

Białka regulujące proces dojrzewania oocytów u ssaków^{*)}

MONIKA ŚWIERCZEWSKA*, KATARZYNA ZAORSKA*,
BARTOSZ KEMPISTY**, MICHAŁ NOWICKI*

*Katedra i Zakład Histologii i Embriologii, **Katedra i Zakład Anatomii Prawidłowej
Wydziału Lekarskiego II UM im. K. Marcinkowskiego, ul. Święcickiego 6, 60-781 Poznań

Świerczewska M., Zaorska K., Kempisty B., Nowicki M.
Proteins regulating the maturation of oocytes in mammals

Summary

In this review, the molecular aspects of meiotic division and characteristics of proteins involved in mammalian oocytes maturation have been presented. Moreover, the role of competition has also been shown. The mammalian oocyte's maturation is divided into: (i) nuclear maturation; (ii) cytoplasmic maturation; and (iii) genomic maturation. The maturation processes involves the stages associated with stored proteins and mRNA as well as the inherited changes in genomic DNA methylation. The proper procedure of all stages of maturation influences the achievement by oocytes of full developmental competence and fertilization ability. Both of these processes are associated with attaining by the embryos the ability of growth and development following embryonic genome activation (EGA). The stages of oocyte's maturation are regulated by the expression of specific genes encoding proteins that are expressed during early folliculo-, and oogenesis, and is species dependent. The most important proteins regulating the process of oocytes maturation involves the following: transforming growth factor of the large super family group (TGF), connexins (Cx), mitogen activated protein kinase (MAPK), protein kinase A (PKA) and epidermal growth factor (EGF).

Keywords: maturation of oocytes, gap junctions, connexins, ligand kit, transforming growth factor beta

Warunkiem prawidłowego zapłodnienia, rozwoju zarodka jest dojrzałość oocytów, która dzieli się na dojrzałość: jądrową, cytoplazmatyczną oraz genomową (19, 23, 33, 38). Dojrzałość jądrowa oocyty determinuje prawidłowy przebieg podziału mejotycznego, który kończy się osiągnięciem metafazy II (MII). Na dojrzałość cytoplazmatyczną składają się zmiany w cytoplazmie oocyty dotyczące gromadzenia substancji, takich jak: mRNA oraz białka, konieczne do zapłodnienia i kontynuowania podziałów mitotycznych zarodka. Dojrzałość genomowa dotyczy procesów epigenetycznych, w tym prawidłowego znakowania (imprintingu) genomu matczynego. Modyfikacje epigenetyczne zachodzą w okresie wzrostu oocyty i prowadzą do zmian w ekspresji genów, bez równoczesnej zmiany w sekwencji DNA (23, 33). Należą do nich: metylacja DNA i modyfikacje białek histonowych (acetylacja, fosforylacja, metylacja, ubikwitynizacja). Wykazano, że genom ojcowski warunkuje wczesny rozwój łożyska, natomiast matczyne odpowiedzialny jest za rozwój zarodka, co sugeruje różny udział genomów matczyne i ojcowskie. Zjawisko imprintin-

gu (piętnowania) jest podstawą zróżnicowania ekspresji dla pewnej puli genów rodzicielskich w powstającym organizmie (33).

U większości ssaków mejoza oocytów inicjowana jest w trakcie rozwoju płodowego, a następnie wstrzymana w diplotenie profazy pierwszego podziału mejotycznego, co określane jest jako pierwotne zahamowanie mejozy (primary meiotic arrest). W tym stadium oocyty utrzymywane są przez kilka tygodni, a czasem kilka lat, w zależności od gatunku. W okresie dojrzewania płciowego oocyty, które osiągnęły swoje pełne rozmiary, nabywają kompetencję umożliwiającą kontynuowanie podziału mejotycznego do stadium metafazy II (25). Podczas trwania tego stadium dochodzi do kolejnego zahamowania mejozy (secondary meiotic arrest). Zakończenie mejozy II zachodzi jedynie w momencie zapłodnienia dojrzałej komórki jajowej (35). *In vivo* podtrzymywanie bloku mejotycznego w pełni dojrzałych oocytach związane jest z receptorami sprzężonymi z białkami G (G protein-coupled receptors, GPRs), głównie GPR3, które zlokalizowane są w oocytach, oraz z czynnikami hamującymi mejozę MIF (MIF – meiotic inhibitory factors), które produkowane są przez somatyczne ko-

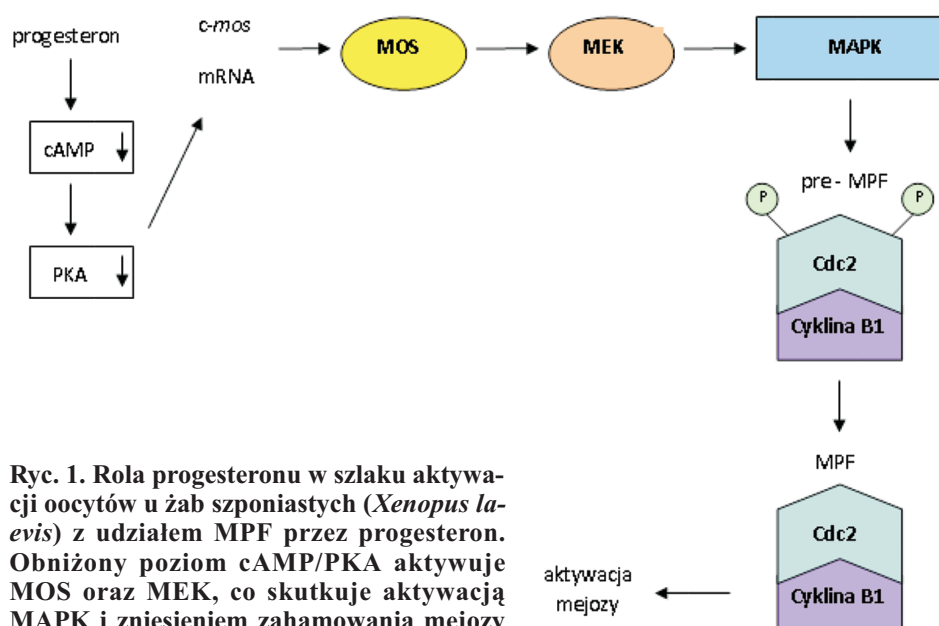
^{*)} Praca finansowana z projektu Ministerstwa Nauki i Szkolnictwa Wyższego (nr grantu 0233/IP1/2011/71) „Iuventus Plus”.

