

ČESKÁ ZEMĚDĚLSKÁ UNIVERZITA V PRAZE

Fakulta agrobiologie, potravinových a přírodních zdrojů

Katedra veterinárních disciplín



Úloha kalcineurinu v meiotickém zrání oocytu prasete

Diplomová práce

Vedoucí práce: doc. Ing. Eva Chmelíková, Ph.D.

Autor práce: Bc. Kristýna Miková

2012

Prohlášení

Prohlašuji, že jsem diplomovou práci na téma: „Úloha kalcineurinu v meiotickém zrání oocytu prasete“ vypracovala samostatně a použila jen pramenů, které cituji a uvádím v příložené bibliografii.

V Praze dne:

Poděkování

Chtěla bych touto cestou poděkovat vedoucímu diplomové práce doc. Ing. Evě Chmelíkové, Ph.D. za odbornou pomoc, připomínky a vedení při řešení zadaného tématu. Dále pak děkuji Ing. Tereze Žalmanové za její rady a pomoc při sepisování této práce.

Souhrn

V současné době dochází v chovu hospodářských zvířat ke značnému rozvoji reprodukčních biotechnologií. U prasete je jejich efektivita zatím ještě poměrně nízká. Vzhledem k tomu, že je prase však kromě svého hospodářského využití také významným biomedicínským modelem, je třeba efektivitu používaných biotechnologií u tohoto druhu zvýšit. Pro zvýšení účinnosti biotechnologií je třeba dobře porozumět všem biologickým a molekulárním mechanismům, které se podílí na řízení oogeneze prasečího oocyty, především na řízení meiotického zrání. Meiotické zrání je regulováno mnoha faktory, včetně cyklinů, kináz a fosfatáz. Významnou úlohu může sehrávat fosfatáza 2B, kalcineurin. Kalcineurin se skládá z katalytické podjednotky A o molekulové hmotnosti 60 kDa a regulační podjednotky B o molekulové hmotnosti 18 kDa. Výskyt kalcineurinu byl potvrzen v mnoha savčích tkáních, v prasečích oocytech však tato fosfatáza nebyla dosud detekována.

Naše práce potvrdila výskyt kalcineurinu v oocyty prasete a ukázala rovněž, že během meiotického zrání dochází ke změnám v buněčné distribuci obou podjednotek proteinu kalcineurinu, které mohou souviset s jeho zapojením do regulace meiotického zrání.

Klíčová slova: prase, oocyt, meiotické zrání, fosfatáza 2B, kalcineurin

Summary

There is a rapid development of reproductive biotechnologies in livestock breeding area, currently. In pigs the efficiency of reproductive biotechnologies is still extremely low. However, except economic use, the pig is very important biomedical model. It is necessary to improve the efficiency of biotechnologies in this animal model. To increase the effectiveness of biotechnologies, we need to understand to all of the biological and molecular mechanisms, which are involved in the regulation of oogenesis of porcine oocytes, and especially in the regulation of meiotic maturation. Meiotic maturation is regulated by many factors, including cyclines, kinases and phosphatases. Calcineurin, phosphatase 2B, can play also an important role in the meiotic maturation. Calcineurin consists of the catalytic subunit A of molecular weight of 60 kDa, and a regulatory subunit B of molecular weight of 18kDa. Occurrence of calcineurin has been confirmed in a variety of mammalian tissues. However, in pig oocytes, this phosphatase has not yet been detected till today.

Our work confirmed the presence of calcineurin in pig oocytes and also showed that there are changes in cellular distribution of two calcineurin subunits during porcine oocyte meiotic maturation. The changes of calcineurin distribution can cohere with the role of calcineurin in regulation of meiotic maturation.

Key words: pig, oocytes, meiotic maturation, phosphatase 2B, calcineurin

OBSAH

1 ÚVOD	7
2 CÍL PRÁCE	8
3 LITERÁRNÍ REŠERŠE.....	9
3.1 OOGENEZE A FOLIKULOGENEZE	9
3.1.1 Fáze množení.....	9
3.1.2 Fáze růstu.....	12
3.1.2.1 Strukturální aspekty ve fázi růstu	13
3.1.2.2 Biochemické aspekty ve fázi růstu	16
3.1.2.3 Meiotická kompetence	17
3.1.3 Fáze zrání.....	18
3.1.3.1 Jaderné zrání	19
3.1.3.2 Cytoplazmatické zrání.....	19
3.1.4 Faktory podílející se na zrání oocyty	24
3.2 KALCINEURIN	33
3.2.1 Struktura kalcineurinu a jeho izoformy	34
3.2.2 Aktivace kalcineurinu	34
3.2.3 Kalcineurin a jeho inhibitory	35
3.2.4 Funkce a exprese kalcineurinu	36
4 MATERIÁL A METODY.....	38
4.1 ZÍSKÁVÁNÍ VAJEČNÍKŮ	38
4.2 ZÍSKÁVÁNÍ OOCYTŮ S UKONČENÝM RŮSTEM.....	38
4.3 KULTIVACE OOCYTŮ S UKONČENÝM RŮSTEM.....	39
4.4 PŘÍPRAVA VZORKŮ PRO STANOVENÍ KALCINEURINU METODOU WESTERN BLOT	39
4.5 STANOVENÍ KALCINEURINU METODOU WESTERN BLOT TING.....	40
4.5.1 Elektroforéza	40
4.5.2 Přenos proteinů na nitrocelulózovou membránu.....	44
4.5.3 Blokování.....	45
4.5.4 Imunodetekce.....	46
4.6 IMUNOHISTOCHEMICKÁ DETEKCE KALCINEURINU	47
5 VÝSLEDKY	48
5.1 STANOVENÍ EXPRESE KALCINEURINU METODOU WESTERN BLOTTING	48
5.2 IMUNOHISTOCHEMICKÁ LOKALIZACE KALCINEURINU.....	49
6 DISKUSE.....	52
7 ZÁVĚR	55
8 SEZNAM LITERATURY	56

1 Úvod

V současné době došlo k prudkému rozvoji biotechnologií, který se projevil také v chovu hospodářských zvířat. U prasete se biotechnologické postupy uplatňují jen velmi pomalu, protože narážejí na řadu problémů, spojených mimo jiné s nedostatkem kvalitních dozrálých oocytů. Využití oocytů pro biotechnologie komplikuje především naše nedostatečná znalost mechanismů, které regulují meiotické zrání oocytů. Na meióze se podílí řada faktorů, jako jsou cykliny, kinázy, fosfatázy, plyny typu oxidu dusnatého či sirovodíku.

Velmi významnou fosfatázou může být fosfatáza 2B, také označovaná jako kalcineurin. Kalcineurin se podílí na regulaci meiotického zrání u oocytů mouchy rodu *Drosophila* a žáby rodu *Xenopus*. Tato práce si kladla za cíl zjistit úlohu kalcineurinu během meiotického zrání oocytu prasete.

2 Cíl práce

Cílem této práce je ověření hypotézy, podle které se calcineurin, fosfatáza 2B, podílí na regulaci meiotického zrání oocyty prasete. Hypotéza byla ověřena na základě sledování exprese a změn buněčné lokalizace dvou známých podjednotek proteinu.

3 Literární rešerše

3.1 Oogeneze a folikulogeneze

Oogeneze je vývojový proces, při kterém vznikají samičí pohlavní buňky, oocyty. Prenatální vývoj oocytů probíhá od primordiálních zárodečných buněk, přes oogonie až po oocyty I v zastavené meióze. Postnatální vývoj oocytů zahrnuje folikulogenezi, pokračování meiózy I a začátek meiózy II. Postovulační vývoj oocytů je spojen s procesem ukončení meiózy II, která nastává při oplození či partenogenetické aktivace. Pokud oocyty nedokončí meiózu II, zanikají a k vývoji oocytů nedochází (Nussbaum a spol., 2004).

Vývojový proces folikulogeneze patří již do prenatálního vývoje a doprovází fáze růstu a zrání oocyty. Je založen na proliferaci a cytodiferenciaci, kde součástí vývoje je nejdříve vznik primordiálních folikulů, růst na preantrální folikuly a následný vývoj dominantního folikulu (Graafova folikulu), který ovuluje (Wartenberg, 1990).

Oocyty pocházejí z malého počtu kmenových buněk - tzv. primordiálních zárodečných buněk (primordialgermcells – PGC), které mají extragonadální původ. Dochází tak k formaci primordiálních zárodečných buněk přes oogonie až na zralý oocyt (Wassarman, 1988).

Primordiální zárodečné buňky se pasivně transportují do endodermu a odtud podél zadního střeva aktivně migrují a vstupují do mezenteria, až nakonec se usadí v genitální liště, která je základem ovarii (Chawengsaksophak et al., 2011). Po dosažení epiteliálního povrchu ovaria se zárodečné buňky stěhují do její kůry a spolu s podpůrnými epiteliálními buňkami dávají základ vnější genitální liště (Wassarman, 1988).

3.1.1 Fáze množení

Primordiální zárodečné buňky putují k epiteliálnímu povrchu ovaria a jsou přeměněny v oogonie (Wassarman, 1988). Mitotické dělení prasečích zárodečných buněk je pozorováno od 13. dne embryonálního života až do asi 7. dnů po narození. Počet

zárodečných buněk se značně zvýší z 5000 ve 20. dnech po oplození až na 1100 000 v 50. dnech po oplození. Poté se mitotická aktivita zastaví a některé zárodečné buňky odumřou (Hunter, 2000).

Oogonie mají charakteristickou morfolonii, s přítomností mezibuněčných můstků spojujících sousední zárodečné buňky (Wassarman, 1988). Spojení zárodečných buněk se podobá spojení gap junction a jedná se o přímou komunikaci mezi buňkami. Existence těchto můstků je přechodná a ukončená cytokineze oogonií přeruší toto spojení zárodečných buněk (Shultz, 1985). Oogonie v interfázi jsou obvykle kulatého nebo vejčitého tvaru. Jádro je v pravidelné a obsahuje v matrix náhodně rozptýlený fibrilogramulární materiál. Oogonie mají výrazná jadérka mající podobu hrubé nepravidelné sítě granulárního materiálu. Oogonie, které procházejí mitózou, obsahují hustě nepravidelnou hmotu chromozomálního materiálu (Baker, 1967).

Cytoplazma klidových a dělicích oogonií obsahuje velké vejčité mitochondrie, obvykle s odpovídajícími kristami (Baker, 1967). Tyto kristy jsou transversálně orientované a jsou v tzv. ortodoxní poloze (Wassarman, 1988).

V určitém stádiu oogeneze vstupují oogonie do stádia *preleptotene* profáze prvního meiotického dělení. V tomto období se připravuje redukční dělení, oogonie se přeměňuje v oocyt (Wassarman, 1988). Mitochondrie v oocytech ve stádiu *pre-leptotene* a *leptotene* jsou často těsně spojené s jaderným obalem. Toto spojení je ještě částečně zachováno ve stádiu *zygotene* a *pachytene*. (Baker, 1967).

Vlastní dělení je pak zahájeno vstupem do stádia *leptotene* kde chromozómy v jádře začínají kondenzovat a jsou viditelná jako tenká vlákna s centrálním osovým vláknem bílkovinné povahy. Chromozómy se začínají upínat na obou koncích vlákna k jaderné membráně. V místě úponu je patrné ztluštění zvané upínací ploténka. Významné funkce této fáze meiózy zastávají konce chromozómů, zvané teloméry (Vacek, 2006; Sherthan, 2007).

V dalším stádiu, *zygotene* pokračuje kondenzace chromozómů. Chromozómy se zkracují a začíná jejich homologické párování, konjugace chromozómů neboli synapse. Dvojice těchto chromozómů se k sobě těsně přikládají a označují se jako bivalenta. Poté se postupně vytváří spojovací struktura žebříčkovité povahy zvaná synaptický komplex

(Heyting, 1996). U oocytů mezi sebou konjugují oba chromosomy X po celé své délce (Bachtrog a Charlesworth, 2001).

V dalším období meiotické profáze, *pachytene* se homologní chromozómy zkracují, více kondenzují a jsou zřetelně rozděleny na dvě sesterské chromatidy, vzniká tak čtveřice spojených chromatid – tetráda (složená ze dvou k sobě přiložených homologních chromozómů – bivalentů), dochází k překřížení chromatid (crossingover) a k vzájemné výměně částí nesesterských chromatid mezi homologními chromozómy v bivalentech (rekombinace). V následujícím *diplotenním* stádiu profáze se chromatidy díky rozpuštění synaptického komplexu začínají od sebe oddělovat, jsou však ještě k sobě poutány v místech, kde došlo k překřížení a zapletení nesesterských chromatid, tzv. chiazmatech. V pozdní *diplotene*, nazývané taky *diktyotene*, se redukční dělení poprvé zastavuje (Wassarman, 1988).

U prasat meióza začíná již 40. den a asi 35. dnů po narození jsou všechna oogonia v profázi prvního meiotického dělení (Hunter, 2000).

Desetiletí výzkumu v reprodukční biologii vedlo k obecně uznávanému dogmatu, že u samic savců zárodečné buňky mohou přežívat, aniž by se po zbytek života tvořily nové. Tyto buňky tak vstupovaly do meiózy na konci fetálního období a podle této teorie postnatální ovaria poskytovala omezenou zásobu oocytů, která nemohla být zásobena či regenerována. Toto dogma, které bylo několikrát vyvráceno, publikoval S. Zuckerman v roce 1951. Při této příležitosti stáli na jedné straně “ovariální optimisté“(ti, kteří se snažili hledat pravdu jinde) a “ovariální pesimisté“(ti, kteří stáli při tomto dogmatu). Prvním současným argumentem předloženým proti dogmatu byla matematická neshoda v počtech folikulů u myší. Podle pesimistů měly rostoucí folikuly s věkem klesat a poté zcela vymizet bez jakékoli další tvorby během jejich života. Podle optimistů a jejich výpočtů by měl být folikulární růst stále zachován a postupně obnovován. Největší pozornosti vzbudil americký biolog Johnathan Tilly, ten v roce 2004 provedl kultivaci z povrchového epitelu dospělých myších vaječníků a zjistil mitoticky aktivní zárodečné buňky, které jsou schopny se diferencovat v oocyty. V roce 2005 provedl další pokus procesem parabíózy u myší. Propojil krevní oběh dvou myší, z nichž jedna nesla v buňkách svého těla gen pro produkci zeleně fluoreskujícího proteinu, a ve druhé byl po čase nalezen oocyt s expresí tohoto zeleně svítícího proteinu. Buňky kostní dřeně tedy vycestovaly do krevního oběhu a propojenými krevními oběhy se dostaly do těla druhé myši, která gen pro

zeleně svítící protein postrádala. Tam se buňky zabudovaly do vaječníku a daly vzniknout novým oocytům (Tilly et al., 2009). Tato nejnovější práce ukázala, že zdrojem zárodečných buněk myši může být i extragonadální tkáň jako je kostní dřev a krevní buňky (Johnson et al., 2005).

3.1.2 Fáze růstu

Funkční jednotkou uvnitř vaječníku je folikul, který se skládá z jedné nebo více vrstev folikulárních buněk. Pro tuto fázi je charakteristické dělení somatických buněk a následná tvorba folikulárních vrstev, zvětšování oocyty a tvorba dutiny naplněné folikulární tekutinou (Mehlmann, 2005).

Populace oocytů je v diktyotenním stádiu profáze I ve vaječníku zastavena a oocyty se nachází v klidovém stádiu meiózy. Toto období je charakterizováno sítovým uspořádáním chromatinu a meiotický proces zahájí své pokračování až v době ovulace. Zablokování způsobuje inhibitor zrání oocyty (OMI – oocytematuration inhibitor), nízkomolekulární peptid produkovaný folikulárními buňkami (Sadler, 2010) (viz kapitola 2.1.4 Faktory podílející se na zrání oocyty). Oocyty jsou uvnitř folikulu obklopené několika dlaždicovými folikulárními buňkami a přibližně 50% těchto oocytů se ztratí během prvních 2 týdnů po narození. Oocyt obklopen jednou vrstvou dlaždicových buněk bývá nazýván primárním oocyt a ve stádiu pozdní *diplotene* setrvává až do období před ovulací (Wassarman, 1988).

