

Univerzita Karlova v Praze
Přírodovědecká fakulta

Studijní program: Vývojová a buněčná biologie



Mgr. Milan Blaha

Signální dráhy a geny regulující zrání oocytů prasete

Signaling pathways and genes regulating oocyte maturation in pig

Disertační práce

Školitel: MVDr. Radek Procházka, CSc.

Praha, 2016

Prohlášení:

Prohlašuji, že jsem závěrečnou práci zpracoval samostatně a že jsem uvedl všechny použité informační zdroje a literaturu. Tato práce ani její podstatná část nebyla předložena k získání jiného nebo stejného akademického titulu.

V Praze, 16. června 2016

.....
Mgr. Milan Blaha

Poděkování

Rád bych na tomto místě poděkoval celému kolektivu Laboratoře vývojové biologie, do které docházím již od dob svého středoškolského studia. Mé díky patří především školiteli panu MVDr. Radku Procházkovi, CSc. za odborné vedení, diskuse nad výsledky, lidský přístup a pochopení během celého mého (nejen) doktorského studia. Svůj vděk bych také rád vyjádřil paní Ing. Lucii Němcové, Ph.D. za mnoho podmětných rad. V neposlední řadě bych rád poděkoval i své rodině, která mě různými způsoby podporovala po celou dobu studia.

Výsledky předložené v této práci byly získány díky finančním prostředkům z těchto grantů:

- grant P502/11/0593, Grantová agentura České republiky
- grant QI 101A166, Národní agentura pro zemědělský výzkum
- grant QJ1510138, Národní agentura pro zemědělský výzkum
- RVO 67985904, Ústav živočišné fyziologie a genetiky
- interní grant UŽFG/14/14, Ústav živočišné fyziologie a genetiky
- interní grant UŽFG/13/5, Ústav živočišné fyziologie a genetiky

Abstrakt

Znovuzahájení meiózy a expanzi kumulu indukované gonadotropiny v preovulačních folikulech předchází exprese genů amfiregulin (*AREG*) a epiregulin (*EREG*), které patří do rodiny epidermálního růstového faktoru (EGF), v buňkách stěnové granulózy i kumulu. V podmínkách *in vitro* jsou tyto peptidy produkovány i kumulárními buňkami při stimulaci folikuly stimulujícím hormonem (FSH). FSH i peptidy podobné EGF stimulují znovuzahájení meiózy a expanzi kumulu v podmínkách *in vitro* aktivací široké signální sítě v kumulárních buňkách. Za účelem definovat signální dráhy, které řídí FSH- a AREG-indukovanou expanzi kumulu a znovuzahájení meiózy, byly prasečí komplexy oocyt-kumulus (COC) kultivovány se specifickými inhibitory proteinkináz. Výsledky dokumentují, že pro znovuzahájení meiózy indukované FSH (nikoliv AREG) jsou důležité PKA a MAPK14. Aktivita EGFR a MAPK3/1 je důležitá u obou způsobů stimulace. Za účelem charakterizovat efekty FSH a EGF-like peptidů na genovou expresi v kumulárních buňkách byly analyzovány transkriptomy těchto buněk pomocí mikročipů. FSH i AREG+EREG zvýšily expresi genů spojených s regulací proliferace, srážením krve a remodelací extracelulární matrix. FSH (na rozdíl od AREG+EREG) také zvýšil expresi genů kódujících klíčové transkripční faktory spojené s plodností samic. Produkce prostaglandinu E2 (PGE2) indukovaná FSH nebo EGF-like peptidy pravděpodobně hraje důležitou roli v procesu ovulace. Bylo zjištěno, že PGE2 stimuluje expanzi kumulu a meiotické zrání u myši, ale jen málo je známo o jeho roli u prasete. Data prezentovaná v této práci dokumentují, že PGE2 je schopen zvýšit expresi genů spojených s expanzí kumulu a stimulovat meiotické zrání, ale méně efektivně než FSH. Posledním cílem této studie bylo určit, zda mohou být znovuzahájení meiózy a expanze kumulu blokovány vysokou hladinou cGMP. Předložená data ukazují, že COC exprimují *NPPC* a *NPR2* a produkují velké množství cGMP při stimulaci exogenním CNP. Vysoké hladiny cGMP inhibovaly meiotické zrání, ale inhibiční efekt cGMP byl zrušen stimulací FSH. Vysoká koncentrace intracelulárního cGMP nebyla schopna potlačit aktivitu MAPK3/1 indukovanou FSH v kumulárních buňkách, expanzi kumulu ani expresi genů s ní spojených.

Abstract

The gonadotropin-induced resumption of meiosis and cumulus expansion in preovulatory follicles is preceded by expression of epidermal growth factor (EGF)-like factors, amphiregulin (*AREG*) and epiregulin (*EREG*), in mural granulosa and cumulus cells. *In vitro*, the EGF-like peptides are also produced in cumulus cells upon stimulation by FSH. Both FSH and the EGF-like peptides stimulate resumption of meiosis and cumulus expansion *in vitro* via activation of a broad signaling network in cumulus cells. To define signaling pathways that drive FSH- and AREG-induced cumulus expansion and meiotic resumption, *in vitro* cultured pig cumulus-oocyte complexes (COCs) were treated with specific protein kinase inhibitors. The results document that FSH-stimulated, but not the AREG-stimulated resumption of meiosis, depends on the PKA and MAPK14 activities; both modes of stimulation require activation of EGFR and MAPK3/1. To characterize the effects of FSH and EGF-like peptides on gene expression in cumulus cells, transcriptomes of cumulus cells were analysed using microarray approach. Both FSH and AREG+EREG increased the expression of genes associated with regulation of cell proliferation, blood coagulation and extracellular matrix remodeling. In contrast to AREG+EREG, FSH also increased the expression of genes coding for key transcription factors associated with female fertility. The FSH or EGF-like peptides-induced production of prostaglandin E2 (PGE2) seems to play an important role in the ovulation process. PGE2 was found to stimulate cumulus expansion and meiosis resumption in mice, but little is known about its role in pigs. The data presented in this thesis document that PGE2 is able to upregulate expression of cumulus expansion-related genes and to stimulate meiosis resumption, but less efficiently than FSH. The final aim of this study was to determine whether the resumption of meiosis and expansion of cumulus cells can be blocked by high levels of cGMP. The presented data show that the COCs express *NPPC* and *NPR2* and produced a large amount of cGMP upon stimulation with exogenous CNP. The high levels of cGMP inhibited meiosis resumption, but the inhibitory effect of cGMP was reversed by stimulating the COCs with FSH. The high concentration of intracellular cGMP was not able to suppress FSH-induced activation of MAPK3/1 in cumulus cells, cumulus expansion and expression of expansion-related genes.

OBSAH

1 Úvod.....	5
1.1 Oogeneze a folikulogeneze	5
1.2 Znovuzahájení meiózy	6
1.3 Expanze kumulu.....	8
2 Cíle práce	11
3 Souhrn výsledků a komentáře k publikacím	12
3.1 Signální dráhy regulující zrání oocytů a expanzi kumulu indukovanou AREG nebo FSH.....	13
3.2 Genová exprese v kumulárních buňkách stimulovaných AREG+EREG nebo FSH	15
3.3 Vliv analogů cGMP na zrání oocytů a expanzi kumulu	18
3.4 Regulace MAPK3/1 v rámci zrání oocytů a expanze kumulu	19
3.5 Úloha PGE2 během expanze kumulu	20
4 Shrnutí	22
5 Citovaná literatura	23
6 Seznam publikací	31
7 Seznam prezentací.....	32
8 Seznam použitých zkratk.....	34
9 Životopis	36
10 Přílohy	37

1 Úvod

Kvalita prasečích oocytů maturovaných v podmínkách *in vitro* není uspokojivá kvůli problémům spojeným s formováním prvojader a vysokému výskytu polyspermie (Hunter, 2000). Zdá se, že klíčem k získání kvalitních oocytů maturovaných *in vitro* a k úspěšné fertilizaci je znalost interakcí oocyty a somatických buněk folikulu a poznatky o působení faktorů, které jsou oocytem, buňkami kumulu nebo stěnové granulózy produkovány do folikulární tekutiny. Tyto poznatky získané v rámci základního výzkumu lze využít nejen pro navržení nových kultivačních systémů, které zlepší vývojovou schopnost *in vitro* maturovaných oocytů, ale i v humánní medicíně, např. při hledání markerů vývojové kompetence.

1.1 Oogeneze a folikulogeneze

Oocyty savců vznikají z primordiálních zárodečných buněk (PGC), které pochází z extraembryonálního epiblastu. Po migraci do genitální lišty se PGC diferencují na oogonie, které se mitoticky dělí. Vstupem do meiózy se z oogonie stává primární oocyt. Meióza se však zastavuje v diplotenním stádiu profáze I. meiotického dělení, ve kterém může oocyt setrvat i několik let. Primární oocyt má dekonenzovaný chromatin a jeho jádro nazýváme zárodečný váček („*germinal vesicle*“ – GV). Ke znovuzahájení meiózy dochází v důsledku preovulačního uvolnění gonadotropních hormonů – především luteinizačního hormonu (LH). Dochází k rozpadu zárodečného váčku („*germinal vesicle breakdown*“ – GVBD), přechodu do metafáze I (MI) a z primárního oocyty vzniká oocyt sekundární. Metafázi I obvykle záhy následuje metafáze II (MII), což je stádium, ve kterém u většiny savčích druhů dochází k oplození.

