



# Charakterystyka zdolności rozwojowej oocytów ssaków w aspekcie zapłodnienia i rozwoju zarodkowego: I. Dojrzałość jądrowa i molekularne aspekty jej regulacji

Jolanta Opiela, Lucyna Kątska-Książkiewicz

Dział Biotechnologii Rozrodu, Immuno- i Cytogenetyki Zwierząt,  
Instytut Zootechniki, Balice

**Characterization of mammalian oocyte competence to undergo fertilization and embryonic development: I. Nuclear maturation and molecular aspects of its regulation**

## Summary

Near the end of the growth phase, mammalian oocyte achieves competence to undergo three aspects of maturation, i.e. nuclear, cytoplasmic and genomic. All these processes are essential for the formation of an egg having the capacity for fertilization and development. This review will consider the aspects of molecular events during the process of nuclear maturation. Meiotic maturation of an oocyte is under the control of the cell cycle molecules, of which cAMP, MPF and MAP kinases seem to be the most important. The present findings regarding Ringo protein and cdc25b kinase as modulators of MPF activity and mechanism of MPF activation are discussed. Moreover, the roles of the FF-MAS, ribosomal S6 kinase p90<sup>rsk</sup>, POLO like kinases and the newly discovered proteins MISS and formin-2 are described.

## Key words:

oocyte, nuclear maturation, MPF, MAP kinases, p90<sup>rsk</sup>, FF-MAS, POLO kinases, MISS, Ringo, Fmn-2, cdc25b.

## Adres do korespondencji

Jolanta Opiela,  
Dział Biotechnologii  
Rozrodu, Immuno-  
i Cytogenetyki Zwierząt,  
Instytut Zootechniki,  
32-083 Balice;  
e-mail: ojola@interia.pl

## 1. Wprowadzenie

Dojrzałość oocytu jest podstawowym czynnikiem decydującym o zdolności do zapłodnienia i prawidłowego rozwoju zarodkowego, a następnie płodowego. Uzyskanie tych zdolności

wymaga osiągnięcia dojrzałości jądrowej, cytoplazmatycznej oraz genomowej. Dojrzałość jądrowa wskazuje na osiągnięcie stadium metafazy drugiego podziału mejozy. Uzyskiwana jest w czasie dojrzewania mejozy, zainicjowanego rozpadem pęcherzyka zarodkowego (GVBD – *germinal vesicle breakdown*) i kontynuowanego do momentu zatrzymania cyklu komórkowego w stadium metafazy drugiego podziału mejozy (MII). Natomiast zdolność oocyty do wznowienia i ukończenia mejozy określana jest mianem kompetencji mejozy. Kompetencja mejozy osiągnięta jest stopniowo, podczas wzrostu oocyty i zależy od jakości morfologicznej oraz stopnia strukturalno-funkcjonalnej dojrzałości cytoplazmy (1).

Dojrzałość cytoplazmatyczna warunkuje zdolność oocyty do zapłodnienia oraz do zapoczątkowania i kontynuacji podziałów mitotycznych zarodka (2). Z kolei dojrzałość genomowa jest równoznaczna z prawidłowym zakończeniem procesów epigenetycznych, towarzyszących nabyciu imprintingu genomu matczynego (3).

## 2. Przebieg mejozy

Dojrzewanie oocytów *in vitro* przebiega w tempie podobnym jak w warunkach *in vivo* (4). W badaniach prowadzonych na oocytach bydłych wykazano, że rozpad pęcherzyka zarodkowego zapoczątkowujący mejozę, tj. GVBD następuje po około 6 godz. od momentu umieszczenia kompleksów oocyt-komórki wzgórka jajonośnego w hodowli (5). Po około 12 godz. hodowli ponad 70% oocytów osiąga stadium metafazy I (4). Najwyższą częstotliwość występowania stadium anafazy I obserwowano między 12 a 14 godz. hodowli, natomiast stadium telofazy I między 15 a 16 godz. hodowli. Pierwsze oocyty w stadium metafazy II (MII) pojawiają się już po 14 godz. hodowli, a po około 18 godz. około 60% oocytów uzyskuje dojrzałość jądrową. Odsetek dojrzałych oocytów wzrasta stopniowo osiągając nawet około 90% po 24 godz. hodowli (4). W stadium MII mejoza zostaje zatrzymana w wyniku działania czynnika cytostatycznego, CSF (*cytostatic factor*) (6,7). Czynniki te stabilizuje aktywność MPF (*M-phase promoting factor; maturation promoting factor*) (6). Stwierdzono, że wiele białek ma aktywność CSF, czyli wykazuje zdolność zablokowania cyklu w stadium MII, a wśród nich kinazy MEK, MAP i p90<sup>rsk</sup>. Wniknięcie plemnika podczas zapłodnienia inaktywuje CSF, czego wynikiem jest destabilizacja MPF, zakończenie mejozy i przejście oocyty z fazy M do interfazy.