Rostoucí oocyt, který je obklopen více než jednou vrstvou granulózních buněk je umístěn v sekundárním folikulu. Pro vývoj primárních a sekundárních folikulů nemusí být přítomné gonadotropiny, ale pro jejich optimální růst jsou potřebné (Cortvrindt et al., 1997). Nejvnitřnější vrstva folikulárních buněk rostoucího folikulu má cylindrický tvar a nazývá se *corona radiata*. Tyto buňky tvoří specializované intracelulární spoje, nazývané *gap junctions* s oolemou. Činností těchto buněk se vytvoří kolem oocyty další obal – *zona pellucida*, složená převážně z glykoproteinů. Kolem folikulu vzniknou přeměněnou okolního vazivového stromatu dva obaly. Vnitřní obal složený z přeměněných vazivových buněk se nazývá *theca folliculi interna* a vnější, složený z hustě uspořádaného vaziva s převahou kolagenních vláken, zvaný *theca folliculi externa*. Vnější *theca* vrstva obalu je

vazivová s hojnými cévami a vnitřní *theca* je spíše bohatá na buňky. Na množení thékálních buněk působí folikulární hormon (FSH) a růstový faktor (GDF-9). *Theca folliculi interna* je od granulózních buněk oddělená bazální membránou (Vacek 2006; Wassarman, 1988).

Theca folliculi interna je schopná syntetizovat steroidní hormony. Tyto buňky nemohou produkovat estrogen, ale produkují androgeny v reakci na LH. Androgeny poté prostupují do granulózních buněk, kde jsou pak působením folikulostimulačního hormonu (FSH) přeměněny na estrogény. Díky těmto estrogenům tak oocyt může růst a společně s granulózními buňkami vytvářet dutinu s folikulární tekutinou (Young, 2010). Tvorbou dutiny, která se také nazývá *antrum folliculise* formuje antrální folikul někdy také označovaný jako terciální nebo Graafův folikul (Wassarman, 1988). Vývoj až na antrální folikuly je zcela závislý na gonadotropinech (Cortvrindt et al., 1997). Granulózní buňky uvnitř folikulu se koncentrují do oblasti kolem oocytu a vytváří zde tzv. vejconosný hrbolek, *cumulus oophorus*. Buňky těsně sousedící s oocytem jsou označovány jako kumulární buňky. Vnější buňky spojené okrajem antrálního folikulu nazýváme murální granulózní buňky (Eppig, 2001).

Granulózní buňky hrají rozhodující roli v dodávání živin během růstu oocytu. Oolema je schopná transportovat aminokyseliny a obsahuje dva výměnné operační systémy Na dependentní ASC systém pro dopravu aminokyselin s krátkým lineárním řetězcem či polárních řetězců jako alanin, serin a cystein a Na independentní systém podobný jako L systém pro dopravu aminokyselin s velkými alifatickými či aromatickými řetězci jako je například leucin a GLY systém pro dopravu glycinu. Oocyty u některých druhů výslovně vyžadují vazbu s granulózními buňkami (Buccione et al., 1990).

3.1.2.1 Strukturální aspekty ve fázi růstu

Jednotlivé struktury se v oocytu objevují a vyvíjí při jeho růstu. Jádro primárního oocytu obsažené v primárním folikulu se výrazně zvětšuje a bývá označováno jako zarodečný váček (*germinal vesicle* – GV). V důsledku růstu oocytu dochází k výrazné změně v poměru cytoplazmy a nukleoplazmy, která může představovat zvýšení z 8:1 u malých oocytů až na 64:1 u plně vzrostlých oocytů. Se zvětšováním jádra prodělává

charakteristickou změnu jadérko a mimo jadérová tělíska (Wassarman, 1988). Tělíska prvního typu (fibrogranulární) se skládají se smíšené populace těsně uspořádaných fibril, 6 - 10 nm na šířku a s roztroušenými granulemi asi s 15 nm v průměru. Tělíska druhého typu (fibrilární) se skládají ze spleť volných fibril 4 – 10 nm v průměru. Tyto tělíska jsou také charakterizovány přítomností nepravidelných tvarů, široce rozptýlených ostrůvků s různou velikostí tvořeny hustými fibrilemi. Tělíska třetího typu (stočená) vypadají, že jsou vysoce zkroucená vlákna s tloušťkou 20 – 35 nm (Chouinard, 1973). V určitých fázích vývoje oocytů jsou důležitou produkcí ribozomů. U savčích oocytů jsou tělíska zesílena v dřívějším stádiu profáze. Přítomnost těchto tělísek může odrážet vytlačování nukleárního materiálu, v podstatě ribonukleoproteinů do ooplazmy, kde pak v rané fázi embryogeneze může být využit (Antoine, 1989).

Chromozomy zůstávají vysoce rozptýleny a jakmile je růst dokončen kondenzují především v okolí jadérka. Tato transformace na heterochromatin je u myších oocytů zahájena v době tvoření dutiny folikulu (*antrum folliculi*). U ostatních savců tato formace začíná v pozdějším stupni folikulogeneze (Wassarman, 1988). Heterochromatin je rigidní část jádra, obsahující hustě sbalený, neaktivní chromatin, nepřístupný transkripčnímu aparátu. Heterochromatin se replikuje až na konci S-fáze a obecně se nejčastěji vyskytuje v telomerách a centromerách.

Jádro rostoucích oocytů obsahuje jedno dlouhé jadérko, ale častěji dvě až tři menší jadérka. Během růstové fáze v jadérku probíhá intenzivní rRNA syntéza. Jadérko podstupuje přechod z rozptýlené síťovité struktury složené především z fibrilogramulárnísítědo hustě sjednocené hmoty, výhradně fibrilárního charakteru (Wassarman, 1988). Ve stádiu *diplotene* se zvyšuje počet mitochondrií, ty mívají kulovitý tvar a jejich kristy se stávají sloupkovité, až nakonec jsou uspořádané ve středových obloucích. Během této doby bývají úzce spojené s hladkým endoplasmatickým retikulem (Wassarman, 1988). Velká většina mitochondriální DNA, která je zděděná embryem je maternálního původu. To patrně není pouhým důsledkem nepoměru počtu mitochondrií oocytu a spermie, ale předpokládá se aktivní proces, který po oplození zlikviduje mitochondrie paternálního původu. Tomu odpovídá i typický maternální přenos chorob způsobených mutacemi mtDNA.

Endoplazmatické retikulum (ER) v primárních oocytech tvoří asi 20% objemu cytoplazmy, zatímco u větších oocytů se objem snižuje na 10%. ER proliferuje v kontaktu

s vnějším jaderným obalem tvořící úzké ER cisterny. Mezi jaderným obalem a ER cisternami jsou viditelné váčky s šedým obsahem, kde jsou lipidové kapénky. Proliferující ER tvoří četné symetrické cisterny v okolí jádra. Většina oddělených vnějších cisteren potom tvoří pohárkovité struktury, které přechází k periférii cytoplazmy. Jiné cisterny jsou v oocytech u různých druhů odkláněny od jádra a jsou v úzkém kontaktu s mitochondriemi. Kolem žloutkových globulí a lipidových kapének je přítomen nepravidelný plášť ER, který byl popsán u oocyty králíka, skotu a malpy běločelé (Osuchowska, 2006).

V malých myších oocytech (20 μ m) se objevuje Golgiho komplex jako zploštělé probíhající lamely spojené s několika vakuolami nebo granuly. V pozdějších stádiích jsou tyto lamely rozprostřené dál od sebe a poté jsou spojené s dalšími obalenými váčky a lipidovými váčky. Tyto změny jsou spojené s účastí Golgiho komplexu na zpracování a koncentraci sekrečních produktů (např. glykoproteinů *zóny pellucidy*) a vzniku kortikálních granul. Při přeměně plně vzrostlých oocytů na oplozené vejce dochází ke změně v počtech rozpoznatelných Golgiho lamel, které se snižují a v počtu malých membránových váček, které se zvyšují (Wassarman, 1988).

Oocyty většiny druhů savců vykazují velké množství cytoplazmatických inkluzí, ke kterým řadíme lipidové kapénky a glykogen. Ve zralých prasečích oocytech najdeme cytoplazmatické inkluze, které obsahují velké kapénky tuku (až 4 μ m v průměru), byly nazvány žloutkové globule. V blízkosti těchto globulí se vyskytují malé skupinky mitochondrií (Osuchowska, 2006).

Kortikální granula (*cortical granules* - CG) jsou malé, kulovité, membránovité orgány, která najdeme v neoplozeném vejci a mají podobu lysosomů. V době oplození vylévají svůj obsah do perivitellního prostoru a brání tak polyspermii. Kortikální granula se poprvé objevují během růstu oocyty, spojené s rozšiřujícím Golgiho komplexem, který se přemísťuje do subkortikální oblasti rostoucího oocyty (Wassarman, 1988).

Všechny savčí oocyty mají relativně silný extracelulární obal *zonu pellucidu*. V perivitellním prostoru se objevuje v počátcích růstu oocyty. V raných stádiích růstu oocyty se *zona pellucida* objevuje jako místa jemných filament mezi oocytem a folikulárními buňkami (Wassarman, 1988).

Tloušťka se u různých druhů pohybuje v rozmezí (~1-25 μ m) a obsah bílkovin je (~1-30ng). *Zona pellucida* se skládá z dlouhých vzájemně propojených fibril, která mohou být rozpuštěna mírnou kyselinou, zásadou, teplem nebo redukčním činidlem.

Glykoproteiny *zony pellucidy* jsou drženy vzájemně ve fibrilách nekovalentními interakcemi. Tyto glykoproteiny jsou odpovědné za omezení vazby spermií mezi jednotlivými druhy, navozují spermií akrozomální reakci a chrání oplozené vejce před navázáním spermií (Wassarman, 2008).

Během růstu oocyty se také zvyšují počty polyribosómů. Tento nárůst souvisí se zvýšenou syntézou proteinů. U oocytů s ukončeným růstem a neoplozených vajíček můžeme v cytoplazmě najít mřížkovité struktury (lamely, fibrily). Funkce těchto cytoplazmatických složek není přesně známa, mohou sloužit jako žlutek nebo zásobárna ribosómů. Během rýhování kompletně mizí (Wassarman, 1988).

3.1.2.2 Biochemické aspekty ve fázi růstu

Oocyty jsou základní pro folikulární formaci. Folikulární růst a oogeneze kromě vysoce dynamických změn (morfogeneze, struktura chromatinu) popsané výše, podstupují i důležitou transkripci genů v průběhu jejich růstu (Eppig, 2001). Dochází zde ke zvyšování obsahu RNA v oocyty. Oocyt v primárním folikulu není transkripčně aktivní, protože jeho jadérko tvoří granulózní část a zatím v něm chybí fibrilární složka, oocyt tedy nemůže syntetizovat ribosómy. Transkripce je zahájena až v oocytech sekundárních folikulů, kde se jadérko stává fibrilogranulózní. V terciálních folikulech se s jejich růstem transkripce i jaderná aktivita zvyšuje. Vytvořené molekuly RNA a proteiny jsou využity pro růst nebo uloženy do zásoby (Hyttel et al., 1999). Mezi významné transkripční geny folikulárního uspořádání patří gen *Figla* (nebo také *Figa*). Exprese tohoto genu začíná již v raném embryonálním vývoji, u myši to je ve 13 dni a jeho důležitost se jeví v počáteční organizaci primordiálních folikulů a tvorby proteinů *zony pellucidy* (Eppig, 2001).

Přechod z primárního oocytů na sekundární je ovlivněn růstovými faktory jako je GDF-9 a GDF-9B (také označován jako BMP 15 - bone morphogenic protein - 15). BMP-15 je účinnější v pokročilejších fázích zrání kde aktivuje KL expresi, která je dále zapojená do růstu oocytů a proliferaci granulózních buněk. Později tento faktor řídí FSH sekreci (Zuccotti et al., 2011). Hodnoty KL mRNA jsou zvýšená za nepřítomnosti GDF-9 in vivo.

Některé studie ukazují, že při nedostatečné KL expresi nebo její mutaci dochází u myši k neplodnosti kvůli vývojovým abnormalitám (Thomas et al., 2005).

3.1.2.3 Meiotická kompetence

Pojmem meiotická kompetence označuje schopnost oocyty znovu zahájit a dokončit meiotické zrání. Získání meiotické kompetence se zřejmě uskutečňuje ve dvou krocích: rostoucí oocyty nejprve podstoupí rozpad zárodečného váčku (*germinal vesicle break down* - GVBD) s vývojem do metafáze I a poté následuje získání schopnosti vývoje z metafáze I do metafáze II (Wassarman, 1988). Rostoucí oocyty mohou být klasifikovány jako nekompetentní nebo kompetentní k znovu zahájení meiózy. Nekompetentní oocyty, které nejsou schopné znovu zahájit meiózu, zůstanou ve stádiu profázemeiózy I, protože nemají dostatečné množství cyklinu B (Blanco et al., 2011). Kompetentní oocyty pak mohou být částečně meioticky kompetentní nebo úplně. Projevení částečné meiotické kompetence sice znamená, že oocyt je schopný zahájit zrání, ale tento proces nedokončí. Teprve oocyty schopné dokončit proces zrání jsou brány jako úplně meioticky kompetentní (Motlík et al. 1984). Meiotická kompetence těsně koreluje s velikostí oocyty, která postupně koreluje s velikostí folikulu. Oocyty skotu získají schopnost dokončit GVBD a meiózu, jakmile antrální folikul dosahuje 2-3 mm v průměru. Meiotická kompetence také souvisí s průměrem oocyty, u oocyty skotu musí mít průměr 110 μ m k dokončení nukleárního zrání stádia metafáze II. Oocyty skotu menší než 95 μ m v průměru nejsou schopny znovu zahájit meiózu (Blanco et al., 2011). U prasečích oocytů s průměrem 100 μ m mohou oocyty pokračovat v meióze, ale dále nemohou postoupit za metafázi I (Telfer, 1997). Oocyty prasete o velikosti 110 μ m z folikulů o průměru 1-1,5 mm po vyjmutí z folikulu spontánně vstupují do meiózy, procházejí rozpadem zárodečného váčku a většina z nich dosáhne stádia metafáze I. (Motlík et al. 1984). Oocyty s průměrem 115 μ m mohou meiotické zrání dokončit do metafáze II (Telfer, 1997). Plně dorostlé prasečí oocyty o velikosti 120 μ m jsou zcela meioticky kompetentní a po 48 - hodinové kultivaci dozrávají do stádia metafáze II (Motlík et al., 1984). Je-li oocyt odstraněn z antrálního folikulu, spontánně se obnoví meióza a oocyt vstupuje do metafáze II. Folikulární buňky tedy drží oocyty v profázi I meiotického dělení. Meióza pokračuje až po nárůstu

preovulačního luteinizačního hormonu (LH). LH receptory se nenacházejí na kumulárních buňkách oocyty, ale na buňkách murální granulózy, takže mechanismus stimulace zrání oocyty je nepřímý. Murální granulózní buňky přeloží LH akci a dochází ke změně signálních molekul uvnitř oocyty s následnou obnovou meiózy (Mahlmann, 2005).

Nezralé oocyty, které se nacházejí v profázi I meiotického dělení jsou stimulovány folikulostimulačním hormonem (FSH), který navodí vývoj malých antrálních folikulů do preovulačního stádia. Z tohoto stádia dojde k dominanci jednoho folikulu, který prostřednictvím dalšího hormonu luteinizačního (LH) ovuluje a oocyt tak spadá do procesu zrání (Schatten et Sun, 2011).

3.1.3 Fáze zrání

Tato fáze zahrnuje aktivaci různých signálních cest, které směřují k aktivaci faktorů zrání. Klíčovým faktorem je zde MPF (metaphasepromotingfactor), který umožňuje vstup do M-fáze z meiózy I a meiózy II (Schmitt et Nebreda, 2002) (viz kapitola 2.1.4 Faktory podílející se na zrání oocyty).

