

Svoluji k zapůjčení své diplomové práce ke studijním účelům a prosím, aby byla vedena přesná evidence vypůjčovateli. Převzaté údaje je vypůjčovatel povinen řádně ocitovat.

Univerzita Karlova v Praze

Přírodovědecká fakulta

Studijní program: Biologie

Studijní obor: Genetika, molekulární biologie a virologie



Bc. Milan Blaha

Signální dráhy a geny regulující u prasete zrání oocytů a expanzi kumulu indukované gonadotropiny

Signaling pathways and genes regulating gonadotropin-induced maturation of porcine oocytes and cumulus expansion

Diplomová práce

Vedoucí závěrečné práce: Ing. Lucie Němcová, Ph.D.

Praha, 2012

Vedoucí diplomové práce:

Ing. Lucie Němcová, Ph.D.

Laboratoř vývojové biologie

Ústav živočišné fyziologie a genetiky AV ČR, v.v.i.

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, dne 27. 8. 2012

Podpis

PODĚKOVÁNÍ

Poděkování patří především vedoucí diplomové práce paní Ing. Lucii Němcové, Ph.D. za odborné vedení a školení v oblasti molekulární biologie, cenné diskuze a v neposlední řadě i za trpělivost. Rovněž bych rád poděkoval panu MVDr. Radku Procházkovi, CSc. za odborné školení v oblasti izolace a kultivace prasečích oocytů, finanční zabezpečení práce a za cenné diskuze i připomínky k textu.

Diplomová práce byla vypracována v letech 2010-2012 za podpory grantu P502/11/0593 („Signální dráhy a geny regulující gonadotropiny indukované zrání oocyt-kumulárních komplexů prasete“) Grantové agentury ČR a grantu QI101A166 („Biotechnologie v chovu a šlechtění prasat“) Ministerstva zemědělství ČR.

ABSTRAKT

V podmínkách *in vitro* jsou meotické zrání prasečích oocytů a expanze kumulu indukovány FSH a peptidy rodiny EGF (AREG a EREG). FSH a tyto peptidy způsobují expresi genů spojených s expanzí kumulu (*HAS2*, *PTGS2* a *TNFAIP6*). Za účelem zjistit signální dráhy, které kontrolují expanzi kumulu indukovanou FSH nebo AREG, prasečí komplexy oocyt-kumulus (COC) byly ošetřeny specifickými inhibitory proteinkináz. Inhibitory MAPK3/1, MAPK14 a ERBB1 signifikantně redukovaly expresi *HAS2*, *PTGS2* a *TNFAIP6*. Tyto inhibitory rovněž snížily expresi *AREG* a *EREG* indukovanou FSH a LH v buňkách stěnové granulózy. Inhibitor PKA překvapivě neměl efekt na expresi *AREG* v COC, ale snížil expresi *TNFAIP6* indukovanou AREG. Inhibitor PI3K zvýšil expresi *AREG* a *PTGS2*, ale snížil expresi *EREG*, *HAS2* a *TNFAIP6*. Anlog cGMP (8-CPT-cGMP) neovlivnil expresi genů spojených s expanzí kumulu. Nicméně blokoval spontánní meiotickou maturaci prasečích oocytů a jeho efekt byl eliminován FSH.

Klíčová slova: expanze kumulu, geny spojené s expanzí kumulu, meiotická maturace, FSH, amfiregulin, cGMP

ABSTRACT

In vitro, meiotic maturation of porcine oocytes and cumulus expansion are induced by FSH and EGF-like peptides AREG and EREG. FSH and EGF-like peptides induce expression of cumulus expansion-related genes (*HAS2*, *PTGS2* and *TNFAIP6*). To define signaling pathways that control FSH- and AREG-induced cumulus expansion, porcine cumulus-oocyte complexes were treated with specific protein kinase inhibitors. Inhibitors of MAPK3/1, MAPK14 and ERBB1 significantly reduced both FSH- and AREG-induced expression of *HAS2*, *PTGS2* and *TNFAIP6*. These inhibitors decreased FSH/LH-induced expression of *AREG* and *EREG* in mural granulosa cells. Surprisingly, inhibitor of PKA had no effect on *AREG* expression in cumulus-oocyte complexes but the inhibitor decreased expression of *TNFAIP6* induced by AREG. Inhibitor of PI3K increased expression levels of *AREG* and *PTGS2* but *EREG*, *HAS2* and *TNFAIP6* were reduced. Expression levels of the cumulus expansion-related genes were not affected by an analog of cGMP (8-CPT-cGMP). However, 8-CPT-cGMP blocked spontaneous *in vitro* meiotic maturation of porcine oocytes and its effect was abolished by FSH.

Key words: cumulus expansion, cumulus expansion-related genes, meiotic maturation, FSH, amphiregulin, cGMP

SEZNAM POUŽITÝCH ZKRATEK

8-Br-cGMP	cyklický 8-bromoguanosin-3',5'-monofosfát
8-CPT-cGMP	cyklický 8-(4-chlorofenylthio)guanosin-3',5'-monofosfát
ACTB	β-aktin
ADAM17	<i>a disintegrin and metalloproteinase 17</i> , proteáza
ADAM19	<i>a disintegrin and metalloproteinase 19</i> , proteáza
ADAMTS1	<i>a disintegrin and metalloproteinase with thrombospondin motifs 1</i>
ADCY3	adenylátcykláza 3
ADCY6	adenylátcykláza 6
ADCY9	adenylátcykláza 9
AG1478	inhibitor kinázové aktivity ERBB1
AICAR	5-aminoimidazol-4-karboxamidribotid, aktivátor AMPK
AKAP1	<i>A kinase anchor protein 1</i>
Ala	alanin
AMP	adenosin-5'-monofosfát
AMPK	proteinkináza aktivovaná adenosinmonofosfátem
AREG	amfiregulin
ASNS	asparaginsyntetáza
AV ČR	Akademie věd České republiky
BAY73-6691	inhibitor PDE9A
Bc.	bakalář
BCL2L1	<i>BCL2-like 1</i>
BMP15	<i>bone morphogenetic protein 15</i>
BSA	hovězí sérový albumin
BTC	betacelulin
Ca ²⁺	vápenatý kationt
cAMP	cyklický adenosin-3',5'-monofosfát
CBP	<i>CREB binding protein</i> , koaktivátor CREB
CD44	<i>cluster of differentiation 44</i> , receptor vážící hyaluronan
CDC25B	<i>cell-division cycle 25B</i> , fosfatáza aktivující MPF
CDK1	<i>cyclin-dependent kinase 1</i>
CEBPA	<i>CCAAT/enhancer-binding protein α</i> , transkripční faktor
<i>Cebpa/b^{gc/-}</i>	kondicionální eliminace („ <i>conditional gene knockout</i> “) <i>Cebpa</i> a <i>Cebpb</i> v granulózních buňkách
<i>Cebpa^{gc/-}</i>	kondicionální eliminace („ <i>conditional gene knockout</i> “) <i>Cebpa</i> v granulózních buňkách
CEBPB	<i>CCAAT/enhancer-binding protein β</i> , transkripční faktor
<i>Cebpb^{gc/-}</i>	kondicionální eliminace („ <i>conditional gene knockout</i> “) <i>Cebpb</i> v granulózních buňkách
cGMP	cyklický guanosin-3',5'-monofosfát
CITED2	<i>Cbp/p300-interacting transactivator 2</i>
COC	<i>cumulus-oocyte complex</i>
CREB	<i>cAMP response element-binding</i> , transkripční faktor
CSc.	kandidát věd
CYP11A1	20,22-desmoláza

CYP17A1	17 α -hydroxyláza
CYP19A1	aromatáza
ČR	Česká republika
dbcAMP	dibutyryl-cAMP
DES	diethylstilbestrol, syntetický nesteroidní estrogen
DFMO	α -difluoromethylornitin, inhibitor ornitindekarboxylázy
DMSO	dimethylsulfoxid
dNTP	deoxyribonukleotidtrifosfát
E2	17 β -estradiol
eCG	koňský choriový gonadotropin
EDTA	kyselina ethylendiamintetraoctová
EGF	<i>epidermal growth factor</i>
EGFR	receptor EGF, též ERBB1
ERBB1	<i>v-erb-b erythroblastic leukemia viral oncogene homolog 1</i>
ERBB2	<i>v-erb-b erythroblastic leukemia viral oncogene homolog 2</i>
ERBB3	<i>v-erb-b erythroblastic leukemia viral oncogene homolog 3</i>
ERBB4	<i>v-erb-b erythroblastic leukemia viral oncogene homolog 4</i>
EREG	epiregulin
ESR1	<i>estrogen receptor 1</i>
ESR2	<i>estrogen receptor 2</i>
<i>et al.</i>	<i>et alii</i> , a kolektiv
FCS	fetální hovězí sérum
FGF8	<i>fibroblast growth factor 8</i>
FSH	folikuly stimulující hormon
FSHR	receptor FSH
GDF9	<i>growth differentiation factor-9</i>
G _i	inhibiční G-protein
GJA1	<i>gap junction $\alpha 1$ protein</i> , konexin 43
GJA4	<i>gap junction $\alpha 4$ protein</i> , konexin 37
GMP	guanosinmonofosfát
GP130	glykoprotein 130
GPR12	<i>G-protein coupled receptor 12</i>
GPR3	<i>G-protein coupled receptor 3</i>
GREM1	gremlin1
G _s	stimulační G-protein
GV	<i>germinal vesicle</i> , zárodečný váček
GVBD	<i>germinal vesicle breakdown</i> , rozpad zárodečného váčku
G α _s	α -podjednotka stimulačního G-proteinu
h	hodina
H89	inhibitor PKA
HA	hyaluronan
HAPLN1	<i>hyaluronan and proteoglycan link protein 1</i>
HAS2	hyaluronansyntáza 2
HAS3	hyaluronansyntáza 3

HC	<i>heavy chain</i> , těžký řetězec
hCG	lidský choriový gonadotropin
HEPES	kyselina 4-(2-hydroxyethyl)-1-piperazinethansulfonová
HDAC2	histondeacetyláza 2
HPRT	hypoxantin-guanin-fosforibosyl transferáza
Hz	Hertz
IGF1	<i>insulin-like growth factor 1</i>
IL6	interleukin 6
IL6R	receptor IL6
IL6SR	solubilní receptor IL6
Ing.	inženýr
INHBB	inhibin
INSL3	<i>insulin-like 3</i>
IU	mezinárodní jednotka
IVF	<i>in vitro</i> fertilizace
I α I	inter- α -trypsin inhibitor
JAKs	rodina Janusových kináz
KG-501	inhibitor interakce CREB a CBP
KT5720	inhibitor PKA
KT5823	inhibitor PRKG
LCGR	receptor LH
LH	luteinizační hormon
L-NAME	N ^o -nitro-L-arginin methylester, inhibitor NO-syntáz
LY294002	inhibitor PI3K
M-199	kultivační médium
MAP2K1/2	<i>mitogen-activated protein kinase kinase 1/2</i>
MAPK14	<i>mitogen-activated protein kinase 14</i>
<i>Mapk14^{gc/-}</i>	kondicionální eliminace („ <i>conditional gene knockout</i> “) <i>Mapk14</i> v granulózních buňkách
MAPK3/1	<i>mitogen-activated protein kinase 3/1</i>
<i>Mapk3/1^{gc/-}</i>	kondicionální eliminace („ <i>conditional gene knockout</i> “) <i>Mapk3/1</i> v granulózních buňkách
MAPK8	<i>mitogen-activated protein kinase 8</i>
MGC	<i>mural granulosa cells</i> , buňky stěnové granulózy
MI	metafáze I
MII	metafáze II
min	minuta
MPF	<i>mitosis/meiosis/maturation-promoting factor</i> , komplex CDK1 s cyklinem B
mRNA	mediátorová RNA
MVDr.	doktor veterinárního lékařství
MYT1	<i>membrane associated tyrosine/threonine protein kinase 1</i>
NFIL3	<i>nuclear factor, interleukin 3-regulated</i>
NF- κ B	<i>nuclear factor κ-light-chain-enhancer of activated B cells</i>
NO	oxid dusnatý

NOS1	NO-syntáza 1
NOS2	NO-syntáza 2
NOS3	NO-syntáza 3
NPPC	<i>natriuretic peptide precursor C</i>
NPR1	<i>natriuretic peptide receptor 1</i>
NPR2	<i>natriuretic peptide receptor 2</i>
NRG1	<i>neuregulin 1</i>
NRIP1	<i>nuclear receptor interacting protein 1</i>
OCT3/4	<i>octamer transcription factor 3/4</i>
ODC1	ornitindekarboxyláza 1
ODPF	<i>oocyte-derived paracrine factors</i>
ODQ	1 <i>H</i> -[1,2,4]oxadiazol[4,3- <i>a</i>]chinoxalin-1-on, inhibitor NO-syntáz
p38MAPK	MAPK14
PBS	<i>phosphate buffered saline</i> , fosfáty pufrovaný fyziologický roztok
PDE3	fosfodiesteráza 3
PDE3A	fosfodiesteráza 3A
PDE3B	fosfodiesteráza 3B
PDE5	fosfodiesteráza 5
PDE5A	fosfodiesteráza 5a
PDE6	fosfodiesteráza 6
PDE6C	fosfodiesteráza 6C
PDE9A	fosfodiesteráza 9A
PGC	primordiální zárodečné buňky
PGE2	prostaglandin E2
PGR	receptor progesteronu
Ph.D.	<i>doktor filozofie</i> , absolvent doktorandského studia
PI3K	fosfoinositid-3-kináza
PKA	proteinkináza A
PKB	proteinkináza B
PKC	proteinkináza C
PMA	<i>phorbol 12-myristate 13-acetate</i> , aktivátor PKC
PMSG	sérový gonadotropin březích klisen
PRKAR2	<i>cAMP-dependent protein kinase type IIa regulatory subunit</i>
PRKG	proteinkináza závislá na cGMP
PRKG2	proteinkináza 2 závislá na cGMP
PTGER2	receptor 2 pro prostaglandin E
PTGS1	prostaglandin-endoperoxidsyntáza 1
PTGS2	prostaglandin-endoperoxidsyntáza 2
PTX3	pentraxin 3
RAF1	<i>v-raf-1 murine leukemia viral oncogene homolog 1</i>
RAP2A	<i>ras-related protein 2a</i>
RAPGEF3	<i>rap guanine nucleotide exchange factor 3</i>
RAS	<i>rat sarcoma</i> , G-protein
RCF	<i>relative centrifugal force</i> , relativní odstředivé zrychlení

RLT	lyzační roztok
RNAi	RNA interference
ROS	<i>reactive oxygen species</i> , reaktivní formy kyslíku
RPE	promývací pufr
RT-PCR	reverzní transkripce, polymerázová řetězová reakce
RUNX1/2	<i>Runt-related transcription factor 1/2</i>
RW1	promývací pufr
RXFP2	<i>relaxin/insulin-like family peptide receptor 2</i>
s	sekunda
SB230580	inhibitor MAPK14
SDS	laurylsulfát sodný
SDS-PAGE	elektroforéza v polyakrylamidovém gelu v přítomnosti SDS
Ser	serin
SFKs	rodina SRC kináz
SIS3	inhibitor fosforylace SMAD3
SMAD2	<i>sma- and mad-related protein 2</i>
SMAD3	<i>sma- and mad-related protein 3</i>
SMOX	sperminoxidáza
SNAP	S-nitroso-N-acetylpenicilamine, donor NO
SNAP25	<i>synaptosomal-associated protein 25</i>
SOX2	<i>SRY-box containing gene 2</i>
SSAT1	spermidin/spermin N ¹ -acetyltransferáza 1
STAR	<i>steroidogenic acute regulatory protein</i>
STAT3	<i>signal transducer and activator of transcription 3</i>
STAT5	<i>signal transducer and activator of transcription 5</i>
SULT1E1	estrogensulfotransferáza
TAE	elektroforetický tris-acetátový pufr s EDTA
TAPI-2	inhibitor ADAM17
T _{an}	teplota nasednutí („ <i>annealing</i> “) primerů
TBS	fyzilogický roztok pufrovaný tris
Thr	treonin
TNFAIP6	<i>tumor necrosis factor alpha-induced protein 6</i>
TNFRSF12A	<i>tumor necrosis factor receptor superfamily member 12A</i>
TNFSF12	<i>tumor necrosis factor ligand superfamily member 12</i>
TRIS	2-amino-2-hydroxymethylpropan-1,3-diol
Tween 20	polyoxyethylensorbitanmonolaurát
Tyr	tyrosin
U0126	inhibitor MAP2K1/2, v důsledku toho i MAPK3/1
USA	Spojené státy americké
v.v.i	veřejná výzkumná instituce
v/v	<i>volume/volume</i>
VCAN	versikan
WEE2	<i>WEE1 homolog 2</i> , kináza

OBSAH

1 ÚVOD	13
2 PŘEHLED LITERATURY	14
2.1 Oogeneze a folikulogeneze	14
2.1.1 Signalizace luteinizačním hormonem	14
2.1.2 Faktory rodiny EGF	15
2.1.3 Receptory faktorů rodiny EGF	16
2.2 Zrání oocytů	17
2.2.1 Aktivita proteinkinázy A způsobuje profázní blok	17
2.2.2 Vliv lokalizace podjednotek PKA na zovuzahájení meiózy	19
2.2.3 GPR3	20
2.2.4 ADCY3	21
2.2.5 PDE3A	22
2.2.6 PDE3A je inhibována cGMP	23
2.2.7 Syntéza cGMP ve folikulu	23
2.2.8 Úloha vodivých spojů při udržování profázního bloku	26
2.2.9 Úloha fosfodiesteráz štěpících cGMP ve znovuzahájení meiózy	28
2.2.10 Regulace PDE3A prostřednictvím proteinkinázy B	29
2.3 Expanze kumulu	29
2.3.1 HAS2	29
2.3.2 TNFAIP6	30
2.3.3 PTX3	31
2.3.4 VCAN a HAPLN1	32
2.3.5 Signální molekuly regulující expanzi kumulu	33
2.3.5.1 PKA/cAMP	33
2.3.5.2 ERBB1	34
2.3.5.3 GDF9 a BMP15	35
2.3.5.4 MAPK3/1	35
2.3.5.5 MAPK14	37
2.3.5.6 PTGS2	38
2.3.5.7 IL6	40
2.3.5.8 PGR	41
2.3.5.9 PKB	42
2.3.5.10 NO/cGMP	43
3 MATERIÁL A METODY	46
3.1 Izolace a kultivace COC a MGC	46
3.2 Izolace RNA	48
3.3 Návrh a testování primerů pro real-time RT-PCR	49
3.4 Real-time RT-PCR	49
3.5 Stanovení jaderné maturace	52
3.6 Western blot	52
3.7 Statistická analýza	53
4 VÝSLEDKY	54
4.1 Efekt inhibitorů vybraných signálních molekul na expresi <i>AREG</i> , <i>EREG</i> , <i>HAS2</i> , <i>PTGS2</i> a <i>TNFAIP6</i>	54
4.1.1 Efekt inhibitorů na expresi <i>AREG</i> v COC indukovanou FSH	54
4.1.2 Efekt inhibitorů na expresi <i>EREG</i> v COC indukovanou FSH	55
4.1.3 Efekt inhibitorů na expresi <i>AREG</i> v MGC indukovanou FSH a LH	55
4.1.4 Efekt inhibitorů na expresi <i>EREG</i> v MGC indukovanou FSH a LH	56