### 2.1. Rola cAMP

Mejoza w oocytach większości ssaków rozpoczyna się w czasie rozwoju płodowego lub krótko po urodzeniu osobnika i trwa do momentu osiągnięcia stadium diplotenu profazy pierwszego podziału mejozy. W stadium tym, określanym jako stadium pęcherzyka zarodkowego, GV (*germinal vesicle*), cykl komórkowy oocy-



tu zostaje zatrzymany. U dojrzałej płciowo samicy w trakcie każdego cyklu płciowego jeden lub kilka oocytów, w zależności od gatunku, w odpowiedzi na hormonalny impuls wznowia podział mejotyczny. Impulsem tym jest przedowulacyjny wyrzut hormonu luteotropowego (LH), który indukuje zarówno wznowienie mejozy jak i owulację. W warunkach *in vitro* wznowienie mejozy w oocytach ssaków może nastąpić spontanicznie, w konsekwencji izolacji oocytu z pęcherzyka antralnego, a następnie jego hodowli w odpowiedniej pożywce, bez konieczności stymulacji tego procesu gonadotropinami. Możliwość taka wskazuje równocześnie, że płyn pęcherzykowy oraz komórki pęcherzyka są odpowiedzialne za utrzymanie oocytu w stadium GV, najprawdopodobniej poprzez biosyntezę i sekrecję czynników hamujących mejozę lub inhibicję związków stymulujących mejozę, bądź w wyniku działania obu mechanizmów (8).

Jednym ze związków regulujących cykl komórkowy jest cykliczny adenozymonofosforan (cAMP), którego działanie zostało opisane początkowo w oocytach gryzoni (9,10), a następnie u innych gatunków ssaków, w tym również bydła (8). Wysokie stężenie cAMP aktywuje kinazę białkową A (PKA; *cAMP-dependent protein kinase*). Kinaza PKA fosforyluje dotychczas nie rozpoznane białka, co skutkuje zablokowaniem mejozy w stadium GV. Natomiast za degradację i inaktywację cAMP odpowiedzialne są fosfodiesterazy (PDEs). Obecność PDEs stwierdzono w pęcherzykach jajnikowych wszystkich badanych dotąd gatunków, przy czym w oocycie obecna jest forma PDE3 (8,11), natomiast w komórkach ziarnistych pęcherzyka forma PDE4 (8,12). W wyniku zastosowania inhibitorów PDE3 dochodzi do zatrzymania dojrzewania oocytu, zarówno *in vivo* jak i *in vitro*, co wskazuje na udział tego enzymu w procesie dojrzewania (13,14).

Za syntezę cAMP w oocycie odpowiedzialna jest cyklaza adenylowa (AC). Jednakże, mimo stwierdzenia ekspresji AC, nie znaleziono odpowiedzi na pytanie czy ilość cAMP, która powstaje w oocycie jest wystarczająca dla wywołania bloku mejotycznego. W alternatywnej hipotezie zakłada się, że cAMP dyfunduje z komórek ziarnistych do oocytu poprzez połączenia szczelinowe. Dyfuzja cAMP z komórek ziarnistych do cytoplazmy oocytu wraz z inaktywacją PDE utrzymuje stężenie cAMP na poziomie zapobiegającym wznowieniu mejozy (12). Prawdopodobne jest, jak się wydaje, że aktywność PDE3 reguluje hipoksantyna, naturalny inhibitor wznowienia mejozy (11). W badaniach przeprowadzonych na oocytach szczura wykazano, że PDE3 kontroluje zasoby cAMP w oocycie i jest niezbędny w regulacji GVBD (11). Spadek poziomu cAMP, który prowadzi do wznowienia mejozy, następuje w efekcie działania gonadotropin, na skutek przerwania połączeń międzykomórkowych między oocytom a komórkami ziarnistymi. Stwierdzono jednak, że do zaniku połączeń szczelinowych między oocytom a komórkami ziarnistymi dochodzi dopiero po kilku godzinach od GVBD (15). Ta obserwacja doprowadziła do hipotezy, że komórki ziarniste wydzielają czynniki parakrynnie znoszące hamujące działanie cAMP. Do grupy takich czynników, które *in vitro* znoszą hamujące działanie cAMP, oprócz FSH, należą również naskórkowy czynnik wzrostowy (EGF – *epidermal growth factor*), soma-



totropina (GH – *growth hormone*), oraz czynnik martwicy nowotworów (TNF $\alpha$  – *tumor necrosis factor  $\alpha$* ). Jednakże wymienione czynniki są nieefektywne przy zastosowaniu inhibitorów PDE silniejszych od hipoksantyny lub po uzupełnieniu pożywki dwumaślanem cAMP (dbcAMP – *dibutyryl-cAMP*) (12). W badaniach zmierzających do wykrycia czynnika syntetyzowanego przez komórki ziarniste, który posiadałoby zdolność indukcji dojrzewania mejotycznego, doprowadzono do izolacji MAS (*meiosis-activating sterol*), pochodnej cholesterolu, która jest obecna zarówno w jądrach jak i jajnikach (16). Czynnik FF-MAS (*follicular fluid meiosis-activating sterol*) został wykryty w płynie pęcherzykowym. Wykazano, że stężenie FF-MAS wzrasta pod działaniem gonadotropin (16). W warunkach hodowli *in vitro* FF-MAS znosi blokadę mejozy wywołaną działaniem hipoksantyny, lecz nie jest zdolny do zniesienia bloku mejotycznego wywołanego dodatkiem do pożywki dbcAMP (17). Reasumując, na podstawie analogii do dobrze już rozpoznanych molekularnych mechanizmów kontrolujących wznowienie mejozy u *Xenopus* można założyć, że regulacja tego procesu w oocytach ssaków może przebiegać za pośrednictwem wielu ścieżek przekazywania sygnałów. Ścieżki te mogą regulować poziom cAMP poprzez kontrolę ekspresji PDE3 w oocyty. Spadek stężenia cAMP może być wystarczającym bodźcem dla wznowienia mejozy; jednakże w świetle najnowszych badań należy przypuszczać, że istnieją sygnały, które znoszą hamujące działanie cAMP.