Charakteristickými znaky meiotického zrání jsou u obratlovců: 1) znovuzahájení meiózy I, která zahrnuje rozpad zárodečného váčku (GVBD), kondenzaci chromozomů, a formaci vřeténka, 2) přechod mezi meiózou I a meiózou II, včetně inhibice S-fáze a 3) zastavení v metafázi II, díky cytostatickému faktoru (CSF) aktivity (viz kapitola Faktory podílející se na zrání oocyty). Meióza II je dokončená po oplození zralého oocyty a vydělení 2. pólového tělíska (Schmitt et Nebreda, 2002).

Oocyt ve fázi zrání prodělává jaderné a cytoplazmatické zrání. Komplex událostí, který se odehrává během zrání oocyty, závisí na správné dynamice rozdělení chromozómu během nukleárního zrání, pak také na znovurozdělení cytoplazmatických organel a na uložení mRNA, proteinů transkripčních faktorů (Ferreira et al., 2009).

3.1.3.1 Jaderné zrání

Jaderné zrání zahrnuje změny chromatinu od procesu rozpadu zárodečného váčku (GVBD) během metafáze I do metafáze II zrání oocyty. U obratlovců, kompletní jaderné zrání končí v metafázi II. V tomto stádiu je oocyt fyziologicky připravený, aby dokončil druhé meiotické dělení po oplození (Marteil et al., 2009). U mnoha bezobratlých k této zástavě nedochází a oocyt zraje jen do metafáze I, kde dochází k oplození (Schmitt et Nebreda, 2002).

V oocyty těsně před GVBD je patrné jadérko a jaderná membrána. GV chromatinu je rozděleno do 4 stádií a to podle jeho kondenzace, změny a přítomnosti jadérka a úbytkem jaderné membrány. Ve stádiu GV 0 je chromatin rozptýlen po celé jaderné oblasti a dochází k nepatrnému vlnění jaderné membrány, které postupně získává na intenzitě (Lucas et al., 2002). U prasečích oocytů ve stádiu GV 0 málo kondenzovaný chromatin neohraničuje jadérko. V ostatních stádiích je chromatin kolem jadérka více kondenzovaný a má tvar prstenu nebo koňské podkovy (Tan et al., 2009). V GV 4 stádiu se už nedá rozpoznat jadérko, mizí po splynutí s cytoplazmou. Jaderná membrána rovněž není zachována, je rozptýlená do membránových fragmentů, jež jsou spojeny s endoplazmatickým retikulem (Lucas et al., 2002). Během jaderného zrání se z mikrotubulů tvoří meiotické vřetenko, které je poté spojené s chromozómy. V cytoplazmě jsou dočasně přítomné další mikrotubuly a mikrofilamenta se přemísťují z cytoplazmy oocyty do jeho kůry a kolem chromatinu (Marteil et al., 2009).

GVBD je aktivován z procesu cytoplazmatického zrání faktorem MPF. Signální cesty v procesu aktivace tohoto faktoru jsou popsány v kapitole Faktory podílející se na zrání oocyty.

3.1.3.2 Cytoplazmatické zrání

Cytoplazmatický proces zrání oocyty může být rozdělen do tří hlavních událostí: přerozdělení cytoplazmatických organel a dynamika cytoskeletárních filament a molekulární zrání (Ferreira et al., 2009).

Přerozdělení cytoplazmatických organel

Během činnosti mikrofilament a mikrotubulů dochází k přemísťování cytoplazmatických organel, které jsou závislé na potřebách buňky během každého stupně vývoje. Mitochondrie se přemísťují z periferních částí všude do prostředí cytoplazmy. Při dosažení metafáze II se mitochondrie, společně s tukovými kapičkami dostávají u oocyty skotu do střední polohy, jak je patrné z obr.1A. Mitochondrie jsou zde ve větším počtu a to je spojené se zvyšující se potřebou energie, která je podstatná pro následující průběh vývoje (Ferreira et al., 2009).

Obsah ATP probíhá v širokém rozsahu meiotického zrání a změní se, až po vydělení prvního pólového tělíska (Marteil et al., 2009). Před embryonální aktivací genomu mají mitochondrie střední hodnotu aktivity, která může souviset s přizpůsobením ochrany proti volným radikálům (reactive oxygen species - ROS) v důsledku mitochondriálního metabolismu. Tato ochrana je poskytnuta akceptory radikálů jako je glutathion a peroxidáza, které jsou produkovány během molekulárního zrání oocyty či během dvou buněčného stádia embrya. Pokud je mitochondriální aktivita vysoká v počátcích vývoje zárodku, embryo pravděpodobně nepřežije, protože nebude schopné odstranit nadměrnou produkci ROS.

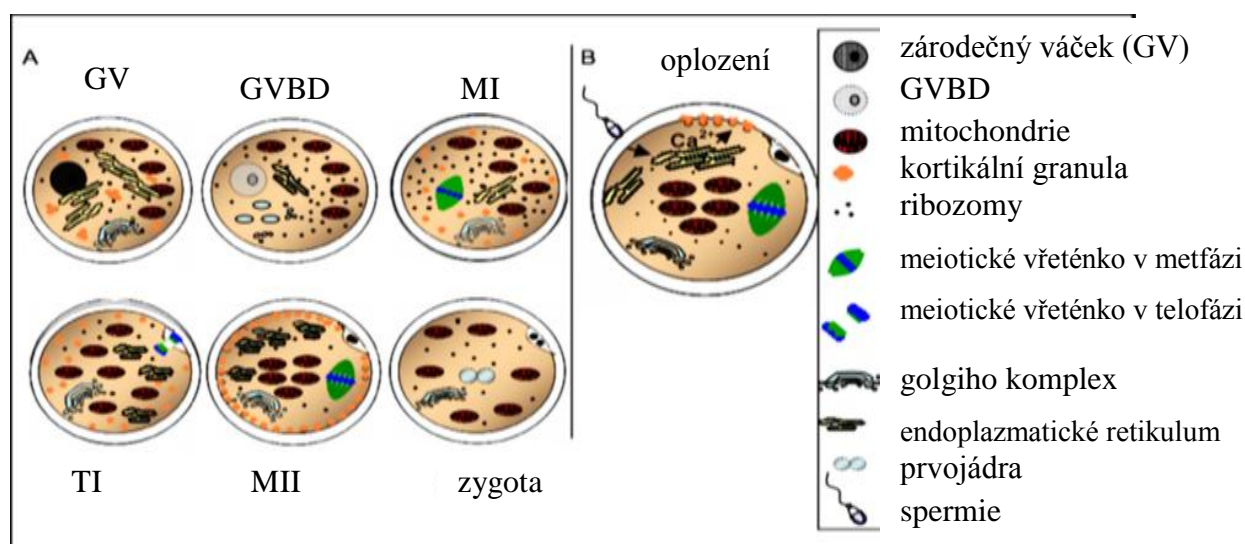
Ribozómy jsou syntetizovány transkripcí ribozomální RNA (rRNA). Během metafáze I meiózy je syntéza proteinů třikrát větší než během stádia rozpadu zárodečného váčku (GVBD). To může být způsobeno nepřítomností funkčního jadérka, která vede k nepřítomnosti rRNA transkripci nebo produkci ribozomů. Produkce ribozómu je větší ve stádiu zárodečného váčku, kde je přítomné jadérko.

Golgiho fragmenty jsou ve stádiu GV přeměněny do váčků během GVBD. Organizační mechanismy Golgiho komplexu nejsou závislé na centrozomu, ale spíše přes místa exportu ER (Ferreira et al., 2009). ER je hlavní zásobárnou intracelulárních Ca^{2+} iontů a má zásadní úlohu v aktivaci oocyty během oplození. Ve zralých oocytech se ER hromadí na periférii oocyty, konkrétně v oblastech kortikálních granul a má jemnou retikulární strukturu. U různých druhů se ER hromadí na opačném konci než je meiotické vřetenko (Marteil et al., 2009).

Kortikální granula se u nezralých oocytů myši nachází v celé cytoplazmě (cytoplazma kůry a vnitřní cytoplazma), zatímco u zralých oocytů jsou distribuovány do

korové části cytoplazmy a nelze je pozorovat kolem vřeténka v metafázi II. U prasat a skotu se kortikální granula stěhují také do korové části cytoplazmy, nicméně tvoří souvislou vrstvu těsně pod membránou oocytu, jak lze vidět na obr.1A (Marteil et al., 2009). Kortikální granula jsou organely obsahující strukturální proteiny, enzymy a glykosaminoglykany. Exocytózou kortikálních granul (kortikální reakce) při proniknutí spermie dojde k rychlé změně extracelulární matrix oocytu, při které dochází k uvolnění Ca^{2+} iontů z ER, viz obr.1B (Ferreira et al., 2009).

Obr.1 Schématický přehled distribuce buněčných organel: A- během nezralé fáze až ke stádiu metafáze II a formaci zygoty, B- během oplození.



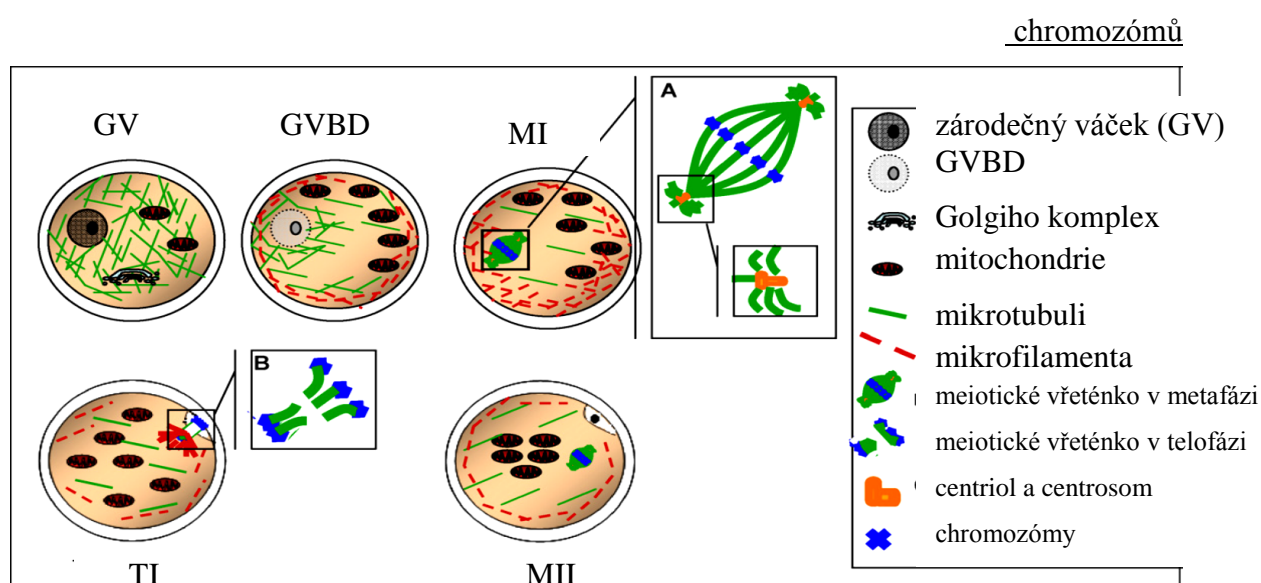
(Ferreira et al., 2009)

Lipidové kapénky (lipid droplets-LP) představují v oocytech zásobu energie. V oocytech prasete a koně dochází k novému uspořádání během jejich zrání a oplození. V oocytech koní byla zaznamenána homogenní distribuce v GV 0 fázi a ve zralých oocytech, LD přispívají k polarizaci oocytu v okolí MII vřeténka. Oocyty s polarizovanou distribucí LD vykazují vyšší míru zrání, oproti jednotnému rozdělení (Marteil et al., 2009).

Dynamika cytoskeletárních filament

Cytoskelet vytváří tři typy filament: mikrotubuly, mikrofilamenta a intermediální filamenta. Mikrotubuly a mikrofilamenta jsou složené z globulárních podjednotek a to z $\alpha - \beta$ tubulinu a z G- aktinu a jsou specificky zapojená do procesu zrání oocyty. Mikrotubuly se podílí na přerozdělování organel, hlavně mitochondrií a segregaci chromozomů uvnitř meiotického vřetenka. Mikrofilamenta nebo také aktinová filamenta řídí přerozdělování kortikálních granul, endoplazmatického retikula a umístění chromozomů do správné polohy. V oocytech prasete a skotu nejsou mikrotubuly detekované v profázi I nezralých oocytů. Najdeme je až během GVBD, jako hvězdicovité struktury vycházející z centrozomu spojené s chromatinem, respektive s kinetochorem. (Marteil et al., 2009). V oocytech se různí terminologie na centrozom. Většinou se odkazuje na atypický centrozom bez centriolů (acentriolární centrozom). Jiná terminologie odkazuje na myší oocytyacentrozomálního vřetenka, podle kterého je segregace chromozomů řízena vřetenkem mikrotubulů bez centrozomů (Schatten et. Sun, 2011). Toto vřetenko je ve zvýšené míře shromážděno ve středu oocyty po GVBD a je složené z 80 mikrotubul organizujícího centra (MOTCc). Je vytvořeno v profázi z cytoplazmatické mikrotubulární sítě a funkčně tak nahrazuje centrozom. MOTCc obsahují pericentriolární materiál složky γ -tubulinu a pericentrinu (Schuh et Ellenberg, 2007). V metafázi I jsou mikrotubuly polymerizovány tubulinem, vzniká meiotické vřetenko a chromozomy se řadí do ekvatoriální roviny; obr.2A.

Obr.2 Dynamikacytoskeletárních filament v průběhu zrání oocytu: A-detail meiotického vřeténka s centrosomem, B-detail meiotického vřeténka s mikrotubuly mezi sadami



(Ferreira et al., 2009)

Meiotické vřeténko v metafázi I je úměrně větší než v metafázi II, to může mít souvislost s haploidním počtem chromozómů v MII. Vřeténko má sudovitý tvar a jeho póly jsou zploštělé. Oocyt se dostává do anafáze I, kde se od sebe chromozómy začínají oddělovat, a velká část mikrotubulů může být lokalizována mezi dvěma oddělujícími sadami chromozómů; obr.2B. Vřeténko se prodlužuje a velká část aktinových filament může být pozorována kolem chromozómů. V telofázi I jsou mikrotubuly mezi sadami chromozómů a vytváří tak konickou strukturu. Širší část mikrotubulů je spojena s chromozómy, které jsou poté vypuzeny ven z buňky a formují první pólové tělísko (polar body-PB). Zúžující část mikrotubulů je spojena s druhou sadou chromozómů, která zůstává v oocytu a vstupuje do meiózy II. Během přechodu z telofáze I do metafáze II neexistuje žádná další interfáze, pouze dochází k rychlé kondenzaci chromatinu a mizení mikrofilament a mikrotubulů meiotického vřeténka v procesu označovaném jako interkinéze (Ferreira et al., 2009). V prasečích oocytech vycházejí mikrotubuly z kůry oocytu do středu cytoplazmy a zmizí až na konci meiotického zrání (Marteil et al., 2009). Během přechodu z GV fáze k anafázi I jsou aktinová filamenta distribuovaná v kortikální oblasti pod oolemou, bez připojení k mikrotubulům; obr. 2. (Ferreira et al., 2009).

Molekulární zrání

Molekulární zrání zahrnuje uskladnění a zpracování mRNA, která bude pomocí ribozómů přeložena do proteinů. Tyto proteiny jsou zapojené ve zrání oocyty, fertilizaci, formaci prvojadra a do ranné embryogeneze. mRNA je zpracována do ribonukleoproteinových částic, které jsou chráněné před nukleotickou degradací a jsou aktivovány až v případě potřeby. Při aktivaci se fosforyluje mnoho faktorů (jako například eIF-4F), které zahájí translaci. Fosforyluje se S6 protein na 40S ribozomální podjednotku a defosforyluje se poly(A) - polymeráza (Ferreira et al., 2009). Překlad mRNA je částečně regulovaný cytoplazmatickou polyadenylací, to znamená, že přidáním adeninu k mRNA vede k aktivaci překladu proteinů a deadenylaci (Marteil et al., 2009).