Vývoj oocyty by nebyl možný bez součinnosti buněk, které jej obklopují. Primární oocyty na počátku obklopují ploché pre-granulózní buňky, na povrchu tohoto útvaru se vytvoří bazální membrána a vznikne primordiální folikul, který je považován za základní funkční jednotku vaječníku. Vývoj folikulu (folikulogenezi) lze následně rozdělit na dvě základní fáze – preantrální (na gonadotropinech nezávislou) fázi a antrální (na gonadotropinech závislou) fázi. Preantrální fáze zahrnuje folikuly primordiální, primární i sekundární. Začíná zformováním primordiálního folikulu a končí v okamžiku, kdy sekundární folikul začíná exprimovat receptor pro folikuly

stimulující hormon (FSH) – je tedy schopen reagovat na gonadotropiny. Působením FSH dochází k formování antra – dutiny vyplněné folikulární tekutinou (Dietich *et al.*, 1998). Vznikem antra a díky zvětšování folikulu lze rozdělit granulózní buňky na dva základní typy. Rozlišujeme buňky kumulární, které společně s oocytem vytváří funkční celek – komplex oocyt kumulus (COC), a buňky stěnové granulózy (MGC). Tyto dva typy se od sebe liší celou řadou vlastností, ale pravděpodobně nejvýznamnější je absence receptoru luteinizačního hormonu u buněk kumulu, jehož expresi inhibuje přítomnost/blízkost oocyty (Eppig *et al.*, 1997).

Vzhledem k tomu, že LH (respektive jeho receptor) je nezbytný pro úspěšnou ovulaci, vyvstává otázka, jakým způsobem je LH signalizace zprostředkována do kumulu, respektive oocyty. V *in vitro* podmínkách může LH nahradit FSH, který efektivně indukuje znovuzahájení meiózy a expanzi kumulu (viz dále). Nicméně v podmínkách *in vivo* jsou mediátorem LH signalizace peptidy z rodiny epidermálního růstového faktoru (EGF) – amfiregulin (AREG) a epiregulin (EREG), které jsou v důsledku stimulace gonadotropiny exprimovány granulózními buňkami u myši (Park *et al.*, 2004), prasete (Procházka *et al.*, 2011; Yamashita *et al.*, 2007) i člověka (Zamah *et al.*, 2010).

Z hlediska *in vitro* maturace oocytů prasete je zajímavé, že oocyt kultivované jako COC v přítomnosti AREG a/nebo EREG mají větší vývojovou kompetenci po partenogenetické aktivaci než oocyt kultivované jako COC s FSH nebo s FSH a LH (Procházka *et al.*, 2011). Lze tedy říci, že v podmínkách *in vitro* AREG a EREG pouze nemimikují efekt FSH a že mají unikátní účinky, které jsou potenciálně zajímavé z hlediska vývoje lepších kultivačních systémů. Tyto poznatky daly impuls k dalšímu výzkumu signálních drah řídicích FSH- a AREG-indukované zrání oocytů a expanzi kumulu a ke studiu rozdílů v genové expresi mezi kumulárními buňkami kultivovanými s FSH a AREG+EREG.

1.2 Znovuzahájení meiózy

Jak již bylo uvedeno, savčí oocyt jsou zadrženy v profázním meiotickém bloku. Tento blok je udržován díky vysoké koncentraci cyklického adenosinmonofosfátu (cAMP), který je u myši produkován na základě aktivity receptoru GPR3 (Mehlmann *et al.*, 2004; Yang *et al.*, 2012). Cyklický adenosinmonofosfát aktivuje protein

kinázu A (PKA). PKA fosforyluje fosfatázu CDC25B, která je nezbytná pro znovuzahájení meiózy u samic (Lincoln *et al.*, 2002). Tato fosforylace vede k lokalizaci CDC25B mimo jádro, což jí zabraňuje aktivovat *maturation-promoting factor* (MPF), komplex CDK1+cyklin B (Pirino *et al.*, 2009). Pro regulaci aktivity PKA a udržení profázního meiotického bloku je klíčová inhibice fosfodiesterázy 3A (PDE3A). Aktivita této fosfodiesterázy je nezbytná pro znovuzahájení meiózy u mnoha živočišných druhů včetně myši (Masciarelli *et al.*, 2004), člověka (Nogueira *et al.*, 2003), prasete (Laforest *et al.*, 2005; Sasseville *et al.*, 2006) a skotu (Thomas *et al.*, 2002). PDE3A je regulována cyklickým guanosinmonofosfátem (cGMP), který působí jako její kompetitivní inhibitor (Lugnier, 2006). Do oocyty proniká cGMP prostřednictvím vodivých spojů („*gap junctions*“) z kumulárních buněk, kde je syntetizován především receptorem s vlastní guanylátcyklázovou aktivitou NPR2 (Robinson *et al.*, 2012). Množství cGMP difundujícího z kumulu do oocyty je u myši regulováno LH, a to minimálně třemi mechanismy (Robinson *et al.*, 2012):

1. Snížením exprese genu *Nppc* ve stěnové granulóze. Tento gen kóduje prekurzor natriuretického peptidu C (CNP). CNP je aktivátorem NPR2 a je nezbytný pro guanylátcyklázovou aktivitu receptoru. Tento mechanismus byl nalezen i v kravských granulózních buňkách (Yang *et al.*, 2016).
2. Snížením guanylátcyklázové aktivity NPR2 nezávisle na CNP, např. defosforylací a inaktivací NPR2 (Egbert *et al.*, 2014).
3. Snížením propustnosti vodivých spojů mezi kumulárními buňkami díky fosforylaci GJA1 (konexin 43) prostřednictvím MAPK3/1, respektive v závislosti na aktivaci receptoru epidermálního růstového faktoru (Norris *et al.*, 2008; Hsieh *et al.*, 2011).

U prasete není mechanismus regulace syntézy cGMP jasný (viz cíle práce a výsledky). Není ani jasné, zda u prasete dochází ke snížení propustnosti vodivých spojů jako u myši. Byly publikovány i výsledky, které naznačují, že u prasete dochází dokonce k zvýšení propustnosti vodivých spojů během *in vitro* kultivace (Santiquet *et al.*, 2012). Důležitou roli hraje pravděpodobně i hydrolýza cGMP v kumulárních buňkách, která se v důsledku kultivace s gonadotropiny u prasete zvyšuje (Sasseville *et al.*, 2008), a zdá se, že tento mechanismus (zvýšení fosfodiesterázové aktivity PDE5) byl nalezen i u potkana (Egbert *et al.*, 2014).

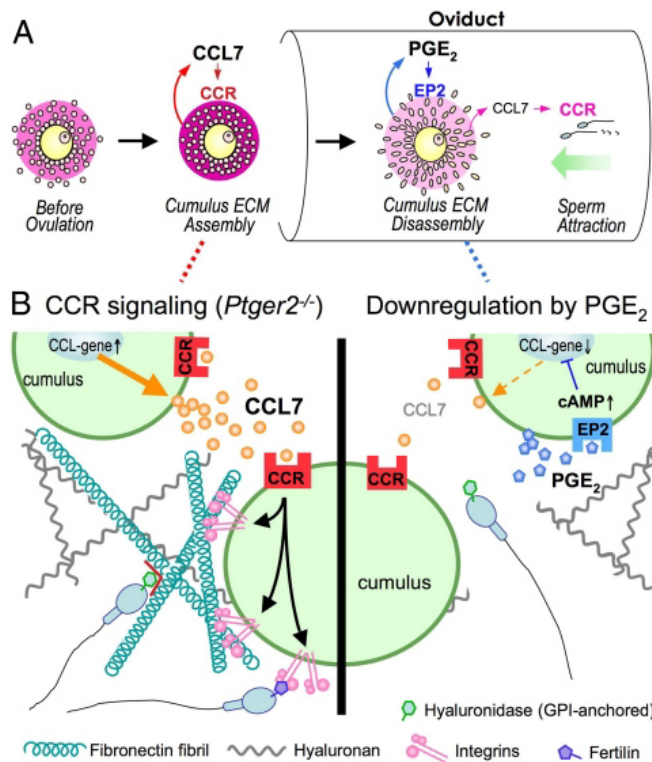
Některé studie také poukazují na schopnost CNP zvyšovat vývojovou kompetenci oocytů (Wei *et al.*, 2015; Zhang *et al.*, 2015), např. v dvoukrokovém kultivačním systému (CNP a estradiol po dobu 6 h, následně zrání s médiu s EGF a lidským choriovým gonadotropinem) v případě kozích COC (Zhang *et al.*, 2015). Podobný dvoukrokový kultivační systém spočívající v pre-kultivaci s látkami zvyšujícími hladinu cAMP (FSH, IBMX) v COC, eventuálně indukujícími expresi receptoru LH, následované kultivací s EGF zvýšil i vývojovou kompetenci prasečích oocytů (Kawashima *et al.*, 2008).

1.3 Expanze kumulu

V důsledku signalizace LH a růstovými faktory z rodiny EGF dochází v kumulu k produkci komponent extracelulární matrix (ECM), což vede k mucifikaci kumulu, především díky syntéze a retenci hyaluronanu. Expanzi kumulu předchází exprese „genů spojených s expanzí kumulu“, která je indukována FSH nebo AREG a EREG. Mezi tyto geny bývají u myši řazeny hyaluronan syntáza 2 (*Has2*), „tumor necrosis factor- α -induced protein 6“ (*Tnfaip6*), prostaglandin-endoperoxid syntáza 2 (*Ptgs2*) a pentraxin 3 (*Ptx3*). HAS2 je enzym, který na povrchu kumulárních buněk syntetizuje lineární molekuly hyaluronanu. TNFAIP6 katalyzuje přenos těžkého řetězce z inter- α -trypsin inhibitoru na hyaluronan (Rugg *et al.*, 2005), čímž pravděpodobně zvyšuje stabilitu expandovaného kumulu, což naznačují výsledky na zvířatech, u kterých byl gen *Tnfaip6* odstraněn (Fülöp *et al.*, 2003). Na hyaluronan navázaný těžký řetězec váže i PTX3, který je rovněž důležitý pro stabilitu/elasticitu a organizaci extracelulární matrix expandujícího kumulu (Scarchilli *et al.*, 2007).