## 2.2. Czynnik dojrzewania mejotycznego MPF i związki modulujące jego aktywność (fosfataza cdc25b, białko Ringo)

Nabywanie kompetencji mejotycznej jest skorelowane ze zmianami w akumulacji i aktywacji białek regulujących cykl komórkowy. Jednym z najistotniejszych jest czynnik dojrzewania mejotycznego (MPF – *M-phase promoting factor; maturation promoting factor*), po raz pierwszy opisany przez Masui i wsp. (1971). Czynnik cytoplazmatyczny MPF powstaje w wyniku połączenia podjednostki katalitycznej p34<sup>cdc2</sup> z podjednostką regulatorową – cykliną B (18). Kompleks MPF jest głównym czynnikiem regulującym przejście z fazy G2 do M w procesie mejozy i mitozy (19).

W trakcie profazy pierwszego podziału mejotycznego MPF pozostaje w stanie nieaktywnym (pre-MPF) w następstwie hamującej fosforylacji treoniny 14 i tyrozyny 15 kinazy p34<sup>cdc2</sup> przez kinazę Myt1 i kinazę Wee1, przy czym ta ostatnia fosforyluje tylko tyrozynę w pozycji 15 Cdc2 (20). Po uwolnieniu oocytu z pęcherzyka w jego cytoplazmie dochodzi do spadku stężenia cAMP oraz do aktywacji MPF. Aktywacja MPF wymaga defosforylacji p34<sup>cdc2</sup>, treoniny w pozycji 14 i tyrozyny w pozycji 15 przez fosfatazę Cdc25b (21), oraz fosforylacji p34<sup>cdc2</sup>, treoniny w pozycji 161 przez kinazę aktywującą CAK (*cyclin-dependent kinase-activating kinase; czyli cdk-activating kinase*) (22,23). Początkowo uważano, że kinaza Cdc25c jest niezbędna dla aktywacji kompleksu p34<sup>cdc2</sup>/cyklina B u kręgowców (22). Następnie stwierdzono, że inaktywacja tej kinazy w oocytach myszy nie powodowała zaburzeń mejo-



zy, a w konsekwencji zaburzeń płodności (24). Natomiast oocyty myszy z inaktywowanym genem *cdc25b* (*cdc25<sup>-/-</sup>*) nie były zdolne do aktywacji MPF, co skutkowało ich bezpłodnością. Zjawisku temu można było przeciwdziałać poprzez mikroiniekcję mRNA *Cdc25b* do oocytów ze znokautowanym genem *cdc25<sup>-/-</sup>*. W eksperymencie tym wykazano, że kinaza *Cdc25b* jest niezbędna dla aktywacji MPF (21). Z kolei w badaniach na oocytach *Xenopus* wykazano, że kinaza *Plx1* (będąca odpowiednikiem kinazy *Plk1* u myszy), należąca do tzw. rodziny kinaz POLO lub PLKs (*polo like kinases*), fosforyluje fosfatazę *Cdc25*, jednak dotychczas nie wyjaśniono czy *Plx1* zapoczątkowuje proces aktywacji *p34<sup>cdc2</sup>* (25). Na uwagę zasługuje również obserwacja, że u *Xenopus* kinaza *Plx1* aktywowana jest wcześniej niż kinaza *p34<sup>cdc2</sup>*, zarówno w trakcie mejozy jak i mitozy (25). Natomiast u myszy stężenie kinazy *Plk1* znacząco wzrasta po zapoczątkowaniu GVBD (26). Trudno jednakże na tej podstawie wnioskować, czy kinaza *Plk1* aktywuje kinazę *Cdc25*, podobnie jak ma to miejsce u *Xenopus*.

Aktywny czynnik MPF odpowiedzialny jest za rozpoczęcie GVBD, kondensację chromosomów i utworzenie wrzeciona kariokinetycznego pierwszego podziału mejotycznego (19). Istnieją jednak sprzeczne doniesienia dotyczące roli MPF w kondensacji chromatyny oocytu. Badając oocyty bydłce Tatemoto i Terada (27) stwierdzili, że *p34<sup>cdc2</sup>* wywiera duży wpływ na kondensację chromatyny, natomiast Kubelka i wsp. (28) uważają, że kondensacja chromatyny następuje bez udziału aktywnego MPF. Rezultaty podobne jak u bydła Kubelka i wsp. (29) uzyskali na oocytach świni. Autorzy ci uważają, że kondensacja chromatyny oraz GVBD mogą wystąpić bez udziału aktywnej kinazy *p34<sup>cdc2</sup>*. Natomiast, wówczas gdy kinaza ta zostanie zablokowana, np. przez butyrolakton I, dla wystąpienia GVBD jest niezbędna zwiększona aktywność kinazy MAP (29).

W przeciwieństwie do oocytów myszy czy szczura, GVBD w oocytach owcy, krowy i kozy wymaga obecności nowo syntetyzowanych białek (1). Oocyty bydłce niezdolne do wznowienia mejozy pozostają w stadium GV, ponieważ nie dysponują odpowiednią ilością cykliny B (30). Również w badaniach przeprowadzonych na oocytach świńskich wykazano, że wznowienie dojrzewania mejotycznego wymaga działania kaskady aktywującej kinazę *p34<sup>cdc2</sup>* w oocytach, które już zgromadziły cyklinę B (31). Natomiast w oocytach myszy, zarówno mejotycznie kompetentnych jak i niekompetentnych, stężenie cykliny B jest około 7-krotnie większe od stężenia kinazy *p34<sup>cdc2</sup>* (32). Stężenie kinazy *p34<sup>cdc2</sup>* i cykliny B wzrasta w trakcie dojrzewania oocytu. Ponadto wykazano, że w mejotycznie kompetentnych jak i niekompetentnych oocytach mysich stężenie kinaz *cdc25* i *wee1* jest wyższe od stężenia *p34<sup>cdc2</sup>*. W badaniach tych wskazuje się, że czynnikiem limitującym tempo nabywania kompetencji mejotycznej jest nagromadzenie kinazy *p34<sup>cdc2</sup>* (32).

