostatický faktor, což umožní oocyty vstoupit do anafáze II (Lorca et al., 1993). Jednou z účinných molekul závislých na vápníku je kalcineurin. Kalcineurin je nezbytný pro degradaci cyklinu B a pro výstup oocyty *Xenopa* z metafáze II po oplození nebo aktivaci (Mochida a Hunt, 2007; Nishiyama et al., 2007). V této práci se podařilo prokázat přítomnost kalcineurinu v oocytech oplozených *in vitro* i v partenogeneticky aktivovaných oocytech prasete. V zygotách byly obě podjednotky kalcineurinu, A i B, lokalizovány v prvojádrech, v cytoplasmě a zejména v korové oblasti. V oblasti jádérka nebyl protein zaznamenán. V partenogeneticky aktivovaných oocytech byla zaznamenána nejvyšší intenzita kalcineurinu A v oblasti prvojádra. V mnoha somatických buňkách je kalcineurin zapojen do kontroly transkripce (Crabtree, 2001) a mohl by tedy hrát roli v transkripci genů v zygotě po aktivaci oocyty. Navíc, kalcineurin reguluje funkci IP $_3$ R pomocí defosforylace (Cameron et al., 1995), tudíž by mohl být zapojen do regulace oscilací vápníku v průběhu aktivace oocyty. Po *in vitro* fertilizaci i po partenogenetické aktivaci byla zaznamenána silnější intenzita fluorescence v okolí prvojader, a to zejména kalcineurinu A. V okolí prvojader se nachází síť mikrotubulů, která je důležitá pro migraci prvojader do středu vajíčka (Schatten, 1994). Po inhibici kalcineurinu v nervové tkáni došlo ke zvýšení fosforylace aktinu a tubulinu, což naznačuje, že má kalcineurin silný vliv na fosforylaci složek cytoskeletu buňky (Silverman-Gavrila a Charlton, 2009). Tudíž by mohl být kalcineurin zapojen také do organizování mikrotubulů, které je nezbytné pro vytvoření sítě mikrotubulů v okolí prvojader.

Oscilace intracelulárního vápníku vyvolané proniknutím spermie do oocyty způsobí fúzi kortikálních granul s oolemou (Bleil et al., 1981; Miyazaki et al., 1992; Ducibella, 1996). Enzymy uvolněné z kortikálních granul do perivitelinního prostoru modifikují strukturu *zony pellucidy*, a tím zabrání navázání další spermie na ZP a polyspermickému oplození (Bleil et al., 1981). Jelikož nebyla v korové oblasti oocyty prasete zaznamenána změna ve fluorescenci kalcineurinu po aktivaci spermií či partenogenetickou aktivací oproti zralým oocytům, lze předpokládat, že kalcineurin není obsažen v kortikálních granulích, ale nachází se v jejich okolí pod oolemou. Během exocytózy kortikálních granul dochází k jejich přesunu směrem k oolemě pomocí zkracování a depolymerizace aktinových filament (Ducibella, 1996),

přičemž do defosforylace aktinu je zapojen pravděpodobně i kalcineurin (Silverman-Gavrila a Charlton, 2009). Tyto výsledky naznačují možnou úlohu kalcineurinu v exocytóze CG přes regulaci fosforylačního stavu aktinových vláken.

Je zřejmé, že protein fosfatáza 2B je přítomna v oocytech prasete a je pravděpodobně zapojena do procesu aktivace oocyty u savců. Pro lepší pochopení úlohy kalcineurinu v jednotlivých dějích aktivace je nezbytné pokračovat v dalších experimentech.

## 7. Závěr

Cílem této práce bylo potvrzení hypotézy, zda je kalcineurin, neboli fosfatáza 2B, přítomen v meioticky zralých a v aktivovaných prasečích oocytech a je-li zapojen do procesu jejich aktivace doprovázené exocytózou kortikálních granul. Hypotéza byla ověřována pomocí sledování lokalizace kalcineurinu ve zralých, v partenogeneticky aktivovaných, či v oocytech aktivovaných spermií.

V této práci se podařilo prokázat přítomnost kalcineurinu v oocytech prasete. Pomocí imunocytochemické metody byly lokalizovány obě podjednotky kalcineurinu (CnA, CnB) v oocytech nacházejících se v metafázi druhého meiotického dělení a v oocytech aktivovaných partenogeneticky nebo pomocí spermie během *in vitro* fertilizace. Ve zralých prasečích oocytech byl kalcineurin lokalizován hlavně v korové oblasti. Během aktivace oocytu byla zaznamenána změna v redistribuci katalytické podjednotky kalcineurinu a to zejména v okolí prvojader. V jádru aktivovaných oocytů nebyl protein pozorován. Nejvyšší intenzita fluorescenčního signálu na periférii oocytu přetrvávala i po jeho aktivaci a to v případě kalcineurinu A i kalcineurinu B.