4.1.5	Efekt inhibitorů na expresi <i>PTGS2</i> v COC indukovanou FSH.....	56
4.1.6	Efekt inhibitorů na expresi <i>PTGS2</i> v COC indukovanou AREG	57
4.1.7	Efekt inhibitorů na expresi <i>PTGS2</i> v MGC indukovanou FSH a LH	57
4.1.8	Efekt inhibitorů na expresi <i>HAS2</i> v COC indukovanou FSH	58
4.1.9	Efekt inhibitorů na expresi <i>HAS2</i> v COC indukovanou AREG.....	58
4.1.10	Efekt inhibitorů na expresi <i>HAS2</i> v MGC indukovanou FSH a LH	59
4.1.11	Efekt inhibitorů na expresi <i>TNFAIP6</i> v COC indukovanou FSH.....	59
4.1.12	Efekt inhibitorů na expresi <i>TNFAIP6</i> v COC indukovanou AREG	60
4.1.13	Efekt inhibitorů na expresi <i>TNFAIP6</i> v MGC indukovanou FSH a LH.	60
4.2	Ověření exprese genů vybraných na základě výsledků z mikročipu	61
4.3	Vliv analogů cGMP na zrání oocytů a expanzi kumulu	62
4.3.1	Vliv analogů cGMP na zrání oocytů.....	62
4.3.2	Vliv analogů cGMP na expanzi kumulu	63
4.3.3	Vliv 8-CPT-cGMP na fosforylaci MAPK3/1 v COC indukovanou FSH.	64
4.3.4	Vliv 8-CPT-cGMP na expresi <i>HAS2</i> , <i>PTGS2</i> a <i>TNFAIP6</i>	65
4.4	Expresa <i>NPPC</i>	66
4.5	Expresa <i>NPR2</i>	67
5	DISKUZE.....	68
5.1	Vliv inhibitorů PI3K, PKA, MAPK3/1, MAPK14 a ERBB1 na expresi genů důležitých pro expanzi kumulu	68
5.1.1	Expresa <i>AREG</i> a <i>EREG</i>	68
5.1.2	Expresa <i>HAS2</i> , <i>PTGS2</i> a <i>TNFAIP6</i>	69
5.2	Ověření exprese genů vybraných na základě výsledků z mikročipu	70
5.3	Vliv analogů cGMP na zrání oocytů a expanzi kumulu	71
6	SOUHRN	74
7	SEZNAM LITERATURY	75

1 ÚVOD

U prasat je *in vitro* fertilizace (IVF) málo efektivní kvůli problémům s formováním prvojadér a vysokému výskytu polyspermie (Hunter, 2000). Zlepšení této situace by mohly přinést nové kultivační systémy navržené na základě znalosti procesů, které zrání oocytů provázejí (Kawashima *et al.*, 2008).

Luteinizační hormon (LH) indukuje ve folikulu změny, které směřují k ovulaci. Dochází ke znovuzahájení meiózy u oocytu a v kumulu se vytváří a reorganizuje extracelulární matrix (expanze kumulu). Podobné účinky jako LH má na komplexy oocyt-kumulus (COC) také folikuly stimulující hormon (FSH) v podmínkách *in vitro*. FSH se běžně používá ke stimulaci meiotické maturace prasečích oocytů. Fyziologickým stimulem, který způsobuje znovuzahájení meiózy a expanzi kumulu, jsou ale u myši (Park *et al.*, 2004) i u prasete (Procházka *et al.*, 2011) peptidy podobné epidermálnímu růstovému faktoru („EGF-like“) AREG a EREG. Kultivace prasečích COC v médiu s AREG nebo EREG má pozitivní vliv na vývojovou schopnost embryí z nich vzniklých (Akaki *et al.*, 2009; Procházka *et al.*, 2011). Vysoká koncentrace AREG v lidské folikulární tekutině koreluje s počtem získaných oocytů a embryí (Liu *et al.*, 2012), rovněž s jejich kvalitou (Zamah *et al.*, 2010).

Cyklický GMP ovlivňuje zrání oocytů u myši (Vaccari *et al.*, 2009) i prasete (Zhang *et al.*, 2005a, 2005b) a zdá se, že negativně ovlivňuje i expresi genů důležitých pro expanzi kumulu, protože inhibuje MAPK3/1 (Sela-Abramovich *et al.*, 2008; Zhang *et al.*, 2005a).

Cíle této diplomové práce jsou:

1. stanovit efekt inhibitorů vybraných signálních molekul, které ovlivňují expresi genů důležitých pro expanzi kumulu (*PTGS2*, *HAS2*, *TNFAIP6*), respektive srovnat jejich efekt na FSH- a AREG-indukovanou expresi klíčových genů, a to v COC i buňkách stěnové granulózy (MGC),
2. ověřit, zda se liší exprese genů (vybraných na základě výsledků z mikročipu) v prasečích COC stimulovaných FSH, nebo AREG,
3. stanovit efekt analogu cGMP na meiotické zrání prasečích oocytů v podmínkách *in vitro*,
4. ověřit, zda je analog cGMP schopen inhibovat expresi genů důležitých pro expanzi kumulu.

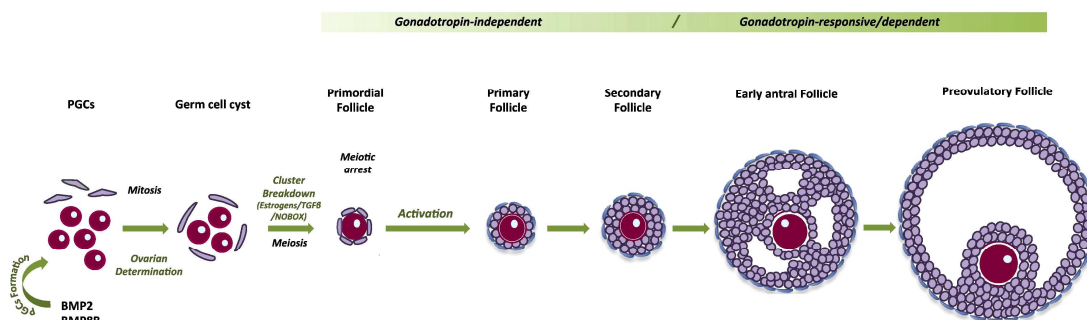
2 PŘEHLED LITERATURY

2.1 Oogeneze a folikulogeneze

Vývoj ovariálních folikulů u savců probíhá ve dvou fázích.

Prvních z nich, fáze preantrální, je nezávislá na gonadotropinech. Dochází při ní k diferenciaci primordiálních zárodečných buněk (PGC) na oogonie a posléze oocyty, které vstupují do meiotického dělení, ale zastaví se v diplotenním stádiu profáze I. Vytváří se primordiální folikul, ve kterém je primární oocyt obklopen zploštělými granulózními buňkami. Z primordiálního folikulu se vytváří folikul primární. V tomto stádiu dochází k růstu oocyty, vytvoření *zona pelucida* a k proliferaci granulózních buněk. Vytvořením další vrstvy granulózních buněk folikul vstupuje do stádia sekundárního folikulu. U sekundárních folikulů se v souvislosti s vývojem théky rozvíjí i cévní zásobení, což umožňuje přechod do antrální fáze folikulogeneze.

V antrální, gonadotropiny řízené fázi, se v důsledku působení folikuly stimulujícího hormonu (FSH) vytváří ve folikulu dutina (atrum) vyplněná folikulární tekutinou. Granulózní buňky, které jsou blízko oocyty, se označují jako buňky kumulární a společně s oocytem vytváří funkční komplex oocyt-kumulus (COC). Kumulární buňky jsou ovlivněny faktory produkovanými oocytem a liší se od buněk stěnové granulózy (MGC) mimo jiné absencí receptoru pro luteinizační hormon (Eppig *et al.*, 1997). Luteinizační hormon (LH) indukuje ve folikulu procesy, které vedou ke znovuzahájení meiózy oocyty a k uvolnění COC z folikulu.



Obrázek 1 - Přehled folikulogeneze. Přejato a upraveno (Sánchez *et al.*, 2012).

2.1.1 Signalizace luteinizačním hormonem

Signalizace prostřednictvím luteinizačního hormonu má klíčový význam pro znovuzahájení meiózy a ovulaci COC. Vaječníky myši deficientních na receptor LH (LCGR), který je rovněž aktivován choriovými gonadotropiny, obsahují

preantrální a antrální folikuly, nikoliv však folikuly preovulační ani žádná žlutá tělíska, což naznačuje neschopnost těchto myši ovulovat (Lei *et al.*, 2001).

Expresi *Lcgr* v granulózních buňkách myši stimuluje koňský choriový gonadotropin (eCG) nebo FSH a inhibuje ji přítomnost oocyty, takže kumulární buňky prakticky neexprimují *Lcgr* (Eppig *et al.*, 1997). U člověka je exprese *LCGR* v kumulárních buňkách rovněž velmi nízká v porovnání s MGC, ve kterých FSH zvyšuje expresi *LCGR* v podmínkách *in vitro* (Maman *et al.*, 2012). U prasete FSH stimuluje expresi *LCGR* v kumulární buňkách ve 12. h kultivace a exprese se v průběhu kultivace dále zvyšuje (Shimada *et al.*, 2003). Pro expresi *Lcgr* je důležitý estradiol a jeho receptor ESR2, zatímco ESR1 zřejmě není tolik významný (Couse *et al.*, 2005; Emmen *et al.*, 2005). U preovulačních folikulů *Esr2*^{-/-} myši kultivovaných v podmínkách *in vitro* je výrazně snížena schopnost ovulovat po stimulaci lidským choriovým gonadotropinem (hCG) a produkce estradiolu je rovněž narušena (Rodriguez *et al.*, 2010). Při kultivaci s FSH vykazují folikuly těchto myši v porovnání s *wild-type* folikuly vyšší expresi receptoru FSH (*Fshr*) a *Esr1*, výrazně nižší expresi *Lcgr*, *Cyp19a1* (aromatáza), *Cyp17a1* (17 α -hydroxyláza) a mírně sníženou expresi *Areg* (Rodriguez *et al.*, 2010). Stimulace hCG vede k nižší produkci cAMP, nižší expresi *Areg*, *Ptgs2*, *Pgr* a *Sult1e1* a fosforylace MAPK3/1 je rovněž snížena. (Rodriguez *et al.*, 2010).

2.1.2 Faktory rodiny EGF

V souvislosti s absencí *LCGR* v kumulárních buňkách vyvstává otázka, jakým způsobem je zprostředkována signalizace LH uvnitř folikulu. Zjištění, že FSH pozitivně ovlivňuje schopnost epidermálního růstového faktoru (EGF) indukovat expanzi kumulu prasečích COC, vedlo k hypotéze, že právě EGF způsobuje expanzi kumulu a znovuzahájení meiózy (Procházka *et al.*, 2003). Dalším výzkumem bylo zjištěno, že tímto prostředníkem není EGF, ale jemu podobné peptidy amfiregulin (AREG), epiregulin (EREG) a betacelulin (BTC).

U myši jsou *Areg*, *Ereg* a *Btc* exprimovány přechodně (maximum 3 h) ve stěnové granulóze po stimulaci hCG (Park *et al.*, 2004). Nedávno bylo zjištěno, že hCG indukuje přechodně (maximum 4 h) v MGC myši stimulovaných eCG expresi dalšího faktoru z rodiny EGF – neuregulinu 1 (*Nrg1*) typu III (Noma *et al.*, 2011). U prasete v *in vitro* podmínkách FSH stimuluje v COC expresi *AREG* a *EREG* (Procházka *et al.*, 2011; Yamashita *et al.*, 2007; Yamashita *et al.*, 2011). U člověka

exprimují buňky stěnové granulózy i kumulu 36 h po *in vivo* stimulaci hCG především *AREG* a mnohem méně *EREG* a *BTC* (Zanah *et al.*, 2010). V lidské folikulární tekutině je pomocí ELISA dobře detekovatelný *AREG*, *EREG* jen v 5 % vzorků a *BTC* není detekovatelný vůbec (Zanah *et al.*, 2010).

AREG, *EREG* i *BTC* jsou transmembránové glykoproteiny, ze kterých je signalizační peptid (tedy extracelulární část proteinu) uvolňován aktivitou metaloproteáz (Harris *et al.*, 2003). U prasete transmembránové prekurzory štěpí proteáza *ADAM17*, jejíž exprese i aktivita je v COC indukována FSH a LH (Yamashita *et al.*, 2007) a udržována díky progesteronu (Yamashita *et al.*, 2010). *TAPI-2*, specifický inhibitor *ADAM17*, měl na fosforylaci *MAPK3/1* u prasete minimálně stejný vliv jako širokospektrální inhibitor metaloproteáz galardin (Yamashita *et al.*, 2007), který inhiboval zrání krysích oocytů kultivovaných ve folikulech v přítomnosti LH (Ashkenazi *et al.*, 2005). Tyto poznatky naznačují klíčový význam *ADAM17* pro uvolňování *AREG* a *EREG* signalizačních peptidů. Není známo, jaká proteáza štěpí *NRG1*, ale exprese *Adam19*, která je za tento děj zodpovědná v mozku, se ve stěnové granulóze myši stimulovaných eCG zvyšuje po hCG (Noma *et al.*, 2011).

Pro odstěpování signalizačních peptidů z jejich transmembránových prekurzorů je pravděpodobně důležitá i proteinkináza C (Zhang *et al.*, 2009). Proteinkináza C (PKC) je nezbytná pro aktivaci receptoru EGF (*ERBB1*) po FSH v myších (Downs *et al.*, 2008) i prasečích COC (Chen *et al.*, 2008), přičemž inhibitor PKC ale neovlivňuje zrání prasečích oocytů indukované *AREG* nebo EGF (Chen *et al.*, 2008).

2.1.3 Receptory faktorů rodiny EGF

Signální molekuly rodiny EGF mohou aktivovat 4 typy *ERBB* receptorů (Harris *et al.*, 2003). V lidských kumulárních buňkách i MGC je nejvíce exprimován *ERBB1*, exprese *ERBB2* a *ERBB4* jsou srovnatelné a nejméně se exprimuje *ERBB3*, přičemž v kumulárních buňkách se tyto geny (vyjma *ERBB4*) exprimují více než v MGC (Zamah *et al.*, 2010). U myši se množství *ERBB1-3* v ováriu nemění po eCG ani hCG, ale množství *ERBB4* výrazně klesá po hCG (Noma *et al.*, 2011).

Vzhledem k rozdílné afinitě *AREG*, *EREG* a *BTC* k jednotlivým *ERBB* receptorům, vyvstává otázka, zda je signalizace hned třemi peptidy redundantní (Park *et al.*, 2004), nebo zda má nějaký fyziologický význam. Myši, u kterých byl

eliminován *Areg* (Luetkeke *et al.*, 1999), *Ereg* (Lee *et al.*, 2004), nebo *Btc* (Jackson *et al.*, 2003), jsou plodné. Nicméně novější práce ukazují, že u *Ereg*^{-/-} myši výrazně menší počet oocytů znovuzahájí meiózu po stimulaci hCG, přičemž v průběhu času se rozdíl mezi *Ereg*^{+/-} a *Ereg*^{-/-} zvířaty zmenšuje (Kim *et al.*, 2011). Podíl expandovaných COC v *in vivo* podmínkách je v 5. a 7. h po hCG nižší u *Ereg*^{-/-} zvířat, stejně tak i počet COC získaných superovulací (Kim *et al.*, 2011). Je u nich snížena exprese *Areg* (pouze 8 % v porovnání s *Ereg*^{+/-}) po hCG (Kim *et al.*, 2011). U prepubertálních *Ereg*^{-/-} myši stimulovaných sérovým gonadotropinem březích klisen (PMSG) a hCG byly výrazně potlačeny fosforylace ERBB1 na Tyr845, 1068 a 1173 a fosforylace ERBB2, ale u dospělých myši v proestu nebyly pozorovány žádné rozdíly ve fosforylaci ERBB1 a ERBB2 (Kim *et al.*, 2011). U dospělých i prepubertálních *Ereg*^{-/-} myši byla nižší fosforylace MAPK3/1, nižší množství PTGS2, nižší fosforylace STAT3 na Tyr705 a vyšší fosforylace MAPK8, což naznačuje, že aktivace ERBB1 a ERBB2 je důležitá pro expresi *Areg* (Kim *et al.*, 2011). V souvislosti s těmito poznatky není překvapivé, že u *Ereg*^{-/-} myši dochází k většímu opoždění zrání oocytů po hCG než u *Ereg*^{+/-} myši, expanze kumulu a exprese genů klíčových pro expanzi byla u *Ereg*^{-/-} rovněž více narušena (Hsieh *et al.*, 2007).

2.2 Zrání oocytů

Zrání oocytů je proces, při kterém dochází k přechodu z profáze I do metafáze II, což vyžaduje překonání profázního bloku.