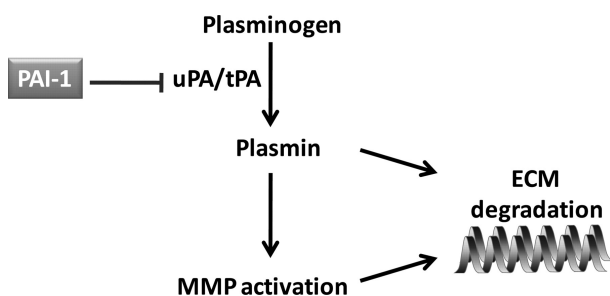
Klíčovou roli v procesu expanze kumulu sehrává u myši také prostaglandin E2 (PGE2). Myši, u kterých byl odstraněn gen *Ptgs2* kódující enzym stojící na počátku syntézy prostaglandinů, vykazují narušenou expanzi kumulu (Takahashi *et al.*, 2006). U myši postrádajících gen *Ptger2* kódující receptor PGE2 dochází k problémům s ovulací a oplozením oocytu (Hizaki *et al.*, 1999; Tilley *et al.*, 1999). Molekulární podstata problémů s fertilizací u *Ptger2*^{-/-} myši spočívá pravděpodobně ve změnách v regulaci genové exprese kumulárních buněk. U myši dochází před ovulací k expresi chemokinů *Ccl2*, *Ccl7* a *Ccl9*, které usnadňují migraci spermií k COC a svým působením zvyšují viskozitu ECM kumulu, což je důležité kvůli mechanickému stresu při a po ovulaci (Tamba *et al.*, 2008). Ve vejcovodu však

PGE₂ inhibuje expresi těchto chemokinů, zejména *Ccl7*, což vede ke změnám struktury ECM, které jsou nezbytné pro průnik spermie do oocyty (Tamba *et al.*, 2008). V případě *Ptger2*^{-/-} myši ke snížení exprese *Ccl7* ani k remodelaci ECM nedochází, což ústí v problémy s oplozením, protože ECM je rezistentní vůči hyaluronidáze spermií, které se navíc zachytávají na kumulárních buňkách díky interakci fertilinu s integriny (Tamba *et al.*, 2008).



Obrázek 1 - Vliv PGE₂ na vlastnosti ECM kumulu v čase fertilizace. Popisek v textu. Přejato z Tamba *et al.* (2008).

Další skupinou genů, jejichž exprese je v kumulu zvýšena v důsledku signalizace gonadotropiny, jsou geny kódující určité komponenty fibrinolytického systému. Ústředním členem tohoto systému je serinová proteáza plazmin, která vzniká z plazminogenu působením aktivátorů plazminogenu - tkáňovým aktivátorem plazminogenu tPA (PLAT) a aktivátorem plazminogenu urokinázového typu uPA (PLAU). Této aktivaci může být zabráněno inhibitory aktivace plazminogenu PAI1 a PAI2 (Bouton *et al.*, 2012), které budou dále označovány jako SERPINE1 a SERPINE2.



Obrázek 2 - Zjednodušené schéma aktivace plazminu. Přejato z Beier *et Alteer* (2012).

U myši bylo zjištěno, že exogenní SERPINE2 přidaný do kultivačního média je schopen inhibovat expanzi kumulu i meiotické zrání oocytů (Liu *et al.*, 2013). Přidání PLAU do kultivačního média způsobuje expanzi kumulu, zatímco inhibitor PLAU měl podobný efekt jako SERPINE2 (Liu *et al.*, 2013). PLAU také zvyšuje expresi *Has2* v kumulárních buňkách myši, zatímco SERPINE2 ji snižuje (Liu *et al.*, 2013). Navíc se zdá, že dvojice SERPINE2-PLAU je specifická pro myš a že u potkana (Liu *et Hsueh*, 1987) nebo makaka rhesus (Liu *et al.*, 2004) gonadotropiny stimulují expresi spíše PLAT a SERPINE1. U makaků reguluje expresi SERPINE1 v granulóznicích buňkách i PGE2 (Markosyan *et Duffy*, 2009).

2 Cíle práce

- Popsat vliv inhibitorů vybraných signálních molekul na meiotické zrání oocytů a expanzi kumulu indukovanou FSH nebo AREG
- Popsat rozdíly v genové expresi v kumulárních buňkách, které byly stimulovány FSH, respektive AREG
- Popsat vliv natriuretického peptidu C a syntetických analogů cGMP (8-Br-cGMP a 8-CPT-cGMP) na meiotické zrání oocytů v podmínkách *in vitro*, na expanzi kumulu indukovanou gonadotropiny a na aktivitu MAPK3/1
- Podat přehled o významu MAPK3/1 pro meiotické zrání oocytů a expanzi kumulu
- Popsat vliv prostaglandinu E2 (PGE2) na expanzi kumulu a na meiotické zrání oocytů. Dále popsát vliv vybraných inhibitorů signálních molekul na expresi vybraných genů (*HAS2*, *PTGS2*, *TNFAIP6*) indukovanou PGE2.

3 Souhrn výsledků a komentáře k publikacím

Předložená disertační práce se skládá z celkem pěti publikací – čtyř již publikovaných (1-4) a jedné odeslané k recenznímu řízení (5):

(1) Procházka, R., Blaha, M., and Němcová, L. (2012). Signaling pathways regulating FSH- and amphiregulin-induced meiotic resumption and cumulus cell expansion in the pig. *Reproduction* 144, 535-546. (IF 2012: 3,555)

(2) Blaha, M., Němcová, L., Kepková, K.V., Vodička, P., Procházka, R. (2015). Gene expression analysis of pig cumulus-oocyte complexes stimulated in vitro with follicle stimulating hormone or epidermal growth factor-like peptides. *Reproductive Biology and Endocrinology* 13 (1), art. no. 113, p. 1. (IF 2015: 2,226)

(3) Blaha, M., Němcová, L., Procházka, R. (2015). Cyclic guanosine monophosphate does not inhibit gonadotropin-induced activation of mitogen-activated protein kinase 3/1 in pig cumulus-oocyte complexes. *Reproductive Biology and Endocrinology* 13 (1), art. no. 1. (IF 2015: 2,226)

(4) Procházka, R., Blaha, M. (2015). Regulation of mitogen-activated protein kinase 3/1 activity during meiosis resumption in mammals. *Journal of Reproduction and Development* 61, 495-502. (IF 2015: 1,515)

(5) Blaha, M., Procházka, R., Adámková, K., Nevorál, J., Němcová, L. Prostaglandin E2 stimulates the expression of cumulus expansion-related genes in pigs: the role of protein kinase B.

Vlastní texty těchto prací jsou v oddíle Přílohy. Soubor obsahuje dvě již zveřejněné prvoautorské publikace (2 a 3). Kumulovaný impact factor (KIF) byl stanoven jako součet IF časopisů po korekci na počet autorů (AIF). Podle požadavků oborové rady se AIF vypočítá podle vztahu: $AIF = IF/(n+1)$, kde n je počet autorů, přičemž u prvoautorské publikace se AIF zdvojnásobuje. Na základě těchto pravidel byl vypočítán kumulovaný impact factor $KIF = 3,249$. Dále je třeba upozornit, že data z publikace (1) byla již použita v mé diplomové práci *Signální dráhy a geny regulující u prasete zrání oocytů a expanzi kumulu indukované gonadotropiny* obhájené v r. 2012 na Katedře genetiky a mikrobiologie Přírodovědecké fakulty UK.

Tato disertační práce navazuje a rozšiřuje práci diplomovou, a proto jsem se rozhodl tuto publikaci zařadit i do práce disertační. Data pro ostatní předložené texty vznikla až během doktorského studia. Publikace (4) je přehledový článek.

3.1 Signální dráhy regulující zrání oocytů a expanzi kumulu indukovanou AREG nebo FSH

Komentář k publikaci (1): Procházka, R., Blaha, M., and Němcová, L. (2012). Signaling pathways regulating FSH- and amphiregulin-induced meiotic resumption and cumulus cell expansion in the pig. Reproduction 144, 535-546.

Cílem této studie bylo popsat vliv inhibitorů vybraných signálních molekul na zrání oocytů a expanzi kumulu indukovanou FSH nebo AREG. Byly vybrány následující inhibitory:

Inhibitor	Cílová molekula	Poznámka
H89	PKA	---
SB203580	MAPK14	---
U0126	MAP2K1	ve svém důsledku inhibuje MAPK3/1
AG1478	ERBB1	inhibitor receptoru EGF, respektive AREG a EREG
LY294002	PI3K	ve svém důsledku inhibuje aktivaci PKB

Tabulka 1 - Přehled použitých inhibitorů.

Použitím těchto inhibitorů byly získány následující výsledky.

PKA

Inhibitor PKA (H89; Sigma-Aldrich, Praha, ČR) výrazně narušil *in vitro* meiotickou maturaci oocytů prasete stimulovanou FSH. Maturace oocytů stimulována FSH byla téměř zcela zablokována ve stádiu zárodečného váčku pomocí H89 v koncentraci 5–15 μ M. Znovuzahájení meiózy indukované AREG naopak nebylo H89 inhibováno a většina oocytů prošla rozpadem zárodečného váčku (GVBD), což naznačuje, že PKA není nezbytná pro znovuzahájení meiózy indukované AREG. H89 rovněž negativně působil na expanzi kumulu indukovanou FSH i AREG a měl negativní vliv

na expresi *TNFAIP6*, nikoliv však *HAS2* a *PTGS2*. Vzhledem k tomu, že AREG není schopen PKA v COC aktivovat v prvních hodinách kultivace, zůstává otázkou, jaké signální molekuly jsou zodpovědné za aktivaci PKA v tomto kultivačním systému. Výsledky naší i dalších laboratoří naznačují, že touto molekulou by mohl být prostaglandin E2 – viz příložená publikace (5).