mórki pęcherzykowe w pęcherzykach antralnych (25, 28, 29). Przedowulacyjny wzrost LH prowadzi do indukcji mejozy. *In vitro* oocyty podejmują mejozę spontanicznie w momencie uwolnienia ich z pęcherzyków antralnych, jeżeli są one utrzymywane w hodowli w odpowiednich warunkach (3, 25, 27). Inhibitory mejozy, takie jak: hipoksantyna (HX), analogi cAMP, inhibitory fosfodiesterazy (PDE), mogą blokować spontaniczne dojrzewanie, przy czym ich hamujący efekt może być przewyższony przez dostarczenie do pożywki hodowlanej gonadotropin. Aktywacja mejozy może być również osiągnięta poprzez wzbogacanie pożywki hodowlanej o hormony i czynniki wzrostu, takie jak: lutropina (luteinizing hormone, LH), gonadoliberyna (gonadotropin-releasing hormone, GnRH), nabłonkowy czynnik wzrostu (epidermal growth factor, EGF), insulinopodobny czynnik 3 (insulin-like peptide 3, INSL3) (25, 27).

Białka uczestniczące w podziale mejotycznym

W procesie indukcji podziału mejotycznego ważną rolę odgrywa równowaga pomiędzy kinazami a fosfatazami. Sugeruje się, że spadek poziomu cyklicznego adenozymonofosforanu (cyclic adenosine monophosphate, cAMP) w oocytach jest istotnym etapem w indukcji dojrzewania mejotycznego (6, 7, 25, 27). Wykazano, że wywołuje on zmniejszenie aktywności kinazy białkowej A (protein kinase A, PKA) i prowadzi do defosforylacji ufosforylowanego białka hamującego dojrzewanie (cyclin dependent kinase 1, CDK1) (25, 28). Kolejną funkcją deaktywacji PKA w oocytach jest sprzyjanie syntezie małej liczby białek koniecznych do dojrzewania mejotycznego, takich jak serynowo-treoninowa kinaza MOS (serine/threonine kinase, MOS) oraz cyklina B (25). Jedną z kinaz białkowych biorących udział w procesie indukowania dojrzewania oocytów jest aktywowana mitogenem kinaza białkowa (mitogen-activated protein kinase, MAPK),

głównie MAPK3/1, określana również jako ERK1/2. Aktywacja oraz funkcja MAPK związana jest z kaskadą fosforylacji białek. Regulatorem MAPK jest kinaza MAPK, nazywana także MAP2K lub MEK, która fosforyluje serynowe i treoninowe reszty ERK1/2 (25, 35). Białko MEK także jest aktywowane przez fosforylację. U kręgowców odpowiedzialna jest za to serynowo-treoninowa kinaza MOS (serine/threonine kinase, MOS), która jest produktem protoonkogenu *c-mos*. Wykazano, że zahamowanie transkrypcji genu *c-mos* w komórkach rozrodczych myszy u osobników żeńskich prowadzi do obniżonej płodności oraz wysokiego odsetka występowania potworniaków jajnika (12, 16). Cały szlak *Mos*/MAPK podczas dojrzewania oocytów działa poprzez aktywację i stabilizację czynnika inicjującego dojrzewanie (maturation promoting factor, MPF), który zbudowany jest z dwóch podjednostek: regulatorowej – cykliny B1 oraz katalitycznej – kinazy p34 (nazywanej także CDK1 lub *Cdc2*) (25). W warunkach *in vitro* wykazano, że szlak *Mos*/MAPK bierze udział w znoszeniu zahamowania mejozy w wyniku hormonalnej aktywacji z udziałem progesteronu w oocytach żaby szponiastej (*Xenopus laevis*) (ryc. 1). Badania *in vitro* u ssaków wskazują również, że aktywacja MAPK w komórkach warstwy ziarnistej otaczających oocyt, przez gonadotropiny jest wymagana przy wznowie mejozy, co udowodniono w badaniach przeprowadzonych na oocytach mysich i świńskich otoczonych komórkami wzgórka jajonośnego (cumulus enclosed oocytes, CEOs). Potwierdzono także, że aktywacja MAPK odgrywa ważną rolę, pośrednicząc w funkcji LH. W przypadku świni w komórkach warstwy ziarnistej MAPK jest aktywowane natychmiast po dodaniu LH i FSH (24). Obserwowano również efekt kinazy białkowej AMP (adenosine 5'-monophosphate kinase-activated protein kinase, PRKA), określanej także jako AMPK (9, 27). Mayes i wsp. (27) wykazali istotną rolę tej kinazy w regulacji