Wraz z progresją dojrzewania jądrowego oocytu następują zmiany w aktywności MPF. Od momentu GVBD aktywność MPF stopniowo narasta. Po osiągnięciu wartości maksymalnej w metafazie I aktywność MPF maleje, co pozwala na kontynuację mejozy do stadium anafazy I. Po wyrzuceniu pierwszego ciała kierunkowego aktywność MPF ponownie wzrasta aż do momentu osiągnięcia przez komórkę stadium



metafazy II. Kolejny spadek aktywności MPF obserwowano w oocytach bydłych po 30 do 40 h od rozpoczęcia dojrzewania *in vitro* (33), co tłumaczy łatwość spontanicznej aktywacji starzejących się komórek jajowych. Inaktywacja MPF następuje w wyniku partenogenetycznej aktywacji lub zapłodnienia komórki jajowej (33).

Do roli modulatora aktywności MPF pretenduje białko Ringo/Speedy, po raz pierwszy zidentyfikowane i scharakteryzowane u *Xenopus* (34). Nadekspresja Ringo w oocytach *Xenopus* aktywowała MPF i kinazę MAP (*mitogen activated protein kinase*). Natomiast w badaniach przeprowadzonych przez Terret i wsp. (35) na oocytach myszy wskazuje się, że Ringo uczestniczy w dojrzewaniu mejotycznym poprzez interakcje z kinazą p34<sup>cdc2</sup>, a nie poprzez aktywację ścieżki aktywującej kinazę MAP. Iniekcja Ringo do cytoplazmy oocytu myszy *Mos*<sup>-/-</sup> blokowała wyrzucenie ciała kierunkowego zarówno w pierwszym jak i w drugim podziale mejotycznym (35), natomiast iniekcja *Mos* nie miała wpływu na wyrzut pierwszego ciała kierunkowego (36). Obserwacje te dowodzą, że Ringo uczestniczy w regulacji dojrzewania mejotycznego oocytów myszy, aktywując ścieżki inne niż *Mos*/.../MAPK. Białko Ringo jest najprawdopodobniej modulatorem aktywności MPF w krytycznych momentach dojrzewania mejotycznego, tj. podczas wejścia w fazę M oraz wyjścia z tej fazy, podczas I i II podziału mejotycznego. Białko Ringo, inicjując wzrost aktywności MPF przed wystąpieniem GVBD, uczestniczy w procesie wznowienia mejozy, a następnie w utrzymaniu wysokiego poziomu aktywności kompleksu MPF w stadium MII (37).

### 2.3. Kinazy MAP i kinaza rybosomowego białka S6, p90rsk

Kolejne białka kontrolujące dojrzewanie oocytu należą do rodziny kinaz MAP (*mitogen activated protein kinase*). Są to serynowo-treoninowe kinazy białkowe, które biorą udział w przekazywaniu sygnału od błony komórkowej do wnętrza komórki. Kinazy MAP mogą przemieszczać się z cytoplazmy do jądra komórkowego, gdzie fosforylują czynniki transkrypcyjne, wpływając tym samym na ekspresję genów (37). Spośród kinaz MAP najlepiej scharakteryzowane są kinazy ERK (*extracellular regulated protein kinase*), p42-ERK2 i p44-ERK1 określane również jako p<sup>44</sup>MAPK1 i p<sup>42</sup>MAPK2 (38). Aktywacja i regulacja aktywności tych kinaz następuje poprzez zewnątrzkomórkowe sygnały, takie jak czynniki wzrostu i neurotransmitery. Aktywacja kinaz MAP zachodzi w wyniku fosforylacji treoniny i tyrozyny przez kinazę kinazy MAP czyli MAPKK lub MEK (*MAP kinase kinase*) (39). Z kolei aktywacja kinazy MEK może następować pod wpływem specyficznych enzymów jak c-ras, c-raf lub c-mos należących do rodziny kinaz kinazy MAP (MAPKKK) (40,41). W oocytach myszy kinaza MEK aktywowana jest przez kinazę *Mos*, natomiast u myszy *Mos*<sup>-/-</sup> kinaza Raf1 nie aktywizuje ścieżki MEK/MAPK (36).

Dotychczasowa znajomość funkcji kinaz MAP w oocytach zwierząt domowych jest znacznie skromniejsza w porównaniu do znajomości tych procesów u *Xenopus* czy myszy. Dotyczy to zwłaszcza znajomości sposobu w jaki regulują one dojrzewa-



nie mejotyczne. Wiadomo, że kinaza MAP odpowiedzialna jest za utrzymanie chromatyny oocytu w stanie skondensowanym w trakcie przejścia MI/MII czyli w okresie kiedy MPF ulega inaktywacji (36). Również polimeryzacja i depolimeryzacja mikrotubul wrzeciona, przemieszczanie się wrzeciona oraz kondensacja chromatyny oocytów wymagają aktywności kinaz MAP. Inaktywacja kinazy MAP w trakcie przejścia MI/MII hamuje segregację chromosomów, wyrzucenie pierwszego ciała kierunkowego oraz utworzenie wrzeciona podziałowego drugiego podziału mejotycznego (42). Ponadto, aktywność kaskady Mos/.../kinaza MAP jest konieczna dla zablokowania dojrzewających oocytów w stadium MII.