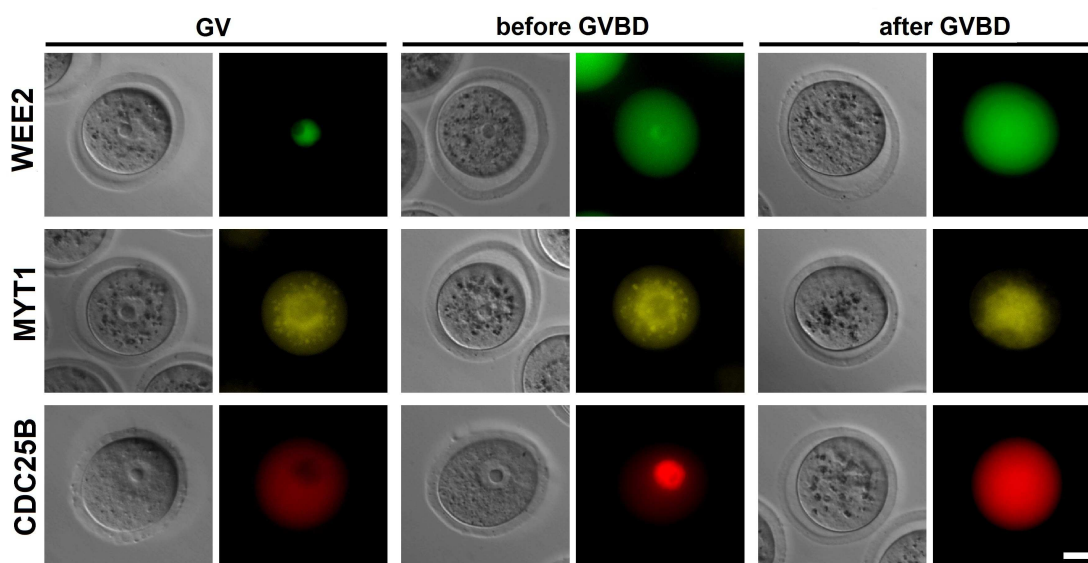
2.2.1 Aktivita proteinkinázy A způsobuje profázní blok

Aktivita proteinkinázy A (PKA) v oocytech hraje klíčovou roli pro udržování profázního bloku savčích oocytů, protože ve svých důsledcích inhibuje aktivaci komplexu cyklin-dependední kinázy 1 (CDK1) s cyklinem B, který je označován jako MPF („*meiosis/mitosis/maturation-promoting factor*“).

Pro aktivaci MPF v oocytech myši je nepostradatelná fosfatáza CDC25B (Lincoln *et al.*, 2002) odstraňující inhibiční fosforylace CDK1 na Thr14 a Tyr15. Přestože jsou *Cdc25b*^{-/-} myši životaschopné a samci fertillní s normální spermatogenezí a morfologií varlat, samice jsou zcela sterilní, protože jejich oocyty nejsou schopné znovuzahájit meiózu (Lincoln *et al.*, 2002). PKA fosforyluje CDC25B v myších oocytech na Ser321, což způsobuje interakci CDC25B s 14-3-3 proteinem a udržuje CDC25B lokalizovanou v cytoplazmě, kde nemůže aktivovat

MPF (Pirino *et al.*, 2009). Defosforylace Ser321 má pro znovuzahájení meiózy klíčový význam, protože mikroinjekce *Cdc25b*, ve které byl Ser321 nahrazen za nefosforylovatelný Ala, způsobuje jadernou lokalizaci CDC25B a rozpad zárodečného váčku („*germinal vesicle breakdown*“ – GVBD), tedy znovuzahájení meiózy (Pirino *et al.*, 2009), a to účinněji než *wild-type* mRNA (Oh *et al.*, 2010; Zhang *et al.*, 2008).

PKA fosforyluje *in vitro* Ser15 kinázy WEE2, která se specificky exprimuje v oocytech (Han *et al.*, 2005). Společně s MYT1 vytváří tato kináza inhibiční fosforylace Thr14 a Tyr15 na molekule CDK1 a brání GVBD. MYT1 a WEE2 se (pravděpodobně vzhledem k různé lokalizaci v oocyty) mohou jen omezeně zastupovat, protože mikroinjekce morfolino-oligonukleotidů potlačujících translaci *Wee2*, nebo *Myt1* způsobila znovuzahájení meiózy jen u části myších oocytů, zatímco kombinace směřující proti oběma mRNA vedla k GVBD u většiny oocytů (Oh *et al.*, 2010). Mikroinjekce *Wee2*, jejíž translací vzniká protein obsahující místo Ser15 zbytek kyseliny asparagové, inhibuje GVBD u oocytů drápatky efektivněji než *wild-type* mRNA (Han *et al.*, 2005). V oocytech myši dochází před GBVD k translokaci WEE2 z jádra do cytoplazmy (Oh *et al.*, 2010). Tento děj je nezávislý na aktivitě PKA a nastává až poté, co je CDC25B v jádře, tedy pravděpodobně v důsledku aktivace MPF (Oh *et al.*, 2010). U prasete hraje WEE2 rovněž klíčovou úlohu při udržování meiotického bloku, avšak klíčovým zbytkem pro aktivaci WEE2 není Ser15, nýbrž Ser77, který je konzervovaný, a zdá se, že by mohl být důležitý i u jiných druhů včetně myši, zatímco Ser15 je specifický pouze pro myš (Shimaoka *et al.*, 2011). Jaderná lokalizace WEE2 je u prasete rovněž nezbytná pro funkci tohoto proteinu (Shimaoka *et al.*, 2011).



Obrázek 2 - Lokalizace WEE2, MYT1 a CDC25B v oocytech myši ve stádiu zárodečného váčku, před a po jeho rozpadu. Přejato a upraveno (Oh *et al.*, 2010).

2.2.2 Vliv lokalizace podjednotek PKA na znovuzahájení meiózy

Aktivita proteinkinázy A je závislá na cyklickém adenosinmonofosfátu (cAMP). Dle klasické představy je pokles koncentrace cAMP v oocytu přímou příčinou poklesu aktivity PKA a znovuzahájení meiózy. Nicméně nejnovější poznatky ukazují, že u prasečích rostoucích oocytů (průměr 100 μm), které nemají meiotickou kompetenci, rovněž dochází v podmínkách *in vitro* k poklesu koncentrace cAMP, aniž by došlo k poklesu aktivity PKA, zatímco u plně dorostlých oocytů (120 μm) je pokles hladiny cAMP doprovázen snížením aktivity PKA a znovuzahájením meiózy (Nishimura *et al.*, 2012). Klíčovou událostí vedoucí k GVBD je u prasete zřejmě translokace regulační podjednotky 2 (PRKAR2) PKA do jádra před GVBD (kolem 18. h kultivace), ke které u rostoucích oocytů nedochází (Nishimura *et al.*, 2012). U myši bylo již dříve zjištěno, že lokalizace PRKAR2 na mitochondrie pomocí AKAP1 je důležitá pro GVBD (Newhall *et al.*, 2006). Samice *Akap1*^{-/-} myši mají radikálně sníženou plodnost, zatímco samci jsou fertillní (Newhall *et al.*, 2006). Ovulují srovnatelné množství COC, ale oocyty jsou často degenerované, ve stádiu zárodečného váčku nebo neschopné vydělit první pólové tělísko, přičemž inhibitor PKA má *in vitro* pozitivní vliv na znovuzahájení meiózy i vydělení pólového tělíska (Newhall *et al.*, 2006). Je rovněž zajímavé, že oocyty těchto myši jsou více senzitivní k inhibici GVBD pomocí nehydrolyzovatelných analogů cAMP nebo inhibitorů jeho hydrolýzy v oocytu (Newhall *et al.*, 2006). U krysy bylo zjištěno, že AKAP1 je fosforylován MPF, což zřejmě vede ke změnám

lokalizace PRKAR2 (Kovo *et al.*, 2002). Zdá se, že iniciální množství aktivního MPF indukuje aktivaci dalšího MPF na základě fosforylace AKAP1 (Kovo *et al.*, 2002).

Tyto výsledky naznačují, že spíše než koncentrace cAMP v oocytu hraje zásadní roli lokalizace jednotek PKA, což ale neznamená, že cAMP není významným negativním regulátorem aktivity PKA. Pokles cAMP v oocytu myši je rovněž důležitý pro vydělení menšího pólového tělíska (Chen *et al.*, 2012).

2.2.3 GPR3

Koncentrace cAMP v oocytu je udržována především oocyt samotným díky receptoru GPR3 u myši (Ledent *et al.*, 2005; Mehlmann *et al.*, 2004; Mehlmann, 2005; Vaccari *et al.*, 2008), prasete (Yang *et al.*, 2012; Zhang *et al.*, 2012) a člověka (DiLuigi *et al.*, 2008). U krysy hraje tuto roli GPR12 (Hinckley *et al.*, 2005). V myších oocytech se *Gpr12* rovněž exprimuje, ale jeho vliv na udržování meiotického bloku je zřejmě vedlejší, protože mikroinjekce *Gpr12* do oocytů *Pde3a*^{-/-} myši brání meiotické maturaci méně efektivně než *Gpr3* (Hinckley *et al.*, 2005) a eliminace genu *Gpr12* metodou „gene knockout“ nemá na znovuzahájení meiózy žádný vliv (Vaccari *et al.*, 2008). *Gpr3*^{-/-} myši mají obvyklý počet preatrálních a antrálních folikulů, ale až 82 % oocytů v antrálních folikulech znovuzahájilo meiózu nezávisle na LH a téměř polovina z těchto oocytů byla v metafázi II (Mehlmann *et al.*, 2004). Navzdory tomu jsou ale *Gpr3*^{-/-} myši částečně plodné, byť mají nižší počet mláďat (Ledent *et al.*, 2005).

GPR3 je v prasečím oocytu ve stádiu zárodečného vajíčku lokalizován na jaderné membráně a částečně na plazmatické membráně, v metafázi I (MI) a metafázi II (MII) pouze na plazmatické membráně (Yang *et al.*, 2012). U myši je lokalizován na plazmatické membráně a ve shlucích v cytoplasmě, přičemž kolokalizuje s ranými endozomy (Lowther *et al.*, 2011).

GPR3 je označován jako konstitutivně aktivní receptor, který nemá ligand. U myši GPR3 aktivuje $G\alpha_s$ již od preatrálního stádia vývoje folikulu a jeho aktivita je konstantní (Freudzon *et al.*, 2005). Mehlmann *et al.* (2004) však spekulují, zda regulace aktivity GPR3 nějakým způsobem nespojuje zrání oocytu s ději, které probíhají v somatických buňkách folikulu. GPR3 lze aktivovat sfingosylfosforylcholinem nebo sfingosin-1-fosfátem, což vede k inhibici a oddálení GVBD v prasečích (Yang *et al.*, 2012) a myších oocytech (Hinckley *et al.*, 2005).

Není však jasné, zda má efekt sfingosylfosforylcholinu nebo sfingosin-1-fosfátu fyziologický význam. Hinckley *et al.* (2005) spekulují, zda AREG a EREG neovlivňují metabolismus sfingosin-1-fosfátu. Dalším diskutovaným mechanismem, díky kterému může docházet k regulaci aktivity GPR3, je endocytóza tohoto receptoru. V oocytech jsou přítomny proteiny nezbytné pro endocytózu a inhibitory endocytózy monodansylkadaverin a dynasore oddálily GVBD myších oocytů a zvýšily intraoocytární koncentraci cAMP (Lowther *et al.*, 2011).

V prasečích oocytech kultivovaných 24 h jako COC v přítomnosti LH, FSH a EGF je množství GPR3 proteinu konstantní, avšak nižší než u čerstvě izolovaných oocytů (Yang *et al.*, 2012). Exprese *GPR3* v prasečích COC klesá v průběhu kultivace s PMSG a hCG a tento pokles je nejvýraznější mezi 12. a 24. kultivace (Zhang *et al.*, 2012). Množství GPR3 proteinu během kultivace rovněž klesá, ale tento pokles je mnohem mírnější (Zhang *et al.*, 2012). Vzhledem k výsledkům Yang *et al.* (2012) lze předpokládat, že změny v expresi *GPR3* se odehrávají v kumulárních buňkách. Nicméně možný vliv GPR3 na expanzi kumulu, na který upozorňují Zhang *et al.* (2012), je nejasný. Je rovněž zajímavé, že nadměrná exprese *GPR3* v prasečích oocytech snižuje množství cyklinu B a zvyšuje hladinu nejen cAMP, ale i cGMP, přičemž eliminace *GPR3* pomocí RNAi má přesně opačný efekt (Yang *et al.*, 2012).

2.2.4 ADCY3

GPR3 indukuje díky G_{α_s} adenylátcyklázovou aktivitu – mikroinjekce protilátky proti G_s způsobuje znovuzahájení meiózy u myších oocytů kultivovaných ve folikulech (Mehlmann *et al.*, 2002). U myši i u krysy je klíčovou adenylátcyklázou ADCY3, jejíž exprese v oocytu je mnohem vyšší než v somatických částech folikulu, kde převažují hlavně *Adcy6* a *Adcy9* (Horner *et al.*, 2003). *Adcy3^{-/-}* myši mají vaječníky s normální morfologií a folikuly v různých stádiích vývoje, avšak značný podíl oocytů v raných antrálních folikulech nebyl ve stádiu zárodečného vajíčku (Horner *et al.*, 2003). Měly kondenzované chromozomy, dělicí vřeténko, některé folikuly obsahovaly vícejadernou strukturu vzniklou díky aktivaci oocytu (Horner *et al.*, 2003). Spontánní meiotická maturace v podmínkách *in vitro* byla u oocytů z *Adcy3^{-/-}* myši rychlejší než u *wild-type* oocytů (Horner *et al.*, 2003).

Adenylátcykláza může být deaktivována INSL3, který je u krysy indukován LH v théce (Kawamura *et al.*, 2004). Receptor pro INSL3 (RXFP2) je exprimován

pouze v oocytu a jeho aktivaci dochází díky G_i k deaktivaci adenylátcyklázy a poklesu cAMP (Kawamura *et al.*, 2004).

U prasečích oocytů protilátka proti G_{α_s} zvýšila podíl oocytů, které znovuzahájily meiózu v podmínkách *in vitro* a částečně obnovila syntézu cyklinů B1 a B2 a aktivitu MPF, která byla potlačena látkou inhibující PDE3 (Morikawa *et al.*, 2007). Vysoká hladina cAMP zřejmě u prasete inhibuje translaci cyklinu B nutnou pro aktivaci MPF, jak naznačují i výše zmíněné poznatky o GPR3 (Yang *et al.*, 2012).

2.2.5 PDE3A

Další molekulou, která hraje klíčovou roli v regulaci PKA, je fosfodiesteráza 3A (PDE3A) štěpící cAMP. V rámci myšního vaječnicku je PDE3 aktivita specifická pro oocyt (Tsafiriri *et al.*, 1996). Aktivita PDE3 v oocytu je nezbytná pro znovuzahájení meiózy, a to u myši (Masciarelli *et al.*, 2004), krysy (Richard *et al.*, 2001), prasete (Laforest *et al.*, 2005; Sasseville *et al.*, 2006), skotu (Mayes *et al.*, 2002; Thomas *et al.*, 2002) i člověka (Nogueira *et al.*, 2003).

Pde3a^{-/-} myši jsou životaschopné a nevykazují žádné vývojové abnormality (Masciarelli *et al.*, 2004). Samci jsou plodní, avšak samice zcela neplodné, přestože jejich vaječnický obsahují žlutá tělíška a při superovulaci indukované PMSG a hCG ovulují COC podobně jako *wild-type* zvířata (Masciarelli *et al.*, 2004). Jejich oocyty však nejsou schopny *in vivo* znovuzahájit meiózu a obsahují přibližně 2× větší množství cAMP (Masciarelli *et al.*, 2004). V podmínkách *in vitro* lze nepřítomnost PDE3A kompenzovat inhibitorem PKA nebo mikroinjekcí *Cdc25b* do oocytu (Masciarelli *et al.*, 2004). Absence PDE3A v myších oocytech může být *in vitro* kompenzována také mikroinjekcí protilátky proti G_s , potlačením translace *Gpr3* pomocí specifických morfolino-oligonukleotidů, případně eliminací *Gpr3* cílenou mutagenézí (Vaccari *et al.*, 2008). Je zajímavé, že v oocytech *Pde3a*^{-/-} myší je nižší exprese *Gpr3* a *Gpr12*, což indikuje přítomnost mechanismu, kterým se v oocytu udržuje určité množství cAMP (Hinckley *et al.*, 2005).

Roli ve znovuzahájení meiózy může hrát i produkt hydrolýzy cAMP adenosin-5'-monofosfát (AMP) a jím aktivovaná proteinkináza (AMPK). Mikroinjekce konstitutivně aktivní AMPK do myších oocytů, u nichž je znovuzahájení meiózy inhibováno dibutyryl-cAMP (dbcAMP), indukovala GVBD, podobný efekt měl i aktivátor AMPK (AICAR), jehož efekt byl potlačen

inhibitorem AMPK dorsomorfinem (Chen *et al.*, 2006). Inhibitory AMPK potlačují znovuzahájení meiózy myších oocytů indukované FSH a AREG (Chen *et al.*, 2008). AICAR indukuje i zrání oocytů skotu a jeho efekt je redukován inhibitorem AMPK (Bilodeau-Goeseels *et al.*, 2007).

Regulace aktivity PDE3A se zdá být klíčovým mechanismem, kterým se iniciuje znovuzahájení meiózy a kterým somatické buňky folikulu (v důsledku signalizace gonadotropiny) ovlivňují děje uvnitř oocyty.

2.2.6 PDE3A je inhibována cGMP

PDE3 mají větší afinitu k cyklickému guanosin-3',5'-monofosfátu (cGMP) než k cAMP (PDE3A má navíc větší afinitu k cGMP než PDE3B), ale cGMP štěpí 10× pomaleji než cAMP, takže cGMP může vystupovat jako kompetitivní inhibitor PDE3 (Lugnier, 2006). Mikroinjekce PDE5, fosfodiesterázy štěpící cGMP, do oocytů *Pde3a*^{+/+} myší způsobuje znovuzahájení meiózy, zatímco na *Pde3a*^{-/-} oocyty nemá tento zásah vliv (Vaccari *et al.*, 2009). Cyklický GMP inhibuje PDE3A (IC₅₀ = 96,9 nM) a pokles jeho koncentrace v myším oocyty kultivovaném ve folikulu je závislý na přítomnosti LH. V důsledku snížení koncentrace cGMP klesá i množství cAMP a dojde ke znovuzahájení meiózy (Norris *et al.*, 2009).