Ryc. 1. Rola progesteronu w szlaku aktywacji oocytów u żab szponiastych (*Xenopus laevis*) z udziałem MPF przez progesteron. Obniżony poziom cAMP/PKA aktywuje MOS oraz MEK, co skutkuje aktywacją MAPK i zniesieniem zahamowania mejozy

dojrzewania oocytów świni. Zaobserwowano ekspresję podjednostki PRKAA1 w komórkach warstwy ziarnistej kompleksu COC (cumulus-oocyte complex, COC) i w pozabawionych tych komórek oocytach (denuded oocyte, DO). Podjednostka PRKAA2 została wykryta w komórkach ziarnistych i COC, podczas gdy produkt genu PRKAA3 nie był obecny w komórkach ziarnistych, COC, DO i osłonce przejrzystej (zona pellucida, ZP). Badania te wskazują na nową rolę PRKA w regulacji indukcji mejozy w COC i sugerują, że komórki wzgórka jajonośnego odgrywają znaczącą rolę w kontroli dojrzewania oocytów świni, gdzie przekaznikiem jest PRKA (20, 21, 27).

Rola połączeń typu gap junction w dojrzewaniu oocytów

Dojrzałość cytoplazmatyczna związana jest ze wzrostem oocyty, zmianami w strukturze, dystrybucją organelli oraz gromadzeniem substancji biologicznie aktywnych koniecznych do dalszego rozwoju. W przypadku organelli zmiany dotyczą położenia oraz struktury mitochondriów, rybosomów, retikulum endoplazmatycznego, aparatu Golgiego podczas przechodzenia od stadium pęcherzyka zarodkowego (GV – germinal vesicle) do stadium metafazy II (3, 26, 35). Rybosomy produkują białka niezbędne w dojrzewaniu oocytów oraz początkowych stadiach rozwoju zarodka. Poza tym dojrzałość cytoplazmatyczna związana jest z gromadzeniem ATP, mRNA, białek i czynników transkrypcyjnych. Niektóre z tych białek mogą być transportującymi kinazami białkowymi, których liczba oraz lokalizacja zmienia się podczas jądrowego dojrzewania oocyty. Inną grupę stanowią białka wiążące RNA, tzw. białka Staufen, które rozpoznają i wiążą RNA przeznaczone do degradacji (3). Gromadzony materiał umożliwia prawidłowe dojrzewanie i zapłodnienie oraz inicjuje podział komórkowy zygoty ze stadium 8- do 16-komórkowego (2).

Synchronizacja jądrowego oraz cytoplazmatycznego dojrzewania jest istotna ze względu na uzyskanie przez oocyt kompetencji do dalszego rozwoju, co jest ważnym czynnikiem uczestniczącym w dojrzewaniu oocytów *in vitro* oraz rozwoju zarodków (30).

Stopniowy wzrost i dojrzewanie oocyty w pęcherzyku jajnikowym zależą od otaczających pęcherzykowych komórek somatycznych, które tworzą warstwę ziarnistą wokół oocyty. Interakcje komórki somatyczne/oocyt poprzez połączenia gap junctions są dla oocytów źródłem energii oraz substratów do metabolizmu oraz podziałów, zapłodnienia i wczesnych etapów embriogenezy (10, 30, 36).

Połączenia typu gap junction są to międzykomórkowe kanały zbudowane z białek z rodziny koneksyn (connexin, Cx). Wśród tych białek główną rolę w procesie folikulogenezy pełnią Cx43 i Cx37, co zademonstrowano w doświadczeniach, w których uzyskano defekty w rozwoju oocyty i komórek ziarnistych u myszy, u których zidentyfikowano mutacje w genach kodujących te białka. Brak białka Cx43 wpływa na folikulogenezę poprzez wstrzymywanie wzrostu pęcherzykowego we wczesnych etapach rozwoju. Defekt ten w rozwoju komórek warstwy ziarnistej prowadzi do wielu poważnych konsekwencji w rozwoju oocytów, które blokują prawidłowe podziały mejotyczne (1, 5, 6). Ponadto brak lub obniżona ekspresja genu Cx37 powoduje zakłócenia w późniejszych etapach folikulogenezy, wstrzymując formowanie dojrzałych pęcherzyków. Znaczenie połączeń gap junctions pomiędzy oocytem a komórkami warstwy ziarnistej obrazują doświadczenia na mysich oocytach z defektem w genie Cx37, które nie osiągają pełnego wzrostu i nie nabywają kompetencji mejotycznej (6, 25, 33). Wy-

kazano, że komórki warstwy ziarnistej dzięki połączeniom gap junctions pozwalają transportować około 85% substratów metabolicznych do oocytów, modulują aktywność transkrypcyjną oocytów oraz indukują potranslacyjne modyfikacje białek. Połączenia gap junctions pośredniczą również w „dialogu” pomiędzy oocytem a komórkami ziarnistymi poprzez zapobieganie formowaniu ciała żółtego. U owiec brak komórek wzgórka jajonośnego wpływa w znaczący sposób na spadek aktywności biosyntetycznej (6).

Charakterystyka wybranych białek uczestniczących w dojrzewaniu oocytów

Wykazano, że inicjacja wzrostu pęcherzyków angażuje ligand kit (Kit Ligand, KL) i jego receptor c-kit. Białko KL produkowane jest przez komórki ziarniste, natomiast receptor c-kit zlokalizowany jest w błonie komórkowej oocyty. Wykazano, że myszy z mutacją w genie kodującym receptor c-kit charakteryzują się bezpłodnością, a mutacje te ujawniają swój efekt poprzez błędy w gametogenezie (6, 14, 33).