Fizjologicznym substratem kinazy MAP, najlepiej dotychczas poznanym i obecnym w oocytach zarówno *Xenopus*, jak i myszy oraz świni, jest kinaza rybosomowego białka S6, p90<sup>rsk</sup> (43-45). W oocytach *Xenopus* kinaza ta, aktywowana przez kinazę MAP, powoduje unieczynnienie kinazy Myt1. Z kolei zniesienie hamującego wpływu Myt1 prowadzi do aktywacji MPF (43). W oocytach myszy i świni stwierdzono, że częściowa aktywacja kinazy p90<sup>rsk</sup> następuje niezależnie od kinazy MAP, na krótko przed wystąpieniem GVBD, natomiast jej całkowita aktywacja, następująca po rozpadzie pęcherzyka zarodkowego, jest zależna od kinazy MAP (44,45). Dyskusyjna jest konieczność kaskady kinaz MAP dla wznowienia mejozy w oocytach zwierząt domowych. Obecnie przeważa pogląd, że nie jest ona konieczna dla wznowienia mejozy w oocytach ssaków (46-48). W oocytach bydłych aktywacja kinazy MAP następuje równocześnie z aktywacją MPF, czyli w trakcie GVBD (49). Jednakże wznowienie mejozy oraz jej kontynuacja może nastąpić w oocytach bydłych bez aktywacji kinazy MAP (46). Możliwe, że kaskada MEK/MAPK/ p90<sup>rsk</sup> jest potrzebna podczas wznowienia mejozy w oocytach kłaczy, gdyż aktywację kinazy MAP obserwuje się przed wystąpieniem GVBD (50). Natomiast w oocytach kozy aktywacja kinazy MAP następuje po wystąpieniu GVBD (51). Z kolei w badaniach przeprowadzanych na oocytach świńskich wykazano, że kinaza MAP aktywowana jest, podobnie jak u bydła, jednocześnie z MPF w trakcie GVBD, lecz aktywacja MPF i wznowienie mejozy może nastąpić bez jej udziału (47,48). Natomiast Fan i wsp. (45) uważają, że aktywność kaskady MEK/MAPK/p90<sup>rsk</sup> jest niezbędna dla wznowienia wzbudzonej gonadotropinami mejozy w kompleksach oocyt-komórki wzgórka jajonośnego świni. Według tych autorów spontaniczne wznowienie mejozy w oocytach pozbawionych komórek wzgórka nie wymaga aktywności MAPK/p90<sup>rsk</sup> (45). Wysoki poziom aktywności kinazy p90<sup>rsk</sup> w dojrzewających oocytach świni wspomaga formowanie wrzeciona podziałowego, akumulację cykliny B oraz zatrzymanie mejozy w stadium metafazy II. W badaniach porównujących rozmieszczenie oraz stężenie ERK1 i ERK2 oraz p90<sup>rsk</sup> dowiedziono, że kinaza p90<sup>rsk</sup> jest mediatorem działania kinazy MAP w dojrzewaniu mejotycznym oocytów tego gatunku (45).

W czasie GVBD wzrośnięciu aktywności czynnika MPF towarzyszy aktywacja obydwu kinaz MAP, tj. p42-ERK2 i p44-ERK1, następnie ulegają one stopniowej fosforylacji, a pełna fosforylacja następuje w momencie, gdy mejoza osiąga stadium MII (52). W przeciwieństwie do MPF, którego aktywność maleje między dwoma mejo-



tycznymi metafazami, aktywność kinazy MAP utrzymuje się w czasie całego procesu mejozy (52). Inaktywacja kinazy MAP następuje, podobnie jak MPF, po partenogenetycznej aktywacji lub zapłodnieniu komórki jajowej (52).

#### **2.4. Rola kinaz MAP, Polo, białek Formin-2 i MISS w tworzeniu i migracji wrzeciona podziałowego**

Dla właściwego przebiegu dojrzewania mejotycznego konieczne jest utworzenie morfologicznie i fizjologicznie prawidłowego wrzeciona podziałowego. W trakcie mejozy polimeryzacja i depolimeryzacja mikrotubul wrzeciona oraz przemieszczanie się wrzeciona koreluje z aktywnością kaskady Mos/.../kinaza MAP (36,42,53). W pierwszych obserwacjach przeprowadzonych na drożdżach *Saccharomyces cerevisiae* wykazano, że w następstwie zablokowania genu kodującego kinazę Plk nie następuje utworzenie mejotycznego wrzeciona podziałowego (54). W oocytach myszy kinaza Plk1 jest już obecna w stadium GV, ale jej stężenie znacząco wzrasta po 5 do 8 godz. od GVBD. Wzrost stężenia Plk1 koreluje z początkiem formowania, a następnie migracji wrzeciona podziałowego w kierunku powierzchni oocytu (26). W obserwacjach tych wskazuje się, że kinazy POLO biorą udział w formowaniu wrzeciona podziałowego.