Na základě výsledků lze uvažovat o zapojení kalcineurinu v regulaci procesů spojených s aktivací savčího oocytu. Jeho přítomnost v okolí prvojader by mohla vypovídat o zapojení v organizování mikrotubulů důležitých pro migraci prvojader, jelikož má kalcineurin silný vliv na defosforylaci složek cytoskeletu buňky.

K úplnému objasnění role kalcineurinu v aktivaci oocytu prasete je však třeba dalších experimentů.

## 8. Seznam literatury

- Aperia, A., Ibarra, F., Svensson, L. B., Klee, C., Greengard, P. 1992. Calcineurin mediates alpha-adrenergic stimulation of Na<sup>+</sup>, K<sup>+</sup> (+)-ATPase activity in renal tubule cells. *PNAS*, 89 (16), 7394-7397.
- Asano, A., Niwa, K. 2004. Activation and Penetration *In Vitro* of Pig Oocytes Treated with Calcium Ionophore. *Journal of Reproduction and Development*, 50 (1), 77-85.
- Awumey E. M., Moonga, B. S., Sodam, B. R., Koval A. P., Adebajo, O. A., Kumegawa, M., Zaidi, M., Epstein, S. 1999. Molecular and Functional Evidence for Calcineurin-A  $\alpha$  and  $\beta$  Isoforms in the Osteoclast: Novel Insights into Cyclosporin A Action on Bone Resorption. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 254 (1), 248-252.
- Bandyopadhyay, J., Lee, Ji., Lee, Ju., Lee, J. I., Yu, J. R., Jee, Ch., Cho, J. H., Jung, S., Lee, M. H., Zannoni, S., Singson, A., Kim, D. H., Koo, H. S., Ahnn, J. 2002. Calcineurin, a Calcium/Calmodulin-dependent Protein Phosphatase, Is Involved in Movement, Fertility, Egg Laying, and Growth in *Caenorhabditis elegans*. *Molecular Biology of the Cell*, 13, 3281-3293.
- Ben-Yosef, D., Shalgi, R. 1998. Early ionic events in activation of the mammalian egg. *Reviews of Reproduction*, 3, 96-103.
- Berridge, M. J., Irvine, R. F. 1984. Inositol trisphosphate, a novel second messenger in cellular signal transduction. *Nature*, 312, 315-325.
- Bielańska-Osuchowska, Z. 2006. Oogenesis in pig ovaries during the prenatal period: ultrastructure and morphometry. *Reproductive Biology*, 6 (2), 161-193.
- Bleil, J. D., Beall, C. F., Wassarman, P. M. 1981. Mammalian sperm-egg interaction: Fertilization of mouse eggs triggers modification of the major *zona pellucida* glycoprotein, ZP2. *Developmental Biology*, 86 (1), 189-197.
- Cameron, A. M., Steiner, J. P., Roskams, A. J., Ali, S. M., Ronnett, G. V., Snyder, S. H. 1995. Calcineurin associated with the inositol 1,4,5-trisphosphate receptor-FKBP12 complex modulates Ca<sup>2+</sup> flux. *Cell*, 83 (3), 463-472.
- Crabtree, G. R. 2001. Calcium, Calcineurin, and the Control of Transcription. *The Journal of Biological Chemistry*, 276, 2313-2316.