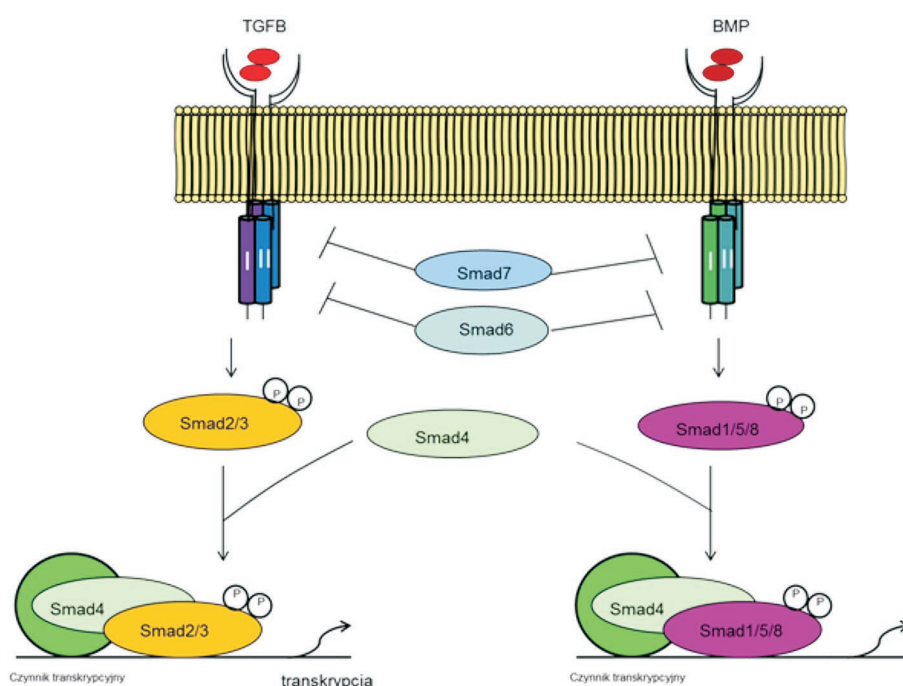
Obecne badania skupiają się na szlakach sygnałowych przebiegających między oocytem a komórkami błony ziarnistej (4). Istotne jest, że interakcja pomiędzy oocytem a komórkami pęcherzykowymi jest dwukierunkowa. Oocyty wydzielają specyficzne cząsteczki sygnałowe (głównie czynniki wzrostu), które mogą wpływać na zasięg procesów jajnikowych obejmujących folikulogenezę, wydzielanie hormonów steroidowych przez komórki wzgórka jajonośnego i proliferację, różnicowanie oraz aktywność wydzielniczą i luteinizacyjną komórek ziarnistych (15, 28, 32, 39). Szczególną uwagę zwraca się na grupę wchodzącą w skład transformujących czynników wzrostu – B (transforming growth factor B, TGFB) i ich potencjalną rolę w regulowaniu funkcji jajnika oraz osiągnięcia stadium zygoty. Wiele spośród badań wskazuje, że różnicujący czynnik wzrostu (growth and differentiation factor 9, GDF9) oraz białko morfogenetyczne kości 15 (bone morphogenetic protein 15, BMP15), znane także jako GDF9B, są niezbędne dla prawidłowego rozwoju pęcherzykowego u szczurów, owiec i ludzi. W skład rodziny TGFB wchodzi ponad 35 białek. Wśród nich wymienia się: grupę TGFB, aktywiny/inhibiny, GDF, BMP, a także hormon antymüllerowski (anty-müllerian hormon – AMH) (4, 6, 13, 18, 32, 34).

Rodzina białek TGFB przekazuje sygnał za pośrednictwem kompleksu receptorów zbudowanych z dwóch typów transbłonowych kinaz serynowo-treoninowych. Dotychczas zidentyfikowano siedem receptorów typu I (activin receptor-like kinases, ALK 1-7) oraz pięć receptorów typu II (ActRII, ActRIIB, BMPRII, TGFβRII i AMHRII). Wiązanie białek z rodziny TGFB z kompleksem receptorowym prowadzi do fosforylacji białek Smad, będących cząsteczkami sygnałowymi, które działając na różne czynniki transkrypcyjne w jądrze komórkowym, indukują ekspresję wybranych

genów. Wyróżnia się osiem rodzajów białek Smad: Smad 1-8. Smad 2 i 3 aktywowane są przez białka z podrodziny TGFB/aktywina, natomiast Smad 1, 5 i 8 są aktywowane przez białka z podrodziny BMP. Jedno z tych białek ulega fosforylacji i następnie oddziałuje z białkiem Smad 4, które przemieszcza się do jądra, gdzie reguluje transkrypcję poprzez interakcje z elementami regulacyjnymi transkrypcji. Smad 6 i 7 są białkami inhibitorowymi, które zapobiegają aktywacji szlaków sygnałowych, takich jak szlak kinazy białkowej aktywowanej mitogenem (MAPK) (18, 22) (ryc. 2).