Za prawidłową migrację wrzeciona podziałowego do strefy podkorowej oprócz kinaz MAP odpowiedzialne jest również niedawno zidentyfikowane (55) białko formin-2 (Fmn2). Myszy ze znokautowanym genem Fmn2 (Fmn2<sup>-/-</sup>) owulowały oocyty w stadium metafazy I. Zjawisku temu przeciwdziałała mikroiniekcja mRNA Fmn2 do oocytu (55). Wrzeciono podziałowe w oocytach myszy Fmn2<sup>-/-</sup> zlokalizowane było centralnie, co uniemożliwiało wyrzucenie pierwszego ciała kierunkowego. W rezultacie zapłodnienia takich oocytów dochodziło do powstania triploidalnych i pentaploidalnych zarodków, które następnie ulegały resorpcji bądź poronieniu (55). Dowiedziono zatem, że białko Fmn2 jest konieczne dla acentrycznego umiejscowienia wrzeciona podziałowego w oocytach oraz, że Fmn-2 jest pierwszym zidentyfikowanym genem odpowiedzialnym za polaryzację oocytów ssaków (55,56).

Wcześniej wspomniano już, że aktywność kaskady Mos/.../kinaza MAP jest konieczna dla zablokowania dojrzewających oocytów w stadium MII. Zastanawia fakt, że pomimo aktywności tej kaskady nie dochodzi do zatrzymania mejozy w stadium MI, tak jak to ma miejsce w MII. Prawdopodobnie decyduje o tym niedawno wykryte w oocytach myszy białko MISS (MAP – *kinase-interacting and spindle-stabilizing protein*), które jest odpowiedzialne za utrzymanie integralności wrzeciona podziałowego MII w trakcie bloku mejozy wywołanego aktywnością cytostatyczną (57). Stwierdzono, że białko MISS jest stabilne tylko w czasie MII oraz, że jest fosforylowane poprzez ścieżkę Mos/.../kinaza MAP. Natomiast w czasie MI ulega degradacji w wyniku działania innej ścieżki, niezależnej od Mos. W doświadczeniu tym wskazuje się, że



kaskada Mos/.../kinaza MAP w stadium MII stabilizuje nie tylko czynnik MPF, ale również wrzeczono II podziału mejotycznego (57).

### 3. Zależność kompetencji mejotycznej oocytu od wielkości pęcherzyka jajnikowego i dojrzałości płciowej samicy

Do momentu utworzenia jamki pęcherzyka (antrum) oocyt, będący w stadium diplotenu pierwszego podziału mejotycznego, intensywnie zwiększa swoją objętość. W tym czasie wzrost oocytu i pęcherzyka przebiega równolegle. Po uformowaniu jamki wzrost oocytu przebiega znacznie wolniej niż wzrost pęcherzyka. W analizie kompetencji mejotycznej oocytów, które nie osiągnęły jeszcze pełnego wzrostu wykazano, że mogą one po uwolnieniu z pęcherzyka wznowić proces mejozy, jednakże nie zostanie on ukończony czyli oocyt nie osiągnie stadium MII. Mimo że w oocytach izolowanych z małych pęcherzyków antralnych następuje GVBD, to jednak proces mejozy ulega zablokowaniu, najczęściej w stadium MI. Na tej podstawie uznano, że dla uzyskania zdolności rozwojowej, a zatem także dojrzałości mejotycznej, konieczny jest rozwój oocytu w środowisku pęcherzyka antralnego, przynajmniej do czasu ukończenia fazy wzrostu (58). Oocyty bydlęce i świńskie kontynuują wzrost w pęcherzykach, które już utworzyły antrum, toteż oocyty pochodzące z pęcherzyków antralnych różniących się wielkością wykazują zróżnicowanie kompetencji mejotycznej (59). Dojrzałość mejotyczna jest zatem ściśle związana z wielkością oocytu, która z kolei jest uwarunkowana wielkością pęcherzyka (60). Stwierdzono, że oocyty bydlęce (także świńskie i kozie) o średnicy 100  $\mu\text{m}$  są już zdolne do wznowienia mejozy, a oocyty o średnicy 110  $\mu\text{m}$  są zdolne do ukończenia dojrzewania jądrowego w stadium MII. Natomiast oocyty bydlęce o średnicy <95  $\mu\text{m}$  nie są zdolne do wznowienia mejozy *in vitro* (61).

Kolejnym czynnikiem decydującym o kompetencji mejotycznej jest dojrzałość płciowa samicy. W badaniach porównawczych na oocytach dojrzałych i niedojrzałych płciowo zwierząt wykazano, że oocyty uzyskane z jajników dojrzałych płciowo krów cechuje większa zdolność rozwojowa w porównaniu do oocytów cieląt. Przyczynę tego stanu upatruje się w nieprawidłowościach podczas uzyskiwania dojrzałości jądrowej i cytoplazmatycznej oocytów zwierząt niedojrzałych płciowo (62). Ledda i wsp., (63) wykazali, że oocyty jagniąt cechuje znacznie niższy poziom aktywności MPF w porównaniu do oocytów uzyskanych od owiec. Podobne badania przeprowadzono na oocytach bydlęcych porównując aktywność MPF i kinazy MAP. Zarówno aktywność MPF jak i kinazy MAP była istotnie mniejsza w oocytach cieląt w wieku poniżej 6 miesięcy (64). W badaniach Chohan i wsp. (65) nad zdolnością bydlęcych oocytów płodowych do wznowienia mejozy i jej kontynuacji do stadium MII wykazano, że nabycie dojrzałości jądrowej uzależnione jest od konfiguracji chromatyny, czyli od podstadium GV, w którym znajdują się oocyty w momencie izolacji z pęcherzyka. Oocyty, które wznowiały mejozę oraz osiągały stadium MII *in vitro*,



w momencie izolacji posiadały wysoce skondensowaną chromatynę. Cechę tę wykazywało 94% oocytów bydłych, ale tylko 27% oocytów płodowych. Powodem niewielkiego odsetka kompetentnych oocytów płodowych był brak odpowiedniej kondensacji chromatyny w momencie rozpoczęcia dojrzewania *in vitro* (65).