- Ding, B., Price, R. L., Borg, T. K., Weinberg, E. O., Halloran, P. F., Lorell, B. H. 1999. Pressure Overload Induces Severe Hypertrophy in Mice Treated With Cyclosporine, an Inhibitor of Calcineurin. *Circulation Research*, 84, 729-734.
- Ducibella, T. 1996. The cortical reaction and development of activation competence in mammalian oocytes. *Human Reproduction Update*, 2 (1), 29-42.
- Eppig, J. J. 2001. Oocyte control of ovarian follicular development and function in mammals. *Reproduction*, 122, 829-838.
- Farghali, H., Masek, K. 1998 Immunopharmacologic agents in the amelioration of hepatic injuries. *International Journal of Immunopharmacology*, 20 (4-5), 125-139.
- Florman, H. M., Ducibella, T. 2006. Fertilization in Mammals. *Knobil and Neil's Physiology of Reproduction* (3rd ed.) Elsevier, 55-112.
- Gilkey, J. C., Jaffe, L. F., Ridgway, E. B., Reynolds, G. T. 1978. A free calcium wave traverses the activating egg of the medaka, *Oryzias latipes*. *The Rockefeller University press*, 76 (2), 448-466.
- Chan, B., Greenan, G., McKeon, F., Ellenberger, T. 2005. Identification of a peptide fragment of DSCR1 that competitively inhibits calcineurin activity *in vitro* and *in vivo*. *PNAS* (Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America), 102, (37), 13075-13080.
- Hafez, E. S. E., Hafez, B. 2000. Folliculogenesis, Egg Maturation, and Ovulation, in Hafez, E. S. E., Hafez, B. (eds.), *Reproduction in Farm Animals* (7th ed.). Lippincott, Williams & Wilkins, Philadelphia, pp. 68-81.
- Heytens, E., Soleimani, R., Sutter, P. De. 2008. Oocyte activation: The impact of calcium signals on fertilization. *Iranian Journal of Reproductive Medicine*, 6 (4), 171-174.
- Hogan, P. G., Li, H. 2005. Calcineurin. *Current Biology*, 15 (12), 442-443.
- Hunter, M. G. 2000. Oocyte maturation and ovum quality in pigs. *Reviews of Reproduction*, 5, 122-130.
- Hurk, R. van den, Zhao, J. 2005. Formation of mammalian oocytes and their growth, differentiation and maturation within ovarian follicles. *Theriogenology*, 63 (6), 1717-1751.
- Im, G. S., Samuel, M., Lai, L., Hao, Y., Prather, R. S. 2007. Development and calcium level changes in pre-implantation porcine nuclear transfer embryos activated with 6-DMAP after fusion. *Molecular Reproduction and Development*, 74 (9), 1158-1164.



- Klee, C. B., Ren, H., Wang X. 1998. Regulation of the Calmodulin-stimulated Protein Phosphatase, Calcineurin. *The Journal of Biological Chemistry*, 273 (22), 13367-13370.
- Liu, Y., Zhang, Y., Min, J., Liu, L.L., Ma, N.Q., Feng, Y.M., Liu, D., Wang, P.Z., Huang, D.D., Zhuang, Y., Zhang, H.L. 2010. Calcineurin promotes proliferation, migration, and invasion of small cell lung cancer. *Tumor Biology*, 31 (3), 199-207.
- Longo, F. J., Chen, D. Y., 1985. Development of cortical polarity in mouse eggs: Involvement of the meiotic apparatus. *Development Biology*, 107 (2), 382-394.
- Lorca, T., Cruzalegui, F. H., Fesquet, D., Cavadore, J. C., Méry, J., Means, A., Dorée, M. 1993. Calmodulin-dependent protein kinase II mediates inactivation of MPF and CSF upon fertilization of *Xenopus* eggs. *Nature*, 366 (6452), 270-273.
- Macháty, Z., Wang, W. H., Day, B. N., Prather, R. S. 1997. Complete activation of porcine oocytes induced by the sulfhydryl reagent, thimerosal. *Biology of Reproduction*, 57 (5), 1123-1127.
- Mayes, M. A., Stogsdill, P. L., Prather, R. S. 1995. Parthenogenic Activation of Pig Oocytes by Protein Kinase Inhibition. *Biology of Reproduction*, 53, 270-275.
- Mochida, S., Hunt, T. 2007. Calcineurin is required to release *Xenopus* egg extracts from meiotic M phase. *Nature*, 449, 336-341.
- Motlík, J., Crozet, N., Fulka, J. 1984. Meiotic competence *in vitro* of pig oocytes isolated from early antral follicles. *Journal of Reproduction and Fertility*, 72, 323-328.
- Miyazaki, S., Igusa, Y. 1981. Fertilization potential in golden hamster eggs consists of recurring hyperpolarizations. *Nature*, 290, 702-704.
- Miyazaki, S., Yuzaki, M., Nakada, K., Shirakawa, H., Nakanishi, S., Nakade, S., Mikishiba, K. 1992. Block of Ca<sup>2+</sup> wave and Ca<sup>2+</sup> oscillation by the antibody to the inositol 1,4,5,-trisphosphate receptor in fertilized hamster eggs. *Science*, 257, 251-255.
- Miyazaki, S. 2006. Thirty years of calcineurin signals at fertilization. *Seminars in Cell & Developmental Biology*, 17, 233-243.
- Nishiyama, T., Yoshizaki, N., Kishimoto, T., Ohsumi, K. 2007. Transient activation of calcineurin is essential to initiate embryonic development in *Xenopus laevis*. *Nature*, 449, 341-346.
- Pallen, C. J., Valentine, K. A., Wang, J. H., Hollenberg, M. D. 1985. Calcineurin-mediated dephosphorylation of the human placental membrane receptor for epidermal growth factor urogastrone. *Biochemistry*, 24 (18),4727-4730.