U ssaków wśród TGFB wyróżnia się trzy izoformy: TGFB1, TGFB2, TGFB3. mRNA/białka zaobserwowano w komórkach ziarnistych oraz osłonkach oocytów niektórych gatunków, aczkolwiek wzór ekspresji TGFB wykazuje dużą różnorodność między gatunkami. U ludzi TGFB1 zaobserwowano w oocytach pęcherzyków pierwszorzędowych oraz w komórkach osłonki i warstwy ziarnistej pęcherzyków antralnych. Intensywność ekspresji wzrasta w komórkach osłonki i ziarnistych w momencie dojrzewania pęcherzyków. TGFB2 ogranicza się jedynie do komórek osłonki dużych preantralnych/antralnych pęcherzyków i maleje w większych pęcherzykach. U niektórych gatunków ssaków, np. szczurów i człowieka, bioaktywność TGFB może ujawniać się zarówno w komórkach osłonki, jak i ziarnistych, w których ekspresja pojawia się podczas wzrostu pęcherzyków preantralnych i rośnie wraz z dojrzewaniem pęcherzyka. U innych gatunków, jak: owce, krowy i świnię, pęcherzykowa aktywność TGFB ujawnia się głównie w komórkach osłonki oocytu. W pęcherzykach owiec ekspresja TGFB mRNA ograniczała się do komórek osłonki oocytów pęcherzyków preantralnych oraz antralnych. U świni osłonka wewnętrzna jest pierwotnym źródłem TGFB, podczas gdy w komórkach ziarnistych zachodzi ekspresja mRNA TGFB1, ale nie białka. Hodowane komórki ziarniste izolowane od bydła i świni ujawniają niską bioaktywność TGFB (13, 18).

Ekspresję BMP15 zaobserwowano w oocytach pęcherzyków pierwszorzędowych owiec, ludzi, szczurów, myszy oraz w pierwotnych pęcherzykach u oposów, aczkolwiek nie zaobserwowano ekspresji mRNA BMP15 w oocytach przed uformowaniem dojrzałych pęcherzyków, co sugeruje, że ten czynnik nie odgrywa znaczącej roli w tym procesie. Ponieważ GDF9 i BMP15 zlokalizowano w oocytach rosnących pęcherzyków u wszystkich gatunków ssaków, wskazuje się, że czynniki te odgrywają główną rolę w regulacji rozwoju pęcherzykowego (11, 18, 31).



Ryc. 2. Schemat aktywacji transkrypcji przez TGFB/BMP z udziałem białek Smad

U myszy GDF9 jest istotny dla prawidłowego rozwoju pęcherzykowego i jest zaangażowany w rozwój prawidłowego fenotypu komórek kumulusa. Białko BMP15 nie jest konieczne dla prawidłowego rozwoju pęcherzykowego, ale odgrywa ważną rolę w końcowym dojrzewaniu pęcherzyka i prawidłowym rozwoju oocytu. W przypadku owiec zarówno GDF9, jak i BMP15 są istotne dla normalnego wzrostu pęcherzykowego, dodatkowo GDF9 może być zaangażowane w luteinizację pęcherzyków w trakcie owulacji. GDF9 oraz BMP15 regulują liczbę owulujących pęcherzyków u owiec, gatunku, który charakteryzuje się niskim poziomem owulacji. Takiej roli GDF9 i BMP15 nie wyznaczono u myszy, gatunku, który cechuje się wysokim poziomem owulacji. Co więcej, GDF9 i BMP15 stały się celem dla nowych metod kontroli płodności, które skupiają się na regulowaniu liczby dojrzewających pęcherzyków (17, 18).

GDF9 i BMP15 aktywują drogi sygnałowe w komórkach wzgórka jajonośnego, regulując ekspresję kluczowych genów i procesów komórkowych, niezbędnych dla prawidłowego różnicowania komórek CC. Wykazano, że podczas dojrzewania oocytów *in vitro* (*in vitro* maturation, IVM) wzbogacenie pożywki czynnikami wydzielanymi przez oocyt (oocyte secreted factors, OSFs) znacznie wspomaga ich rozwój. Oocyt jest głównym regulatorem funkcji komórek warstwy ziarnistej i dlatego pełni ważną rolę w regulacji oogenezy, poziomie owulacji oraz płodności. Wykazano, że samice myszy i owiec z defektem w genie GDF9 oraz owce z defektem w genie BMP15 były sterylne z powodu kompletnej blokady folikulogenezy w stadium pęcherzyka I rzędowego. Doświadczenie *in vitro*, w którym traktowano komórki jajnikowe rekombinowanymi OSF, takimi jak:

GDF9 i BMP15, wykazało, że produkcja progesteronu przez komórki ziarniste u owiec jest hamowana przez rekombinowane owcze GDF9, ale wzmacniana przez mysie GDF9 (11).