#### 4. Podsumowanie

Poznanie molekularnych podstaw procesu dojrzewania oocytów poprzez identyfikację czynników biorących w nim udział, określenie ich funkcji oraz wzajemnych zależności pomiędzy poszczególnymi elementami kaskad pomoże w optymalizacji warunków hodowli *in vitro*. Optymalizacja metod dojrzewania oocytów *in vitro*, prowadzących do uzyskiwania gamet żeńskich o potencjale porównywalnym z komórkami dojrzewającymi w warunkach *in vivo*, znacznie zwiększyłaby możliwości dalszego rozwoju szeregu metod biotechnologii rozrodu, tj. pozaustrojowej produkcji zarodków, klonowania ssaków czy uzyskiwania zwierząt transgenicznych.

Praca finansowana ze środków KBN nr grantu: PZB-KBN-084/P06/2002/4.4.

#### Literatura:

1. Kubiak J. Z., Szollosi M. S., (1994), *Ultrastuktura i funkcja komórki*, t. 6 – Oogeneza, red. Biliński S., Bielańska-Osuchowska Z., Kawiak J., Przełęcka A., 217-247, PWN, Warszawa.
2. Buccione R., Schroeder A. C., Eppig J. J., (1990), *Biol. Reprod.*, 43, 543-547.
3. Cecconi S., (2002), *J. Reprod. Dev.*, 48, 431-445.
4. Kątska L., (1984), *Roczniki Naukowe Zootechniki, Monografie i Rozprawy*, 23, 83-116.
5. Motlik J., Koefoed-Johnsen H. H., Fulka J., (1978), *J. Exp. Zool.*, 205, 377-383.
6. Masui Y., Markert C. L., (1971), *J. Exp. Zool.*, 177, 129-145.
7. Maller J. L., Schwab M. S., Gross S. D., Taieb F. E., Roberts B. T., Tunquist B. J., (2002), *Mol. Cell Endocrinol.*, 187, 173-178.
8. Thomas R. E., Armstrong D. T., Gilchrist R. B., (2002), *Dev. Biol.*, 244, 215-225.
9. Dekel N., Beers W. H., (1980), *Dev. Biol.*, 75, 247-254.
10. Downs S. M., Daniel S. A. J., Bornslaeger E. A., Hoppe P. C., Eppig J. J., (1989), *Gamete Res.*, 23, 323-334.
11. Shitsukawa K., Andersen C. B., Richard F. J., Horner A. K., Wiersma A., van Duin M., Conti M., (2001), *Biol. Reprod.*, 65, 188-196.
12. Conti M., Andersen C. B., Richard F., Mehats C., Chun S. Y., Horner K., Jin C., Tsafirri A., (2002), *Mol. Cell Endocrinol.*, 187, 153-159.
13. Wiersma A., Hirsch B., Tsafirri A., Hanssen R. G., van de Kant M., Kloosterboer H. J., Conti M., Hsueh A. J., (1998), *J. Clin. Invest.*, 102, 532-537.
14. Jensen J., Schwino K., Hazzard T., Zelinski-Wooten M., Conti M., Stouffer R., (2000), *Annual Meeting of the Society for the Study of Reproduction*, 272.
15. Eppig J. J., (1982), *Dev. Biol.*, 89, 268-272.
16. Byskov A. G., Andersen C. Y., Nordholm L., Thogersen H., Guoliang X., Wassmann O., Andersen J. V., Guddal E., Roed T., (1995), *Nature*, 374, 559-562.