Popsaný vývoj oocyty najdeme u prasete a většiny savců. Ovulace neprobíhá u všech savců v metafázi II, například u psů a koní jsou oocyty ovulovány ve stádiu zárodečného váčku a meiotické zrání pokračuje až ve vejcovodu. Oocyty psa ve stádiu MII lze pozorovat mezi 48h a 72h po ovulaci a embryonální vývoj je tak mnohem pomalejší než u jiných druhů (Reynaud et al., 2005). Oocyt zůstává zabrzdněn ve stádiu MII až do aktivace oplozující spermií nebo partenogenetické aktivace. Po penetraci spermie či partenogenetické aktivaci oocyt znovu pokračuje v meiotickém dělení, dokončí jej a vydělí druhé pólóvé tělísko (Sun et Nagai, 2003).

3.1.4 Faktory podílející se na zrání oocyty

Oocyt je řízen celým komplexem faktorů. V této kapitole jsou popsány nejdůležitější a nejlépe prostudované faktory řídící, jak zastavení, tak i znovuspuštění meiotického zrání.

Cyklické nukleotidy

Mezi významné regulátory meiotického zrání patří cyklické nukleotidy, především cyklický adenosin a guanosinmonofosfát (cAMP a cGMP). Obsah cAMP v buňkách vyplývá z cAMP produkce adenylátcyklázy (katalyzuje vznik cAMP z ATP) a cAMP degradace fosfodiesterázou (PDE) (katalyzuje vznik AMP z cAMP) (Masui and Clarke 1979). cAMP stimuluje aktivitu protein kinázy A (PKA). Tato stimulace způsobí konformační změnu, která uvolní aktivní enzym fosforylující určité proteiny k zastavení meiózy. Pokud je ale nízká hladina cAMP mohou být příslušné fosfoproteiny v oocytu defosforylovány a meiotické zrání může být zahájeno (Wassarman, 1988). Intracelulární cAMP reguluje buněčný vývojový cyklus a k jeho výraznému snížení dojde už z přechodu G2 fáze do mitózy a kolísá dál v hodnotách mezi dalšími mitotickými fázemi (Masui and Clarke 1979). Zvýšením hladiny cAMP v oocytu můžeme dále inhibovat proces GVBD, a to také prostřednictvím folikulárních buněk syntetizující tento cyklický nukleotid. Odpovědné folikulární buňky a jejich různá produkce cAMP, jsou pak odezvou na předovulační LH vlnu. cAMP se do oocytu dostává přes gap junction spoje z kumulárních buněk (Sela-Abramovich et al., 2006). Vysoké hladiny cAMP uvnitř oocytu zamezují zrání oocytu, zatímco vyšší hodnoty cAMP ve folikulu mají naopak za následek jeho zrání. Rozdílná regulace cAMP v oocytech a folikulárních vrstvách buněk má tak protichůdnou roli (Thomas et al., 2002b). Hladina cAMP v oocytu může být také zvýšena fosfodiesterázovým inhibitorem, kofeinem. Kofein působí u myších oocytů blokací meiotického zrání. U prasečích oocytů, kofein podobně jako ostatní purinové deriváty, prodlužuje setrvání meiózy ve stádiu GV, pravděpodobně také vlivem zvyšující se hladiny cAMP a potlačení aktivity Cdc2 kinázy a MAP kinázy (Křen, 2004). Pro znovuzahájení meiózy je tedy klíčové nejprve zvýšení intracelulární hladiny cAMP a pak teprve její pokles (Masui and Clarke 1979).

Cyklický GMP je svou strukturou a svým mechanismem velmi podobný cyklickému AMP. Enzymguanylátcykláza, která je aktivována oxidem dusným (NO) štěpí nukleotid GTP na produkt cyklického GMP, který pravděpodobně zvyšuje aktivitu fosfodiesterázy a tak snižuje hladinu cAMP v oocytu (Alberts et al., 1998).

OMI (Oocyte Maturation Inhibitor)

OMI je nízkomolekulární peptid produkovaný folikulárními buňkami (Sadler, 2010). Zabraňuje meiotickému zrání v antrálních folikulech a udržuje tak oocyty v diktyotenním stádiu profáze I. Inhibiční účinek zřejmě působí přes kumulární buňky a vytváří signálve spojení gap junction. OMI tak pravděpodobně neovlivňuje oocyt přímo. Jeho aktivita se snižuje v době předovulačního zrání folikulu (Wassarman, 1988).

Protein kináza C (PKC)

Protein kináza C patří do serin/threonin kináz, které katalyzují fosforylaci přidáním fosfátové skupiny na serinové či treoninové zbytky proteinů (Alberts et al., 1998). Pro maximální aktivitu PKC je potřeba dvou kofaktorů, iontů vápníku a diacylglycerolů (DAG).

Podle její struktury ji můžeme rozdělit do tří skupin: konvenční PKCs (cPKCs) zastoupené PKC- α , - β_I , - β_{II} a - γ izotopy, které mohou být aktivovány volnými ionty vápníku a diacylglyceroly (DAG), nové PKCs (nPKCs) zastoupené PKC- δ , - ϵ , - η , - μ a - θ izotopy, které jsou nezávislé na iontech vápníku, ale mohou být aktivovány DAG a atypické PKCs (aPKCs) zastoupené PKC- ζ , - λ a - τ izotopy, které jsou nezávislé jak na iontech vápníku, tak i na DAG (Petr et al., 2007). PKC funkce je závislá na fázi meiotického zrání. Přímá aktivace PKC v oocytu zadržaná v profázi I inhibuje spontánní zahájení meiózy, brání vstupu do metafáze I. Použití analogu PKC krátce po GVBD se zpomalí proces vydělení pólového tělíska a naopak aktivace PKC v MII podporuje vstup do interfáze v oocytech myši, potkana a žáby, kde ale nemusí dojít k obnovení buněčného cyklu. PKC tak může mít v různých fázích zrání jak stimulační, tak inhibiční účinky, záleží na načasování aktivace v cyklu a na izotopu, který se akce účastní (Viveiros et al., 2003) Nejvýznamnější funkcí PKC je periodické zvyšování Ca^{2+} (Jones, 1998). Aktivace PKC v prasečích oocytech obklopených kumulárními buňkami brání aktivaci MAPK a rozpadu zárodečného váčku (Fan et al., 2002).

Vápník

Ca^{2+} je intracelulární posel, který spouští řadu biologických dějů (Alberts et al., 1998). Zvýšení vápníku v buňce nastává prostřednictvím dvou hlavních mechanismů: uvolnění ze zásob (především z endoplazmatického retikula) přes ligand kanály na organelových membránách a transport skrz iontovými kanály v plazmatické membráně. Transport Ca^{2+} z extracelulárního prostředí je řízen hormonálně nebo napětím. Někdy tyto mechanismy působí v synergickém vztahu. Přechod tohoto vápníku do cytosolu je umožněn pomocí dvou signálních drah - dráha, která využívá inositol 1,4,5-trifosfátové (IP_3) receptory (IP_3R) a dráha využívající ryanodinové receptory (RyR). Zvýšené množství koncentrace Ca^{2+} v cytosolu hraje rozhodující roli v opětovném zahájení meiózy z bloku profáze I (Tosti, 2006). Prostřednictvím inositolfosfolipidové dráhy, která začíná působením fosfolipázy C, dochází ke vzrůstu hladiny Ca^{2+} uvnitř oocyty a to tak, že aktivovaná fosfolipáza C adenylátcyklázou hydrolyzuje membránový inositolfosfolipid na dvě různé mediátorové molekuly diacylglycerol (DAG) a inositol 1,4,5-trifosfát (IP_3). DAG zůstává v plazmatické membráně a společně s Ca^{2+} pomáhá aktivovat enzym protein kinázu C (PKC). IP_3 difunduje cytolem a uvolňuje Ca^{2+} z endoplazmatického retikula (ER) tak, že se naváže na Ca^{2+} -kanály v membráně ER a otevře je. Velký gradient elektrochemického potenciálu Ca^{2+} způsobí výtok Ca^{2+} do cytosolu (Alberts et al., 1998).

Za vylití Ca^{2+} do cytoplazmy jsou také zodpovědné ryanodinové receptory (RyR). Byly pojmenovány podle alkaloidu ryanodin, na který vykazují vysokou afinitu. Na aktivaci těchto receptorů se podílí cyklická ADP-ribóza. RyR kanály jsou aktivovány nízkou koncentrací Ca^{2+} a inhibovány vysokou koncentrací Ca^{2+} (Fill et Copello, 2011). RyR kanály zprostředkovávají uvolnění Ca^{2+} do cytosolu a jejich úloha byla prokázána v oocytech skotu, člověka a prasete (Petr et al., 2002). Ve zralých oocytech skotu jsou RyR rovnoměrně lokalizovány v kortikální vrstvě a jejich objevení je těsně regulováno během zrání a fertilizaci. Stimulace RyR má za následek formaci prvojader a buněčné rýhování

v dávkách srovnatelné s IP_3R stimulací. V oocytech skotu RyR hraje důležitou roli v její aktivaci (Yue et al., 1998).

Kalmodulin (CaM) byl první peptid nalezený ke společnému působení jednotlivých RyR kanálů v lipidové dvojvrstvě (Fill et Copello, 2011). Kalmodulin je multifunkční protein, který obsahuje čtyři vazebná místa pro vápník. Po jeho navázání mění svoji konfiguraci, která mu umožní se navázat k cílovým proteinům a následně tak změnit jejich aktivitu. Aktivuje především CaM - kinázy, kalcineurin (protein fosfatázu 2B), adenylát cyklázu a NO syntézu (Valeyev et al., 2008). Pro vývoj oocytů je významná hlavně CaMK II, která se uplatňuje ve zpětné vazbě na IP_3 dráhu.

Pro spontánní zrání myších a prasečích oocytů se požaduje intracelulární vápenaté kolísání. U jiných druhů se zvyšují vápenaté koncentrace v době GVBD a potvrzují tak vztah mezi tímto zvýšením a zráním oocytu. U myších oocytů je v době GVBD vápník nezávislý (Tosti, 2006). V prasečích oocytech uvolnění vápenatých iontů má za následek znovuzahájení meiózy. Kolísání intracelulární hladiny vápníku může navodit spermie při oplození oocytu. Podobné účinky mohou mít i jiné faktory, které zvýší hladinu Ca^{2+} a navodí tak aktivaci oocytu, partenogenetický vývoj bez penetrace spermie (Petr et al., 2002).

MPF (Metaphase Promoting Factor)

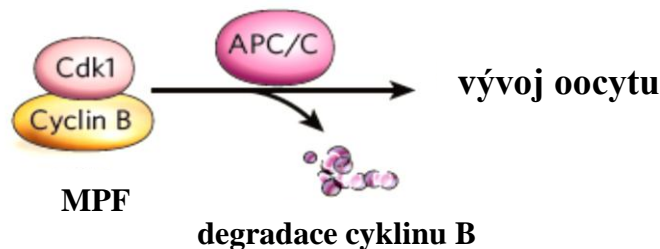
Tento faktor byl jeden z prvních, který byl zjištěn při aktivaci oocytu v době GVBD a byl studován na žabých oocytech a kvasinkách. MPF je složený z katalické podjednotky CDK1 (cyklin dependentní kináza; také nazývána $p34^{cdc2}$) a z regulační podjednotky cyklinu B (Marteil et al., 2009). Vazba cyklinu na CDK je nutnou podmínkou pro její aktivaci (Murray, 2004). Pre-MPF je držený v nečinné formě v profázi I sítí kináz a fosfatáz, jejichž rovnováha je řízena sériemi zpětných vazeb mezi nimi (Marteil et al., 2009). Aktivace MPF je obvykle vyvolána defosforylací tyrozinu (Tyr 15) nebo treoninu (Thr 14) $p34^{cdc2}$ nebo syntézou cyklinu B (Sun et Nagai, 2003). Aktivita cyklinů je ovlivněna jejich lokalizací. Cyklin B se nachází v cytoplasmě, kde se začíná syntetizovat na konci S-fáze a jeho maximální koncentrace je na konci metafáze (Murray, 2004). CDK1 se významně podílí na kondenzaci chromatinu v profázi a fosforyluje lamin, čímž navozuje

rozpad jaderné membrány (Peter et al., 1990). MPF je důležitý pro vstup z G2 fáze do M-fáze (Marteil et al., 2009).

Během zrání v oocyty se MPF objevuje těsně před GVBD a klesá na konci prvního meiotického dělení. Potom se znovu objeví na začátku druhého meiotického dělení a zůstává vysoký až do oplození kvůli MPF stabilizaci pod vlivem cytotatického faktoru CSF. V nezralých oocytech je MPF přítomná v nečinné formě pre-MPF s CDK1. Odstranění inhibitory fosforylace fosfatázou Cdc25 vede k MPF aktivaci. Aktivace Cdc25 závisí na stavu její fosforylace a je dosažena skrz CDK1. MAPK je také přímo zapojená do aktivace Cdc25 během přechodu z G2 fáze do M-fáze. Inhibitor defosforylace Cdc25 je uskutečňován fosfatázou 2A. U plně vzrostlých oocytů tvoří cyklin B a p34^{cdc2} komplex (Sun et Nagai, 2003).

Zástava meiózy se děje pomocí cytotatického faktoru CSF, který inhibuje proteinový komplex APC/C. Tento komplex po aktivaci degraduje cyklin B, inaktivuje MPF a tím dochází k výstupu z metafáze a pokračování meiotického dělení, obr.3 (Jesus and Haccard, 2007).

Obr. 3 Degradace cyklinu B



(Jesus and Haccard, 2007).

Aktivita MPF působí rozpad jaderné laminy, kondenzaci chromozomů a formování dělicího vřeténka, proto MPF hraje klíčovou roli v průběhu meiotického zrání (Peter et al., 1990).

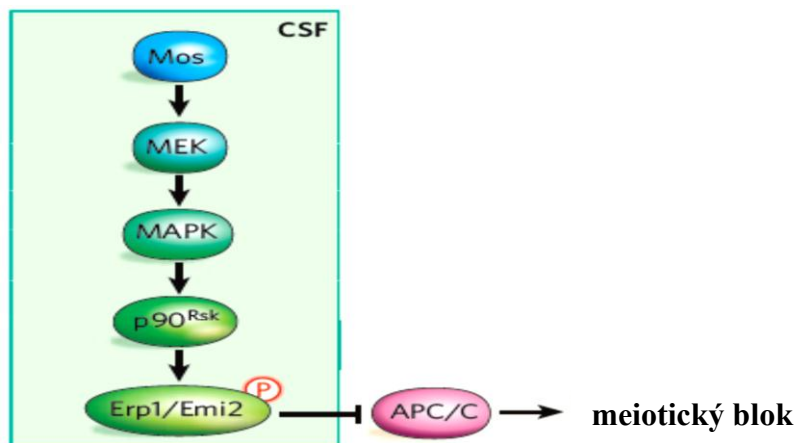
MAPK (Mitogen-Activated protein kinase)

MAP kináza patří do serin/treonin kináz a hraje důležitou roli v regulaci buněčného cyklu (Fan et Sun, 2004). V savčích buňkách byla charakterizována trojice z rodiny MAPK: a to klasická MAPK (také známá jako ERK), extracelulárně regulovaná kináza ovlivněná extracelulárními faktory, dále pak C – jun N – terminální kináza/stresem aktivovaná protein kináza (JNK/SAPK) a p38 kináza. Každá kaskáda se stává nejméně ze tří enzymů, které jsou aktivovány v sérii: MAPK kináza kináza (MAPKKK), MAPK kináza (MAPKK) a MAP kináza (MAPK). V současné době bylo identifikováno přinejmenším 14 MAPKKK, 7 MAPKK a 12 MAPK v savčí buňce (Zhang et Liu, 2002). MAP kináza je aktivována jako odpověď na řadu růstových faktorů (cytokinů) a dalších signálních molekul (UV záření). K plné aktivaci MAP kinázy je nutná fosforylace threoninových a tyrosinových zbytků (Fan et Sun, 2004). MAP kináza vykazuje vysokou aktivitu během zrání savčích oocytů, kde bývají nejčastěji přítomné tyto dvě izoformy ERK1(p44) a ERK2(p42) (Fan et al., 2002). MAP kináza je aktivována prostřednictvím MAP kinázy kinázy, nazývané také MEK, která fosforyluje katalytické domény MAP kinázy na threoninových a tyrosinových zbytcích. MEK je aktivována také fosforylací členem z rodiny MAPK kináz kináz, produktem protoonkogenu *c-mos*, nazývaným *Mos* (Fan et Sun, 2004). Na konci této kaskády stojí kináza p90Rsk (ribosomální protein S6-kináza) (Fan et Sun, 2004).