PI3K/PKB

Inhibitor PI3K/PKB (LY294002; Sigma-Aldrich, Praha, ČR) rovněž narušoval meiotické zrání prasečích oocytů stimulované FSH nebo AREG. V případě FSH došlo k výraznému zvýšení podílu oocytů, které sice znovuzahájí meiózu, avšak nedosáhnou po 42 h kultivace stádia MII. V případě meiotického zrání stimulovaného AREG byl pozorován dvojitý efekt inhibitoru – při nižších koncentracích (5 a 10 μ M) inhibitor způsobil zvýšení podílu oocytů, které zůstávají po 42 h ve stádiu zárodečného vajíčku, naopak vyšší koncentrace (20 a 50 μ M) zvýšily procento oocytů, které sice znovuzahájily meiózu, ale nedosáhly stádia MII. Výsledky získané v této studii naznačují, že PKB není nezbytná pro znovuzahájení meiózy, ale hraje důležitou roli při přechodu z MI do MII, jak naznačují i jiné studie (Kalous *et al.*, 2009). Expanze kumulu byla tímto inhibitorem významně narušena v případě stimulace FSH i AREG, čemuž odpovídá i vliv LY294002 na expresi genů spojených s expanzí kumulu. Inhibitor způsobil snížení exprese *HAS2* a *TNFAIP6*, avšak exprese *PTGS2* byla díky jeho působení zvýšena, a to jak po FSH, tak i po AREG. Tyto výsledky vedly k hypotéze, že zvýšení exprese *PTGS2* a *AREG* představuje jakýsi kompenzační mechanismus, kterým dochází k udržení potřebné aktivity PKB nezbytné pro expresi *HAS2* a *TNFAIP6* – viz příložená publikace (5).

MAPK3/1

Inhibitor MAPK3/1 (U0126; Merck Chemicals, Nottingham, UK) způsobil narušení meiotického zrání oocytů stimulovaných FSH i AREG – v obou experimentálních systémech vedl ke zvýšení podílů oocytů, které zůstaly ve stádiu zárodečného vajíčku. Efektivně inhiboval i expanzi kumulu indukovanou FSH i AREG a expresi *HAS2*, *PTGS2* a *TNFAIP6*. Tato data jsou ve shodě s dříve publikovanými výsledky u myši, u které jsou MAPK3/1 naprosto nezbytné pro znovuzahájení meiózy, expanzi kumulu, úspěšnou ovulaci a luteinizaci (Fan *et al.*, 2009), viz příložená publikace (4).

EGFR

Vzhledem k výsledkům získaným s inhibítorem MAPK3/1 nepřekvapí ani efekt inhibítoru receptoru epidermálního růstového faktoru (AG1478; Sigma-Aldrich, Praha, ČR), jehož ligandem je AREG. V obou experimentálních systémech vedl tento inhibítor ke zvýšení podílu oocytů, které zůstaly ve stádiu zárodečného vřáku. Dále AG1478 inhiboval expanzi kumulu a expresi všech tří genů s ní spojovaných. Ze získaných dat je tedy zřejmé, že i efekt FSH vyžaduje aktivaci EGFR.

3.2 Genová exprese v kumulárních buňkách stimulovaných AREG+EREG nebo FSH

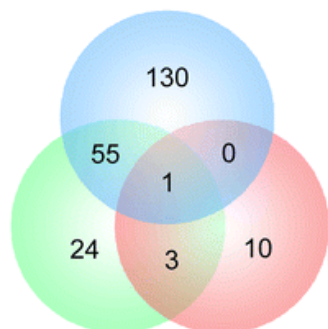
Komentář k publikaci (2): Blaha, M., Němcová, L., Kepková, K.V., Vodička, P., Procházka, R. (2015). Gene expression analysis of pig cumulus-oocyte complexes stimulated in vitro with follicle stimulating hormone or epidermal growth factor-like peptides. Reproductive Biology and Endocrinology 13 (1), art. no. 113, p. 1. (IF 2015: 2,226)

Cílem této studie bylo najít rozdíly v profilech genové exprese kumulárních buněk kultivovaných 3 h v médiu obohaceném o FSH nebo o AREG a EREG. Tento časový interval byl vybrán na základě dříve zjištěného poznatku, že prasečí COC kultivované 3 h v přítomnosti FSH a následně přenesené do kontrolního média bez gonadotropinu syntetizují hyaluronan a dochází u nich k expanzi kumulu (Procházka *et al.*, 2003). Lze se tedy domnívat, že exprese klíčových genů, jejichž produkty jsou zapojeny do expanze kumulu, je indukována do 3 h po přidání gonadotropinu do média.

V rámci studie byly porovnávány profily genové exprese kumulárních buněk kultivovaných jako COC s FSH, kumulárních buněk kultivovaných jako COC s AREG+EREG a kumulárních buněk kultivovaných jako COC v médiu bez FSH nebo AREG+EREG (kontrola). Pomocí mikročipů bylo nalezeno velké množství rozdílně exprimovaných genů, a proto byly další analýzy prováděny jen u těch genů, jejichž exprese se podle dat z mikročipů zvýšila nebo snížila alespoň 1,5×. Bylo zjištěno, že FSH způsobuje zvýšení/snížení exprese většího množství genů než AREG+EREG (Obrázek 3). FSH zvýšil v kumulárních buňkách expresi 186 genů, AREG+EREG zvýšily expresi pouze 83 genů. Obdobná situace byla i u genů, jejichž

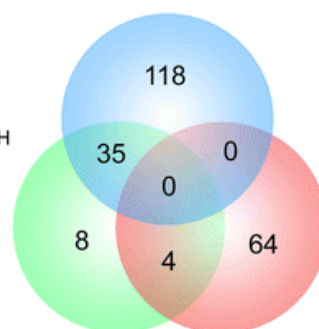
exprese se v důsledku kultivace s FSH nebo AREG+EREG v kumulárních buňkách snížila – FSH měl tento vliv na expresi 153 genů a AREG+EREG na 47 genů. Seznam těchto genů je dostupný v přílohách.

A Overexpressed genes



B Underexpressed genes

● FSH vs. C
● AREG/EREG vs. C
● AREG/EREG vs. FSH



Obrázek 3 - Vennovy digramy znázorňující počty genů, jejichž exprese se liší mezi kumulárními buňkami stimulovanými FSH (modrá) nebo AREG+EREG (zelená) v porovnání s nestimulovanými buňkami, respektive mezi buňkami stimulovanými AREG+EREG v porovnání s buňkami stimulovanými FSH (červená). Přejato z (2).

Z množiny těchto genů bylo vybráno celkem 50 genů, jejichž exprese byla kvantifikována pomocí real-time PCR (qRT-PCR). Z množiny genů, jejichž exprese byla (dle dat z mikročipů) po kultivaci s FSH zvýšená, bylo vybráno celkem 27 genů a zvýšení exprese bylo potvrzeno u 21 z nich (78 %). Naopak v případě genů, jejichž exprese se díky kultivaci s FSH snižuje, se podařilo pomocí qRT-PCR potvrdit snížení exprese jen u 4 z 12 (33 %). Obdobná situace byla i u genů, jejichž exprese se zvyšovala/snižovala po kultivaci s AREG+EREG. U 9 z 12 genů (75 %) bylo pomocí qRT-PCR potvrzeno zvýšení exprese, u 3 z 11 genů (27 %) bylo potvrzeno snížení exprese.

Pomocí mikročipů bylo zjištěno, že FSH (ale nikoliv AREG+EREG) indukuje expresi genů kódujících transkripční faktory (*CEBPB*, *FOS*, *FOXO3*, *IDI1*, *ID3*, *NR5A2*), které jsou spojovány s reprodukční fyziologií samic. Myši, u kterých byl gen *Cebpb* v granulárních buňkách odstraněn metodou *conditional gene knockout*, mají sníženou plodnost a AREG není schopen v podmínkách *in vitro* stimulovat expresi *Ptgs2* a *Tnfaip6* v COC těchto myší (Fan *et al.*, 2009). Podobně i u myší, u kterých byl v granulárních buňkách odstraněn *Nr5a2*, dochází k vážnému narušení ovulace a sterilitě, byť není jasné, zda je NR5A2 nezbytný pro samotnou expanzi kumulu (Bertolin *et al.*, 2014; Duggavathi *et al.*, 2008).

Další důležitou skupinou jsou geny, jejichž produkty hrají roli při tvorbě a remodelaci extracelulární matrix. FSH indukoval expresi *HAS2* a *TNFAIP6*, ale i *ADAMTS1*, jehož exprese nebyla podle výsledků qRT-PCR stimulována AREG+EREG. U myši se exprese *Adamts1* výrazně liší mezi *in vivo* a *in vitro* maturovanými COC (Dunning *et al.*, 2007) a u prasete lze jeho expresi v COC v podmínkách *in vitro* stimulovat dibutyryl-cAMP (dbcAMP) (Appelant *et al.*, 2015). AREG+EREG a ve větší míře FSH indukovaly expresi syndekanu 4 (*SDC4*), jehož exprese v kumulárních buňkách může vypovídat o vývojové schopnosti oocytu (Wathlet *et al.*, 2011). FSH i AREG+EREG také indukovaly řadu genů, jejichž produkty se účastní koagulace krve (např. *F3*), respektive se jedná o součásti fibrinolytického systému (*SERPINE1*, *PLAT*, *PLAU*, *TFPI2*). Expresе těchto genů indukovaná gonadotropiny byla popsána v řadě studií (Li *et al.*, 1997; Li *et al.*, 2006; Cao *et al.*, 2006), přesto však zůstává role plazminu a jeho aktivátorů během ovulace nejasná. Z hlediska kultivací COC v podmínkách *in vitro* je relevantní především vliv komponent fibrinolytického systému na ECM kumulu. Role plazminu během expanze kumulu je diskutována již v publikacích z 80. let 20. století (Liu *et al.*, 1986), nicméně jeho funkce během tohoto procesu je rovněž nejasná. Jak bylo uvedeno v literárním úvodu, exogenní SERPINE2 přidaný do kultivačního média je schopen inhibovat expanzi kumulu i meiotické zrání oocytů, zatímco přidání PLAU do kultivačního média způsobuje expanzi kumulu (Liu *et al.*, 2013). PLAU také zvyšuje expresi *Has2* v kumulárních buňkách myši, zatímco SERPINE2 ji snižuje (Liu *et al.*, 2013). Výsledky předložené studie (2) také naznačují, že gonadotropiny u prasete stimulují spíše expresi *PLAT* a *SERPINE1*. Vliv *PLAT* a inhibitorů proteáz (např. aprotininu) na zrání oocytů a expanzi kumulu u prasete je zajímavým námětem dalšího studia.