2.2.7 Syntéza cGMP ve folikulu

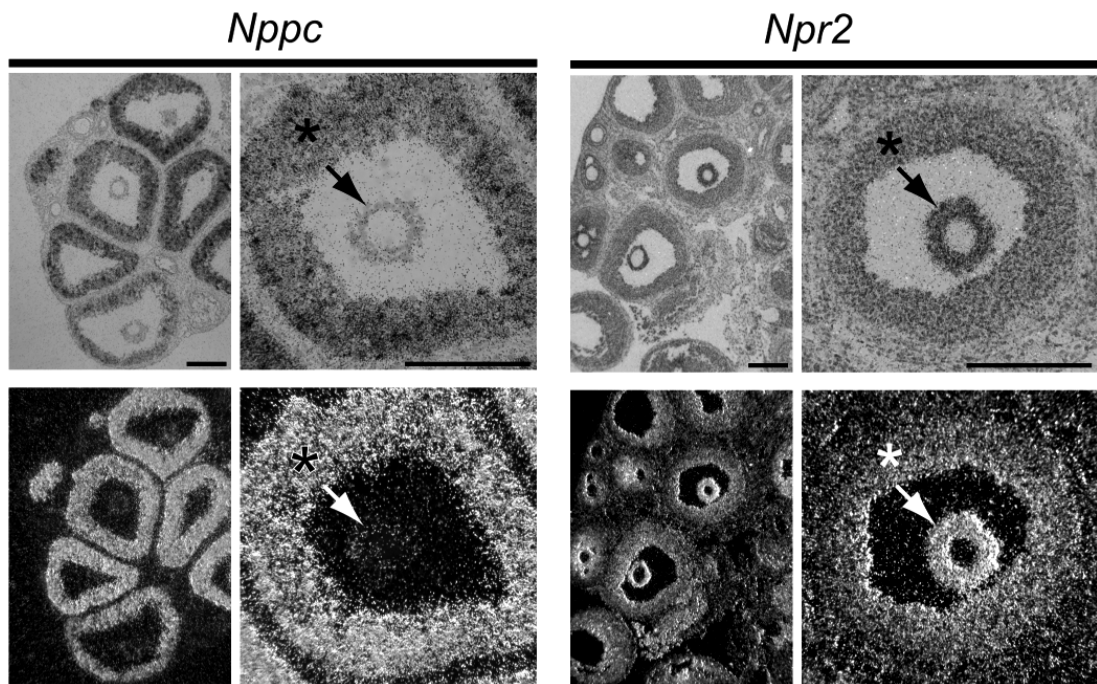
Syntéza cGMP je v granulóznicích buňkách myši realizována především pomocí receptoru s vlastní guanylátcyklázovou aktivitou NPR2; ostatní guanylátcyklázy jsou zřejmě méně významné (Robinson *et al.*, 2012). Aktivita NPR2 je indukována natriuretickým peptidem typu C (NPPC) a pouze NPPC je schopen *in vitro* zvýšit množství cAMP a cGMP v myších COC (Zhang *et al.*, 2010) a inhibovat GVBD (Kawamura *et al.*, 2011; Zhang *et al.*, 2010).

Npr2 je u myši exprimován především v kumulárních buňkách a jeho exprese je udržována faktory, které jsou uvolňovány z oocyty, především GDF9, BMP15 a FGF8 (Zhan *et al.*, 2010). Expresi *Npr2* v myších kumulárních buňkách indukuje *in vitro* estradiol, který také udržuje receptor funkční (Zhang *et al.*, 2011), pravděpodobně na základě přímé interakce s intracelulární částí receptoru (Chen *et al.*, 1998). V podmínkách *in vivo* eCG stimuluje expresi *Npr2* v myších kumulárních buňkách, hCG ji v řádu hodin snižuje (Zhang *et al.*, 2011). Na druhé straně se zdá, že pokles guanylátcyklázové aktivity po LH (v řádu minut) u myších folikulů kultivovaných *in vitro* nastává mechanismem nezávislým na množství NPR2

proteinu (Robinson *et al.*, 2012). V tomto ohledu jsou potenciálními regulátory NPR2 PKC a Ca^{2+} (Abbey-Hosch *et al.*, 2005; Potter, 2011). U krysy je exprese *Npr2* v granulózniích buňkách indukovatelná *in vivo* syntetickým estrogenem diethylstilbestrolem (DES) nebo eCG, schopnost granulózniích buněk vyvozovat radioaktivně značený natriuretický peptid C po DES i eCG stoupá, stejně tak i produkce cGMP (Noubani *et al.*, 2000). Exprese *Npr1* není hormony ovlivněna a natriuretický peptid A nezvyšuje produkci cGMP v granulózniích buňkách krysy (Noubani *et al.*, 2000).

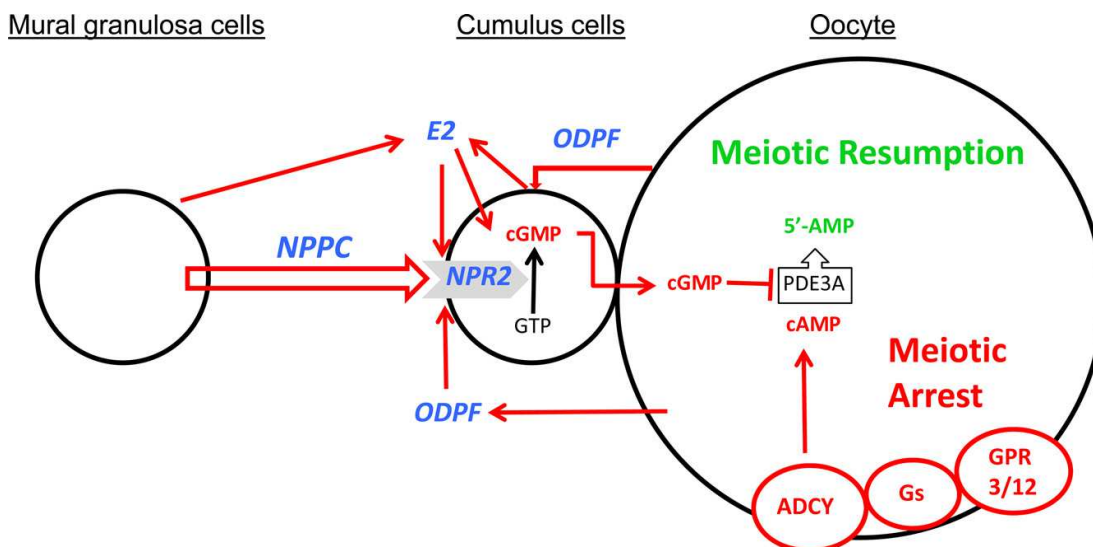
Nppc je naopak exprimován především ve stěnové granulóze (Zhang *et al.*, 2010) a jeho množství se během vývoje folikulu a stimulací eCG nebo PMSG *in vivo* u myši zvyšuje (Kawamura *et al.*, 2011; Robinson *et al.*, 2012; Sato *et al.*, 2012; Zhang *et al.*, 2011). Natriuretický peptid C dokonce sám vykazuje účinky podobné těm, které mají eCG nebo FSH: stimuluje růst preantrálních folikulů *in vitro*, injekce tohoto peptidu do prepubertální myši zvyšuje hmotnost vaječnicků a způsobuje vývoj raných antrálních folikulů na folikuly preovulační, které úspěšně ovulují po LH/hCG (Sato *et al.*, 2012). U krysy byly zjištěny významné změny v množství natriuretického peptidu C v ováriu během estrálního cyklu: proestrus 354 ± 94 pg/mg, estrus 47 ± 6 pg/mg, metestrus 53 ± 11 pg/mg, diestrus 99 ± 36 pg/mg (Jankowski *et al.*, 1997). LH nebo hCG naopak *in vivo* expresi *Nppc* u myši snižují (Kawamura *et al.*, 2011; Robinson *et al.*, 2012), stejně tak i množství natriuretického peptidu typu C v lidské folikulární tekutině (Kawamura *et al.*, 2011).

Není jasné, jaká proteáza je zodpovědná za odštěpení natriuretického peptidu C z jeho transmembránového prekurzoru. FURIN štěpí prekurzor v podmínkách *in vitro* (Potter *et al.*, 2009). Exprese *Furin* v théce je indukována v ováriích krysy hCG, je závislá na aktivitě PKA a ERBB1 a zdá se, že FURIN hraje roli v rámci ovulace (Kelty *et al.*, 2010). Jeho role při štěpení NPPC je však jen hypotetická.



Obrázek 3 - Expres *Nppc* a *Npr2* ve folikulech myši stimulovaných *in vivo* 48 h eCG. Přejato (Zhang *et al.*, 2010).

Npr2^{-/-} myši mají cca poloviční hmotnost než *wild-type* zvířata, neurologické poruchy a kratší kosti (Tamura *et al.*, 2004). Samci jsou plodní, samice vykazují mnohé anomálie reprodukčního systému – mají morfologické abnormality dělohy, menší vaječníky, které neobsahují žádná žlutá tělíska a nemají estrus (Tamura *et al.*, 2004). Myši nesoucí mutantní alely genů *Nppc* a *Npr2*, jsou zcela neplodné (Kiyosu *et al.*, 2012). Ovulace u nich není narušena, ale všechny oocyty vykazují abnormality, již v antrálních folikulech předčasně zahajují meiózu, takže jsou při ovulaci již degenerované (Kiyosu *et al.*, 2012). V preovulačních folikulech navíc postrádají kumulární buňky a nikdy nedají vzniknout ani dvoubuněčnému embryu (Kiyosu *et al.*, 2012).



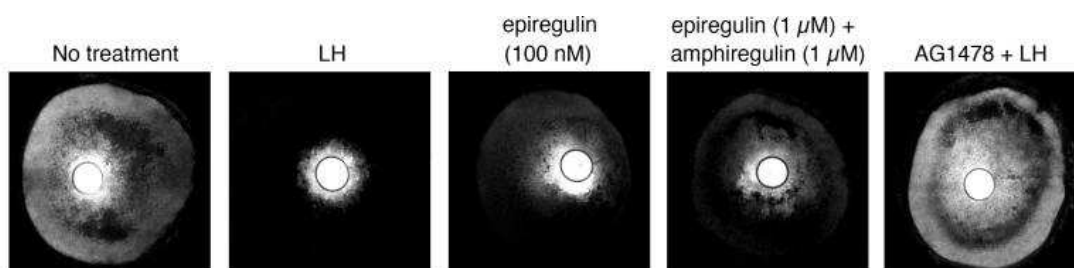
Obrázek 4 - Cyklický GMP z granulózních buněk brání znovuzahájení meiózy. GDF9, BMP15 a FGF8 jsou znázorněny jako ODPF („oocyte-derived paracrine factors“), estradiol jako E2. Přejato (Zhang *et al.*, 2011).

2.2.8 Úloha vodivých spojů při udržování profázního bloku

Další cestou, kterou může docházet k poklesu cGMP uvnitř oocyty, je narušení vodivých spojů („gap junctions“). Buňky stěnové granulózy a kumulu jsou mezi sebou a s oocytem spojeny vodivými spoji, které jsou nezbytné pro růst a vývoj oocyty i celého folikulu (Ackert *et al.*, 2001; Su *et al.*, 2009). Spoje mezi somatickými buňkami folikulu jsou realizovány prostřednictvím GJA1, který je znám také jako konexin 43; GJA4 (konexin 37) spojuje kumulární buňky s oocytem (Veitch *et al.*, 2004).

Karbenoxolon, látka narušující vodivé spoje, indukoval znovuzahájení meiózy krysích oocytů kultivovaných uvnitř intaktních folikulů i v podmínkách *in vivo* (Sela-Abramovich *et al.*, 2006). Způsobil snížení hladiny cAMP v oocyty (překvapivě nedošlo ke zvýšení aktivity PDE3) a jeho efekt byl potlačen inhibitorem PDE3 isobutylmethylxantinem (Sela-Abramovich *et al.*, 2006). Podobně i LH způsobuje snížení permeability vodivých spojů, a to mechanismem závislým na aktivitě MAPK3/1, které u myši fosforylují GJA1 na Ser255, 262 a 279/282 (Norris *et al.*, 2008). Fosforylace GJA1 indukované LH jsou u myši rovněž závislé na ERBB1, protože ERBB1 je důležitý pro aktivaci MAPK3/1 (Hsieh *et al.*, 2011). V krysích folikulech byla také zjištěna fosforylace GJA1 indukovaná LH (Sela-Abramovich *et al.*, 2005), navíc LH inhibuje translaci *Gjal* (Kalma *et al.*, 2004). Množství GJA1 (protein i mRNA) se u křesy zvyšuje od metaestru k proestru

(cca 2×) a v estru dochází k prudkému poklesu (Granot *et al.*, 1997). U juvenilních zvířat lze zvýšení GJA1 (mRNA a protein) vyvolat PMSG, zatímco za prudký pokles jeho exprese zodpovídá hCG (Granot *et al.*, 1997).

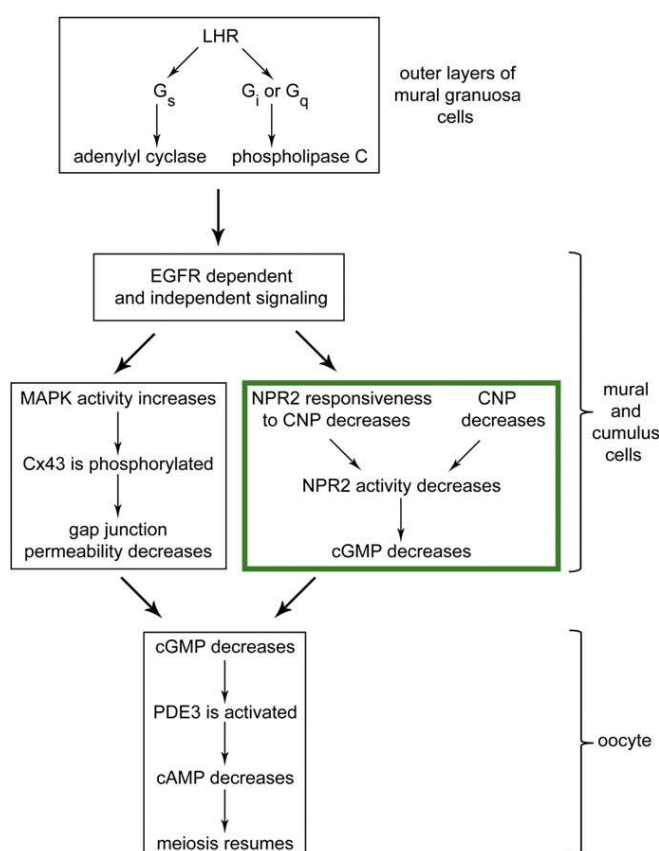


Obrázek 5 – Vliv LH na permeabilitu vodivých spojů. LH inhibuje u myši pronikání fluorescenční látky (Alexa Fluor 350) z oocyty do kumulu a MGC. Přejato (Norris *et al.*, 2010).

U prasečích COC se prvních 4,5 h kultivace zvyšuje rychlost přenosu fluorescenční látky (kalcein) mezi kumulárními buňkami; v přítomnosti EGF nebo eCG dochází za 6,5 h k poklesu rychlosti přenosu, nicméně na hodnotu mírně vyšší nebo srovnatelnou s čerstvě izolovanými COC (Santiquet *et al.*, 2012). V prasečích COC dochází ke zvyšování permeability vodivých spojů mechanismem nezávislým na gonadotropinech, ale stimulovaným folikulární tekutinou (Santiquet *et al.*, 2012). Nicméně dle Sasseville *et al.* (2009) dochází ke zvyšování komunikace prostřednictvím vodivých spojů nezávisle na gonadotropinech až do 12. h kultivace (v přítomnosti hCG a PMSG). Následně mezi 12. až 24. h nastává prudký pokles permeability vodivých spojů na hodnotu čerstvě izolovaných COC mechanismem závislým na gonadotropinech. Množství GJA1 se během kultivace u prasete nemění, ale je fosforylován a stává se složkou membránových raftů, což je zřejmě příčinou snížené permeability (Sasseville *et al.*, 2009). Podle Shimada *et al.* (2001; Shimada *et al.*, 2001) u prasete fosforylaci GJA1 snižují inhibitory PI3K a PKC, nikoliv MAPK3/1, zatímco Sasseville *et al.* (2009) uvádí, že jen inhibitor PKA aplikovaný od začátku kultivace měl na fosforylaci GJA1 vliv. Rovněž zůstává otázkou, zda u prasete existuje přímé spojení mezi snížením permeability vodivých spojů znovuzahájením meiózy (Sasseville *et al.*, 2009).

U myši LH způsobuje pokles koncentrace cGMP v oocyty kultivovaném uvnitř folikulu. Narušení vodivých spojů se podílí na a tomto poklesu, protože podobné účinky jako LH má karbenoxolon a protilátka proti GJA4 (Norris *et al.*, 2009). Inhibitor MAPK3/1 (U0126), který je schopen zamezit snížení permeability vodivých spojů (Sela-Abramovich *et al.*, 2006; Norris *et al.*, 2008), však není

schopen potlačit efekt LH (Norris *et al.*, 2009). AREG rovněž způsobuje pokles koncentrace cGMP v preovulačním folikulu myši a efekt AREG je mírně inhibován U0126 (Hsieh *et al.*, 2011). Permeabilita vodivých spojů i pokles cGMP jsou ale spojeny se signalizací prostřednictvím ERBB1 a inhibitor jeho kinázové aktivity AG1478 je schopen částečně potlačit pokles cGMP v oocytu indukovaný LH (Norris *et al.*, 2010) a prakticky zcela zrušit efekt AREG (Hsieh *et al.*, 2011). Existují tedy dvě cesty poklesu cGMP v oocytu – první je závislá na aktivitě ERBB1 a snížení permeability vodivých spojů a druhá je na ERBB1-signalizaci nezávislá (Norris *et al.*, 2009; Norris *et al.*, 2010).