Wpływ TGFB na funkcję komórek warstwy ziarnistej jest różny u poszczególnych gatunków ssaków. U szczurów TGFB potencjalnie stymuluje różnicowanie komórek ziarnistych, aczkolwiek u innych gatunków, takich jak: bydło (TGFB2), owce (TGFB1 i TGFB2), świnię (TGFB1 i TGFB2), te czynniki wzrostu wykazują znikomą aktywność stymulacyjną, a nawet hamujący efekt na proliferację komórek ziarnistych. W warunkach *in vitro* białka TGFB stymulują syntezę progesteronu komórek ziarnistych u gryzoni, podczas gdy hamujący efekt obserwuje się w komórkach ziarnistych pobranych od bydła, owiec i świni. W przeciwieństwie do efektu TGFB na komórki ziarniste, w przypadku wpływu na komórki osłonki w odniesieniu do steroidogenezy efekt jest podobny u różnych gatunków (18). Badania wskazują, że delecja bądź mutacja w genach GDF9 lub BMP15 może wpływać na płodność (24, 32, 34). Myszy GDF9 (-/-) były bezpłodne z zatrzymaniem wzrostu pęcherzykowego w stadium pęcherzyka I rzędowego. Oocyty u tych myszy rosły szybciej i były większe, ale charakteryzowały się wieloma defektami strukturalnymi. Dodatkowo poziom FSH i LH wzrastał i obserwowano cysty jajnikowe. W przypadku BMP15 (-/-) samice myszy pozbawionych funkcji genu BMP15 były bezpłodne, wzrost pęcherzykowy był prawidłowy, natomiast owulacja i zapłodnienie oocytów były znacznie ograniczone. W przypadku GDF9 wykazano ważny udział tego białka w kształtowaniu fenotypu komórek wzgórka jajonośnego u myszy, ale może ono pełnić również ważną rolę w procesie luteinizacji. Na tej podstawie uznaje się białka GDF9 i BMP15 za nowe regulatory płodności (17). Istnieją znaczące różnice między gatunkami, rozród myszy może przebiegać prawidłowo przy braku BMP15, natomiast jest to konieczny czynnik w zapłodnieniu u człowieka i owiec. U człowieka nieprawidłowa ekspresja GDF9 korelowana jest z zespołem policystycznych jajników, a mutacje w GDF9 i BMP15 są powiązane z niewydolnością jajników lub dwuzygocycznymi bliźniętami (32).

Wykazano, że oocyt stymuluje proliferację i zwiększa produkcję estradiolu (E2) przez komórki kumulusa. Oocyt pełni także istotną rolę w procesie ekspansji komórek kumulusa u myszy oraz przyspiesza ten proces u szczura, świni i krowy. Fenotyp komórek kumulusa jest odmienny od ściennych komórek ziarnistych, co jest regulowane przez duże stężenie wydzielanych przez oocyt czynników w zewnątrzkomórkowym płynie pęcherzykowym. Czynniki TGFB, GDF9 i BMP15 są wykrywane w płynie pęcherzykowym, co więcej, immunoneutralizacja GDF9 czy BMP15 może modyfikować wzrost pęcherzykowy oraz stan owulacji. GDF9 wydaje się jednym z ważniejszych czynników indukcji czy utrzymania fenotypu komórek wzgórka jajonośnego (18).

Badania przeprowadzone na szczurach wskazują na negatywne sprzężenie zwrotne pomiędzy ligandem KL a BMP15, w którym to ligand KL pochodzący z komórek ziarnistych hamuje BMP15 syntetyzowany przez oocyt, natomiast BMP15 wydzielany przez oocyt stymuluje ekspresję ligandu KL w komórkach ziarnistych (4).

BMP15 i GDF9 są białkami w znaczący sposób wpływającymi na przebieg procesu dojrzewania oocytów *in vitro*. Na poziomie molekularnym zmiany we wzorze ekspresji genów i pewne nieprawidłowości w programowaniu epigenetycznym są w dużym stopniu udokumentowane w zarodkach i płodach otrzymywanych z oocytów hodowanych/dojrzewających *in vitro*. Sugeruje się, że zmiany w zarodkach pochodzących z dojrzewających *in vivo* i *in vitro* oocytów wynikają z różnic środowiskowych, w których te oocyty rozwijają się i wzrastają. Ostatnie badania wykazały, że dodanie BMP15 i GDF9, gdy oocyty poddano dojrzewaniu *in vitro*, podnosi ich kompetencję rozwojową. Natomiast Yeo i wsp. (40) wykazali, że dodanie GDF9 do medium do oocytów hodowanych w warunkach *in vitro* miało negatywny efekt na rozwijający się płód (32).

Mało wiadomo jest na temat wpływu GDF9 na rozwój pęcherzyków jajnikowych u świni. Lee i wsp. (23) wykonali badania, których celem było scharakteryzowanie genu GDF9 u świni, jego roli w rozwoju pęcherzykowym oocytów i dodatkowo efekt różnych hormonów na ekspresję GDF9 podczas hodowli *in vitro* (24). Wykazano, że w świńskich oocytach ekspresja GDF9 spadała podczas dojrzewania, gdy dodawano pożywkę bez surowicy, ale z dodatkiem różnych hormonów oraz składników, takich jak: hCG, PMSG czy EGF (epidermal growth factor). Taka pożywka jest powszechnie używana i akceptowana jako standard w hodowlach oocytów IVM (24).

W przypadku hodowli oocytów *in vitro* stadium metafazy II, tj. dojrzałość jądrową, osiąga około 80-90% oocytów. Problematyczne okazuje się osiągnięcie przez oocyty dojrzałości cytoplazmatycznej, dlatego też wzbogaca się pożywki hodowlane białkami, aminokwasami, hormonami (LH, GnRH), czynnikami wzrostu (EGF, INSL3), również płynami ustrojowymi, jak płynem pęcherzykowym lub surowicą (24, 25, 27, 37). Często dla uzyskania zarodków o wysokiej jakości przeprowadza się synchronizację cyklu meiotycznego oocytów za pośrednictwem dwumaślanu-cyklicznego AMP (dbAMP). Stosuje się również hodowle 2-etapowe: etap 1 – hodowla przez 20-22 godziny z dodatkiem czynnika synchronizującego cykl meiotyczny (dbAMP), etap 2 – hodowla przez 24 godziny bez tego związku (23).