3.3 Vliv analogů cGMP na zrání oocytů a expanzi kumulu

Komentář k publikaci (3): Blaha, M., Němcová, L., Procházka, R. (2015). Cyclic guanosine monophosphate does not inhibit gonadotropin-induced activation of mitogen-activated protein kinase 3/1 in pig cumulus-oocyte complexes. Reproductive Biology and Endocrinology 13 (1), art. no. 1. (IF 2015: 2,226)

Cílem předložené studie bylo testovat hypotézu, zda jsou *NPPC* a *NPR2* v prasečích COC exprimovány a zda je možno jejich expresi ovlivnit přidáním FSH. Dále, zda exogenní CNP je schopen indukovat produkci cGMP a zda jsou cGMP nebo jeho analogy 8-Br-cGMP a 8-(4-chlorofenylthio)-cGMP (8-CPT-cGMP) schopny inhibovat meiotické zrání v podmínkách *in vitro*. Pomocí qRT-PCR bylo zjištěno, že množství *NPPC* se během kultivace (0-20 h) v médiu obohaceném o FSH nemění. Naopak množství *NPR2* klesá již 4 h od začátku kultivace. Obdobné výsledky byly získány i při kultivaci s AREG a EREG (data nebyla použita v publikaci). Pomocí kompetitivní ELISA (cGMP complete ELISA kit - Enzo Life Sciences, USA) bylo dále zjištěno, že exogenní CNP v koncentraci 100 nM stimuluje produkci cGMP v prasečích COC - již 1 h po přidání CNP byla koncentrace cGMP v COC stimulovaných CNP 15× vyšší než u nestimulovaných kontrolních COC. Zajímavý byl vliv FSH na schopnost CNP indukovat produkci cGMP. Pokud byl FSH přidán současně s CNP, výrazně snížil produkci cGMP v komplexu. Pokud však byl FSH přidán až hodinu po CNP, neměl na množství syntetizovaného cGMP vliv. Tato data naznačují, že FSH je schopen inhibovat produkci cGMP v prasečích oocytech cestou regulace aktivity *NPR2* nezávisle na CNP, např. cestou inaktivační defosforylace *NPR2* nebo aktivační fosforylace *PDE5* (Egbert *et al.*, 2014). V obou experimentálních uspořádáních docházelo k poklesu koncentrace cGMP v COC kultivovaných po dobu 12 h, což pravděpodobně souvisí se zjištěným poklesem exprese *NPR2* během kultivace. Dále byl testován vliv analogů cGMP na zrání oocytů. Pomocí kompetitivní ELISA bylo zjištěno, že koncentrace analogů cGMP, které pronikly z média do COC, je srovnatelná s koncentrací cGMP produkovaného díky CNP/*NPR2*, pokud je koncentrace analogů v médiu 0,1–1,0 mM. Tyto koncentrace analogů cGMP byly proto využity k testování vlivu těchto analogů na meiotické zrání oocytů zbavených kumulu i v komplexech oocyt-kumulus. Bylo zjištěno, že u COC i oocytů zbavených kumulu dochází k inhibici zrání a ke zvýšení podílu oocytů, které zůstávají ve stádiu zárodečného vaku. FSH je však schopen

inhibiční vliv analogů cGMP zcela zrušit, což je celkem překvapivé vzhledem k tomu, že se jedná o analogy údajně odolné vůči hydrolýze fosfodiesterázami. Zároveň však tento poznatek indikuje, že pozorovaný inhibiční vliv analogů cGMP na meiotické zrání není pouze efekt toxické koncentrace exogenní chemikálie, ale má i biologický význam. CNP neměl signifikantní vliv na meiotické zrání oocytů kultivovaných jako COC bez FSH, ale byl schopen zpomalit nástup GVBD u oocytů kultivovaných jako COC v přítomnosti FSH.

Poslední hypotézou testovanou v rámci této studie byl možný vliv cGMP na aktivitu MAPK3/1 a tím i na expanzi kumulu. Dřívější práce naznačovaly, že donor oxidu dusnatého (SNAP) je schopen inhibovat expanzi kumulu, zrání oocytů a fosforylaci MAPK3/1 indukovanou LH v myších komplexech COC kultivovaných jako celé folikuly (Sela-Abramovich *et al.*, 2008). Podobný negativní efekt na expanzi kumulu a zrání prasečích oocytů měl i nitroprusid sodný (Tao *et al.*, 2005) a 8-Br-cGMP (Zhang *et al.*, 2005). Výsledky těchto studií daly vzniknout hypotéze, že cGMP inhibuje jak znovuzahájení meiózy, tak expanzi kumulu, což může mít určitý biologický význam. V této předložené studii (3) bylo však zjištěno, že CNP ani analogy cGMP nemají vliv na expanzi kumulu, expresi genů spojených s expanzí kumulu ani na fosforylaci MAPK3/1 indukovanou FSH.

3.4 Regulace MAPK3/1 v rámci zrání oocytů a expanze kumulu

Komentář k publikaci (4): Procházka, R., Blaha, M. (2015). Regulation of mitogen-activated protein kinase 3/1 activity during meiosis resumption in mammals. Journal of Reproduction and Development 61, 495-502. (IF 2015: 1,515)

Článek je přehledová studie.

3.5 Úloha PGE2 během expanze kumulu

Komentář k publikaci (5): Blaha, M., Procházka, R., Adámková, K., Nevoral, J., Němcová, L. Prostaglandin E2 stimulates the expression of cumulus expansion-related genes in pigs: the role of protein kinase B.

Posledním z předkládaných textů je připravovaná publikace „*Prostaglandin E2 stimulates the expression of cumulus expansion-related genes in pigs: the role of protein kinase B*“ zasláná do recenzního řízení v časopise *Domestic Animal Endocrinology* (IF = 2,171). Cílem práce je stanovit vliv PGE2 na expresi klíčových genů spojených s expanzí kumulu (*HAS2*, *PTGS2*, *TNFAIP6*) v prasečích COC kultivovaných *in vitro*, dále vliv PGE2 na aktivitu klíčových signálních molekul MAPK3/1 a PKB a produkci hyaluronanu.

Pomocí qRT-PCR bylo zjištěno, že PGE2 v koncentraci 40 ng/ml a vyšší stimuluje expresi genů spojených s expanzí kumulu i *EREG*. Srovnatelná koncentrace PGE2 (35 ng/ml) stimuluje expresi *AREG* a *EREG* v lidských granulózních buňkách (Ben-Ami *et al.*, 2006). Ve folikulární tekutině krávy byla 24 h po počátku estru stanovena koncentrace PGE2 $87,9 \pm 30,9$ ng/ml (Liu *et al.*, 1997). Lze tedy říci, že použité koncentrace PGE2 jsou srovnatelné s těmi, které nacházíme fyziologicky *in vivo* nebo byly používány i v jiných studiích (Eppig, 1981; Salustri *et al.*, 1990).

Byl rovněž testován vliv inhibitorů vybraných signálních molekul na expresi výše uvedených genů indukovanou PGE2. Inhibitory MAPK3/1 (U0126) a receptoru epidermálního růstového faktoru (AG1478) signifikantně potlačily expresi *HAS2*, *PTGS2* a *TNFAIP6* indukovanou PGE2 obdobně jako v případě COC kultivovaných s FSH nebo *AREG* – viz příložená publikace (1). Inhibitor PI3K/PKB (LY294002) dramaticky snížil expresi *HAS2* a *TNFAIP6*, ale neměl vliv na expresi *PTGS2*. Podobný vliv inhibitoru PI3K/PKB byl pozorován i při stimulaci FSH nebo *AREG*, při které LY294002 expresi *PTGS2* dokonce zvyšoval – viz příložená publikace (1). Zjištěná data vedla k hypotéze, že zvýšení exprese *PTGS2* po inhibitoru PI3K/PKB představuje kompenzační mechanismus, který má zabezpečit aktivitu PI3K/PKB nezbytnou pro expresi genů spojených s expanzí kumulu (*HAS2* a *TNFAIP6*). Následně bylo zjištěno, že PGE2 je skutečně schopen aktivovat PKB i MAPK3/1.

PGE2 samotný však není schopen indukovat expanzi kumulu ani znovuzahájení meiózy tak efektivně jako FSH. Přestože dochází k aktivaci klíčových signálních molekul a expresi genů spojených s expanzí kumulu, nebyly prokázány statisticky významné rozdíly mezi množstvím hyaluronanu v kontrolních nestimulovaných COC a v COC stimulovaných PGE2. Toto zjištění odpovídá pozorované pouze mírné expanzi kumulu u COC stimulovaných PGE2. Prasečí COC se v tomto ohledu liší od myších COC, u kterých je schopen PGE2 efektivně indukovat expanzi kumulu (Takahashi *et al.*, 2006). Zůstává otázkou, jaké další faktory hrají roli v tomto procesu u prasete. Nicméně pro zodpovězení této otázky je třeba využít jiných experimentálních přístupů, např. mikročipů.