Obrázek 6 - Vliv LH na znovuzahájení meiózy oocytů myši. Přejato (Robinson *et al.*, 2012).

2.2.9 Úloha fosfodiesteráz štěpících cGMP ve znovuzahájení meiózy

V oocytech myši byly ve stádiu zárodečného vřetka detekovány *Pde6a* a *Pde9a*, jejichž transkripcí vznikají fosfodiesterázy štěpící cGMP (Hanna *et al.*, 2012). Inhibitor PDE9A (BAY73-6691) neměl na zrání myších oocytů vliv, ale v kombinaci s 8-Br-cGMP významně snižoval podíl oocytů, které znovuzahájily meiózu, což poukazuje na význam hydrolýzy cGMP v oocytech (Hanna *et al.*, 2012).

V prasečích COC se během kultivace s eCG a hCG zvyšuje hydrolýza cGMP 3,1× během prvních 24 h kultivace a 5,5× po 48 h (Sasseville *et al.*, 2008). Hydrolýza cGMP probíhá především v kumulárních buňkách a je senzitivní k inhibitorům PDE5 a PDE6 (Sasseville *et al.*, 2008). PDE5A a PDE6C byly detekovány v prasečích COC, přičemž množství PDE6C se během kultivace výrazně zvětšilo (Sasseville *et al.*, 2008).

2.2.10 Regulace PDE3A prostřednictvím proteinkinázy B

Konstitutivně aktivní proteinkináza B (PKB) fosforyluje PDE3A v myším oocytu a způsobuje její aktivaci (Han *et al.*, 2006). Fosforylace PKB u myši předchází GVBD *in vivo* i v podmínkách *in vitro* a je nezávislá na aktivitě MPF (Kalous *et al.*, 2006). Není ale jasné, jakým způsobem dochází k aktivaci PKB v oocytu, zda a jak se na aktivaci PKB podílí somatické buňky folikulu, např. prostřednictvím AREG a EREG nebo poklesem cGMP. U prasečích oocytů zřejmě PKB není pro znovuzahájení meiózy nutná, je však důležitá pro přechod z metafáze I do metafáze II (Kalous *et al.*, 2009; Shimada *et al.*, 2001).

2.3 Expanze kumulu

Luteinizační hormon indukuje prostřednictvím AREG, EREG a BTC expresi genů nutných pro syntézu komponent extracelulární matrix, její stabilitu i dynamiku. Jedná se především o *Has2*, *Tnfrsf25* a *Ptx3*. Ke genům spojeným s expanzí kumulu („*cumulus expansion-related genes*“) se řadí i *Ptgs2*, jejíž význam je ale především v rámci signalizačních procesů (viz 2.3.6).

2.3.1 HAS2

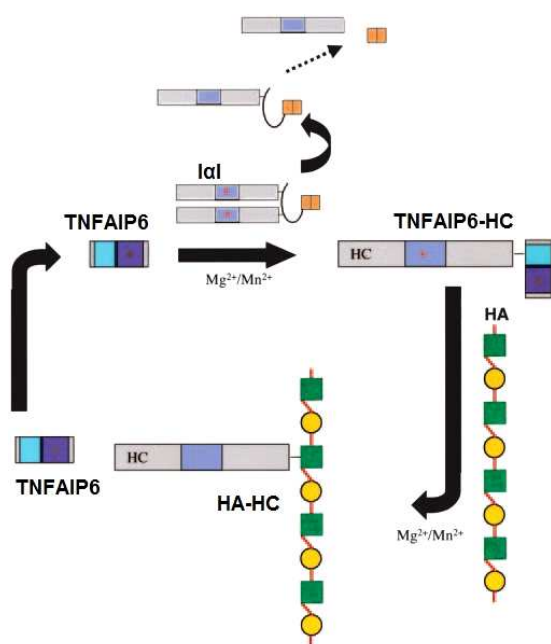
Hyaluronansyntáza 2 (HAS2) je transmembránový enzym zodpovědný za syntézu hyaluronanu, lineárního glykosaminoglykanu a klíčové komponenty extracelulární matrix expandovaného kumulu. U prasete je *HAS2* exprimován v důsledku stimulace eCG v kumulárních buňkách, ale nikoliv v oocytu, ve kterém je naopak exprimována *HAS3* (Yokoo *et al.*, 2004). *HAS2* syntetizuje delší molekuly hyaluronanu než *HAS3* (Itano *et al.*, 2002) a exprese *HAS2* je výrazně ovlivňována gonadotropiny (Yokoo *et al.*, 2004). Hyaluronan syntetizovaný *HAS3* je u myši ale důležitý pro zvětšování perivitelinního prostoru, což vede k nižšímu výskytu polyspermie (Ueno *et al.*, 2009). Vysoká exprese *HAS2* (společně s *PTGS2* a *GREM1*) v lidských kumulárních buňkách koreluje s dobrými

morfologickými a fyziologickými charakteristikami embryí, která vzniknou z oocytů, jež obklopují (Cillo *et al.*, 2007; McKenzie *et al.*, 2004).

Receptor CD44 je spojován s ukotvováním hyaluronanu v kumulu, protože se jeho exprese v kumulárních buňkách prasete zvyšuje během kultivace COC v přítomnosti eCG (Kimura *et al.*, 2002). Interakce hyaluronanu s CD44 je zároveň považována za nutnou pro znovuzahájení meiózy oocytu (Yokoo *et Sato*, 2004; Yokoo *et al.*, 2010). Protilátka proti CD44 výrazně snížila podíl prasečích oocytů, které po 48 h kultivace s eCG dosáhly MII, snížila fosforylaci GJA4 a aktivitu MPF (Yokoo *et al.*, 2007; Yokoo *et al.*, 2010), ale na expanzi kumulu neměla žádný vliv (Yokoo *et al.*, 2007). Navíc se ukázalo, že CD44 je po kultivaci mnohem více sialylován než v přirozeně ovulovaných COC, přičemž sialylace vede k snížené schopnosti vázat hyaluronan, což může být jednou z příčin nižší kvality prasečích oocytů maturovaných *in vitro* (Yokoo *et al.*, 2007).

2.3.2 TNFAIP6

TNFAIP6 je důležitý pro stabilizaci extracelulární matrix kumulu. Katalyzuje transesterifikační reakci, při které dochází k přenosu těžkého řetězce (HC) z molekuly inter- α -trypsin inhibitoru (I α I) na N-acetylglukosamin hyaluronanu (Rugg *et al.*, 2005). Tím dojde k zesíťování jinak lineárních molekul hyaluronanu, což napomáhá hydrataci kumulu a vylepšuje jeho mechanické vlastnosti. Samci *Tnfaip6*^{-/-} myši jsou plodní, zatímco samice sterilní, protože jejich kumulární buňky nejsou schopné expanze, při superovulaci (indukované PMSG a hCG) poskytují jen polovinu COC ve srovnání s *wild-type* zvířaty a jejich COC není možno oplodnit *in vivo* (Fülöp *et al.*, 2003). Tato zvířata ovulují buď oocyty zcela zbavené kumulu, nebo ho lze velmi snadno mechanicky odstranit, přičemž lze tento fenotyp zrušit *in vivo* i *in vitro* rekombinantním TNFAIP6 (Fülöp *et al.*, 2003). Význam I α I pro expanzi kumulu ilustrují i myši deficientních na bikunin, důležitou komponentu molekuly I α I. Samice těchto myší mají sníženou plodnost, ovulují menší množství oocytů, které jsou bez kumulu, protože kumulus se rozpadne v důsledku stimulace gonadotropiny už ve folikulu a kumulární buňky se rozptýlí do antra (Zhuo *et al.*, 2001). Dodání exogenního I α I tuto abnormalitu odstraní (Zhuo *et al.*, 2001).



Obrázek 7 - TNFAIP6 přenáší HC z IαI na hyaluronan (HA). Bikunin je znázorněn oranžově. Přejato a upraveno (Rugg *et al.*, 2005).

Komplexy těžkých řetězců z IαI a hyaluronanu se vytváří i během expanze kumulu u prasete (Nagyová *et al.*, 2004). Exprese *TNFAIP6* je u prasete indukována hCG *in vivo* a FSH s LH v COC i MGC v podmínkách *in vitro* (Nagyová *et al.*, 2009).

2.3.3 PTX3

Dalším proteinem, který je u myši důležitý pro expanzi kumulu, je pentraxin 3 (PTX3). Komplex PTX3 se skládá z osmi identických protomerů, které jsou spojeny disulfidickými vazbami, přičemž již tetramer má biologickou aktivitu (Ievoli *et al.*, 2011; Inforzato *et al.*, 2008). Pentraxin se váže na těžké řetězce (původem z IαI) kovalentně navázané na hyaluronan (Scarchilli *et al.*, 2007).



Obrázek 8 – PTX3 stabilizuje extracelulární matrix vazbou na HC. Přejato a upraveno (Scarchilli *et al.*, 2007).

Samice *Ptx3*^{-/-} myši jsou neplodné, protože jejich oocyty nemohou být *in vivo* oplodněny kvůli abnormálnímu kumulu (Salustri *et al.*, 2004). Jejich kumulární buňky syntetizují srovnatelné množství hyaluronanu jako *wild-type*, ale nedochází k organizaci stabilní extracelulární matrix a mají nižší schopnost retence hyaluronanu (Salustri *et al.*, 2004), případně oocyty kumulů postrádají (Varani *et al.*, 2002). Protilátka proti N-koncové oblasti PTX3, která je důležitá pro interakci s HC, brání rekombinantnímu PTX3, aby zmírnil výše uvedený fenotyp *Ptx3*^{-/-} myši (Scarchilli *et al.*, 2007). Rovněž nižší stupeň oligomerizace PTX3 než tetramer není schopen fenotyp těchto myši změnit (Ievoli *et al.*, 2011).

2.3.4 VCAN a HAPLN1

Versikan (VCAN) je velký proteoglykan, jehož funkce v kumulu není dosud zcela objasněna. U myši a krysy se exprimuje v granulóznicích buňkách a jeho exprese se 10× zvedá po hCG a je pozitivně ovlivněna progesteronem (Russel *et al.*, 2003b). Imunohistochemicky byl prokázán i v expandovaném kumulu a ve žlutém tělísku (Russel *et al.*, 2003b). Versikan je v kumulu štěpen ADAMTS1 (Russel *et al.*, 2003a; Brown *et al.*, 2010). Samice *Adamts1*^{-/-} myši mají méně mláďat ve srovnání s *wild-type* zvířaty, cysty v děloze a snížené množství velkých antrálních folikulů (Shindo *et al.*, 2000). Schopnost ovulace je u těchto myši výrazně snížena, nižší je i podíl oplodněných oocytů ku ovulovaným COC (*in vivo*), zřejmě v důsledku faktu, že v COC těchto myši je přítomen neštěpený versikan (Brown *et al.*, 2010).

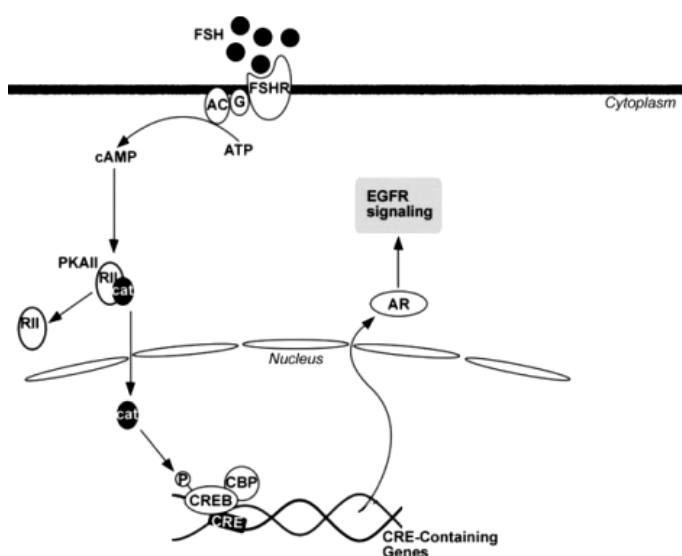
Stimulace gonadotropiny zvyšuje i expresi *Hapln1*, který kóduje protein stabilizující interakci mezi hyaluronanem a versikanem při vývoji srdce (Wiring *et al.*, 2007). U nestimulovaných myši je HAPLN1 imunohistochemicky detekovatelný v oocytech a v théce, po PMSG a hCG se výrazně zvýší jeho množství v MGC i kumulu a zdá se, že je důležitý pro formování žlutého tělíska (Sun *et al.*, 1999). Imunohistochemicky je rovněž detekovatelný i ve folikulární tekutině krysy stimulované PMSG a hCG (Kobayashi *et al.*, 1999). *Hapln1*^{-/-} myši umírají záhy po narození, protože nejsou schopné vytvářet hyalinní chrupavky, takže jim chybí např. výstuž bronchů (Carulli *et al.*, 2010). Nicméně myši, u kterých je exprimován pod kontrolou promotoru pro kolagen II, jsou plodné (Carulli *et al.*, 2010). V kryších granulóznicích buňkách je exprese *Hapln1* indukovatelná FSH a IGF1 a závislá na signalizaci PKB a méně na MAPK14 (Sun *et al.*, 2003).

2.3.5 Signální molekuly regulující expanzi kumulu

Gonadotropiny a faktory rodiny EGF způsobují v kumulární buňkách a MGC aktivaci řady signálních molekul, které ovlivňují expresi genů důležitých pro expanzi kumulu.

2.3.5.1 PKA/cAMP

FSH indukuje v MGC fosforylaci CREB na Ser133 mechanismem závislým na PKA (Gonzalez-Robayna *et al.*, 1999). Tato fosforylace, která může být navozena i v důsledku aktivace MAPK14 (Delghandi *et al.*, 2005), je nutná pro interakci s CBP (Parker *et al.*, 1996). KG-501 (inhibitor interakce CREB s CBP) potlačil v myších COC kultivovaných s FSH expresi *Areg* (Ning *et al.*, 2008).



Obrázek 9 - FSH indukuje expresi *Areg* (AR) mechanismem závislým na PKA. Přejato a upraveno (Ning *et al.*, 2008).

Pro expresi *Areg* jsou ale rovněž důležité MAPK8 a NRIP1 (Nautiyal *et al.*, 2010). Expanze kumulu je vážně narušena u *Nrip1*^{-/-} myši, u kterých nedochází ani k uvolnění COC z folikulu (Nautiyal *et al.*, 2010; Tullet *et al.*, 2005). Je u nich dramaticky nižší exprese *Areg*, *Ptgs2*, *Has2*, *Tnfaip6*, *Adamts1* a *Vcan* (Tullet *et al.*, 2005), rovněž i *Ereg* a *Btc* (Nautiyal *et al.*, 2010). AREG dodaný do kultivačního média byl schopen zvýšit expresi *Ptgs2*, *Has2*, *Ptx3* (a částečně i *Tnfaip6*) na hodnotu srovnatelnou s *wild-type* COC a indukovat expanzi (Nautiyal *et al.*, 2010). AREG injikovaný společně s hCG zvyšuje počet uvolněných COC při superovulaci u *Nrip1*^{+/-} myši, ale není schopen iniciovat ovulaci u *Nrip1*^{-/-} zvířat, přestože v jejich folikulech došlo k expanzi kumulu, ke které při stimulaci pouze s hCG u *Nrip1*^{-/-} myši nedochází (Nautiyal *et al.*, 2010). Zdá se tedy, že primární

příčinou narušení expanze kumulu u *Nrip1*^{-/-} myší je nízká exprese *Areg*. Je rovněž zajímavé, že v granulózních buňkách *Nrip1*^{-/-} myší je výrazně snížena exprese *Areg* po forskolinu nebo AREG, ale nikoliv v důsledku stimulace prostaglandinem E2 (PGE2), přičemž obdobně tomu je i u COC (Nautiyal *et al.*, 2010). Poznatky o významu NRIP1, MAPK8 a CREB jsou v souladu s tím, že u *Mapk14*^{gc-/-} myší, které mají v granulózních buňkách fosforylované CREB a MAPK8, dochází k vyšší expresi *Areg* (Liu *et al.*, 2010), avšak nejsou ve shodě s interpretací, že MAPK14 indukuje expresi *Areg* inhibicí fosforylace MAPK8.

Negativním regulátorem exprese *Ptgs2*, *Pgr*, *Areg*, *Ereg* i produkce progesteronu je u krysy jaderný faktor regulovaný interleukinem 3 (NFIL3), jehož exprese je indukována hCG v granulózních buňkách (Li *et al.*, 2011). NFIL3 interaguje s CBP a CEBPB, a tak inhibuje expresi výše zmíněných genů, přičemž užití RNAi proti němu zvyšuje expresi *Ptgs2* (Li *et al.*, 2011).

V prasečích COC kultivovaných s FSH a LH inhibitor PKA (H89) zcela potlačil expresi *Areg*, *Ereg*, *Has2* a *Tnfaip6*, výrazně snížil expresi *Adam17* a *Ptgs2* (Yamashita *et al.*, 2009).

2.3.5.2 ERBB1

Signalizace prostřednictvím receptoru epidermálního růstového faktoru hraje klíčovou roli v indukci expanze kumulu. U myší, v jejichž granulózních buňkách byla potlačena signalizace prostřednictvím ERBB1, je narušeno znovuzahájení meiózy, expanze kumulu i ovulace (Hsieh *et al.*, 2007; Hsieh *et al.*, 2011; Kelty *et al.*, 2010). Fosforylace MAPK3/1 a MAPK14 indukované LH jsou závislé (u MAPK14 alespoň částečně) na ERBB1 (Hsieh *et al.*, 2011). Inhibitor kinázové aktivity ERBB1 (AG1478) zcela potlačil expresi *Has2*, *Ptgs2* a *Tnfaip6* ve folikulech krysy kultivovaných s LH (Ashkenazi *et al.*, 2005).