V rostoucím oocytu je MAP kináza lokalizována především v cytoplazmě a na počátku fáze zrání se přesunuje do zárodečného váčku, kde může indukovat začátek zrání z cytoplazmy do jádra (Inoue et al., 1998). Po GVBD je MAPK zapojená do regulace v organizaci mikrotubulů a meiotického vřeténka. U prasečích oocytů je MAP kináza fosforylována v průběhu GVBD, při které udržuje kondenzaci chromozómů. Po GVBD fosforyluje cytoskeletární proteiny a proteiny jaderné laminy, kterým zabraňuje v jejich předčasném spojení (Peter et al., 1990). Aktivace této kinázy je základní pro udržení zástavy v metafázi II a naopak její inaktivace je podmínkou pro formaci prvojader po oplození či partenogenetické aktivace. MAPK vzájemně působí s proteinovými kinázami (MPF, PKA, PKC, CaM) a stejně tak i s proteinovými fosfatázami (Fan et Sun, 2004). MAP kináza na rozdíl od MPF vykazuje vysokou aktivitu v průběhu celé fáze zrání a klesá po oplození nebo partenogenetické aktivaci (Sun et al., 2001). U prasete se názory na dobu aktivace MAPK liší. Bylo popsáno, že dochází k současné aktivaci MPF a MAP kinázy

(Goudet et al., 1998). V další studii ovšem bylo popsáno, že dochází nejdříve k aktivaci MPF a poté k aktivaci MAPK (Inoue et al., 1998). Nejvíce autorů zastává názor, že nejdříve dochází k aktivaci MAPK a poté MPF (Inoue et al., 1998). MAP kináza je společně s Mos kinázou součástí cytotatického faktoru (CSF), viz obr. 4.

Obr.4 Dráha vedoucí k meiotickému bloku



(Jesus and Haccard, 2007).

CSF (Cytostatic factor)

Cytoplazmatický faktor udržuje vysokou aktivitu MPF a zastavuje zrání oocytů v metafázi II. Aktivita CSF se objevuje po metafázi I, postupně se zvyšuje a zůstává vysoká během zrání oocyty. V oocyty se poté CSF kumuluje a funguje jako inhibitor buněčného rozdělení. Po oplození se aktivita CSF náhle sníží a na rozdíl od MPF se už zygotě neobjevuje (Masui, 2001). Zastavení meiózy pomocí CSF se děje skrz aktivitu enzymu Mos, který je přítomný jen během meiózy a při působení MEK, MAPK a p90Rsk. Enzym p90Rsk fosforyluje Erp1, který následně blokuje meiózu tím, že nedojde k aktivaci proteinového komplexu APC/C, obr.4 (Jesus and Haccard, 2007). Pokud je komplex APC/C aktivován, dojde k inaktivaci MPF a následné degradaci proteinu Mos calpainem a proteázami závislými na vápníku. Mos protein se ztrácí z cytosolu oocyty a k celé kaskádě aktivity CSF nedochází (Masui, 1991).

NO (oxid dusnatý)

Oxid dusnatý je dvouatomová molekula, která vznikne katalyckou přeměnou L-argininu na L-citrulin s pomocí enzymu NO-syntázy (Blair et al., 2005). NO-syntáza (NOS) byla izolována v několika formách, které se mezi sebou liší subcelulární lokalizací, kinetikou, způsobem aktivace, a tedy i funkcí. Konstitutivní izoformy (stále přítomné – cNOS), sem řadíme endoteliální eNOS a nervovou nNOS se nachází hlavně v buňkách endotelu a v neuronech. Aktivují se vazbou vápenatých iontů na kalmodulin. Induktivní izoforma (iNOS) je obsažena v makrofázích, hepatocytech, srdečních myocytech a dalších buňkách. Aktivuje se jen po stimulaci těchto buněk. Všechny izoenzymy NOS obsahují hemové železo (protoporfyrin IX), flavinmononukleotid (FMN), flavinadenindinukleotid (FAD), jako kofaktor potřebují nikotinamidadenindinukleotidfosfát (NADPH) a tetrahydrobiopterin. Katalycky účinné jsou jen ve formě dimerů a jsou stereospecifické. NO-syntázy se tedy mohou klasifikovat podle svého zdroje na endotelovou (eNOS), neuronovou (nNOS) a makrofágovou nebo-li indukovatelnou NO-syntázu (iNOS) (Kupková a Beneš, 2004).

Oxid dusnatý má silný vliv na reprodukční systém, ovlivňuje například sexuální chování, biosyntézu steroidních hormonů, folikulární růst, ovulaci, oplodnění a dokonce i embryonální implantaci. Pokud jde o imunolokalizaci NOS v savcích vaječnicích, je zde přítomna pouze izoforma eNOS a iNOS. Isoforma nNOS ve vaječnicích nebyla nalezena. V prasečích vaječnicích je častější izoforma eNOS než iNOS. Přítomnost eNOS je spojená s vývojem folikulu a oocyty, rozvojem žlutého tělíska a následné regrese, zatímco iNOS je funkční až ve druhé fázi vývoje folikulu, ovulace a rozvoje CL (Tao et al., 2004).

NO bývá regulátorem signální kaskády, jež kontroluje přechod mezi metafázemi prvního a druhého meiotického dělení a zároveň se podílí na udržení oocyty v MII. NO-dependentní signální kaskáda se může také významně podílet na regulaci komunikace v buňce pomocí vápníku při aktivaci oocyty (Davis et al., 2001).

Při použití oxidu dusnatého (NO) nejsou žádné údaje o roli PKC izotopů během aktivace prasečích oocytů. NO je na PKC nezávislý (Petr et al., 2007).

Na NO-dependentní aktivaci oocytů prasete se mohou dále podílet i mechanismy z řady molekul pomocí nitrosylace. K těmto molekulám patří ryanodinové receptory, jejichž

stimulace vyvolává u dozrálých oocytů prasete aktivaci. NO aktivuje nitrosylací Ras protein, který je součástí MAP-signální kaskády v oocytech (Schmidt and Nebrada, 2002). NO donory mají schopnost aktivovat v *in vitro* podmínkách prasečí oocyty, dokáží navodit partenogenetickou aktivaci a to prostřednictvím eNOS a kalmodulinu. Samotný kalmodulin aktivaci oocytu nevyvolá. Aktivace je navozená tím, že se jednak blokuje pomocí inhibitoru specifickým vůči všem třem izoformám NOS – L-NMMA, ale také L-NAME, který má nejvyšší specifitu vůči eNOS izoformě (Petr et al., 2007).

H₂S (Sirovodík)

Sirovodík (nebo-li sulfan) je bezbarvý plyn, jehož molekula je tvořena jedním atomem síry a dvěma atomy vodíku. Je endogenního původu vytvořený z cysteinu třemi enzymy. Enzym 3-merkaptopyruvát je sulfotransferáza účinná, jak v mitochondriích, tak i v cytosolu. Další dva enzymy cystathion beta-syntáza (CBS) a cystathion gamma-lyáza (CBE) jsou účinné jen v cytosolu. (Kamoun, 2004).

CBS hraje důležitou roli v samičím reprodukčním cyklu. Je přítomný ve vaječniku s nejsilnější expresí ve folikulárních buňkách ve všech stádiích. Expese enzymu CBS v oocytu dosud nebylo prokázáno. CBS zvyšuje růst folikulů, ovlivňuje plodnost a má vliv na pravidelnost a délku estrálního cyklu. CBS v granulózních buňkách hraje důležitou roli ve zrání oocytu a ukazuje se, že genovým knockoutem CBS v těchto buňkách má za následek inhibici zrání oocytu (Zhu et al., 2011).

Sirovodík je znám především svou toxicitou a spolu s oxidem dusnatým a oxidem uhelnatým patří k tzv. gasotransmitterům.

3.2 Kalcineurin

Kalcineurin je znám jako bílkovinná fosfatáza 2B (PP2B), také nazývána jako Ca²⁺ - kalmodulin aktivovaná protein fosfatáza, která hraje významnou roli během regulace meiózy a především je nezbytná pro oplození a aktivaci oocytu (Hogan and Li, 2005).

Označení „kalcineurin“ je spojené s jeho nejrozšířenějším výskytem v savčí nervové tkáni a s jeho vazbou pro vápenaté ionty (Klee et al., 1979).

3.2.1 Struktura kalcineurinu a jeho izoformy

Kalcineurin je heterodimer, který se skládá z katalycké podjednotky A o velikosti 58-64 kDa vázající kalmodulin a regulační podjednotky B o velikosti 19 kDa, vázající Ca^{2+} . Tyto dvě podjednotky si zachovávají svoji strukturu, sekvenci aminokyselin, od kvasinek až po organismus člověka (Klee et al., 1998). Kalcineurin je přítomen ve všech eukaryot, kromě vyšších rostlin. U savců jsou přítomny tři izomery kalcineurinu A ($A\alpha$, $A\beta$, $A\gamma$) a dva izomery kalcineurinu B (B1, B2). Všechny tyto izoformy jsou produkty samostatných genů (Hogan and Li, 2005). Isoformy kalcineurinu $A\alpha$, $A\beta$ a B1 se vytváří téměř ve všech tkáních, zatímco zbylé izoformy $A\gamma$ a B2 jsou omezené na tkáň mozku a varlete (Molkentin, 2004). Kalcineurin B má strukturu s typickým motivem (EF-hand) polypeptidového řetězce, který váže Ca^{2+} . Proteiny obsahující EF-hand doménu mají vazebná místa pro vápník a v případě kalcineurinu B má tento protein 4 vazebná místa pro Ca^{2+} , jedno místo s vysokou afinitou k vápníku a zbylé tři mají afinitu nízkou (Klee et al., 1998).

3.2.2 Aktivace kalcineurinu

Aktivita kalcineurinu je závislá na iontech vápníku, kterou řídí dvě strukturálně podobné, ale funkčně odlišné látky, kalmodulin a kalcineurin B. Kalcineurin má čtyři vazebná místa pro vápník a jedno vazebné místo pro kalmodulin. Na kalcineurin B se naváží vápenaté ionty a na kalcineurin A kalmodulin. Po obsazení všech těchto vazebných míst se uvolní autoinhibiční doména a dojde k aktivaci enzymu. (Sobotková a Bartůňková, 2008). Koncentrace Ca^{2+} potřebná pro aktivaci se snižuje se zvyšující se koncentrací kalmodulinu a kalmodulinová koncentrace potřebná pro aktivaci se snižuje se zvyšující Ca^{2+} koncentrací (Klee et al., 1998). Kalmodulin bývá pevně spojený s kalcineurinem jen v

přítomnosti fyziologické hodnoty zvýšení Ca^{2+} , díky které dál dochází k defosforylizaci vybraných substrátů (Hogan and Li, 2005). Méně než 10^{-7} M vápníku způsobí, že v místě vysoké afinity kalcineurin B zůstává navázaný na kalcineurin A, ale enzym je inaktivní. Obsazení slabých míst afinity vápníkem (k_d mezi 0,5 – 1 μM) má za následek malou aktivaci (Klee et al., 1998).

Kalcineurin přednostně defosforyluje proteiny s basickými aminokyselinami na N-konci a bez acidických aminokyselin na C-konci polypeptidického řetězce substrátu (Klee et al., 1998). Procesem defosforylace, tedy ztrátou fosfátové skupiny z proteinu či nukleotidu, kalcineurin reguluje a aktivuje další proteiny (Jesus and Haccard, 2007).

Kalcineurin může také přímo defosforylovat členy proteinové rodiny NFAT (nuclear factor of activated T-cells), které řídí genovou expresi a jsou řazeny mezi transkripční faktory (Molkentin, 2004). Kalcineurin se prostřednictvím dvou vazebných míst váže na proteiny NFAT 1-4 a specificky defosforyluje serinové zbytky v motivech SRR (serine-rich region) a SP (serine-proline) (Neal a Clipstone, 2001). Po následné defosforylaci kalcineurinem dochází k translokaci NFAT do jádra (Sobotková a Bartůňková, 2008). Hlavním vazebným místem pro kalcineurin jsou místa se shodnou sekvencí PxIxIT zachovanou napříč proteiny NFAT1-4. Druhé vazebné místo se shodnou sekvencí LxVP nevykazuje tak silnou sekvenční podobnost mezi jednotlivými kalcineurinem regulovanými proteiny NFAT a slouží pravděpodobně k selektivní interakci určitých proteinů NFAT s kalcineurinem (Martínez-Martínez et al., 2006). Kalcineurin má relativně úzkou specifitu účinku. Pro svou aktivitu vyžaduje ionty železa a zinku (Klee et al., 1998). Aktivní místo obsahuje Fe^{2+} , Zn^{2+} kovové ionty a následná oxidace Fe^{2+} na Fe^{3+} může enzym inaktivovat (Aramburu et al., 2004).

3.2.3 Kalcineurin a jeho inhibitory

Nejvýznamnějším inhibitorem kalcineurinu je imunosupresivum cyklosporin A (CsA), cyklický polypeptid složený z 11 aminokyselin, který se běžně vyskytuje jako sekundární metabolit vláknitých hub. Široké uplatnění má v transplantační medicíně a v terapii autoimunitních onemocnění (atopická dermatitida, psoriáza atd.) (Sobotková a Bar-

tůňková, 2008). Vazba CsA v T lymfocytech na cyklofilin (Cyp-A) vytvoří komplex, který inhibuje kalcineurin (Hogan and Li, 2005). Dalším inhibitorem kalcineurinu je imunosupresivum označované jako takrolimus nebo také FK506 (Sobotková a Bartůňková, 2008). Vazba FK506 na protein FKBP12 vytváří v T lymfocytech znovu komplex, který inhibuje kalcineurin (Hogan and Li, 2005). Dalším kalcineurinovým inhibitorem je pimekrolimus tvořící komplex s FKBP12. Vlivem těchto imunosupresiv dochází v buňce k zablokování přechodu z fáze G0 do fáze G1. Tyto inhibitory mají podobné nežádoucí účinky spojené s nefrotoxitou, hepatotoxicitou, neurotoxitou a rozvojem hypertenze (Sobotková a Bartůňková, 2008).

3.2.4 Funkce a exprese kalcineurinu

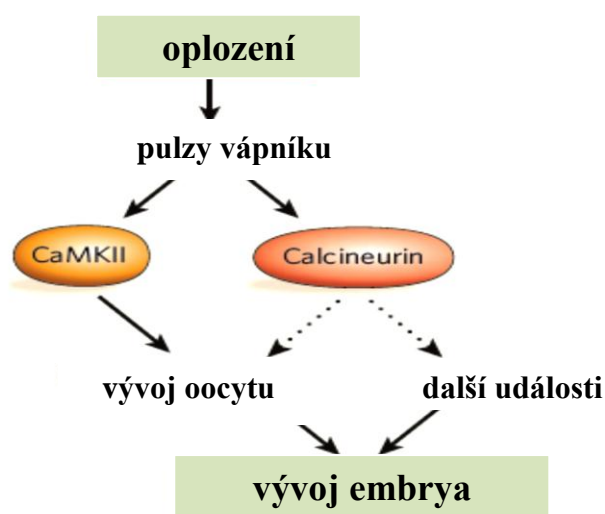
Kromě již zmíněné regulace a signalizace prostřednictvím vápenatých iontů se kalcineurin účastní řady biochemických dějů. Aktivace kalcineurinu je nezbytná zejména pro transkripci genů pro cytokiny, ale aktivovaný kalcineurin také reguluje transport proteinů a iontů, moduluje enzymatickou aktivitu a hraje úlohu i v apoptóze. Nejvýznamnějším transkripčním faktorem, který je kalcineurinem regulován, je NFAT. Touto cestou je regulována exprese genů pro interleukiny (IL-2, IL-3, IL-4, IL-13) a další faktory (INF- γ , GM-CSF, TNF- α) (Sobotková a Bartůňková, 2008). Kalcineurin tedy hraje roli, jak v programované buněčné smrti T a B lymfocytů, tak i v jejich aktivaci. Kalcineurin a NFAT jsou zodpovědné za vývoj kardiovaskulární tkáně a kosterní svaloviny. Výskyt kalcineurinu v savčí tkáni je široce rozšířený, najdeme ho dále v tukové tkáni, nadledvinkách, míše, ledvinách, jater, plicích, dřeni, slinivce, placentě, krevních destiček, sítnici, hladké svalovině, slezině, spermiích, štítné žláze a brzlíku (Rusnak and Mertz, 2000).