4 Shrnutí

- Byl popsán vliv inhibitorů PKA, PKB, MAPK3/1, EGFR a MAPK14 na meiotické zrání oocytů a expanzi kumulu indukovanou FSH nebo AREG.
- Byly nalezeny rozdíly v genové expresi u kumulárních buněk stimulovaných FSH a AREG. FSH indukuje expresi většího množství genů, mj. i geny kódující důležité transkripční faktory. V budoucnosti by bylo vhodné podobnou studii provést i u kumulárních buněk stimulovaných PGE2, eventuálně pre-kultivovaných s látkami zvyšujícími hladinu cAMP v buňce (např. dbcAMP, CNP). Velmi vhodné by bylo i zapojení proteomických přístupů.
- Natriuretický peptid C je schopen zvýšit koncentraci cGMP v prasečích COC, avšak FSH je schopen jeho efekt účinně inhibovat, je-li do média přidán současně s CNP. Analogy cGMP jsou schopny inhibovat spontánní meiotické zrání prasečích oocytů kultivovaných jako COC, ale jejich efekt lze zcela zrušit přidáním FSH. CNP ani analogy cGMP nemají vliv na expanzi kumulu, expresi genů s ní spojených ani na fosforylaci MAPK3/1.
- Byly sumarizovány poznatky o významu MAPK3/1 pro zrání oocytů a expanzi kumulu formou přehledového článku.
- Prostaglandin E2 je schopen indukovat mírnou expanzi kumulu, aktivaci PKB a MAPK3/1 a expresi genů spojených s expanzí kumulu a *EREG*. Podobně jako v případě FSH- a AREG-stimulované exprese došlo ke snížení množství *HAS2* a *TNFAIP6* mRNA při kultivaci s inhibitorem PI3K/PKB, ale exprese *PTGS2* nebyla inhibitorem ovlivněna, což naznačuje kompenzační mechanismus, kterým dochází k udržování aktivity PKB. Množství hyaluronanu v COC kultivovaných s PGE2 není signifikantně větší než u kontrolních COC. Prostaglandin E2 rovněž stimuluje znovuzahájení meiózy, ale nikoliv tak efektivně jako FSH.

5 Citovaná literatura

- Appeltant R, Beek J, Vandenberghe L, Maes D, Van Soom A. 2015. Increasing the cAMP concentration during in vitro maturation of pig oocytes improves cumulus maturation and subsequent fertilization in vitro. *Theriogenology* 83(3):344-352.
- Beier JI, Arteel GE. 2012. Alcoholic liver disease and the potential role of plasminogen activator inhibitor-1 and fibrin metabolism. *Exp Biol Med (Maywood)* 237(1):1-9.
- Ben-Ami I, Freimann S, Armon L, Dantes A, Strassburger D, Friedler S, Raziel A, Seger R, Ron-El R, Amsterdam A. 2006. PGE2 up-regulates EGF-like growth factor biosynthesis in human granulosa cells: new insights into the coordination between PGE2 and LH in ovulation. *Mol Hum Reprod* 12(10):593-599.
- Bertolin K, Gossen J, Schoonjans K, Murphy BD. 2014. The orphan nuclear receptor Nr5a2 is essential for luteinization in the female mouse ovary. *Endocrinology* 155(5):1931-1943.
- Bouton MC, Boulaftali Y, Richard B, Arocas V, Michel JB, Jandrot-Perrus M. 2012. Emerging role of serpinE2/protease nexin-1 in hemostasis and vascular biology. *Blood* 119(11):2452-2457.
- Cao M, Buratini J, Lussier JG, Carrière PD, Price CA. 2006. Expression of protease nexin-1 and plasminogen activators during follicular growth and the periovulatory period in cattle. *Reproduction* 131(1):125-137.
- Dierich A, Sairam MR, Monaco L, Fimia GM, Gansmuller A, LeMeur M, Sassone-Corsi P. 1998. Impairing follicle-stimulating hormone (FSH) signaling in vivo: targeted disruption of the FSH receptor leads to aberrant gametogenesis and hormonal imbalance. *Proc Natl Acad Sci U S A* 95(23):13612-13617.
- Duggavathi R, Volle DH, Matakı C, Antal MC, Messaddeq N, Auwerx J, Murphy BD, Schoonjans K. 2008. Liver receptor homolog 1 is essential for ovulation. *Genes Dev* 22(14):1871-1876.

Dunning KR, Lane M, Brown HM, Yeo C, Robker RL, Russell DL. 2007. Altered composition of the cumulus-oocyte complex matrix during in vitro maturation of oocytes. *Hum Reprod* 22(11):2842-2850.

Egbert JR, Shuhaibar LC, Edmund AB, Van Helden DA, Robinson JW, Uliasz TF, Baena V, Geerts A, Wunder F, Potter LR, Jaffe LA. 2014. Dephosphorylation and inactivation of NPR2 guanylyl cyclase in granulosa cells contributes to the LH-induced decrease in cGMP that causes resumption of meiosis in rat oocytes. *Development* 141(18):3594-3604.

Eppig JJ. 1981. Prostaglandin E2 stimulates cumulus expansion and hyaluronic acid synthesis by cumuli oophori isolated from mice. *Biol Reprod* 25(1):191-195.

Eppig JJ, Wigglesworth K, Pendola F, Hirao Y. 1997. Murine oocytes suppress expression of luteinizing hormone receptor messenger ribonucleic acid by granulosa cells. *Biol Reprod* 56(4):976-984.

Fan HY, Liu Z, Shimada M, Sterneck E, Johnson PF, Hedrick SM, Richards JS. 2009. MAPK3/1 (ERK1/2) in ovarian granulosa cells are essential for female fertility. *Science* 324(5929):938-941.

Fülöp C, Szántó S, Mukhopadhyay D, Bárdos T, Kamath RV, Rugg MS, Day AJ, Salustri A, Hascall VC, Glant TT, Mikecz K. 2003. Impaired cumulus mucification and female sterility in tumor necrosis factor-induced protein-6 deficient mice. *Development* 130(10):2253-2261.

Hizaki H, Segi E, Sugimoto Y, Hirose M, Saji T, Ushikubi F, Matsuoka T, Noda Y, Tanaka T, Yoshida N, Narumiya S, Ichikawa A. 1999. Abortive expansion of the cumulus and impaired fertility in mice lacking the prostaglandin E receptor subtype EP(2). *Proc Natl Acad Sci U S A* 96(18):10501-10506.

Hsieh M, Thao K, Conti M. 2011. Genetic dissection of epidermal growth factor receptor signaling during luteinizing hormone-induced oocyte maturation. *PLoS One* 6(6):e21574.

Hunter MG. 2000. Oocyte maturation and ovum quality in pigs. *Rev Reprod* 5(2):122-130.

Kalous J, Kubelka M, Solc P, Susor A, Motlík J. 2009. AKT (protein kinase B) is implicated in meiotic maturation of porcine oocytes. *Reproduction* 138(4):645-654.

Kawashima I, Okazaki T, Noma N, Nishibori M, Yamashita Y, Shimada M. 2008. Sequential exposure of porcine cumulus cells to FSH and/or LH is critical for appropriate expression of steroidogenic and ovulation-related genes that impact oocyte maturation in vivo and in vitro. *Reproduction* 136(1):9-21.

Laforest MF, Pouliot E, Guéguen L, Richard FJ. 2005. Fundamental significance of specific phosphodiesterases in the control of spontaneous meiotic resumption in porcine oocytes. *Mol Reprod Dev* 70(3):361-372.

Lei ZM, Mishra S, Zou W, Xu B, Foltz M, Li X, Rao CV. 2001. Targeted disruption of luteinizing hormone/human chorionic gonadotropin receptor gene. *Mol Endocrinol* 15(1):184-200.

Li M, Karakji EG, Xing R, Fryer JN, Carnegie JA, Rabbani SA, Tsang BK. 1997. Expression of urokinase-type plasminogen activator and its receptor during ovarian follicular development. *Endocrinology* 138(7):2790-2799.

Li Q, Jimenez-Krassel F, Kobayashi Y, Ireland JJ, Smith GW. 2006. Effect of intrafollicular indomethacin injection on gonadotropin surge-induced expression of select extracellular matrix degrading enzymes and their inhibitors in bovine preovulatory follicles. *Reproduction* 131(3):533-543.

Lincoln AJ, Wickramasinghe D, Stein P, Schultz RM, Palko ME, De Miguel MP, Tessarollo L, Donovan PJ. 2002. Cdc25b phosphatase is required for resumption of meiosis during oocyte maturation. *Nat Genet* 30(4):446-449.

Liu J, Carrière PD, Doré M, Sirois J. 1997. Prostaglandin G/H synthase-2 is expressed in bovine preovulatory follicles after the endogenous surge of luteinizing hormone. *Biol Reprod* 57(6):1524-1531.

Liu YX, Hsueh AJ. 1987. Plasminogen activator activity in cumulus-oocyte complexes of gonadotropin-treated rats during the periovulatory period. *Biol Reprod* 36(4):1055-1062.

Liu YX, Liu K, Feng Q, Hu ZY, Liu HZ, Fu GQ, Li YC, Zou RJ, Ny T. 2004. Tissue-type plasminogen activator and its inhibitor plasminogen activator inhibitor type 1 are coordinately expressed during ovulation in the rhesus monkey. *Endocrinology* 145(4):1767-1775.

Liu YX, NY T, Sarkar D, Loskutoff D, Hsueh AJ. 1986. Identification and regulation of tissue plasminogen activator activity in rat cumulus-oocyte complexes. *Endocrinology* 119(4):1578-1587.

Lu CH, Lee RK, Hwu YM, Lin MH, Yeh LY, Chen YJ, Lin SP, Li SH. 2013. Involvement of the serine protease inhibitor, SERPINE2, and the urokinase plasminogen activator in cumulus expansion and oocyte maturation. *PLoS One* 8(8):e74602.