Pro expresi *ErbB1* v kumulárních buňkách jsou u myší důležité GDF9 a BMP15, faktory produkované oocytem, a signalizace SMAD2/3 v kumulu (Su *et al.*, 2010). U *Gdf9*^{+/-} *Bmp15*^{-/-} myší je v kumulárních buňkách výrazně potlačena exprese *ErbB1*, *Areg*, *Ereg* a *Btc* a fosforylace MAPK3/1 (Su *et al.*, 2010). Odstranění oocyty vede ke snížení exprese *ErbB1* v kumulárních buňkách i u *wild-type* COC, zatímco pouze *wild-type* oocyty jsou schopné zvýšit expresi *ErbB1* v *Gdf9*^{+/-} *Bmp15*^{-/-} kumulárních buňkách (Su *et al.*, 2010).

2.3.5.3 GDF9 a BMP15

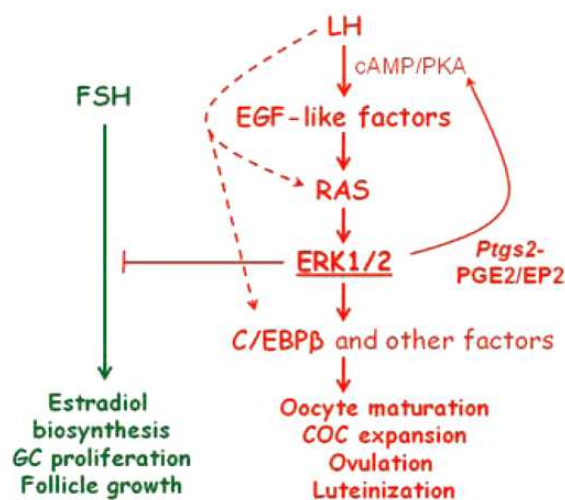
Význam GDF9 a BMP15 pro expresi *ErbB1* u myši do značné míry osvětluje poznatky o úloze těchto proteinů v rámci expanze kumulu, která je u *Gdf9^{+/-} Bmp15^{-/-}* myši narušena (Su *et al.*, 2004). Znovuzahájení meiózy indukované hCG je u těchto myši v podmínkách *in vivo* oddáleno a fosforylace MAPK3/1 v kumulárních buňkách výrazně redukována (Su *et al.*, 2004). Eliminace obou genů *Smad2* a *Smad3* v granulózních buňkách („*conditional gene knockout*“) u myši drasticky naruší folikulogenezi, ovulaci i expanzi kumulu (Li *et al.*, 2008c). *In vitro* vykazují tyto granulózní buňky po stimulaci GDF9 výrazně redukovanou expresi *Has2* a *Ptx3*; exprese *Ptgs2* a *Tnfaip6* je rovněž mírně snížena (Li *et al.*, 2008c).

Nicméně expanze kumulu indukovaná FSH nebo forskolinem není u prasete v podmínkách *in vitro* závislá na přítomnosti oocyty (Procházka *et al.*, 1991). U prasete je totiž *GDF9* exprimován nejen oocytem, ale i v MGC a kumulu, byť je množství *GDF9* v těchto buňkách přibližně třetinové v porovnání s oocytem (Procházka *et al.*, 2004). Je rovněž zajímavé, že množství *GDF9* v kumulární buňkách během kultivace s FSH kontinuálně klesá (v oocyty se nemění) a podobné účinky má i hCG v podmínkách *in vivo* (Procházka *et al.*, 2004). Kultivace prasečích COC v přítomnosti PMSG a hCG má na expresi *GDF9* podobné účinky, ale exprese *BMP15* má maximum v 18. h kultivace a následně klesá, přičemž mezi 12. a 18. h je výrazný nárůst (Li *et al.*, 2008a). Inhibitor SMAD3 (SIS3) narušil expanzi prasečích COC indukovanou FSH i EGF, snížil produkci hyaluronanu a expresi *HAS2* a *TNFAIP6* (Nagyová *et al.*, 2011).

2.3.5.4 MAPK3/1

Význam MAPK3/1 pro znovuzahájení meiózy, expanzi kumulu a ovulaci ukazují myši, v jejichž granulózních buňkách byly geny pro obě tyto MAPK odstraněny (*Mapk3/1^{gc/-}*). Tyto myši jsou zcela neplodné, neovulují, jejich ovária obsahují preovulační folikuly, ale žádná žlutá tělíska, *in vivo* u nich nedochází k expanzi kumulu ani k GVBD (Fan *et al.*, 2009). Oocyty těchto myši v podmínkách *in vitro* meioticky maturují, ale AREG a EREG nestimulují jejich maturaci jako u *wild-type* oocytů (Fan *et al.*, 2009). Po stimulaci hCG mají nízké koncentrace progesteronu v séru a vysoké koncentrace estradiolu v porovnání s *wild-type* zvířaty, protože více exprimují *Cyp19a1* a méně *Sult1e1* (Fan *et al.*, 2009). Expresí genů důležitých pro expanzi kumulu (*Has2*, *Tnfaip6* a *Ptx3*) u nich zcela chybí, podobně

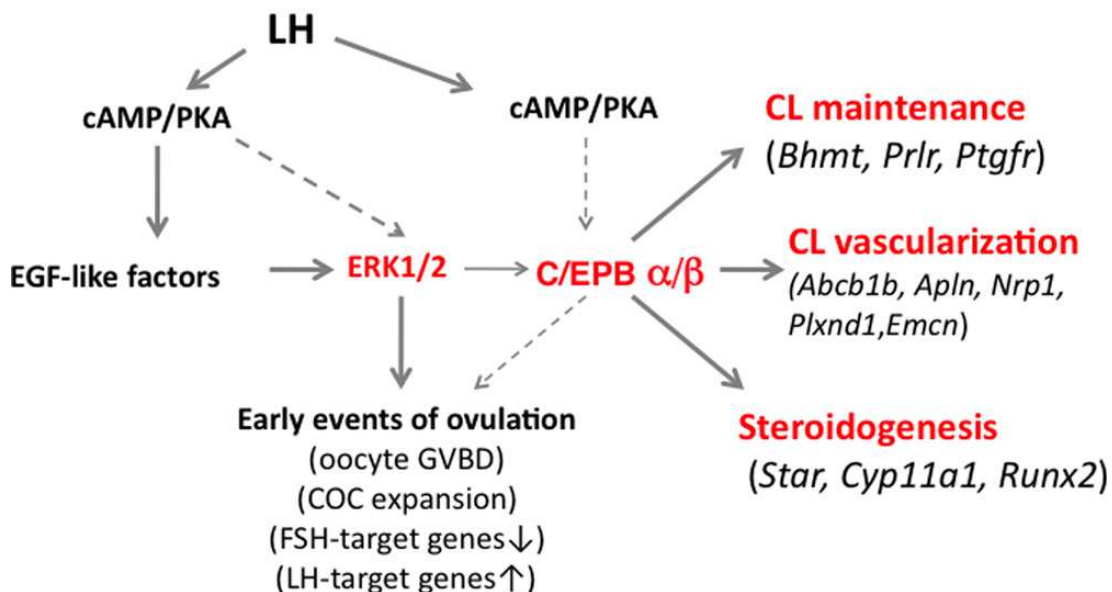
i exprese *Ptgs2* a *Prg* (Fan *et al.*, 2009). Exprese *Ereg* je srovnatelná s *wild-type* zvířaty, ale *Areg* a *Btc* exprimují mnohem méně (Fan *et al.*, 2009). Výrazné potlačení exprese *Areg*, ke kterému dochází u *Ereg*^{-/-} myši, (Kim *et al.*, 2011) společně s těmito výsledky naznačují význam ERBB1 a MAPK3/1 pro expresi *Areg*. V prasečích COC kultivovaných s FSH a LH inhibitor MAPK3/1 (U0126) potlačil expresi *Areg*, *Ereg*, *Adam17*, *Has2*, *Tnfaip6* a *Ptgs2* (Yamashita *et al.*, 2009).



Obrázek 10 - LH snižuje expresi genů spojených s růstem folikulu, produkcí estradiolu a proliferací granulózních buněk, a indukuje procesy vedoucí ke znovuzahájení meiózy, expanzi kumulu, ovulaci a vytvoření žlutého tělíska. Přejato (Fan *et al.*, 2009).

Fenotyp *Mapk3/1*^{gc/-} myši Fan *et al.* (2009) srovnávají s fenotypem *Cebpb*^{gc/-} myši. Jen u myši exprimujících *Cebpb* je schopen AREG indukovat expresi *Ptgs2*, *Tnfaip6*, *Prg* a *Star* (Fan *et al.*, 2009). Samci *Cebpb*^{gc/-} myši jsou fertilní, samice jsou ale neplodné – nemají v ováriích žlutá tělíska, při superovulaci (PMSG a hCG) poskytují jen desetinu COC ve srovnání s *wild-type* zvířaty (Sterneck *et al.*, 1997). Exprese *Cebpb* je v ováriích indukována hCG ve stěnové granulóze a kumulu, a to jak u myši (Sterneck *et al.*, 1997), tak i u krysy (Pall *et al.*, 1997). *Cebpa*^{gc/-} zvířata nemají žádné problémy spojené s reprodukcí, ale eliminace obou genů *Cebpa* i *Cebpb* v granulózních buňkách vede k úplné neplodnosti u samic (Fan *et al.*, 2011). Nicméně příčina neplodnosti těchto myši nespočívá v defektní maturaci oocytů nebo expanzi kumulu a zdá se, že CEBPA a CEBPB ovlivňují expresi jen některých genů (cca 19 %), které jsou indukovány MAPK3/1 (Fan *et al.*, 2011). U *Cebpa/b*^{gc/-} zvířat nedochází k zásadnímu potlačení exprese *Has2*, *Ptx3*, *Tnfaip6*, *Vcan*, *Ptgs2* ani *Il6* (Fan *et al.*, 2011). Zdá se, že transkripční faktory CEBPA/B jsou důležité pro vytvoření a funkci žlutého tělíska, steroidogenezi a vaskularizaci folikulu po ovulaci

(Fan *et al.*, 2011). CEBPA/B nejsou důležité jen pro expresi genů indukovaných MAPK3/1, ale i cAMP/PKA signalizací (Fan *et al.*, 2011)



Obrázek 11 - CEBPA a CEBPB jsou důležité pro vytvoření a funkci žlutého tělíska. Přejato (Fan *et al.*, 2011).

2.3.5.5 MAPK14

Inaktivace („conditional knockout“) *Mapk14* v granulózních buňkách myši poukazuje na význam MAPK14 v rámci expanze kumulu. *Mapk14^{gc/-}* myši jsou plodné a ovulují srovnatelné množství COC po eCG a hCG jako *wild-type* zvířata (Liu *et al.*, 2010). V porovnání s *wild-type* buňkami jejich MGC více exprimují *Areg* a *Ereg* (*in vivo* 4 h po hCG i *in vitro* po forskolinu), zatímco exprese *Areg* a *Ereg* v COC (*in vivo* 4 h po hCG) je poloviční, což naznačuje kompenzační mechanismus nutný pro expresi genů spojených s expanzí kumulu (Liu *et al.*, 2010). Expresce *Areg*, *Ptgs2* a *Has2* je u nich v COC v porovnání s *wild-type* zvířaty srovnatelná nebo mírně nižší, pokud jsou COC stimulovány AREG, ale výrazně nižší při stimulaci PGE2, což naznačuje zapojení MAPK14 v rámci signalizace prostaglandiny, respektive látkami, jejichž druhý posel je cAMP (Liu *et al.*, 2010). Expanze kumulu je u COC *Mapk14^{gc/-}* myši srovnatelná s *wild-type* COC, je-li indukována AREG, ale výrazně nižší po PGE2 nebo FSH (Liu *et al.*, 2010). V *Mapk14^{gc/-}* COC je v porovnání s *wild-type* komplexy dramaticky snižená exprese *Il6*, poloviční exprese *Ptgs2*, *Tnfaip6*, *Ptx3* a *Ptger2* (Liu *et al.*, 2010). V MGC se dramaticky méně exprimuje *Il6*, *Ptx3* je polovina, *Ptgs2*, *Tnfaip6*, *Has2* a *Ptger2* vykazují srovnatelnou expresi jako u *wild-type* zvířat, ale *Areg*, *Inhbb* (inhibin) a *Ereg* jsou zvýšené

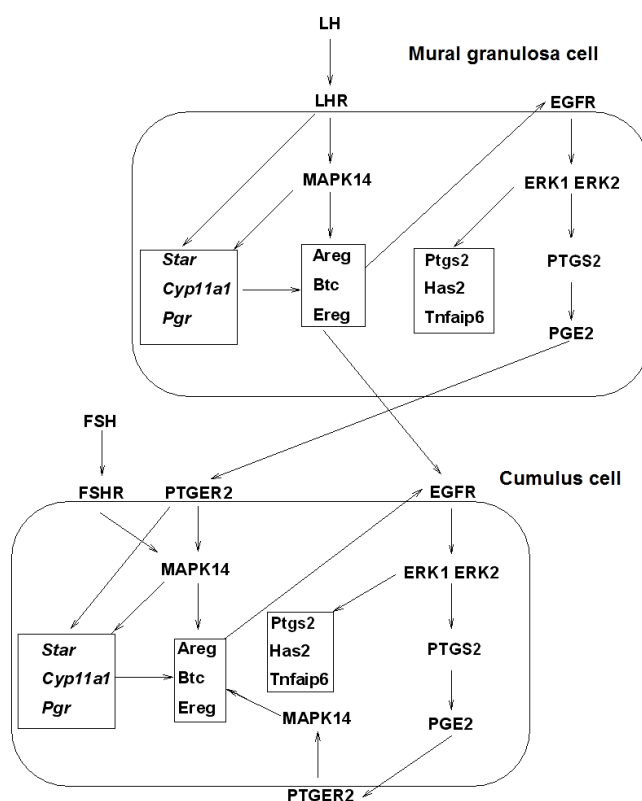
(Liu *et al.*, 2010). V MGC je rovněž nižší exprese *Lcgr*, *Cyp11a1*, *Star* a *Il6*, tedy genů spojených s ovulací a luteinizací (Liu *et al.*, 2010). V prasečích COC kultivovaných s FSH a LH inhibitor MAPK14 (SB230580) zcela potlačil expresi *Has2* a *Tnfaip6*, výrazně snížil expresi *Areg*, *Ereg*, *Adam17* a *Ptgs2* (Yamashita *et al.*, 2009). MAPK14 může být zapojena i do uvolňování AREG a EREG peptidů z transmembránových prekurzorů (Killock *et al.*, 2010; Xu *et al.*, 2010).

2.3.5.6 PTGS2

Klíčovou roli PTGS2 v rámci expanze kumulu a dalších procesech spojených s reprodukcí indikují fenotypy zvířat, u kterých byly geny *Ptgs2* nebo *Ptger2* eliminovány. Samice *Ptgs2*^{-/-} (ale nikoliv *Ptgs1*^{-/-}) myši vykazují normální folikulogenezi, mají sníženou schopnost ovulace, fertilizace a problémy s meiotickou maturací oocytů (Lim *et al.*, 1997). V *in vivo* podmínkách vykazují COC *wild-type* myši první známky expanze 6 h po hCG a zcela expandovány jsou 12 h po hCG, zatímco u *Ptgs2*^{-/-} zvířat vykazují první známky expanze až 9 h po hCG a plné expanze nedosáhnou (Takahashi *et al.*, 2006). PGE2 stimuluje GVBD a expanzi myších COC, zvyšuje expresi *Tnfaip6* a *Ptgs2*, má antiapoptické účinky na kumulární buňky a indukuje fosforylaci PKB v oocytu i v kumulu (Takahashi *et al.*, 2006). Inhibitory MAPK3/1, MAPK14 a NF-κB potlačují expanzi kumulu indukovanou PGE2, zatímco vliv inhibitorů PI3K/PKB, PKA a MAPK8 na expanzi je jen mírný, ale tyto signální molekuly jsou důležité pro antiapoptické účinky PGE2 (Takahashi *et al.*, 2006). COC *Ptger2*^{-/-} myši mají nekvalitní kumulusek, což způsobuje nízký podíl oplozených oocytů ve srovnání s *wild-type* zvířaty (Hizaki *et al.*, 1999; Tilley *et al.*, 1999), a sníženou schopnost ovulovat (Hizaki *et al.*, 1999).

AREG stimuluje expresi *Ptgs2* u myších COC a inhibitor kinázové aktivity ERBB1 (AG1478) tento efekt AREG výrazně snižuje (Shimada *et al.*, 2006b). Podobně i v prasečích COC je exprese PTGS2 indukována FSH, AREG i EREG (Procházka *et al.*, 2011). PGE2 v myších COC zvyšuje expresi *Areg* a *Has2*, přičemž AG1478 má na expresi *Areg* po PGE2 relativně malý vliv (Shimada *et al.*, 2006b). Zdá se tedy, že AREG stimuluje expresi *Ptgs2* v kumulárních buňkách a produkovaný PGE2 způsobuje expresi *Areg* a zprostředkovaně i *Has2* a *Tnfaip6* (Shimada *et al.*, 2006b). Expese *Areg* může být spojena jak s MAPK14, tak i s PKA, zatímco navržený model (obrázek 12) zdůrazňuje roli MAPK14. Tento fakt je zřejmě způsoben tím, že použitý inhibitor PKA (KT5720) není efektivní. PGE2 indukuje

expresi *AREG* a *EREG* i lidských granulózních buňkách podobně jako LH, přičemž inhibitor PKA (H89) je schopen tento efekt PGE2 zcela potlačit a inhibitor MAPK3/1 (U0126) snížit na polovinu (Ben-Ami *et al.*, 2006). V přítomnosti selektivního inhibitoru PTGS2 nimesulidu je schopnost LH indukovat v lidských granulózních buňkách expresi *AREG* a *EREG* dramaticky narušena (Ben-Ami *et al.*, 2006), a tak se zdá, že PGE2 působí autokrinně i na MGC. Inhibitor Janusových kináz (JAKs) potlačil expresi *Ptgs2*, *Has2*, *Ptx3* a *Tnfaip6* indukovanou PGE2 v myších COC, ale neměl negativní vliv na expresi *Areg*, *Ereg*, *Pgr* a *Adamts1* (Liu *et al.*, 2009b).



Obrázek 12 - AREG stimuluje expresi *Ptgs2* v kumulárních buňkách a produkovaný PGE2 způsobuje expresi *Areg* a zprostředkovaně i *Has2* a *Tnfaip6*. EGFR je ERBB1. Přejato a upraveno (Shimada *et al.*, 2006).