U prasete byl kalcineurin poprvé prokázán na plazmatické membráně lymfocytů (Chantler, 1985). U prasečích samčích pohlavních buněk - spermií byly objeveny také dvě izoformy kalcineurinu (Tash et al., 1988)

V žabách oocytech Mochida and Hunt (2007) prokázali, že po aktivaci protein kinázy C, která hydrolyzuje na diacylglycerol a inositol-1,4,5-trisfosfát (IP₃) se z endoplazmatického retikula uvolní prostřednictvím navázaného (IP₃) vápník, který po aktivaci kal-

calcineurinu defosforyluje proteinový komplex APC/C. Tento proteinový komplex degraduje cyklin B a přímo tak ovlivňuje aktivitu MPF. Calcineurin je pak zapojen do ranného embryonálního vývoje, kde se podílí na dekondenzaci chromatinu a na změnách v cytoskeletu, které pak v dalším vývoji mohou navodit migraci prvojader, viz obr. 5 (Jesus and Haccard, 2007).

Obr.5 Aktivace calcineurinu po oplození



(Jesus and Haccard, 2007).

Calcineurin je významně zapojen do regulace meiózy v žábých oocytech rodu *Xenopus* (Nishiyama et al., 2007, Mochida and Hunt, 2007).

V reprodukčních orgánech mouchy rodu *Drosophila*, byl calcineurin také nalezen a předpokládá se, že stejně tak, jak v oocytech žáby rodu *Xenopus*, tak i v oocytech mouchy ovlivňuje roli během meiózy a je nezbytný pro oplození a aktivaci oocytu (Takeo et al., 2006).

V savčích oocytech nebyl calcineurin dosud identifikován. Jeho přítomnost, ale v prasečích oocytech předpokládáme, a díky stanové hypotéze v této práci, by bylo zajímavé tuto jeho roli objasnit.

4 Materiál a metody

4.1 Získávání vaječníků

Vaječníky prasat byly odebírány na jatkách z poražených prasnic. Po jejich získání v různé fázi pohlavního cyklu byly transportovány ve vytemperovaných termolahvích s fyziologickým roztokem (0,9% chlorid sodný) do laboratoře při 39 °C.

4.2 Získávání oocytů s ukončeným růstem

Oocyty s ukončeným růstem, ve stádiu zárodečného vajíčku byly získány aspirací folikulů o velikosti 2 – 5 mm pomocí jehly 20G (Sterican, Braun Melsungen, Německo). Ze získané folikulární tekutiny byly oocyty pod stereomikroskopem (Nikon SMZ 645, Japonsko) odsány pipetou a přeneseny do kapek média M199 (Sigma – Aldrich, Německo) obohaceného o další složky, viz tab. 4.1. Pro další experimenty byly vybírány jenom oocyty s neporušenou cytoplazmou a kompaktním obalem kumulárních buněk.

Tab. 4.1 Složení modifikovaného média M199

gentamycin	0,0025 ml/100 ml
laktát	0,06 ml/100 ml
pyruvát	0,025 ml/100 ml
růstový protein	0,1 g/100 ml

4.3 Kultivace oocytů s ukončeným růstem

Oocyty byly kultivovány v Petriho miskách v médiu M199 při teplotě 39 °C ve směsi 5 % CO₂ se vzduchem do tří stádií meiotického zrání:

1. Stádium zárodečného vajíčku (0 hodin kultivace *in vitro*),
2. stádium meiotické metafáze I (24 hodin kultivace *in vitro*),
3. stádium meiotické metafáze II (48 hodin kultivace *in vitro*).

4.4 Příprava vzorků pro stanovení kalcineurinu metodou Western blot

Oocyty byly nejdříve zbaveny kumulárních buněk prostřednictvím tenké skleněné pipety. Každý vzorek obsahoval 50 oocytů. Získané kumulární buňky ze všech 50 oocytů v daném stádiu tvořily samostatné vzorky. Všechny vzorky byly odděleně promyty v pufru PBS obsahující sůl kyseliny fosforečné (složení viz tab. 4.2). Po promytí v pufru PBS byly oocyty a kumulární buňky dány do mikrozkumavek s 50 μl lyzačního pufru, viz tab. 4.3, který obsahuje inhibitory proteáz (Roche, Applied Science, Francie). Aby u oocytů byla porušena *zona pellucida* následně pak došlo k jejich popraskání, musely být oocyty opakovaně nasávány a vysávány skrz pipetu, která měla menší průměr než oocyty. Vzorky byly inkubovány na ledu po dobu 10 minut, následně precipitovány 5 μl 100% kyselinou trichloroctovou (TCA, 5 μl na 50 μl lyzačního pufru) a ponechány dalších 10 minut na ledu. Poté se vzorky nechaly 5 minut centrifugovat při 10 000 g a teplotě 4°C. Po centrifugaci byl ze vzorku odsát supernatant a byly promyty v 50 μl acetonu s 10% HCl. Vzorek prošel další centrifugací a znovu byl odsát jeho supernatant s následným promytím sedimentu v 50 μl acetonu. Po další centrifugaci byl odsát a odpařen aceton a vzorky tak byly pro stanovení exprese kalcineurinu uchovány při teplotě -20°C

Tab. 4.2 pufr PBS

Na₂HPO₄	29g
NaH₂PO₄ . 2 H₂O	2,96g
NaCl (100 mM)	5,84g
H₂O	do 1 000ml

Tab. 4.3 Lyzační pufr

10% Triton X	0,15 ml
10% SDS	0,05 ml
PBS	4,3 ml
10% inhibitory proteáz v PBS	0,5 ml

4.5 Stanovení kalcineurinu metodou Western blotting

4.5.1 Elektroforéza

Elektroforéza patří mezi elektromigrační separační metody. Principem této metody je využití rozdílné pohyblivosti nabitých částic ve stejnosměrném elektrickém poli s jejich následnou separací. Velikost nabitých částí může být různá a jsou-li na začátku separace částice v jednom místě, pak během separace se dostávají dopředu ty nabité částice, které mají větší pohyblivost (jsou menší), a opožďují se částice s menší pohyblivostí. Tím dochází k jejich oddělení. Gelová SDS elektroforéza v polyakrylamidu se používá ke kvalitativní charakterizaci bílkovin, ke kontrole čistoty a ke kvantitativnímu stanovení. Použití

SDS (dodecylsulfát sodný) v kombinaci se zahříváním se bílkoviny štěpí před jejich aplikací na gel. Denaturované polypeptidy váží SDS, stávají se záporně nabitými a migrují v polyakrylamidovém gelem s pohyblivostí závislou na velikosti polypeptidu.

Proteiny oocytů a kumulárních buněk byly nejprve rozděleny pomocí elektroforézy na 15% polyakrylamidovém gelu s SDS (SDS-PAGE). Pro separaci proteinů byla použita zónová, mini vertikální elektroforéza (Hofer Pharmacia Biotech, Německo).

Pro přípravu polyakrylamidového gelu byl použit gelový sendvič a spacers o tloušťce 1 mm. Ve zkumavce byl nejprve namíchán pufr o pH 8,8 (složení pufru viz tab. 4.4) a poté byl připraven 12,5% separační gel (složení gelu viz tab. 4.5). Roztoky pufru a gelu byly pipetou promíchány a ihned pomocí pipety aplikovány do sendviče podél spaceru tak, aby nevznikaly žádné vzduchové bubliny. Separační roztok byl nanesen do výšky 1,5 cm pod okraj skel, poté protáhnut 25G jehlou a opatrně přelit 0,5 až 1 cm vrstvou destilované vody pro udržení rovného povrchu gelu.

Po 60 minutách byla destilovaná voda odlita a na zpolymerizovaný separační gel byl pomocí pipety nalit gel zaostřovací. Na přípravu tohoto gelu byl ve zkumavce smíchán 0,67 ml 30% akrylamidový roztok, 1 ml pufr o pH 6,8 (složení pufru viz tab. 4.6), 2,3 ml destilovaná H₂O, 30 µl persulfát amonný a 5 µl TEMED (N,N,N',N' - tetramethylethylendiamin).

Polymerace akrylamidu je iniciována tak, že TEMED katalyzuje rozložení persulfátu na volný radikál. Poté byl zaostřovací gel napipetován až po okraj skel a následně byl do něj vložen hřebínek, který vytvořil vzorkové jamky. Po 45 minutách byl hřebínek vysunut z gelu a gel byl umístěn do elektroforézové vany, kde byl nalit elektroforézový pufr (složení viz tab. 4.7).

Proteiny vzorků oocytů a kumulárních buněk byly před separací rozpuštěny ve vzorkovém pufru (Laemmli, 1970; 20 µl; složeni pufru viz tab. 4.8). Pufr obsahuje přísadu tenzidu SDS, který se pevně k proteinům váže a mění jejich konformaci. K této změně dochází po rozpuštění disulfidických můstků v molekule proteinu. Na neutralizaci pH bylo použito 5 µl 0,1 NaOH.

Do každé vytvořené jamky bylo nanášeno pomocí pipety 25 µl vzorku ve vzorkovém pufru a 5 µl standardu molekulové hmotnosti (Prestained SDS-PAGE Standard, Bio-

Rad Lab., Kanada), pro sledování správného dělení proteinů při elektroforéze a pro kontrolu správného přenesení proteinů na membránu. V jamkách kde se nenacházely vzorky, bylo dále napipetováno 25 μ l vzorkového pufru. Součástí tohoto vzorku byla bromfenolová modř, díky které byla sledována délka elektroforézy. Bromfenolová modř se pohybuje v čele dělených proteinů a na konci elektroforézy by měla být přibližně 0,5 cm od konce gelu. Následně byla sestavená aparatura, kterou jsme zapojili ke zdroji elektrického proudu a postupně nastavovali parametry napětí a čas - 90 V, 90 mA, 20 W po dobu 30 minut a 180 V, 100 mA, 20 W po dobu 1 hodiny a 20 minut.

Tab. 4.4 Pufř do separačního gelu

2M Tris-HCl (pH 8,8)	7,5 ml
10 %SDS	0,4 ml
H₂O	2,1 ml

Tab. 4.5 12,5 % separační gel (15ml)

30 % akrylamid	7,5 ml
pufř (pH 8,8)	3,7 ml
destilovaná H₂O	3,8 ml
persulfát amonný	75 μ l
TEMED (N, N, N', N' - tetramethylen – ethylendiamin	5 μ l

Tab. 4.6 Pufr do zaostřovacího gelu

1M Tris – HCl (pH 6,8)	5 ml
10 % SDS	0,4 ml
H₂O	4,6 ml

Tab. 4.7 Elektroforetický pufr

25 mM Tris	3 g
192 mM glycin	14,4 g
10% SDS	10 ml
H₂O	do 1 000 ml

Tab. 4.8 Vzorkový pufr

1 M Tris – HCl (pH 6,8)	0,6 ml
50 % glycerol	5 ml
10 % SDS	2 ml
1 % bromfenolová modř	0,5 ml
H₂O	0,9 ml

4.5.2 Přenos proteinů na nitrocelulózovou membránu

Pro přenos proteinů na speciální membránu se využívá blotovací metoda, Western blotting. Mezi jeho výhody patří zvýšená dostupnost bílkovin po přenosu na membránu. S gelem se hůře manipuluje a toho se pak dále využívá především u imunodetekce. Další výhodou je zahuštění bílkovin na membráně, což má za následek zvýšenou citlivost detekce. Proteiny jsou na membráně imobilizovány a nedochází tak k jejich difúzi. Mezi přednostmi blottingu patří rovněž jednodušší manipulace a následné uchování membrány.

Po ukončení elektroforézy byla od sebe oddělena skla a sejmutý gel byl na 10 minut namočen do vychlazeného blotovacího pufru - Towbinova pufru (složení pufru viz tab.4.9). Poté do vychlazené destilované vody byla namočena nitrocelulózová membrána (Hybond ECL, Amersham Pharmacia Biotech, Velká Británie), která pak byla následně vložena do vychlazeného blotovacího pufru na 10 minut. Nitrocelulózová membrána musela být tedy methanolem zvlhčena, jelikož je příliš hydrofobní. Do blotovacího pufru byly namočeny tři houby, které byly poté vloženy do blotovacího modulu. Na houby byly vloženy filtrační papíry opět namočené v blotovacím pufru. Na filtrační papír byl opatrně přenesen gel, na který byla přiložena nitrocelulózová membrána. Potom byl na membránu opět umístěn filtrační papír nasáklý blotovacím pufrem. Plastovou zkumavkou byly jemně převálcováním vytlačeny vzduchové bubliny. Na konec byly znovu na filtrační papír položeny tři houby namočené v blotovacím pufru a blotovací modul byl uzavřen. Blotovací modul byl naplněn blotovacím pufrem a přemístěn do elektroforézové vany, do které byla nalita vychlazená destilovaná voda doplněná ledem. Sestavená komora byla připojena k elektrickému zdroji, na kterém byly nastaveny parametry - 25 V, 400 mA, 20 W na 1 hodinu a 30 minut. Pomocí elektroblottingu dochází k přenosu proteinů z gelu na membránu s využitím síly elektrického pole.

Tab. 4.9 Blotovací pufr – Towbinův

25 mM Tris	3 g
192 mM glycin	14,4 g
10 % SDS	1 ml
methanol (před použitím)	100 ml
H₂O	do 1 000 ml

4.5.3 Blokování

Po přenosu proteinů na membránu je nezbytné zablokovat vazebná místa, neboť povrch membrány váže jak antigen, tak i následně přidané protilátky. K blokování se nejčastěji používají roztoky inertních proteinů, v našem případě byla membrána přes noc umístěna ve 2 % odtučněném mléce (Amersham Pharmacia Biotech, Velká Británie). Proteiny mléčného kaseinu se navázaly na všechna místa, kam se dosud nenavázaly proteiny při přenosu. Molekuly imunoglobulinů se už po přidání protilátek nemohou nespecificky vázat na prázdný povrch membrány, ale musí specificky najít svůj epitop na přeblokových antigenech. Blokování výrazně snižuje šum pozadí a odstraňuje falešné pozitivy. Membrána byla poté promyta 1 x 15 minut a 2 x 5 minut v PBST (složení viz tab. 4.10).

Tab.4.10 PBST

Na₂ HPO₄	29 g
NaH₂ PO₄ . 2H₂ O	2,96 g
NaCl (100 mM)	5,84 g
Tween 20	1 ml
H₂ O	do 100 ml

4.5.4 Imunodetekce

Imunodetekce patří mezi specifické detekční metody, které používáme po blottingu proteinů. V této detekci se využívá vazba protilátky na proteiny. Po inkubaci specifickou primární protilátkou je membrána vymyta protilátkou sekundární, která je vůči primární protilátce rovněž specifická. Pro identifikaci kalcineurinu a jeho zviditelnění musí být sekundární protilátka nějak značena, v našem případě bylo použito enzymatické značení peroxidázou.

Po blokování byla nitrocelulósová membrána inkubována 2 hodiny při laboratorní teplotě s myší polyklonální protilátkou anti - kalcineurin ředěnou 2 % netučným mlékem podle doporučení výrobce - primární alfa 1:10 000, primární beta 1:3000 (Sigma-Aldrich, Německo). Po inkubaci byla membrána promyta 1 x 15 minut a 2 x 5 minut v PBST.