- Petr, J., Rajmon, R., Rozinek, J., Sedmíková, M., Jeřeta, M., Chmelíková, E., Švestková, D., Jílek, F. 2005. Activation of pig oocytes using nitric oxide donors. *Molecular Reproduction and Development*, 71 (1), 115-122.
- Procházka, R., Kaňka, J., Sutovský, P., Fulka, J., Motlík, J. 1992. Development of pronuclei in pig oocytes activated by a single electric pulse. *Journal of Reproduction and Fertility*, 96 (2), 725-734.
- Rusnak, F., Mertz, P. 2000. Calcineurin: Form and Function. *Physiological Reviews*, 80 (4), 1483-1521.
- Saneyoshi, T., Kume, S., Natsume, T., Mikoshiba, K. 2000. Molecular cloning and expression profile of *Xenopus* calcineurin A subunit. *Biochimica et Biophysica Acta – Molecular Cell Research*, Elsevier, 1499 (1-2), 164-170.
- Santella, L., Lim, D., Moccia, F. 2004. Calcium and fertilization: the beginning of life. *Trends in Biochemical Sciences*, 29 (8), 400-408.
- Sedmíková, M., Burdová, J., Petr, J., Etrych, M., Rozinek, J., Jílek, F., 2003. Induction and activation of meiosis and subsequent parthenogenetic development of growing pig oocytes using calcium ionophore A23187. *Theriogenology*, 60, 1609-1620.
- Schatten, G. 1994. The Centrosome and Its Mode of Inheritance: The Reduction of the Centrosome during Gametogenesis and Its Restoration during Fertilization. *Developmental Biology*, 165 (2), 299-335.
- Silverman-Gavrila, L. B., Charlton, M. P. 2009. Calcineurin and cytoskeleton in low-frequency depression. *Journal of Neurochemistry*, 109 (3), 716-732.
- Smits, J. E. J., Cortvrindt, R. G. 2002. The earliest stages of folliculogenesis *in vitro*. *Reproduction*, 123, 185-202.
- Sun, Q. Y., Nagai, T. 2003. Molecular Mechanism Underlying Pig Oocyte Maturation and Fertilization. *Journal of Reproduction and Development*, 49, 347-359.
- Sutovsky, P., Navara, Ch. S., Schatten, G. 1996. Fate of the Sperm Mitochondria, and the Incorporation, Conversion, and Disassembly of the Sperm Tail Structures during Bovine Fertilization. *Biology of Reproduction*, 55, 1195-1205.
- Sutovsky, P., Oko, R., Hewitson, L., Schatten, G. 1997. The Removal of the Sperm Perinuclear Theca and Its Association with the Bovine Oocyte Surface during Fertilization. *Developmental Biology*, 188, 75-84.
- Takeo, S., Tsuda, M., Akahori, S., Matsuo, T., Aigaki, T. 2006. The Calcineurin Regulator Sra Plays an Essential Role in Female Meiosis in *Drosophila*. *Current Biology*, 16, 1345-1440.

- Tash, J. S., Krinks, M., Patel, J., Means, R. L., Klee, C. B., Means, A. R. 1988. Identification, characterization, and functional correlation of calmodulin-dependent protein phosphatase in sperm. *JCB*, 106 (5), 1625-1633.
- Thibault, C., Szöllösi, D., Gérard, M. 1987. Mammalian oocyte maturation. *Reproduction, Nutrition, Development*, 27 (5), 865-896.
- Voronina, E., Wessel, G. M. 2003. The regulation of oocyte maturation. Elsevier, 58, 53-110.
- Wang, J. H., Desai, R. 1976. A brain protein and its effect on the  $CA^{2+}$ - and protein modulator-activated cyclic nucleotide phosphodiesterase. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 72 (3), 926-932.
- Wassarman, P. M. 1988. The mammalian ovum, in Kuobil, E., Neil, J. (eds.), *Physiology of the Reproduction*. Raven Press, New York, pp. 69-102.
- Whitaker, M. 1996. Control of meiotic arrest. *Reviews of Reproduction*, 1, 127-135.
- Williams, C. J. 2002. Signalling mechanism of mammalian oocyte activation. *Human Reproduction Update*, 8 (4), 313-321.
- Yanagimachi, R. 1988. Chapter 1 Sperm-Egg Fusion. *Current Topics in Membranes and Transport*, 32, 3-43.