Pro expresi *Ptgs2* v preovulačním folikulu je rovněž důležitý transkripční faktor RUNX1 (Liu *et al.*, 2009a), jehož exprese je indukována hCG nebo AREG a senzitivní vůči inhibitorům PKA, MAPK3/1, MAPK14, ERBB1 a PGR (Jo *et al.*, 2006).

Inaktivace estradiolu je rovněž důležitá pro expresi *Ptgs2* a *Tnfaip6* u myši. V COC *Sult1e1*^{-/-} (sulfotranferáza inaktivující estradiol) myši je snížená exprese *Ptgs2* a *Tnfaip6* 5 h po hCG a narušená expanze kumulu (Gershon *et al.*, 2007).

Expres *Sult1e1* v MGC i kumulu je u myši indukovaná hCG a negativně ji ovlivňuje inhibice PTGS2 (Gershon *et al.*, 2007). *Sult1e1*^{-/-} myši mají sníženou schopnost ovulace, kterou zvyšuje injekce PGE2, zatímco injekce estradiolu snižuje počet ovulovaných COC po hCG u *wild-type* zvířat (Gershon *et al.*, 2007). Expres *Sult1e1* je u myši závislá na aktivaci MAPK3/1 (Fan *et al.*, 2009), a tak se zdá, že expres *Areg* indukovaná FSH/LH nebo PGE2 vede cestou aktivace ERBB1 k expresi *Sult1e1*. Estradiol je rovněž důležitý pro funkci NPR2 (Robinson *et al.*, 2012), a tak se zdá, že aktivita SULT1E1 může přispívat k znovuzahájení meiózy.

2.3.5.7 IL6

Produkce IL6 myšimi granulózními buňkami stoupá přibližně 4× díky stimulaci LH, při použití forskolinu a aktivátoru PKC (PMA) je produkce IL6 30× vyšší (Shimada *et al.*, 2007). Antagonista receptoru progesteronu (RU486) redukuje produkci IL6 po LH i forskolinu/PMA (Shimada *et al.*, 2007). FSH/AREG i forskolin/PMA zvyšují produkci IL6 i v COC (Shimada *et al.*, 2007). Expres *Il6* je u myších COC stimulována i PGE2, výrazně ji potlačují inhibitory MAPK14 a PKA, zcela jí zamezí inhibitor MAPK3/1 (Liu *et al.*, 2009b). Inhibitor PTGS2 má na expresi *Il6* negativní vliv jen po stimulaci AREG nebo FSH, což naznačuje, že expres *Il6* je indukována přímo PGE2, byť antagonist progesteronu inhibuje expresi *Il6* i po PGE2 (Liu *et al.*, 2009b). Expres *Il6* je zřejmě ovlivněna i NF-κB (Shimada *et al.*, 2006a).

Kultivace myších COC s IL6 a jeho solubilním receptorem (IL6SR) vede k expanzi kumulu a indukuje fosforylaci STAT3, STAT5, MAPK3/1 a MAPK14, přičemž takto indukovaná expanze je potlačena inhibitory MAPK14, MAPK3/1 a JAKs (Liu *et al.*, 2009b). V médiu s hypoxantinem indukuje IL6 se svým solubilním receptorem (IL6/IL6SR) rozpad zárodečného váčku stejně jako FSH (Liu *et al.*, 2009b). IL6/IL6SR indukoval expresi *Has2* v COC stejně jako FSH, ale expres *Ptgs2*, *Tnfaip6* a *Ptx3* byla po IL6/IL6SR nižší (Liu *et al.*, 2009b). IL6/IL6SR ale zvyšoval expresi genů kódujících molekuly zapojené do signalizace IL6 (*Gp130* a *Stat3*) a transkripční faktory *Cebpb*, *Nrip1* a *Runx1/2* více než FSH (Liu *et al.*, 2009b). Samice *Gp130*^{-/-} myši jsou zcela neplodné kvůli problémům s meiotickou maturací oocytů a ovulací, zatímco samci jsou plodní (Molyneaux *et al.*, 2003). U myši stimulovaných eCG indukuje hCG expresi *Snap25* v COC i MGC (Shimada *et al.*, 2007). Maximum má expres *Snap25* 8 h po hCG a je nižší

u *Ptgs2*^{-/-} zvířat, výrazně snižená u *Pgr*^{-/-} myši a negativně ji ovlivňuje i inhibitor PKC (Shimada *et al.*, 2007). Zdá se, že SNAP25 je nutný pro sekreci IL6 a dalších cytokinů a chemokinů, jejichž produkce MGC i COC se po LH nebo FSH/AREG zvyšuje (Shimada *et al.*, 2007).

Je rovněž zajímavé, že rekombinantní IL6 zlepšuje životaschopnost a vývojovou schopnost prasečích partenogenických embryí – zvyšuje podíl blastocyst, snižuje expresi kaspázy 3 a zvyšuje expresi antiapoptických genů *BCL2L1* a survivinu v blastocystách (Shen *et al.*, 2012). V těchto blastocystách dochází rovněž i k vyšší expresi *OCT3/4*, *SOX2*, *NANOG* (geny klíčové pro pluripotenci) a členů signální dráhy IL6: *IL6R*, *GPI30* a *STAT3* (Shen *et al.*, 2012). Nicméně jeho role v rámci expanze kumulu u prasete nebyla dosud studována.

2.3.5.8 PGR

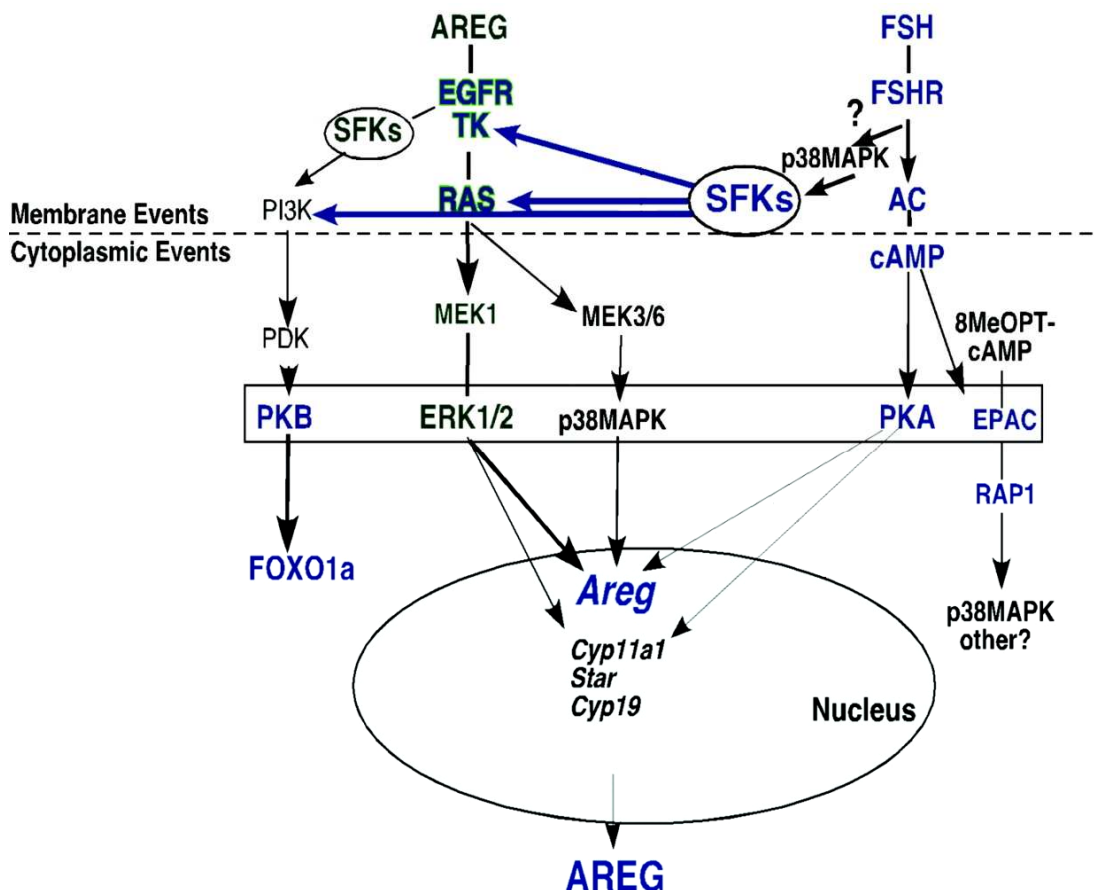
Receptor progesteronu a progesteron samotný rovněž hrají roli během expanze kumulu, jak vyplývá z dosud uvedeného. Exprese *Pgr* stoupá přechodně po hCG u krysy (Park *et Mayo*, 1991) i v prasečích kumulárních buňkách po FSH nebo forskolinu (Shimada *et al.*, 2004b). Samice *Pgr*^{-/-} myši mají výrazné defekty reprodukčního systému, nedostatečně vyvinuté mléčné žlázy, nevykazují sexuální chování a nejsou schopné ovulovat, a to ani po PMSG a hCG (Lydon *et al.*, 1995). U *Pgr*^{-/-} samic zůstávají COC uvnitř luteinovaného folikulu a hCG neindukuje expresi *Adamts1* v granulózních buňkách (Robker *et al.*, 2000). Antagonista receptoru progesteronu (RU486) narušuje expanzi kumulu u prasečích COC (Shimada *et al.*, 2004b), ale nesnižuje expresi *HAS2*, *TNFAIP6* ani *VCAN* (Shimada *et al.*, 2004a). Nicméně snižuje expresi *ADAMTS1* v prasečích COC indukovanou FSH a LH (Shimada *et al.*, 2004a). Tato proteáza je důležitá pro štěpení *VCAN*. U *Pgr*^{-/-} myši je rovněž nižší exprese *Areg* a *Ereg* (Shimada *et al.*, 2006b). Nižší exprese *Areg* a *Ereg* může souviset s rolí progesteronu v rámci uvolňování *AREG* a *EREG* signálních peptidů, jak byla popsána u prasete (Yamashita *et al.*, 2010). Antagonista receptoru progesteronu inhibuje expresi *Runx1* indukovanou hCG v granulózních buňkách krysy, přičemž *RUNX1* je důležitý pro sekreci progesteronu (Jo *et Curry*, 2006).

2.3.5.9 PKB

Role PKB v rámci signalizace vedoucí k expanzi kumulu není jasná, ostatně ani mechanismus, kterým je PKB aktivována. Fosforylaci PKB u myši vyvolává LH nezávisle na ERBB1 a AREG (Hsieh *et al.*, 2011). Lidský choriový gonadotropin indukuje v MGC i COC myši expresi neuregulinu 1 (NRG1), který indukuje fosforylaci PKB a nikoliv MAPK3/1, ale v kombinaci s AREG zvyšuje fosforylaci MAPK3/1 (Noma *et al.*, 2011). Tomu odpovídá i zjištění, že NRG1 nestimuluje expresi *Has2*, *Ptgs2* ani *Tnfaip6*, ale kombinace NRG1 a AREG má na expresi těchto genů větší vliv než AREG samotný (Noma *et al.*, 2011). NRG1 samotný rovněž nemá vliv na GVBD ani expanzi kumulu, ale v kombinaci s AREG 2× zvýší podíl dvoubuněčných embryí v porovnání s COC, které byly stimulovány pouze AREG (Noma *et al.*, 2011).

V kultuře granulózních buněk myši je PKB fosforylována díky stimulaci FSH, forskolinem a analogem cAMP (Wayne *et al.*, 2007). Fosforylaci PKB po FSH potlačují inhibitory rodiny Src kináz (SFKs), MAPK14 a ERBB1 (Wayne *et al.*, 2007). Při stimulaci AREG fosforylaci PKB zcela potlačí inhibitor SFKs a kinázové aktivity ERBB1, mírně ji potlačí inhibitor PKA a MAPK14 (Wayne *et al.*, 2007). Fosforylace PKB v oocytu i v kumulu byla rovněž nižší u *Ptgs2*^{-/-} myší (Takahashi *et al.*, 2006). Zdá se tedy, že PKB může být aktivována i na základě signalizace cAMP, např. prostřednictvím RAPGEF3 (Mei *et al.*, 2002).

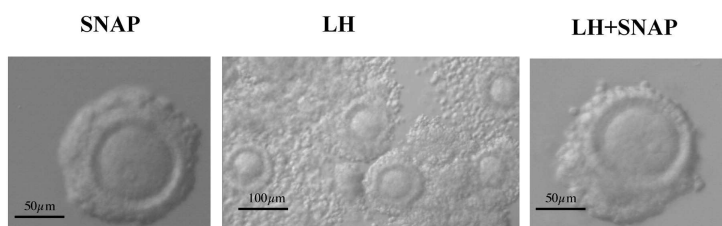
V prasečích COC inhibitor PI3K (LY294002) potlačil aktivaci MAPK3/1 indukovanou EGF a jeho efekt nebylo možno překonat vyšší koncentrací EGF (Li *et al.*, 2008b). V prasečích COC kultivovaných s FSH a LH inhibitor PI3K (LY294002) neměl signifikantní vliv na expresi *Areg*, *Ereg* ani *Adam17* (Yamashita *et al.*, 2009).



Obrázek 13 - Komunikace mezi signalizací FSH a faktory rodiny EGF v granulózních buňkách. MAPK14 je p38MAPK. Přejato a upraveno (Wayne *et al.*, 2007).

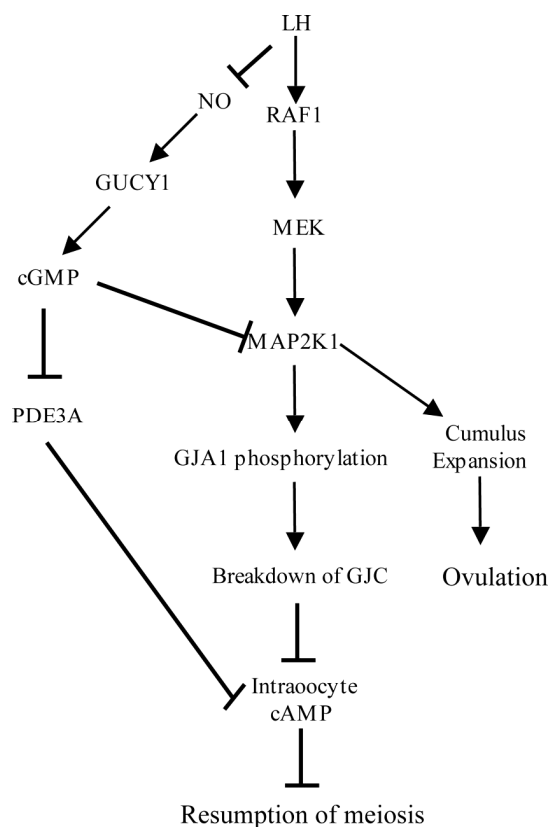
2.3.5.10 NO/cGMP

Expanze kumulu může být také inhibována oxidem dusnatým, respektive cGMP. Donor NO (SNAP) *in vivo* inhiboval u myši ovulaci indukovanou hCG a v podmínkách *in vitro* expanzi kumulu a znovuzahájení meiózy indukované LH (Sela-Abramovich *et al.*, 2008). Vliv SNAP na expanzi kumulu byl závislý na cGMP a jeho příčinou byla inhibice MAP2K1, která je nutná pro aktivaci MAPK3/1 (Sela-Abramovich *et al.*, 2008). MAPK3/1 jsou nezbytné pro uzavření komunikace prostřednictvím vodivých spojů (Norris *et al.*, 2008) a expresi důležitých genů potřebných pro expanzi kumulu (Fan *et al.*, 2009). Inhibitor solubilních guanylátcykláz (ODQ) měl podobné účinky jako LH, což naznačuje, že LH nějakým způsobem ovlivňuje syntézu NO.



Obrázek 14 - Donor NO (SNAP) inhibuje expanzi kumulu indukovanou LH (Sela-Abramovich *et al.*, 2008).

Podobně i jiný donor NO (nitroprusid sodný) inhiboval expanzi kumulu u prasečích COC indukovanou FSH a hCG (Tao *et al.*, 2005). Natriuretický peptid A negativně ovlivňuje zrání oocytů a expanzi kumulu u prasečích COC kultivovaných v přítomnosti FSH, přičemž 8-Br-cGMP má podobné účinky a efekt natriuretického peptidu A i 8-Br-cGMP na GVBD a expanzi kumulu lze odstranit inhibitorem cGMP-závislé proteinkinázy (PRKG) KT5823 (Zhang *et al.*, 2005a; Zhang *et al.*, 2005b). Zajímavé je, že ANP/cGMP má vliv pouze na FSH-indukovanou maturaci a nikoliv na spontánní (Zhang *et al.*, 2005b).



Obrázek 15 - NO/cGMP jako inhibitor expanze kumulu a znovuzahájení meiózy. Přejato (Sela-Abramovich *et al.*, 2008).

Byť se vzhledem k novějším poznatkům o syntéze cGMP v myších folikulu jedná o kontroverzní výsledky, zdá se, že cGMP může díky svým negativním účinkům na signalizaci MAPK3/1 inhibovat znovuzahájení meiózy i prostřednictvím regulace vodivých spojů. Cyklický GMP možná díky inhibici MAPK3/1 do určité míry synchronizuje expanzi kumulu a znovuzahájení meiózy – jeho pokles způsobí GVBD a umožní expanzi kumulu.

Role PRKG v těchto procesech je ale nejasná. Exprese *Prkg2* je v myších COC i MGC indukována hCG a potlačují ji inhibitory PKC, ERBB1, MAPK3/1 a antagonist receptoru progesteronu (Sriraman *et al.*, 2006). Její exprese je rovněž redukována antagonistou receptoru endotelinu 2 a zdá se, že dráha progesteron/endotelin 2/PRKG2 je důležitá pro vlastní uvolnění COC z folikulu (Palanisamy *et al.*, 2006).