Oocyty świni wymagają nieco dłuższej hodowli (42-48 godzin) w porównaniu do innych gatunków zwierząt gospodarskich. Hodowlę prowadzi się w różnych pożywkach, do najczęściej stosowanych należą: NCSU-23 – płyn zawierający taurynę i hipotaurynę lub sorbitol – (NCSU-37), płyn TALP (zmodyfikowany

roztwór płynu Krebsa-Ringera) lub TCM 199 – płyn Tissue Culture Medium 199 (23).

Podsumowanie

Na osiągnięcie przez oocyt pełnej kompetencji rozwojowej ma wpływ wiele czynników, począwszy od równowagi między kinazami a fosfatazami, poprzez czynniki wynikające ze struktury oocyty (połączenia typu gap junctions wpływające na interakcje komórek somatycznych z oocytem) i w ostateczności rola białek produkowanych przez sam oocyt, takich jak różnicujący czynnik wzrostu (growth and differentiation factor 9, GDF9) czy białko morfogenetyczne kości 15 (bone morphogenetic protein 15, BMP15). Szczegółowe poznanie mechanizmów, złożoności procesów oraz roli poszczególnych czynników biorących udział w procesie dojrzewania oocytów u ssaków w odniesieniu do dojrzałości jądrowej, cytoplazmatycznej i genomowej oocyty pozwolą na optymalizację warunków hodowli *in vitro*. Ponadto, poznanie mechanizmów regulujących oogenezę umożliwi scharakteryzowanie kompetencji rozwojowej oocytów, jak również wyjaśnienie zaburzeń, takich jak cysty jajnikowe. Sugeruje się także, że białka wchodzące w skład transformujących czynników wzrostu mogą posłużyć jako markery prawidłowego dojrzewania oocytów.