Lugnier C. 2006. Cyclic nucleotide phosphodiesterase (PDE) superfamily: a new target for the development of specific therapeutic agents. *Pharmacol Ther* 109(3):366-398.

Markosyan N, Duffy DM. 2009. Prostaglandin E2 acts via multiple receptors to regulate plasminogen-dependent proteolysis in the primate periovulatory follicle. *Endocrinology* 150(1):435-444.

Masciarelli S, Horner K, Liu C, Park SH, Hinckley M, Hockman S, Nedachi T, Jin C, Conti M, Manganiello V. 2004. Cyclic nucleotide phosphodiesterase 3A-deficient mice as a model of female infertility. *J Clin Invest* 114(2):196-205.

Mehlmann LM, Saeki Y, Tanaka S, Brennan TJ, Evsikov AV, Pendola FL, Knowles BB, Eppig JJ, Jaffe LA. 2004. The Gs-linked receptor GPR3 maintains meiotic arrest in mammalian oocytes. *Science* 306(5703):1947-1950.

Nogueira D, Albano C, Adriaenssens T, Cortvrindt R, Bourgain C, Devroey P, Smits J. 2003. Human oocytes reversibly arrested in prophase I by phosphodiesterase type 3 inhibitor in vitro. *Biol Reprod* 69(3):1042-1052.

Norris RP, Freudzon M, Mehlmann LM, Cowan AE, Simon AM, Paul DL, Lampe PD, Jaffe LA. 2008. Luteinizing hormone causes MAP kinase-dependent phosphorylation and closure of connexin 43 gap junctions in mouse ovarian follicles: one of two paths to meiotic resumption. *Development* 135(19):3229-3238.

Park JY, Su YQ, Ariga M, Law E, Jin SL, Conti M. 2004. EGF-like growth factors as mediators of LH action in the ovulatory follicle. *Science* 303(5658):682-684.

Pirino G, Wescott MP, Donovan PJ. 2009. Protein kinase A regulates resumption of meiosis by phosphorylation of Cdc25B in mammalian oocytes. *Cell Cycle* 8(4):665-670.

Prochazka R, Kalab P, Nagyova E. 2003. Epidermal growth factor-receptor tyrosine kinase activity regulates expansion of porcine oocyte-cumulus cell complexes in vitro. *Biol Reprod* 68(3):797-803.

Robinson JW, Zhang M, Shuhaibar LC, Norris RP, Geerts A, Wunder F, Eppig JJ, Potter LR, Jaffe LA. 2012. Luteinizing hormone reduces the activity of the NPR2 guanylyl cyclase in mouse ovarian follicles, contributing to the cyclic GMP decrease that promotes resumption of meiosis in oocytes. *Dev Biol* 366(2):308-316.

Rugg MS, Willis AC, Mukhopadhyay D, Hascall VC, Fries E, Fülöp C, Milner CM, Day AJ. 2005. Characterization of complexes formed between TSG-6 and inter-alpha-inhibitor that act as intermediates in the covalent transfer of heavy chains onto hyaluronan. *J Biol Chem* 280(27):25674-25686.

Salustri A, Ulisse S, Yanagishita M, Hascall VC. 1990. Hyaluronic acid synthesis by mural granulosa cells and cumulus cells in vitro is selectively stimulated by a factor produced by oocytes and by transforming growth factor-beta. *J Biol Chem* 265(32):19517-19523.

- Santiquet NW, Develle Y, Laroche A, Robert C, Richard FJ. 2012. Regulation of gap-junctional communication between cumulus cells during in vitro maturation in swine, a gap-FRAP study. *Biol Reprod* 87(2):46.
- Sasseville M, Côté N, Gagnon MC, Richard FJ. 2008. Up-regulation of 3'5'-cyclic guanosine monophosphate-specific phosphodiesterase in the porcine cumulus-oocyte complex affects steroidogenesis during in vitro maturation. *Endocrinology* 149(11):5568-5576.
- Sasseville M, Côté N, Guillemette C, Richard FJ. 2006. New insight into the role of phosphodiesterase 3A in porcine oocyte maturation. *BMC Dev Biol* 6:47.
- Scarchilli L, Camaioni A, Bottazzi B, Negri V, Doni A, Deban L, Bastone A, Salvatori G, Mantovani A, Siracusa G, Salustri A. 2007. PTX3 interacts with inter-alpha-trypsin inhibitor: implications for hyaluronan organization and cumulus oophorus expansion. *J Biol Chem* 282(41):30161-30170.
- Sela-Abramovich S, Galiani D, Nevo N, Dekel N. 2008. Inhibition of rat oocyte maturation and ovulation by nitric oxide: mechanism of action. *Biol Reprod* 78(6):1111-1118.
- Takahashi T, Morrow JD, Wang H, Dey SK. 2006. Cyclooxygenase-2-derived prostaglandin E(2) directs oocyte maturation by differentially influencing multiple signaling pathways. *J Biol Chem* 281(48):37117-37129.
- Tamba S, Yodoi R, Segi-Nishida E, Ichikawa A, Narumiya S, Sugimoto Y. 2008. Timely interaction between prostaglandin and chemokine signaling is a prerequisite for successful fertilization. *Proc Natl Acad Sci U S A* 105(38):14539-14544.
- Tao JY, Fu Z, Zhang ML, Xia G, Lei L, Wu ZL. 2005. Nitric oxide influences the meiotic maturation of porcine oocytes cultured in hypoxanthine-supplemented medium. *J Anim Physiol Anim Nutr (Berl)* 89(1-2):38-44.
- Thomas RE, Armstrong DT, Gilchrist RB. 2002. Differential effects of specific phosphodiesterase isoenzyme inhibitors on bovine oocyte meiotic maturation. *Dev Biol* 244(2):215-225.

Tilley SL, Audoly LP, Hicks EH, Kim HS, Flannery PJ, Coffman TM, Koller BH. 1999. Reproductive failure and reduced blood pressure in mice lacking the EP2 prostaglandin E2 receptor. *J Clin Invest* 103(11):1539-1545.

Wathlet S, Adriaenssens T, Segers I, Verheyen G, Van de Velde H, Coucke W, Ron El R, Devroey P, Smits J. 2011. Cumulus cell gene expression predicts better cleavage-stage embryo or blastocyst development and pregnancy for ICSI patients. *Hum Reprod* 26(5):1035-1051.

Wei Q, Zhou C, Yuan M, Miao Y, Zhao X, Ma B. 2015. Effect of C-type natriuretic peptide on maturation and developmental competence of immature mouse oocytes in vitro. *Reprod Fertil Dev*. <http://dx.doi.org/10.1371/journal.pone.0132318>

Yamashita Y, Kawashima I, Yanai Y, Nishibori M, Richards JS, Shimada M. 2007. Hormone-induced expression of tumor necrosis factor alpha-converting enzyme/A disintegrin and metalloprotease-17 impacts porcine cumulus cell oocyte complex expansion and meiotic maturation via ligand activation of the epidermal growth factor receptor. *Endocrinology* 148(12):6164-6175.

Yamashita Y, Okamoto M, Kawashima I, Okazaki T, Nishimura R, Gunji Y, Hishinuma M, Shimada M. 2011. Positive feedback loop between prostaglandin E2 and EGF-like factors is essential for sustainable activation of MAPK3/1 in cumulus cells during in vitro maturation of porcine cumulus oocyte complexes. *Biol Reprod* 85(5):1073-1082.

Yang CR, Wei Y, Qi ST, Chen L, Zhang QH, Ma JY, Luo YB, Wang YP, Hou Y, Schatten H, Liu ZH, Sun QY. 2012. The G protein coupled receptor 3 is involved in cAMP and cGMP signaling and maintenance of meiotic arrest in porcine oocytes. *PLoS One* 7(6):e38807.

Yang L, Wei Q, Ge J, Zhao X, Ma B. 2016. MAPK3/1 is conducive to luteinizing hormone-mediated C-type natriuretic peptide decrease in bovine granulosa cells. *J Reprod Dev* 62(2):137-142.

Zamah AM, Hsieh M, Chen J, Vigne JL, Rosen MP, Cedars MI, Conti M. 2010. Human oocyte maturation is dependent on LH-stimulated accumulation of the

epidermal growth factor-like growth factor, amphiregulin. *Hum Reprod* 25(10):2569-2578.

Zhang J, Wei Q, Cai J, Zhao X, Ma B. 2015. Effect of C-Type Natriuretic Peptide on Maturation and Developmental Competence of Goat Oocytes Matured In Vitro. *PLoS One* 10(7):e0132318.

Zhang M, Tao Y, Zhou B, Xie H, Wang F, Lei L, Huo L, Sun Q, Xia G. 2005. Atrial natriuretic peptide inhibits the actions of FSH and forskolin in meiotic maturation of pig oocytes via different signalling pathways. *J Mol Endocrinol* 34(2):459-472.