## Přílohy

### Seznam zkratk a symbolů

6-DMAP - 6-dimethylaminopurin

AKAP79 - 79-kDa protein kinase A anchoring protein

APC – anafázi podporující komplex (anaphase promoting complex)

bp – páry bází (base pair)

BSA – bovinní sérový albumin

cAMP – cyklický adenosin monofosfát

CG – kortikální granula (cortical granules)

CGE – exocytóza kortikálních granul (cortical granule exocytosis)

Cn – calcineurin

CsA – cyklosporin A

CSF – cytostatický faktor (cytostatic factor)

DAPI - 4,6- diamino-2-fenylindol

dbcAMP – dibutyryl cyklický adenosin monofosfát

DNA – deoxyribonukleová kyselina

eCG – ekvinní choriový gonadotropin (equine chorionic gonadotropin)

ER – endoplazmatické retikulum

FKBP – FK506 vázající protein (FK506 binding protein)

FSH – folikulostimulační hormon

GH – gonadotropní hormon

GVBD – zánik zárodečného váčku (germinal vesicle breakdown)

hCG – humánní choriový gonadotropin (human chorionic gonadotropin)

ICSI – intracytoplazmatická injekce spermie (intracytoplasmatic sperm injection)

IP<sub>3</sub> – inositol trifosfát

IVF – *in vitro* fertilizace

LH – luteinizační hormon

MAP/MAPK\* – mitogenem aktivovaný protein/\*aktivovaná protein kináza (mitogen-activated protein/kinase\*)

MCIP – modulující protein interagující s calcineurinem (Modulatory calcineurin-interacting protein)

MII – metafáze II

MPF – faktor podporující metafázi (metaphase promoting factor)  
NAADP – nikotin adenin dinukleotid fosfát  
NF-AT – jaderný faktor aktivovaných T-buněk (nuclear factor of activated T-cell)  
p34cdc2 – katalytická podjednotka MPF  
PA – partenogenetická aktivace  
PDE – fosfodiesterázový  
PGC – primordiální zárodečné buňky (primordial germ cells)  
PKA – protein kináza A  
PLC $\zeta$  – fosfolipázaC  
PP2B – protein fosfatáza 2B  
RNA – ribonukleová kyselina  
Ryr – ryanodinový receptor  
ZP – *zona pellucida*

### **Seznam tabulek**

Tabulka 1 - Složení zásobního média NCSU-37 (str. 25)  
Tabulka 2 - Složení obohacující NCSU-37 (str. 26)  
Tabulka 3 - Složení a koncentrace jednotlivých sloučenin v médiu pro *in vitro* zrání oocytů (str. 27)  
Tabulka 4 - Složení média TALP (str. 27)  
Tabulka 5 - Roztoky pro přípravu Percollu (str. 28)  
Tabulka 6 - Zásobní roztok pro přípravu Percollu (str. 29)  
Tabulka 7 - Roztoky pro přípravu 90% Percollu (str. 29)  
Tabulka 8 - Složení roztoku BTS (str. 29)  
Tabulka 9 - Relativní intenzita fluorescence kalcineurinu A ve zralých a aktivovaných oocytech prasete (str. 36)  
Tabulka 10 - Relativní intenzita fluorescence kalcineurinu B ve zralých a aktivovaných oocytech prasete (str. 40)

## Seznam obrázků

- Obrázek 1 - Schématický nákres folikulu, a endokrinní faktory ovlivňující jeho vývoj (str. 5)
- Obrázek 2 - Růst folikulu a oocyty (str. 7)
- Obrázek 3 - Signální dráhy ovlivňující aktivaci MPF (str. 13)
- Obrázek 4 - Schematický nákres účinku vápníku na MII blok oocyty (str.16)
- Obrázek 5 - Buněčná lokalizace kalcineurinu A v oocyty v metafázi II (str. 37)
- Obrázek 6 - Buněčná lokalizace kalcineurinu A v oocyty aktivovaném během *in vitro* fertilizace (str. 38)
- Obrázek 7 - Buněčná lokalizace kalcineurinu A v partenogeneticky aktivovaném oocyty (str. 39)
- Obrázek 8 - Buněčná lokalizace kalcineurinu B v oocyty v metafázi II (str. 41)
- Obrázek 9 - Buněčná lokalizace kalcineurinu B v oocyty aktivovaném během *in vitro* fertilizace (str. 42)
- Obrázek 10 - Buněčná lokalizace kalcineurinu B v partenogeneticky aktivovaném oocyty (str. 43)
- Obrázek 11 - Oocyty z kontrolních skupin pro průkaz kalcineurinu A a B (str. 43)