17. Coticchio G., Cecconi S., Borini A., Grondahl C., Rossi G., Macchiarelli G., Griffin AM., Fleming S. D., (2003), *Reproduction*, abstract series no. 30, 37.
18. Solomon M. J., Glotzer M., Lee T. H., Philippe M., Kirschner M. W., (1990), *Cell*, 1990, 63, 1013-1024.
19. Choi T., Aoki F., Mori M., Yamashita M., Nagahama Y., Kohmoto K., (1991), *Development*, 113, 789-795.
20. Mueller P. R., Coleman T. R., Kumagai A., Dunphy W. G., (1995), *Science*, 270, 86-90.
21. Lincoln A. J., Wickramasinghe D., Stein P., Schultz R. M., Palko M. E., de Miguel M. P., Tessarollo L., Donovan P. J., (2002), *Nat. Genet.*, 30, 446-449.
22. Mitra J., Schultz R. M., (1996), *J. Cell Sci.*, 109, 2407-2414.
23. Yamashita M., Mita K., Yoshida N., Kondo T., (2000), *Prog. Cell Cycle Res.*, 4, 115-129.
24. Chen M. S., Hurov J., White L. S., Woodford-Thomas T., Piwnica-Worms H., (2001), *Mol. Cell Biol.*, 21, 3853-3861.
25. Qian Y-W., Erikson E., Li C., Maller J., (1998), *Mol. Cell Biol.*, 18, 4262-4271.
26. Wianny F., Tavares A., Evans M. J., Glover D. M., Zernicka-Goetz M., (1998), *Chromosoma*, 107, 430-439.
27. Tatemoto H., Terada T., (1998), *Theriogenology*, 49, 1007-1020.
28. Kubelka M., Motlik J., Schultz R. M., Pavlok A., (2000), *Biol. Reprod.*, 62, 292-302.
29. Kubelka M., Anger M., Kalous J., Schultz R. M., Motlik J., (2002), *Mol. Reprod. Dev.*, 63, 110-118.
30. Levesque J. T., Sirard M. A., (1996), *Biol. Reprod.*, 55, 1427-1436.
31. Kanayama N., Miyano T., Lee J., (2002), *Zygote*, 10, 261-270.
32. Kanatsu-Shinohara M., Schultz R. M., Kopf G. S., (2000), *Biol. Reprod.*, 63, 1610-1616.
33. Wu B., Ignatz G., Currie W. B., Yang X., (1997), *Biol. Reprod.*, 56, 253-259.
34. Ferby I., Blazquez M., Palmer A., Eritja R., Nebreda A. R., (1999), *Genes Dev.*, 13, 2177-2189.
35. Terret M. E., Ferby I., Nebreda A. R., Verlhac M. H., (2001), *Biol. Cell*, 93, 89-97.
36. Verlhac M-H., Kubiak J. Z., Weber M., Geraud G., Colledge W. H., Evans M. J., Maro B., (1996), *Development*, 122, 815-822.
37. Denhardt D. T., (1999), *Molecular basis of cell cycle and growth control*, Eds. Stein G. S., Baserga R., Giordano A., Denhardt D. T., 225-304, Wiley-Liss, New York.
38. Cobb M. H., Boulton T. G., Robbins D. J., (1991), *Cell Regul.*, 2, 965-978.
39. Seger R., Ahn N. G., Posada J., Munar E. S., Jensen A. M., Cooper J. A., Cobb M. H., Krebs E. G., (1992), *J. Biol. Chem.*, 267, 14373-14381.
40. Pelech S. L., Sanghera J. S., (1992), *Science*, 257, 1355-1356.
41. Ferrel J. E. Jr., (1996), *Curr. Topics in Dev. Biol.*, 33, 1-60.
42. Lee J., Miyano T., Moor R. M., (2000), *Zygote*, 8, 119-125.
43. Palmer A., Gavin A. C., Nebreda A. R., (1998), *EMBO J.*, 17, 5037-5047.
44. Kalab P., Kubiak J. Z., Vehrlac M. H., Colledge W. H., Maro B., (1996), *Development*, 122, 1957-1964.
45. Fan H. Y., Tong C., Lian L., Li S. W., Gao W. X., Cheng Y., Chen D. Y., Schatten H., Sun Q. Y., (2003), *Biol. Reprod.*, 68, 968-977.
46. Gordo A. C., He C. L., Smith S., Fissore R. A., (2001), *Mol. Reprod. Dev.*, 59, 106-114.
47. Ohashi S., Naito K., Sugiura K., Iwamori N., Goto S., Naruoka H., Tojo H., (2003), *Biol. Reprod.*, 68, 604-609.
48. Ye J., Flint A. P., Luck M. R., Campbell K. H. S., (2003), *Reproduction*, 125, 645-656.
49. Meinecke B., Janas U., Podhajsky E., Meinecke-Tillmann S., (2001), *Reprod. Domest. Anim.*, 36, 183-188.
50. Goudet G., Bezaud J., Belin F., Duchamp G., Palmer E., Gerard N., (1998), *Biol. Reprod.*, 59, 456-462.
51. Dedieu T., Gall L., Crozet N., Sevellec C., Ruffini S., (1996), *Mol. Reprod. Dev.*, 45, 351-358.
52. Motlik J., Pavlok A., Kubelka M., Kalous J., Kalab P., (1998), *Theriogenology*, 49, 461-469.
53. Verlhac M-H., Lefebvre C., Guillaud P., Rassiniere P., Maro B., (2000), *Curr. Biol.*, 10, 1303-1306.
54. Sharon G., Simchem G., (1990), *Genetics*, 125, 475-485.
55. Leader B., Lim H., Carabatsos M. J., Harrington A., Ecsedy J., Pellman D., Maas R., Leder F., (2002), *Nat. Cell Biol.*, 4, 921-928.
56. Maro B., Verlhac M. H., (2002), *Nat. Cell Biol.*, 4, E281-283.



57. Lefebvre C., Terret M. E., Djiane A., Rassinier D., Maro B., Verlhac M. H., (2002), *J. Cell Biol.*, 157, 603-613.
58. Eppig J. J., (2001), *Reproduction*, 122, 829-838.
59. Hytell P., Fair T., Callesen H., Greve T., (1997), *Theriogenology*, 47, 23-32.
60. Armstrong D. T., (2001), *Theriogenology*, 55, 1303-1322.
61. Otoi T., Yamamoto K., Koyama N., Tachikawa S., Suzuki T., (1997), *Theriogenology*, 48, 769-774.
62. Gandolfi F., Milanesi E., Pocar P., Luciano A. M., Brevini T. A. L., Aocelia A., Lauria F., Armstrong D. T., (1998), *Mol. Reprod. Dev.*, 49, 168-175.
63. Ledda S., Bogliolo L., Leoni G., Naitana S., (2001), *Biol. Reprod.*, 65, 247-252.
64. Salamone D. F., Damiani P., Fissore R. A., Robl J. M., DUBY R. T., (2001), *Biol. Reprod.*, 64, 1761-1768.
65. Chohan K. R., Hunter A. G., (2003), *Anim. Reprod. Sci.*, 76, 43-51.