Po promytí primární protilátky byla na membránu aplikována sekundární protilátka anti – myší IgG konjugovaný s křenovou protilátkou (Sigma – Aldrich, Německo) naředěny v poměru 1:40 000 v roztoku 2 % mléka v PBST po dobu 2 hodin při laboratorní teplotě. Potom byla membrána opět promyta za stálého míchání 1 x 15 minut a 2 x 5 minut v PBST. Pro detekci kalcineurinu byl použit detekční kit pro Western blotting (ECL Advance western blotting detection kit, Amersham Biosciences, Velká Británie). Tento kit obsahoval

detekční chemiluminiscenční roztoky A a B v poměru 1:1 (1,5 ml:1,5 ml na membránu). Pomocí filtračního papíru byla membrána osušena a inkubována s detekčním roztokem po dobu 5 minut při laboratorní teplotě. Poté byla membrána znovu osušena a přemístěna do kazety a exponována na autoradiografický film (Hyperfilm ECL, Amersham Biosciences, Velká Británie) po dobu 10 sekund, 1 minutu, 10 minut a 30 minut. Na vyvolání byla použita vývojka FOMA LP – T a ustalovač FOMAFIX pro zpracování RTG snímků (FOMA Bohemia spol., Česká republika).

4.6 Imunohistochemická detekce kalcineurinu

Pomocí tenké skleněné pipety byly z oocytů opět odstraněny kumulární buňky a s pomocí manipulačního média doplněného o 0,1 % pronázu odstraněna i *zona pellucida*. Poté byly oocyty propláchnuty v kapkách 0,1 % BSA (bovinní sérový albumin, Sigma – Aldrich, Německo) a fixovány v 2,5 % paraformaldehydu v PBS při laboratorní teplotě. Fixační roztok (etanol + 100 % kyselina octová, 1:3) byl poté za 30 minut vyměněn a za dalších 30 minut byla výměna zopakována. Fixované oocyty byly ošetřeny 0,5 % Tritonem X-100 v PBS při laboratorní teplotě a po 2 hodinách propláchnuty v 0,1 % Tweenu 20 v PBS. Potom byly oocyty inkubovány při teplotě + 4°C přes noc v inkubačním médiu s primární protilátkou anti-kalcineurin A a anti-kalcineurin B 1:100 (Sigma-Aldrich, Německo). Oocyty byly 3x po 10 minutách promyty v 0,1 % Tweenu 20 v PBS, aby byly odstraněny nenavázané protilátky. Poté se oocyty inkubovaly jednu hodinu ve tmě se sekundární protilátkou anti-myší IgG, konjugovaná s fluorescenčně značeným isothiokyanátem (FITC) 1:30 000 (Jackson Immuno Research Laboratories, USA) a současně byl v oocytu obarven chromatin pomocí Hoechst 33258 (Sigma – Aldrich, Německo). V ekvilibračním pufru byly oocyty promyty a poté přeneseny na podložní sklíčko v kapce glycerolu v PBS. Fluorescenční značení bylo snímáno na pomocí fluorescenčního mikroskopu (Nikon Eclipse E600, Japonsko) a laserovému konfokálnímu mikroskopu (Leica SPE, Německo). Pro kontrolu nespecifické vazby protilátky byly oocyty kultivovány pouze se sekundární protilátkou v kontrolní skupině.

Použité chemikálie:

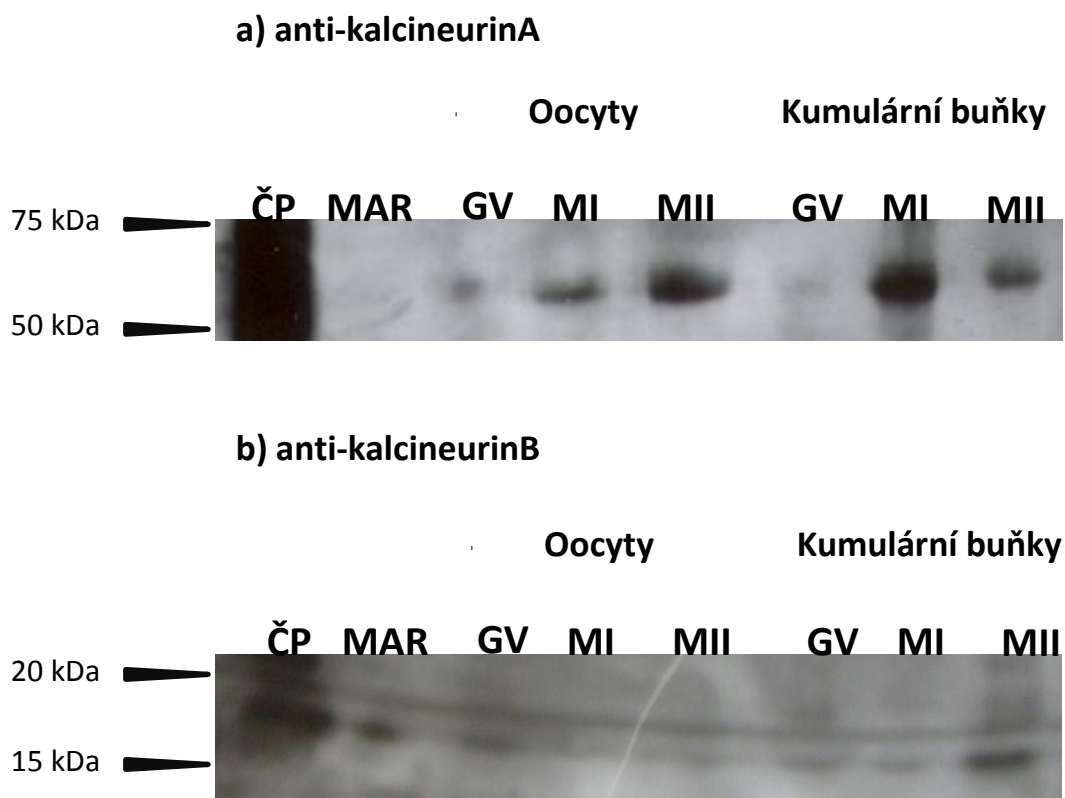
2,5 % paraformaldehyd v PBS	2,5 g paraformaldehydu + 50 ml redestilované H ₂ O
5 % roztok BSA	1 g BSA + 20 ml redestilované H ₂ O
PBS + BSA	1 ml PBS + 20 µl 5 % BSA
PBS + X-100 + BSA	1 ml PBS + 50 µl Triton X-100 + 20 µl 5 % BSA
PBS + Tween 20	1 ml PBS + 10 µl 10 % Tween 20
Inkubační médium	1 ml PBS + 10 µl 10 % Tween 20 + 20 µl 5 % BSA

5 Výsledky

5.1 Stanovení exprese kalcineurinu metodou Western blotting

Metodou western blotting jsme prokázali přítomnost kalcineurinu jak v oocytech, tak i jejich kumulárních buňkách. Kalcineurin jsme detekovali v oocytech ve všech sledovaných stádiích meiotického zrání, stádiu zárodečného váčku, první i druhé meiotické metafáze. Detekovali jsme signál, jak pro kalcineurin A o molekulové hmotnosti 60 kDa, tak také signál pro regulační podjednotku kalcineurinu, podjednotku B, o molekulové hmotnosti 18 kDa. Signál pro kalcineurin B byl oproti signálu kalcineurinu A slabší.

Obr. 5.1 Detekce kalcineurinu A (a) a B (b) pomocí metody Western blott



Obr. 5.1 ČP – čistý protein kalcineurin z hovězího mozku 5 ng. MAR – molekulový standard (Kaleidoscope, BIO-RAD). GV – oocyty kultivované 0 hodin. MII – oocyty kultivované 24 hodin. MII – oocyty kultivované 48 hodin. Kumulární buňky GV – kumulární buňky získané z oocytů ve stádiu GV. Kumulární buňky MI – kumulární buňky odstraněné z oocytů ve stádiu MI. Kumulární buňky MII – kumulární buňky odstraněné z oocytů ve stádiu MII.

5.2 Imunohistochemická lokalizace kalcineurinu

Pomocí imunolokalizace byly sledovány změny v buněčné distribuci proteinu kalcineurinu A a B během meiotického zrání oocyty prasete.

Byla prokázána přítomnost obou podjednotek kalcineurinu, kalcineurinu A i kalcineurinu B. Buněčnou lokalizaci podjednotek kalcineurinu během meiotického zrání, je možné sledovat na obrázku 5.2

Kalcineurin A byl v oocytech přítomen ve všech sledovaných stádiích meiotického zrání, viz obrázek 5.2 (a-c).

Kalcineurin A byl v oocytech rovnoměrně rozptýlen v jádře, korové oblasti i cytoplazmě, jak v oocytech ve stádiu zárodečného váčku, tak také v oocytech ve stádiu první meiotické metafáze viz tabulka 5.2. K významné změně v buněčné lokalizaci proteinu kalcineurinu A došlo při přechodu oocytů ze stádia první do druhé meiotické metafáze. Zvýšila se intenzita fluorescence pro kalcineurin, nejpatrnější nárůst intenzity fluorescence byl v korové oblasti oocytů.

Podobná byla situace při sledování buněčné lokalizace podjednotky kalcineurinu B, viz obrázek 5.2 (a-c). Oocyty ve stádiu zárodečného váčku a první meiotické metafáze měly téměř identický obsah kalcineurinu B vyjádřený intenzitou fluorescence v jádře, korové oblasti a cytoplazmě, viz tabulka 5.3. Při přechodu oocytů z první do druhé meiotické metafáze, došlo podobně jako v případě kalcineurinu A, k nárůstu intenzity fluorescence a to jak v korové oblasti, tak také v oblasti buněčného jádra.

Tab. 5.2 Relativní intenzita fluorescence kalcineurinu A v oocytech prasete během meiotického zrání

N		jádro (x±SEM)	korová oblast (x±SEM)	cytoplazma (x±SEM)
GV	16	0,26 ± 0,06 ^{aA}	0,43 ± 0,07 ^{abB}	0,31 ± 0,03 ^{aC}
MI	15	0,31 ± 0,05 ^{bA}	0,39 ± 0,06 ^{bB}	0,30 ± 0,04 ^{aA}
MII	17	0,67 ± 0,26 ^{cA}	1,18 ± 0,38 ^{cB}	0,75 ± 0,23 ^{bA}

N – počty oocytů ve skupině, x – průměr, SEM – směrodatná odchylka. MI – oocyt ve stádiu první meiotické metafáze, MII – oocyt ve stádiu druhé meiotické metafáze. Významné rozdíly na hladině $p < 0,05$ mezi částmi oocytu (jádro, korová oblast, cytoplazma) v jednotlivých sledovaných kategoriích oocytů (řádky) jsou označeny superskripty A, B, C. Ve vzorcích oocytů ve stádiu MI a MII byla sledována oblast dělicího vřeténka.

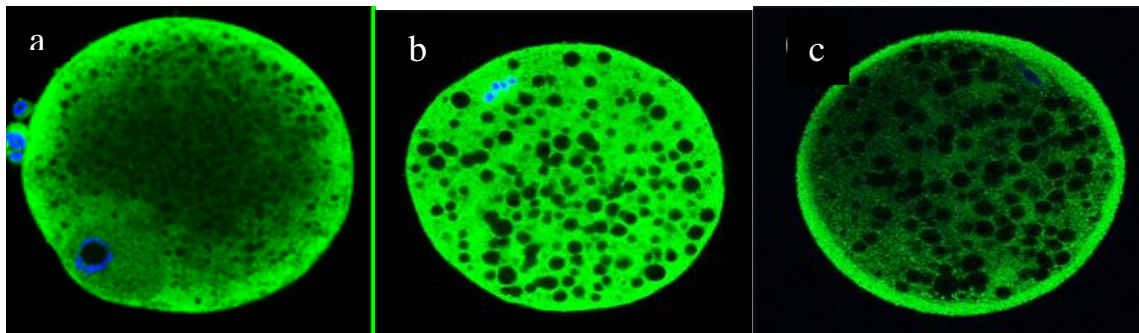
Tab. 5.3 Relativní intenzita fluorescence kalcineurinu B v oocytech prasete během meiotického zrání

N		jádro (x±SEM)	korová oblast (x±SEM)	cytoplazma (x±SEM)
GV	19	0,27 ± 0,05 ^{aA}	0,42 ± 0,08 ^{aB}	0,32 ± 0,03 ^{aAB}
MI	16	0,28 ± 0,03 ^{aA}	0,41 ± 0,04 ^{aB}	0,31 ± 0,02 ^{aA}
MII	19	1,04 ± 0,02 ^{bA}	1,16 ± 0,04 ^{bB}	0,80 ± 0,07 ^{aC}

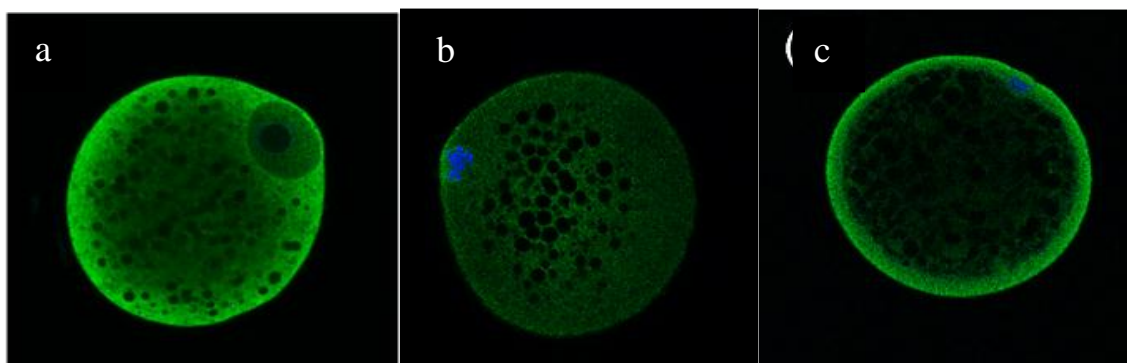
N – počty oocytů ve skupině, x – průměr, SEM – směrodatná odchylka. MI – oocyt ve stádiu první meiotické metafáze, MII – oocyt ve stádiu druhé meiotické metafáze. Významné rozdíly na hladině $p < 0,05$ mezi částmi oocytu (jádro, korová oblast, cytoplazma) v jednotlivých sledovaných kategoriích oocytů (řádky) jsou označeny superskripty A, B, C. Ve vzorcích oocytů ve stádiu MI a MII byla sledována oblast dělicího vřeténka.

Obr. 5.2 Lokalizace kalcineurinu v průběhu zrání oocytu prasete

Kalcineurin A



Kalcineurin B



Detekce kalcineurinu v oocytech ve stádiu zárodečného váčku (GV) (a), ve stádiu první (b) a druhé meiotické metafáze (c) pomocí imunolokalizace s použitím protilátky anti-kalcineurinu. Zelenou fluorescencí je značen protein pomocí FITC a modře chromatin pomocí barviva DAPI. Vzorky byly 400x zvětšeny.

6 Diskuse

Naše experimenty prokázaly přítomnost proteinu kalcineurinu v prasečích oocytech a jejich kumulárních buňkách v průběhu meiotického zrání.

V oocytech ve stádiu zárodečného včaku a první a druhé meiotické metafáze jsme metodou Western blott detekovali přítomnost katalytické podjednotky A kalcineurinu o molekulové hmotnosti 60 kDa a také regulační podjednotky B o molekulové hmotnosti 18 kDa. Denzita bandu pro regulační podjednotku kalcineurinu, kalcineurinu B, byla v oocytech všech sledovaných stádií meiotického zrání poměrně slabá. Při elektroforéze byl do každé jamky nanesen lyzát z 50 oocytů v daném stádiu zrání, v případě regulační podjednotky, kalcineurinu B, je pravděpodobné, že detekční limit námi použité metody, Western blottingu, je pro kalcineurin vyšší a bylo by vhodnější do vzorku použít větší počet oocytů, v ideálním případě minimálně 100 kusů, či by bylo pro další experimenty vhodné využít ECL chemiluminiscenční kit s nižším detekčním limitem či nějaký enhancer chemiluminiscenční reakce. Možným vysvětlením je to, že se v oocytech nevyskytuje podjednotka B v obou izoformách, B1 a B2, ale pouze jedna izoforma, tudíž je menší množství detekovaného proteinu. Což potvrdily i naše další (zde nepublikované) experimenty, ve kterých jsme prokázali v oocytech a jejich obklopujících buňkách pouze přítomnost mRNA pro izoformu B2 podjednotky kalcineurinu B. Western blotting nám bohužel neumožnil sledovat expresi izoform (v případě kalcineurinu A izoformem α , β , γ a v případě kalcineurinu B izoformem B1 a B2), na trhu jsou k dostání pouze protilátky specifické proti podjednotkám, nikoliv izoformám. Důkaz o přítomnosti kalcineurinu v prasečích oocytech, nebyl překvapivý. Tento protein byl už dříve nalezen i v jiných buňkách v těle prasete. Jeho přítomnost byla zjištěna na plazmatické membráně lymfocytů (Chantler et al., 1985) či v kančích pohlavních buňkách, spermích, kde byly detekovány obě podjednotky kalcineurinu (Tash et al., 1988).