6 Seznam publikací

- (1) Procházka, R., Blaha, M., and Němcová, L. (2012). Signaling pathways regulating FSH- and amphiregulin-induced meiotic resumption and cumulus cell expansion in the pig. *Reproduction* 144, 535-546. (IF 2012: 3,555)
- (2) Blaha, M., Němcová, L., Kepková, K.V., Vodička, P., Procházka, R. (2015). Gene expression analysis of pig cumulus-oocyte complexes stimulated in vitro with follicle stimulating hormone or epidermal growth factor-like peptides. *Reproductive Biology and Endocrinology* 13 (1), art. no. 113, p. 1. (IF 2015: 2,226)
- (3) Blaha, M., Němcová, L., Procházka, R. (2015). Cyclic guanosine monophosphate does not inhibit gonadotropin-induced activation of mitogen-activated protein kinase 3/1 in pig cumulus-oocyte complexes. *Reproductive Biology and Endocrinology* 13 (1), art. no. 1. (IF 2015: 2,226)
- (4) Procházka, R., Blaha, M. (2015). Regulation of mitogen-activated protein kinase 3/1 activity during meiosis resumption in mammals. *Journal of Reproduction and Development* 61, 495-502. (IF 2015: 1,515)
- (5) Blaha, M., Procházka, R., Adámková, K., Nevoral, J., Němcová, L. Prostaglandin E2 stimulates expression of cumulus expansion-related genes in pig: the role of protein kinase B. – v recenzním řízení

7 Seznam prezentací

1. R. Procházka, L. Němcová, M. Blaha (2011) Signaling pathways regulating FSH- and amphiregulin-induced maturation of pig cumulus-oocyte complexes in vitro. In: Annual Conference of the Society for Reproduction and Fertility. Brighton, July 11-13, p. 36.
2. R. Procházka, M. Blaha, L. Němcová (2011) Potential of EGF-like peptides to improve culture of pig cumulus-oocyte complexes in vitro. In: 27 th Scientific Meeting of European Embryo Transfer Society. Chester, September 8-11, p. 218.
3. R. Procházka, M. Blaha, L. Němcová (2012) The role of protein kinase A and mitogen-activated protein kinases 3/1 and 14 in regulation of meiotic resumption of pig cumulus-oocyte complexes. Human Reproduction 27, Supplement 1, pp i245-i246.
4. M. Blaha, R. Procházka, L. Němcová (2012) Cyclic guanosine monophosphate does not inhibit mitogen-activated protein kinase signaling and expression of cumulus expansion-related genes in porcine cumulus-oocyte complexes. In: Ovarian Club II The fertilization process of the oocyte and embryo development in relation to various clinical conditions. Prague, Czech Republic, November 8-11, <http://www.comtecmed.com/OC/2012/>.
5. L. Němcová, M. Blaha, K. Kepková-Vodičková, P. Vodička, R. Procházka (2013) Gene expression profiles of pig cumulus-oocyte complexes cultured in vitro with follicle stimulating hormone or epidermal growth factor-like peptides. In: 4th Mammalian Embryo Genomics meeting. Quebec, Canada, October 9-11, p.60. (poster)
6. R. Procházka, M. Blaha, L. Němcová (2013) Effect of cGMP analogues on in vitro maturation of pig cumulus-oocyte complexes. In: Ovarian Club III The inverse pyramid: Regulating follicle number and oocyte quality. Paris, France, November 14-16; <http://www.comtecmed.com/OC/2012/>, P 57.
7. M. Blaha, L. Němcová, R. Procházka (2014) Prostaglandin E2 induces expression of epiregulin and cumulus-expansion related genes in porcine

cumulus-oocyte complexes. In: Annual Conference of the Society for Reproduction and Fertility. Edinburgh, September 1-2, p. 12.

8 Seznam použitých zkratk

8-Br-cGMP	cyklický 8-bromoguanosin-3',5'-monofosfát
8-CPT-cGMP	cyklický 8-(4-chlorofenylthio)guanosin-3',5'-monofosfát
ADAMTS1	<i>a disintegrin and metalloproteinase with thrombospondin motifs 1</i>
AG1478	inhibitor kinázové aktivity receptoru epidermálního růstového faktoru (ERBB1)
AIF	impact factor korigovaný na počet autorů
AREG	amfiregulin
cAMP	cyklický adenosin-3',5'-monofosfát
CDC25B	<i>cell-division cycle 25B</i> , fosfatáza aktivující MPF
CDK1	<i>cyclin-dependent kinase 1</i>
CEBPB	<i>CCAAT/enhancer-binding protein β</i> , transkripční faktor
cGMP	cyklický guanosin-3',5'-monofosfát
CNP	natriuretický peptid C
COC	komplex oocyt-kumulus
dbcAMP	dibutyryl-cAMP
ECM	extracelulární matrix
EGF	<i>epidermal growth factor</i>
ERBB1	<i>v-erb-b erythroblastic leukemia viral oncogene homolog 1</i> , receptor EGF
EREG	epiregulin
et al.	<i>et alii</i> , a kolektiv
F3	(koagulační) faktor III
FOS	transkripční faktor
FOXO3	<i>forkhead box O3</i> , transkripční faktor
FSH	folikuly stimulující hormon
GJA1	<i>gap junction α1 protein</i> , konexin 43
GPR3	<i>G-protein coupled receptor 3</i>
GV	<i>germinal vesicle</i> , zárodečný váček
GVBD	<i>germinal vesicle breakdown</i> , rozpad zárodečného váčku
h	hodina
H89	inhibitor PKA
HAS2	hyaluronansyntáza 2
IBMX	3-isobutyl-1-methylxanthin, inhibitor PDE3A
ID1	<i>inhibitor of differentiation 1</i> , transkripční faktor
ID3	<i>inhibitor of differentiation 3</i> , transkripční faktor
IF	impact factor
KIF	kumulovaný impact factor
LH	luteinizační hormon
LY294002	inhibitor PI3K
MAPK14	<i>mitogen-activated protein kinase 14</i>
MAPK2K1	<i>mitogen-activated protein kinase kinase 1/2</i>
MAPK3/1	<i>mitogen-activated protein kinase 3/1</i>
MGC	<i>mural granulosa cells</i> , buňky stěnové granulózy
MI	metafáze I
MII	metafáze II

MPF	<i>mitosis/meiosis/maturation-promoting factor</i> , komplex CDK1+cyklin B
mRNA	mediátorová RNA
MVDr.	doktor veterinárního lékařství
NPPC	<i>natriuretic peptide precursor C</i>
NPR2	<i>natriuretic peptide receptor 2</i>
NR5A2	<i>nuclear receptor subfamily 5, group A, member 2</i> ; transkripční faktor
PAI1	<i>plasminogen activator inhibitor-1</i> , SERPINE1
PAI2	<i>plasminogen activator inhibitor-2</i> , SERPINE2
PDE3A	fosfodiesteráza 3A
PDE5	fosfodiesteráza 5
PGC	primordiální zárodečné buňky
PGE2	prostaglandin E2
PI3K	fosfoinositid-3-kináza
PKA	proteinkináza A
PKB	proteinkináza B
PLAT	<i>tissue plasminogen activator</i> , též tPA
PLAU	<i>plasminogen activator, urokinase</i> ; též UPA
PTGER2	<i>prostaglandin E receptor 2 (subtype EP2)</i>
PTGS2	<i>prostaglandin-endoperoxide synthase 2</i>
PTX3	<i>pentraxin 3</i>
qRT-PCR	kvantitativní polymerázová řetězová reakce
SB203580	inhibitor MAPK14
SDC4	syndecan-4
SERPINE1	<i>plasminogen activator inhibitor-1</i> , PAI1
SERPINE2	<i>plasminogen activator inhibitor-2</i> , PAI2
SNAP	S-nitroso-N-acetylpenicilamin, donor oxidu dusnatého
TFPI2	<i>tissue factor pathway inhibitor 2</i>
TNFAIP6	<i>tumor necrosis factor alpha-induced protein 6</i>
tPA	<i>tissue plasminogen activator</i> , též PLAT
U0126	inhibitor MAP2K1/2, v důsledku toho i MAPK3/1
UK	<i>United Kingdom</i>
uPA	<i>plasminogen activator, urokinase</i> , též PLAU
USA	<i>United States of America</i>

9 Životopis

Jméno: Milan Blaha
Narozen: 7. března 1988 v Havlíčkově Brodě
Občanství: Česká republika

Vzdělání:

2007-2010 Bakalářské studium, Přírodovědecká fakulta UK:
Molekulární biologie a biochemie organismů

2010-2012 Navazující magisterské studium, Přírodovědecká fakulta UK:
Genetika, molekulární biologie, virologie; specializace Molekulární biologie a genetika eukaryot

2010-2014 Navazující magisterské studium, Pedagogická fakulta UK:
Učitelství všeobecně vzdělávacích předmětů pro ZŠ a SŠ biologie, chemie

2012- dosud Doktorandské studium, Přírodovědecká fakulta UK:
Vývojová a buněčná biologie

Zaměstnání

2012-dosud Ústav živočišné fyziologie a genetiky AV ČR, v.v.i.

Jazykové znalosti: angličtina

10 Přílohy

1. Procházka, R., Blaha, M., and Němcová, L. (2012). Signaling pathways regulating FSH- and amphiregulin-induced meiotic resumption and cumulus cell expansion in the pig. *Reproduction* 144, 535-546. (IF 2012: 3,555)
2. Blaha, M., Němcová, L., Kepková, K.V., Vodička, P., Procházka, R. (2015). Gene expression analysis of pig cumulus-oocyte complexes stimulated in vitro with follicle stimulating hormone or epidermal growth factor-like peptides. *Reproductive Biology and Endocrinology* 13 (1), art. no. 113, p. 1. (IF 2015: 2,226)
 - Seznam primerů použitých pro qRT-PCR
 - Seznam genů rozdílně exprimovaných v FSH- a v AREG+EREG-stimulovaných buňkách
3. Blaha, M., Němcová, L., Procházka, R. (2015). Cyclic guanosine monophosphate does not inhibit gonadotropin-induced activation of mitogen-activated protein kinase 3/1 in pig cumulus-oocyte complexes. *Reproductive Biology and Endocrinology* 13 (1), art. no. 1. (IF 2015: 2,226)
4. Procházka, R., Blaha, M. (2015). Regulation of mitogen-activated protein kinase 3/1 activity during meiosis resumption in mammals. *Journal of Reproduction and Development* 61, 495-502. (IF 2015: 1,515)
5. Blaha, M., Procházka, R., Adámková, K., Nevoral, J., Němcová, L. Prostaglandin E2 stimulates expression of cumulus expansion-related genes in pig: the role of protein kinase B. – v recenzním řízení