Piśmiennictwo

- Ackert C. L., Gittens J. E., O'Brien M. J., Eppig J. J., Kidder G. M.: Inter-cellular communication via connexin43 gap junctions is required for ovarian folliculogenesis in the mouse. *Dev. Biol.* 2001, 233, 258-270.
- Aerts J. M., Bols P. E.: Ovarian follicular dynamics: a review with emphasis on the bovine species. Part I: Folliculogenesis and pre-antral follicle development. *Reprod. Domest. Anim.* 2010, 45, 171-179.
- Brevini T. A., Cillo F., Antonini S., Gandolfi F.: Cytoplasmic remodelling and the acquisition of developmental competence in pig oocytes. *Anim. Reprod. Sci.* 2007, 98, 23-38.
- Buratini J., Price C. A.: Follicular somatic cell factors and follicle development. *Reprod. Fertil. Dev.* 2011, 23, 32-39.
- Carabatsos M. J., Sellitto C., Goodenough D. A., Albertini D. F.: Oocyte-granulosa cell heterologous gap junctions are required for the coordination of nuclear and cytoplasmic meiotic competence. *Dev. Biol.* 2000, 226, 167-179.
- Cecconi S., Ciccarelli C., Barberi M., Macchiarelli G., Canipari R.: Granulosa cell-oocyte interactions. *Eur. J. Obstet. Gynecol. Reprod. Biol.* 2004, 115S, S19-S22.
- Dekel N.: Cellular, biochemical and molecular mechanisms regulating oocyte maturation. *Moll. Cell. Endocrinol.* 2005, 234, 19-25.
- Dekel N.: Protein phosphorylation/dephosphorylation in the meiotic cell cycle of mammalian oocytes. *Rev. Reprod.* 1996, 1, 82-88.
- Downs S. M., Ya R., Davis C. C.: Role of AMPK throughout meiotic maturation in the mouse oocyte: evidence for promotion of polar body formation and suppression of premature activation. *Mol. Reprod. Dev.* 2010, 77, 888-899.
- Feng W. G., Sui H. S., Han Z. B., Chang Z. L., Zhou P., Liu D. J., Bao S., Tan J. H.: Effects of follicular atresia and size on the developmental competence of bovine oocytes: a study using the well-in-drop culture system. *Theriogenology* 2007, 67, 1339-1350.
- Gilchrist R. B., Lane M., Thompson J. G.: Oocyte-secreted factors: regulators of cumulus cell function and oocyte quality. *Hum. Reprod. Update* 2008, 14, 159-177.
- Hashimoto N., Watanabe N., Furuta Y., Tamemoto H., Sagata N., Yokoyama M., Okazaki K., Nagayoshi M., Takeda N., Ikawa Y., Aizawa S.: Parthenogenetic activation of oocytes in c-mos-deficient mice. *Nature* 1994, 370, 68-71.
- Hunter M. G., Paradis F.: Intra-follicular regulatory mechanisms in the porcine ovary. *Soc. Reprod. Fertil. Suppl.* 2009, 66, 149-164.
- Hurk R. van den, Zhao J.: Formation of mammalian oocytes and their growth, differentiation and maturation within ovarian follicles. *Theriogenology* 2005, 63, 1717-1751.
- Hutt K. J., Albertini D. F.: An oocentric view of folliculogenesis and embryogenesis. *Reprod. Biomed. Online* 2007, 14, 758-764.
- Jalocha I., Gabryś M. S., Bal J.: Rola protoonkogenu c-mos w regulacji procesu dojrzewania komórki jajowej. *Postępy Hig. Med. Dośw.* 2010, 64, 636-641.
- Juengel J. L., Bodensteiner K. J., Heath D. A., Hudson N. L., Moeller C. L., Smith P., Galloway S. M., Davis G. H., Sawyer H. R., McNatty K. P.: Physiology of GDF9 and BMP15 signalling molecules. *Anim. Reprod. Sci.* 2004, 82-83, 447-460.
- Juengel J. L., McNatty K. P.: The role of proteins of the transforming growth factor-beta superfamily in the intraovarian regulation of follicular development. *Hum. Reprod. Update* 2005, 11, 143-160.
- Kempisty B., Antosik P., Bukowska D., Jackowska M., Lianeri M., Jaśkowski J. M., Jagodziński P. P.: Analysis of selected transcript levels in porcine spermatozoa, oocytes, zygotes and two-cell stage embryos. *Reprod. Fertil. Dev.* 2008, 20, 513-518.
- Kempisty B., Antosik P., Bukowska D., Jackowska M., Lianeri M., Jaśkowski J. M., Jagodziński P. P.: Assessment of zona pellucida glycoprotein and integrin transcript contents in porcine oocytes. *Reprod. Biol.* 2009, 9, 71-78.
- Kempisty B., Jackowska M., Piotrowska H., Antosik P., Woźna M., Bukowska D., Brüßow K. P., Jaśkowski J. M.: Zona pellucida glycoprotein 3 (pZP3) and integrin β (ITGB2) mRNA and protein expression in porcine oocytes after single and double exposure to brilliant cresyl blue test. *Theriogenology* 2011, 75, 1525-1535.
- Knight P. G., Glister C.: TGF-beta superfamily members and ovarian follicle development. *Reproduction* 2006, 132, 191-206.
- Ka H. H., Sawai K., Wang W. H., Im K. S., Niwa K.: Amino acids in maturation medium and presence of cumulus cells at fertilization promote male pronuclear formation in porcine oocytes matured and penetrated in vitro. *Biol. Reprod.* 1997, 57, 1478-1483.
- Lee G. S., Kim H. S., Hwang W. S., Hyun S. H.: Characterization of porcine growth differentiation factor-9 and its expression in oocyte maturation. *Mol. Reprod. Dev.* 2008, 75, 707-714.
- Liang C. G., Su Y. Q., Fan H. Y., Schatten H., Sun Q. Y.: Mechanisms regulating oocyte meiotic resumption: roles of mitogen-activated protein kinase. *Mol. Endocrinol.* 2007, 21, 2037-2055.
- Marteil G., Richard-Parpaillon L., Kubiak J. Z.: Role of oocyte quality in meiotic maturation and embryonic development. *Reprod. Biol.* 2009, 9, 203-224.
- Mayes M. A., Laforest M. F., Guillemette C., Gilchrist R. B., Richard F. J.: Adenosine 5'-monophosphate kinase-activated protein kinase (PRKA) activators delay meiotic resumption in porcine oocytes. *Biol. Reprod.* 2007, 76, 589-597.
- McLaughlin E. A., McIver S. C.: Awakening the oocyte: controlling primordial follicle development. *Reproduction* 2009, 137, 1-11.
- Mehlmann L. M.: Oocyte-specific expression of Gpr3 is required for the maintenance of meiotic arrest in mouse oocytes. *Dev. Biol.* 2005, 288, 397-404.
- Mermillod P., Dalbičs-Tran R., Uzbekova S., Thélie A., Traverso J. M., Perreau C., Papillier P., Monget P.: Factors affecting oocyte quality: who is driving the follicle? *Reprod. Domest. Anim.* 2008, 43, 293-400.
- Moore R. K., Shimasaki S.: Molecular biology and physiological role of the oocyte factor, BMP-15. *Mol. Cell. Endocrinol.* 2005, 29, 67-73.
- Mottershead D. G., Watson A. J.: Oocyte peptides as paracrine tools for ovarian stimulation and oocyte maturation. *Mol. Hum. Reprod.* 2009, 15, 789-794.
- Opiela J., Kątska-Książkiewicz L.: Charakterystyka zdolności rozwojowej oocytów ssaków w aspekcie zapłodnienia i rozwoju zarodkowego. *Cz. II. Regulacja dojrzałości cytoplazmatycznej i genomowej. Biotechnologia* 2005, 2, 151-162.
- Otsuka F., McTavish K. J., Shimasaki S.: Integral role of GDF-9 and BMP-15 in ovarian function. *Mol. Reprod. Dev.* 2011, 78, 9-21.
- Sagata N.: Meiotic metaphase arrest in animal oocytes: its mechanisms and biological significance. *Trends Cell. Biol.* 1996, 6, 22-28.
- Sirotkin A. V., Taradajnik T. E., Makarevich A. V., Bulla J.: Effect of follicular cells, IGF-I and tyrosine kinase blockers on oocyte maturation. *Anim. Reprod. Sci.* 1998, 51, 333-344.
- Sun Q. Y., Nagai T.: Molecular mechanisms underlying pig oocyte maturation and fertilization. *J. Reprod. Dev.* 2003, 49, 347-359.
- Trounson A., Anderiesz C., Jones G.: Maturation of human oocytes in vitro and their developmental competence. *Reproduction* 2001, 121, 51-75.
- Webb R., Campbell B. K.: Development of the dominant follicle: mechanisms of selection and maintenance of oocyte quality. *Soc. Reprod. Fertil. Suppl.* 2007, 64, 141-163.
- Yeo C. X., Gilchrist R. B., Thompson J. G., Lane M.: Exogenous growth differentiation factor 9 in oocyte maturation media enhances subsequent embryo development and fetal viability in mice. *Hum. Reprod.* 2008, 23, 67-73.

Adres autora: dr Bartosz Kempisty, ul. Święcickiego 6, 60-781 Poznań; e-mail: etok@op.pl