Proces zrání oocytů je podmíněn aktivitou MPF, která je tvořena cyklin dependentní kinázou 1 (CDK 1) a cyklinem B1. Výstup z prvního meiotického bloku je umožněn až částečnou inaktivací MPF, ke které může dojít po degradaci cyklinu B pomocí APC/proteazómu nebo navázáním na separázu (Yu et al., 2002). Tyto procesy jsou regulovány působením různých kináz a fosfatáz a dá se předpokládat, že se během zrání tudíž mění lokalizace jedné z fosfatáz, kalcineurinu. Tuto domněnku potvrdily naše experimenty, ve kterých jsme sledovali relativní intenzitu fluorescenčního signálu podjednotek kalcineurinu A a B v průběhu meiotického zrání v oblasti jádra, kůry a cytoplazmy oocytu prasete. V oocytech ve stádiu GV a MI byl kalcineurin A ve sledovaných třech oblastech rovnoměrně rozptýlen. K významné změně v buněčné lokalizaci proteinu kalcineurinu A došlo

až při přechodu oocytů ze stádia první do druhé meiotické metafáze, kdy byl zřejmý především nárůst intenzity fluorescenčního signálu v korové oblasti oocytů. Podobná byla situace v případě sledování změn v buněčné distribuci kalcineurinu B, obsah kalcineurinu B rostl při přechodu oocytů z první do druhé meiotické metafáze. Nárůst v intenzitě fluorescence byl stejně jako v případě podjednotky A patrný v korové oblasti oocytu, další významný nárůst byl sledován však také v oblasti meiotického vřeténka. Změny v buněčné lokalizaci a množství proteinu mohou souviset s potřebou kalcineurinu v oocytu během jeho zrání. V somatických buňkách je kalcineurin spojován s proteiny cytoskeletu (Goto et al., 1985). Námi zaznamenaný výskyt obou podjednotek kalcineurinu v celé cytoplazmě oocytů ve všech fázích meiotického zrání naznačuje také možnou asociaci kalcineurinu s těmito proteiny.

Mochida a Hunt (2007) zjistili, že u žáby rodu *Xenopus* se kalcineurin podílí na uvolnění žabích vajíček z druhého meiotického bloku. Tento blok je udržován pomocí kaskády zahrnující Mos a MAPK. Klíčový regulátor této signální dráhy APC/Fizzy je u žab drápatek cílovým substrátem kalcineurinu. MAPK se na počátku fáze zrání přesunuje do zárodečného váčku (Stojkovic et al., 1999) a vykazuje vysokou aktivitu v průběhu celé fáze zrání (Sun et al., 2001) kde se podílí na zastavení meiózy v druhé meiotické metafázi (Villa-Diaz et Miyano, 2004). Vzhledem k expresi kalcineurinu v oocytu prasete na konci meiotického zrání se lze domnívat, že změna v aktivitě a lokalizaci kalcineurinu může také souviset s regulací výše popsané dráhy.

Naše experimenty potvrdily expresi obou podjednotek kalcineurinu, katalytické podjednotky A i regulační podjednotky B. Zatím není známo, jaká je přesná úloha obou podjednotek a také, zda kalcineurin v prasečích oocytech působí podobně jako v oocytech drápatky, přes dráhu MAPK. K tomu bude třeba provést další experimenty, například kinázové eseje, které dokáží zmapovat aktivitu významných enzymů jako je MAPK či MPF.

Kromě významu kalcineurinu pro meiotické zrání se nabízí otázka, jakou hraje tento protein úlohu v dřívější fázi oogeneze, růstu a také to, zda a jak se podílí na regulaci procesu oplození, aktivaci oocytu, případně stárnutí a apoptózy.

7 Závěr

Naše experimenty prokázaly výskyt proteinu kalcineurinu v oocytu prasete během meiotického zrání. V oocytech v průběhu zrání jsme detekovali katalytickou podjednotku A i regulační podjednotku B kalcineurinu. Imunohistochemické sledování potvrdilo změny v lokalizaci obou podjednotek během meiotického zrání. Významné byly především změny v nárůstu proteinu při přechodu oocytů z první do druhé meiotické metafáze. Změny v množství a buněčné lokalizaci podjednotek kalcineurinu mohou souviset s jeho úlohou v řízení meiotického zrání oocytu prasete.

8 Seznam literatury

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

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

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

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

Bachtrog, D., Charlesworth, B. 2001. Towards a complete sequence of the human Y chromosome. *Genome Biol*. 2(5). 1016.

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

Blaire, G. A., Gauvin, D., Gangal, M., Authier, S. 2005. Nitric oxide, cell signaling and cell death. *Toxicology*. 208. 177-192.

Buccione, R., Schroeder, A. C., Eppig, J. J. 1990. Interactions between Somatic Cells and Germ Cells throughout Mammalian Oogenesis. *Biology of Reproduction*. 43. 543-547.

Cortvrindt, R., Smits, J., Van Steirteghem, A. C. 1997. Assessment of the need for follicle stimulating hormone in early preantral mouse follicle culture in vitro. *Human Reproduction* 12. 759–768.

Eppig, J. J. 2001. Oocyte control of ovarian follicular development and function in mammals. *Reproduction*. 122. 829–838.

Fan, H. Y., Sun, Q. Y. 2004. Involvement of Mitogen-Activated Protein Kinase Cascade During Oocyte Maturation and Fertilization in Mammals. *Biology of Reproduction*. 70. 535–547.

Goudet, G., Belin, F., Bezard, J. and Gerard, N. 1998 Maturation promoting factor (MPF) and mitogen activated protein kinase (MAPK) expression in relation to oocyte competence for in-vitro maturation in the mare *Mol. Hum. Reprod.* 4. 563-570.

Heyting, C. 1996. Synaptonema complexes: structure and function. *Curr Opin Cell Biol.* 8(3):389-396.

Hunter, M. G. 2000. Oocytematuration and ovum quality in pigs. *Reproduction*. 5. 122–130.

Hyttel, P., Fair, T., Avery, B., Callesen, H., Greve, T. 1999 Transcriptional Activity and Ultrastructure in Bovine Oocytes. *Reproduction in Domestic Animals*. 34. (3-4). 247–254.

Chantler, P. D. 1985. Calcium-dependent Association of a Protein Complex with the Lymphocyte Plasma Membrane: Probable Identity with Calmodulin-Calcineurin. *The Journal of cell biology*. 101. 207-216.

Chawengsaksophak, K., Svingen, T., Ng, E. T., Epp, T., Spiller, C. M., Clark, Ch., Cooper, H., Koopman, P. 2011. Loss of Wnt5a disrupts primordial germ cell migration and male sexual development in mice. *Biology of Reproduction*. 111. 095232.

Chouinard, L. A. 1973. Electron-microscope study of the extranucleolar bodies during growth of the oocyte in the prepubertal mouse. *J. Cell Sci.* 12. 55-69.

Inoue, Y., Tsujimoto, Y., Kimura, A. 1998. Expression of the glyoxalase I gene of *Saccharomyces cerevisiae* is regulated by high osmolarity glycerol mitogen-activated protein kinase pathway in osmotic stress response. *J Biol Chem* 273:2977–2983.

Jessus, C., Haccard, O. 2007. Calcium's double punch. *Nature*. 449. 20.

Johnson, J., Bagley, J., Skaznik-Wikiel, M., Lee, H. J., Adams, G.B., Niikura, Y., Tschudy, K. S., Tilly, J. C., Cortes, M. L., Forkert, R., Spitzer, T., Iacomini, J., Scadden, D. T., Tilly, J. L. 2005. Oocyte generation in adult mammalian ovaries by putative germ cells in bone-marrow and peripheral blood. *Cell*. 122(2). 303-15.

Klee, C. B., Crouch, T. H., Krinks, M. H. 1979. Calcineurin: A calcium- and calmodulin-binding protein of the nervous system.

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.

Kupková, Z., Beneš, L. 2004. Chemické vlastnosti, biologické účinky a metody detekce biologického oxidu dusnatého. *Chem. Listy* 98. 116 – 122.

Martínez-Martínez, S., Rodríguez, A., López-Maderuelo, M. D., Ortega-Pérez, I., Vázquez, J., Redondo, J. M. 2006. Blockade of NFAT Activation by the Second Calcineurin Binding Site. *J Biol Chem*. 281. 6227–6235.

Masui, Y. 2001. From oocyte maturation to the in vitro cell cycle: the history of discoveries of Maturation-Promoting Factor (MPF) and Cytostatic Factor (CSF). *Blackwell Wissenschafts-Verlag*. 69. 1–17.

Masui, Y., Clarke, H. J. 1979. Oocyte Maturation. *International Review of cytology*. Pp 182-282.

Mehlmann, L. M. 2005. Stops and starts in mammalian oocytes: recent advances in understanding the regulation of meiotic arrest and oocyte maturation. *Reproduction*. 130. 791-799.

Mochida, S., Hunt, T. 2007. Calcineurin is required to release *Xenopus* egg extracts from meiotic M phase. *Nature*. 449. 336–340.

Molkentin, J. D. 2004. Calcineurin – NFAT signaling regulates the cardiac hypertrophic response in coordination with the MAPKs. *Cardiovascular Research* 63. 467– 475.

Musui, Y. 1991. The Role of “Cytostatic Factor (CSF)” in the Control of Oocyte Cell Cycles: A Summary of 20 Years of Study. *Develop. Growth & Differ.* 33 (6). 543-551.

Murray, A. W. 2004. Recycling the cell cycle: cyclins revisited. *Cell*. 116. 221-34.

Murray, A., Hunt, T. 1993. *The cell cycle*. Oxford University Press. Oxford. UK. 251 s.

Neal, J. W., Clipstone, N. A. 2001. Glycogen Synthase Kinase-3 Inhibits the DNA Binding Activity of NFATc. *J Biol Chem*. 276. 3666–3673.

Nishiyama, T., Yoshizaki, N., Kishimoto, T., Ohsumi, K. 2007. Transient activation of calcineurin is essential to initiate embryonic development in *Xenopus laevis*. *Nature*. 449. 341-345.

Nussbaum, R. I., McIlnes, R. R., Willard, H. F. 2004. In: Thompson and Thompson, Klinická genetika. Triton. ISBN 80-7254-475-6.

Osuchowska, Z. B. 2006. Oogenesis in pig ovaries during the prenatal period: ultrastructure and morphometry. Department of Histology and Embryology. 22.

Petr, J., Chmelikova, E., Dorflerova, A., Jeřeta, M., Kuthanova, Z. 2007. Effects of protein kinase C on parthenogenetic activation of pig oocytes using calcium ionophore or nitric oxide-donor. Czech J. Anim. Sci. 52. (12). 415–422.

Peter, M., Nakagawa, J., Doree, M., Labbe, J. C., Nigg, E.A. 1990. In vitro disassembly of the nuclear lamina and M phase-specific phosphorylation of lamins by cdc2 kinase. Cell. 61. 591-602.

Reynaud, K., Fontbonne, A., Marseloo, N., Thoumire, S., Chebrou, M., Viaris de Lesegno, C., Chastant-Maillard, S. 2005. In vivo meiotic resumption, fertilization and early embryonic development in the bitch. Reproduction and Fertility. ISSN 1470–1626 (paper) 1741–7899 .

Rusnak, F., Mertz, P. 2000. Calcineurin: Form and Function. Physiological Reviews. 80 (4).

Sadler, T., Langmanova, W. 2010. Lékařská biologie. Grada Publishing. 432 s. 1647 ISBN 978-80-247-2640-3.

Sela-Abramovich, S., Endry, I., Galiani, D., Nevo, N., Dekel, N. 2006. Disruption of gap junctional communication within the ovarian follicle induces oocyte maturation. Endocrinology. 147(5). 2280-2286.

Schuh, M., Ellenberg, J. 2007. Self-Organization of MTOCs Replaces Centrosome Function during Acentrosomal Spindle Assembly in Live Mouse Oocytes Gene Expression. European Molecular Biology Laboratory. 06.025.

Schatten, H., Sun, Q. Y. 2011. Centrosome Dynamics During Mammalian Oocyte Maturation With a Focus on Meiotic Spindle Formation. *Molecular Reproduction*. 78. 757–768.

Scherthan, H. 2007. Telomere attachment and clustering during meiosis. *Cell*. 64(2). 117–124.

Sobotková, M., Bartůňková, J. 2008. Antibiotická imunosupresiva. *Remedia*. 18. 233–241.

Stojkovic, M., Motlik, J., Kölle, S., Zakhartchenko, V., Alberio, R., Sinowatz, F., Wolf, E. 1999. Cell-cycle control and oocyte maturation: Review of literature. *Reproduction of Domestic Animal*. 34. 335–342.

Sun, N-L et Li S-J. 2005. Regulation of intracellular Ca^{2+} and calcineurin by NO/PKG in proliferation of vascular smooth muscle cells. *Acta Pharmacologica Sinica*. 26 (3), 323–328.

Sun, Q. Y., Nagai, T. 2003. Molecular Mechanisms Underlying Pig Oocyte Maturation and Fertilization. Accepted for publication. 49. 347–359.

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. 1435–1440

Tan, J. H., Wang, H. L., Sun, X. S., Liu, Y., Sui, H. S., Zhang, J. 2009. Chromatin configurations in the germinal vesicle of mammalian oocytes. *Molecular Human Reproduction*. 15. 1 pp. 1–9.

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

Thomas, F. H., Ethier, J. F., Shimasaki, S., Vanderhyden, B. C. 2005. Follicle-Stimulating Hormone Regulates Oocyte Growth by Modulation of Expression of Oocyte and Granulosa Cell Factors. *Endocrinology*. 146(2). 941–949.

Thomas, R. E., Armstrong, D. T., Gilchrist, R. B. 2002b. Differential effects of specific phosphodiesterase isoenzyme inhibitors on bovine oocyte meiotic maturation. *Dev Biol*. 244(2). 215–225.

Tilly, J. L., Niihara, Y., Rueda, B. R. 2009. The Current Status of Evidence for and Against Postnatal Oogenesis in Mammals. *Biology of Reproduction*. 80. 2–12.

Vacek, Z. 2006. *Embryologie*. Grada Publishing. 256 s. 1633. ISBN: 978-80-247-1267-3.

Villa-Diaz LG, Miyano T. 2004 Activation of p38 MAPK during porcine oocyte maturation. *Biology of Reproduction*. 71. 691–696.

Viveiros, M. M., O'Brien M., Wigglesworth, K., Eppig, J. J. 2003. Characterization of Protein Kinase C- δ in Mouse Oocytes Throughout Meiotic Maturation and Following Egg Activation. *Biology of Reproduction*. 69. 1494–1499.

Wartenberg, H. 1990. Entwicklung der Genitalorgane und Bildung der Gameten. *Humanembryologie*. 745–822.

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

Wassarman, P. M. 2008. Zona pellucida glycoproteins. *The Journal of biological chemistry*. 283. 36 pp. 24285–24289.

Youngand, J. M., McNeilly, A. S. 2010. Theca: the forgotten cell of the ovarian follicle. *Reproduction*. 140 489-504.

Zhang, W., Liu, T. H. 2002. MAPK signal pathways in the regulation of cell proliferation in mammalian cells. *Cell*. 12(1). 9-18.

Zhu, X. Y., Hang, G., Xin, N. 2011. Hydrogen sulfide in the endocrine and reproductive systems. *Expert Review of Clinical Pharmacology*. 75-82(8).

Zima, T., Štern, P. 2002. Signální transdukce (část II.). *Labor Aktuell*.

Zuccotti, M., Merico, V., Cecconi, S., Redi, C. A., Garagna, S. 2011. What does it take to make a developmentally competent mammalian egg? *Hum. Reprod*. 17 (4). 525-540.