3 MATERIÁL A METODY

3.1 Izolace a kultivace COC a MGC

Vaječníky prepubertálních prasnic byly získány na jatkách. Ihned po porážce byly umístěny do termosky, která obsahovala pufovaný fyziologický roztok (PBS; Sigma-Aldrich, Praha, ČR) o teplotě 37 °C. Během 2 h byly vaječníky dopraveny do laboratoře, kde byly promyty PBS o teplotě 37 °C. Následně byla aspirována folikulární tekutina (obsahující COC a shluky MGC) z folikulů o průměru 3-6 mm pomocí injekční stříkačky a 20 G jehly. Aspirovaná folikulární tekutina byla umístěna do plastové zkumavky, ve které COC a shluky MGC volně sedimentovaly. Po 10 minutách sedimentace byla folikulární tekutina opatrně odsáta tak, aby nedošlo k nasátí COC a MGC ze dna zkumavky. Zkumavky byly naplněny PBS o teplotě 37 °C, otáčením zkumavky byl sediment rozptýlen a směs byla ponechána volně k sedimentaci (10 minut). Poté byl supernatant odsát, sediment promíchán s PBS a vzniklá směs nalita do plastové Petriho misky. Pod binokulární lupou byly ze směsi pomocí tenké skleněné kapiláry a nasávací plastové hadičky vybírány COC, respektive MGC. V případě COC byly selektovány jen komplexy s kompaktním kumulem o průměru cca 330 μm a nevykazující abnormální morfologii nebo barvu. COC/MGC byly umístěny do menší plastové Petriho misky s 2 ml PBS s 5 % fetálního hovězího séra (FCS; Sigma-Aldrich, Praha, ČR), nebo 3 mg/ml polyvinylpyrolidonu (Sigma-Aldrich, Praha, ČR), případně s 10 % folikulární tekutiny z folikulů 3-6 mm (viz dále). Před kultivací byly COC/MGC promyty v kultivačním médiu, aby nedocházelo k naředění média PBS.

COC/MGC byly kultivovány ve čtyřjamkových destičkách (Nunclon, Roskilde, Dánsko). Do jamky bylo vždy umístěno buď 30 COC, nebo 30 shluků MGC. V obou případech kultivace probíhala v 500 μl média M-199 (Gibco, Life Technologies, Rockville, USA) obohaceného o pyruvát sodný (0,91 mM; Sigma-Aldrich, Praha, ČR), L-cystein (0,57 mM; Sigma-Aldrich, Praha, ČR), Hepes (5,50 mM; Sigma-Aldrich, Praha, ČR), penicilin G (50 μg/ml; Sigma-Aldrich, Praha, ČR) a streptomycin (50 μg/ml; Sigma-Aldrich, Praha, ČR). Médium bylo dále doplněno o makromolekulární složku. Pro experimenty s inhibitory vybraných signálních molekul bylo použito FCS (5 %), stejně tak i pro přípravu vzorků, na kterých byly ověřovány výsledky z mikročipu. Vliv analogů cGMP na zrání oocytů byl testován v médiu obohaceném o folikulární tekutinu z folikulů

prepubertálních prasníc o průměru 3-6 mm (10 %). Efekt analogů cGMP na expresi genů důležitých pro expanzi kumulu a na fosforylaci MAPK3/1 byl zjišťován v chemicky definovaném médiu, jehož makromolekulární složku představoval polyvinylpyrolidon (3 mg/ml).

V práci byly použity inhibitory vybraných signálních molekul, jejichž souhrn poskytuje tabulka 1. Všechny inhibitory byly rozpuštěny v DMSO (Sigma-Aldrich, Praha, ČR). Vzniklý roztok byl rozdělen na podíly a uchováván v $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$. Do kultivačního média byly inhibitory přidány až těsně před kultivací. Maximální koncentrace DMSO činila 0,2 % (v/v). Poté byly do kultivačního média přidány COC/MGC a kultivovány 1 h. Následně bylo médium doplněno o FSH (1 IU/ml; Sigma-Aldrich, Praha, ČR), LH (1 IU/ml; Sigma-Aldrich, Praha, ČR) nebo AREG (100 ng/ml; Sigma-Aldrich, Praha, ČR). Obsah jamek byl vždy pečlivě promíchán.

Tabulka 1 – Použité inhibitory.

Inhibitor	Výrobce	Cílová molekula	Výsledná koncentrace v médiu
H89	Sigma-Aldrich, Praha, ČR	PKA	20 μM
SB203580	Merck Chemicals, Nottingham, UK	MAPK14	20 μM
U0126	Merck Chemicals, Nottingham, UK	MAP2K1/2	10 μM
AG1478	Sigma-Aldrich, Praha, ČR	ERBB1	10 μM
LY294002	Sigma-Aldrich, Praha, ČR	PI3K	25 μM

Analogy cGMP 8-CPT-cGMP a 8-Br-cGMP (oba Sigma-Aldrich, Praha, ČR) byly uchovávány v $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$. Po vyjmutí z lednice byly nádobky s analogy ponechány volně na stole, aby se ohřály na laboratorní teplotu. Následně bylo na analytických vahách odváženo cca 1,0-2,0 mg analogu a látka rozpuštěna v adekvátním množství média. Pro experimenty, jejichž cílem bylo stanovit vliv analogů cGMP na zrání oocytů, byla koncentrace analogu 100 μM ; pro real-time RT-PCR byla vzhledem ke kratší době kultivace užita koncentrace 500 μM .

Veškeré kultivace COC nebo MGC probíhaly při 38,5 $^{\circ}\text{C}$ ve zvlhčené atmosféře s 5% CO_2 .

3.2 Izolace RNA

Izolace celkové RNA byla u COC i MGC prováděna pomocí RNeasy Mini Kit (QIAGEN, Hilden, Německo).

Po ukončení kultivace byly COC/MGC pomocí skleněné kapiláry s nasávací plastovou hadičkou přeneseny z kultivačních jamek do plastových eppendorfek o objemu 1,5 ml. Vzhledem k tomu, že se společně s COC/MGC přenesou i část kultivačního média, které je třeba odsát, byla sedimentace COC/MGC podpořena krátkou centrifugací (10 s, 1000 rcf). Poté byly COC/MGC lyzovány v 350 μ l RLT pufru s 3,5 μ l 2-merkptoethanolu. Kompletní lýza byla ověřena pomocí binokulární lupy. Následně bylo k lyzátu přidáno 350 μ l 70% ethanolu, směs byla promíchána otáčením zkumavky (20 \times) a přenesena na izolační kolonku doplněnou sběrnou eppendorfkou. Kolonky se sběrnými eppendorfkami byly umístěny do centrifugy, ve které byla provedena centrifugace (15 s, 8000 rcf). Poté byl obsah sběrných eppendorfek vyliť, kolonky promyty 700 μ l RW1 pufru a následovala další centrifugace (15 s, 8000 rcf). Kolonky byly přeneseny na nové sběrné eppendorfky. Na kolonky bylo nanášeno 500 μ l roztoku RPE a provedena centrifugace (15 s, 8000 rcf). Následně byl obsah sběrných zkumavek odstraněn, na kolonky nanášeno 500 μ l RPE a znovu provedena centrifugace (2 min, 8000 rcf). Na jednu kolonku byl třeba 1 ml roztoku RPE, který byl připraven ze zásobního roztoku obsaženého v soupravě a absolutního ethanolu v poměru 1:4 (v/v). Potřebné množství roztoku RPE bylo připraveno vždy před vlastní izolací, aby nedocházelo ke změnám ve složení roztoku během jeho skladování. Po poslední dvouminutové centrifugaci byl obsah sběrných eppendorfek odstraněn a kolonky se sběrnými eppendorfkami centrifugovány (1 min, 8000 rcf), aby se z kolonek odstranily poslední zbytky ethanolu, který je pro další postup nežádoucí. Kolonky byly po centrifugaci rychle přeneseny na eppendorfky o objemu 1,5 ml a na kolonky bylo nanášeno 25 μ l čisté vody prosté RNáz. Kolonky byly ponechány 1 min při laboratorní teplotě a následně centrifugovány (1 min, 8000 rcf). Celý postup se opakoval s dalšími 25 μ l vody, takže RNA zachycená v kolonce byla eluována celkem 50 μ l vody. Izolovaná RNA byla uchovávána v -80 °C. V případě MGC byla koncentrace RNA v získaném roztoku stanovena spektrofotometricky pomocí přístroje NanoDrop ND-1000 (NanoDrop Technologies, Wilmington, USA). Za tímto účelem byl získaný roztok

RNA promíchán jemným poklepáváním prsty a byly z něj odebrány 2 μ l ještě před umístěním do -80 °C.

3.3 Návrh a testování primerů pro real-time RT-PCR

Primery pro real-time RT-PCR byly navrženy v programu Oligo6 (Molecular Biology Insights Inc., Cascade, USA). Optimální teplota pro nasednutí primerů byla stanovena na základě gradientové PCR. Všechny použité primery poskytovaly aplikony odpovídající velikosti.

3.4 Real-time RT-PCR

Real-time RT-PCR byla provedena pomocí QIAGEN One-Step RT-PCR Kit (QIAGEN, Hilden, Německo) na cykleru RotorGene 3000 (Corbett Research, Sydney, Australia). Reakční směs o celkovém objemu 25 μ l obsahovala QIAGEN One-Step RT-PCR pufr (1 \times), dNTPs (400 μ M každý), specifické primery (viz tabulka 2; každý 400 nM), SybrGreenI (0,5 μ l ze 1000 \times naředěného zásobního roztoku; Molecular Probes, Eugene, USA), 5 IU inhibitoru RNáz RNasine (Promega, Madison, USA), QIAGEN One-Step RT-PCR Enzyme Mix (1 μ l) a templátovou RNA (3 μ l).

Reakční podmínky byly následující:

1. reverzní transkripce: 50 °C, 30 min
2. predenaturace: 95 °C, 15 min
3. PCR
 - I. denaturace: 95 °C, 30 s
 - II. nasednutí primerů při specifických teplotách (viz tabulka 2): 20 s
 - III. extenze: 72 °C, 20 s

Měření fluorescence bylo prováděno na konci extenze při 72 °C. Vzhledem k tomu, že u některých produktů (*ASNS*, *HDAC2*, *HPRT*) byla teplota tání blízká 72 °C, byly extenze i měření fluorescence prováděny při 70 °C.

Interakce SybrGreenI s DNA není sekvenčně specifická, což může negativně ovlivnit výsledek kvantifikace. Za účelem ověřit, že se během PCR nasyntetizoval jen jeden produkt, byla vytvořena křivka tání. Dále lze pomocí křivky tání posoudit, zda se teplota tání produktu nenachází blízko teploty extenze a měření. Velikost produktů byla dále ověřována pomocí elektroforézy v 1,5% agarozovém gelu v TAE pufru. Výsledky elektroforézy byly vizualizovány ethidium bromidem a pomocí

MultiImage Light Cabinet se software ChemiImager 4000i 3.3b (Alpha Innotech Corp., Leandro, USA).

Relativní koncentrace templátu byla stanovena pomocí komparativní analýzy, při které je množství templátu vztahováno k určenému stanovovanému vzorku. Software provádějící tuto analýzu je dodáván s cyklem RotorGene 3000. Naměřené hodnoty byly normalizovány porovnáním s relativní koncentrací vnitřního standardu (*ACTB*, nebo *HPRT*).

Tabulka 2 – Použité primery.

Gen	Sekvence	Délka [bp]	T _{an} [°C]	Odkaz
ACTB	F: 5'– GAG AAG CTC TGC TAC GTC G –3'	129	55	Procházka <i>et al.</i> , 2011
	R: 5'– CCA GAC AGC ACC GTG TTG G –3'			
AREG	F: 5'– GAT CCT CTG CTC AGC CCA TTA TG –3'	140	54	Procházka <i>et al.</i> , 2011
	R: 5'– CCT CAC TTC CCG AGG ACA TC –3'			
ASNS	F: 5'– GAA AGG TGG CAG ATC ATA TTG –3'	172	51	NM_001167640
	R: 5'– TCC GTG TTC TTC CGA ATG TA –3'			
CITED2	F: 5'– CGC GGC CAG GTT TAA CAA CTC –3'	149	59	XM_003353194
	R: 5'– GCA AAT CCG GCA TGT AGT GGT –3'			
EREG	F: 5'– AAG ACA ATC CAG GTG TGG CTC AAG –3'	278	58	Yamashita <i>et al.</i> , 2007
	R: 5'– CGA TTT TTG TAC CAT CTG CAG AAA –3'			
HAS2	F: 5'– GAA GTC ATG GGC AGG GAC AAT TC –3'	407	54	Procházka <i>et al.</i> , 2011
	R: 5'– TGG CAG GCC CTT TCT ATG TTA –3'			
HDAC2	F: 5'– TCA AAT TTC TGC GTT CAA TA –3'	189	51	XM_001925318
	R: 5'– CCC AGT TAA CAG CCA TAT C –3'			
HPRT	F: 5'– CCA GTA AAC GGG CGA TAT AA –3'	129	55	Dyce <i>et al.</i> , 2004
	R: 5'– CTT GAC CAA GGA AAG CAA GG –3'			
NPPC	F: 5'– AGA AGG GCG ACA AGA CTC CT –3'	182	59	NM_001008482
	R: 5'– GAA GCA GCC CTT GGA CAA AC –3'			
NPR2	F: 5'– TGC TTT GAT GCC ATA ATT GA –3'	137	50	NM_001244322
	R: 5'– AAT GCT AGG GCC ATA CGA G –3'			
ODC1	F: 5'– GAG GAG GCC AGT GAG CAG ACG TT –3'	176	62	NM_001122983
	R: 5'– CGA TCC AGG CCG TCA CAG –3'			
PGR	F: 5'– CCT AGC TCA CAG CGT TTC TAC C –3'	179	55	Ying <i>et al.</i> , 2000
	R: 5'– CAT CCC TGC CAA TAT CTT GG –3'			
PTGS2	F: 5'– AAA TAA TAT AAG CTT CTG ACT CC –3'	190	55	Procházka <i>et al.</i> , 2011
	R: 5'– TCC TAA AAT TGA GGA AAC TCC –3'			
RAP2A	F: 5'– GCA GTT CGT GAC CGG CTC C –3'	237	59	NM_001123185
	R: 5'– ATC TGG TCC CGC ATA GGC TTG –3'			
SMOX	F: 5'– CCG TGT ACA GAG CGT GAA A –3'	105	55	NM_001185170
	R: 5'– CCA TTG GCT TCT GCT AGA TGA –3'			
TNFAIP6	F: 5'– TCA TAA CTC CAT ATG GCT TGA AC –3'	391	54	Yamashita <i>et al.</i> , 2007
	R: 5'– TCT TCG TAC TCA TTT GGG AAG CC –3'			
TNFRSF12A	F: 5'– GGA GCG CGG ACC TAG ACA AGT –3'	198	65	NM_001142839
	R: 5'– CTC TCC TGC GGC ACC GTC TC –3'			

T_{an} je teplota nasednutí primerů.

3.5 Stanovení jaderné maturace

COC byly kultivovány 44 h v médiu M-199 obohaceném o výše uvedené chemikálie, folikulární tekutinu (10 %) a FSH, případně i o analogy cGMP. Poté byly COC přeneseny skleněnou kapilárou s nasávací hadičkou z kultivační jamky do tenké skleněné zkumavky s malým množstvím PBS. Kumulus byl odstraněn vortexováním (25 Hz, 3 min). Oocyty byly ze zkumavky vypláchnuty PBS do malé Petriho misky, odkud byly skleněnou kapilárou s nasávací hadičkou přenášeny do malé kapky PBS na jiné Petriho misce. Poté, co byly všechny oocyty sesbírány, byly v malém množství média přeneseny na podložní sklo. Na tomto skle byly pomocí injekční stříkačky s 18 G jehlou nanесeny dvě linie lékařské vazelíny, mezi kterými se nacházely oocyty. Po odsátí PBS pomocí kapiláry bylo na vazelínu opatrně položeno krycí sklo, které bylo tlačeno kapilárou do vazelíny tak, aby se oocyty dotýkaly povrchu krycího skla, ale zároveň nedošlo k jejich rozmáčknutí. Takto připravený preparát byl rychle přenesen do fixačního roztoku, který tvořila směs ledové kyseliny octové s absolutním ethanolem v poměru 1:3. Ve skleněné kyvetě s touto směsí byly preparáty fixovány alespoň 48 h. Před pozorováním byly obarveny 1% orceinem. Přebytečný orcein byl ihned vymyt fixačním roztokem a obarvený preparát pozorován pod světelným mikroskopem. Byly zaznamenány počty oocytů, které zůstaly ve stádiu zárodečného vajíčka (GV), prošly rozpadem zárodečného vajíčka, ale nebyly v metafázy II (GVBD), a oocyty v metafázy II (MII).

3.6 Western blot

Na konci kultivace byly COC promyty v PBS a rozpuštěny v 20 μ l Laemmli vzorkového pufru (30 COC na vzorek), který obsahoval 2 % SDS a 5 % 2-merkaptoethanolu. Vzorky byly povařeny 3 min a následně uschovány v -20 °C. SDS-PAGE byla provedena v 10% gelu. Poté byly proteiny přeneseny z gelu na Immobilon-P membránu (Millipore, Bedford, USA). Membrány byly 2 h při laboratorní teplotě blokovány v roztoku, který byl připraven rozpuštěním suchého odtučněného mléka (5 %) a Tween 20 (0,5 %) v TBS. Následně byly membrány inkubovány přes noc s primárními protilátkami (1:1000) v 5% roztoku BSA v TBS-Tween 20 při teplotě 4 °C. Použité primární protilátky byly p-ERK and ERK1 detekující MAPK3/1 (Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, USA). Sekundární protilátka konjugovaná s křenovou peroxidázou (Amersham ECL anti-mouse

or anti-rabbit IgG, GE Healthcare, Little Chalfont, UK) byla rozpuštěna (1:5000) v 2% roztoku BSA v TBS-Tween 20. Membrány byly inkubovány s roztokem sekundární protilátky 1 h při laboratorní teplotě a po inkubaci důkladně oplachovány TBS-Tween 20. Vizualizace byla provedena pomocí chemiluminescence (Pierce, Rockford, USA) na fotografický film. Intenzita proužků byla analyzována denzitometricky pomocí Image J Version 1.29 software (National Institute of Mental Health, Bethesda, USA).

3.7 Statistická analýza

Každý experiment (vyjma předběžných výsledků týkajících se *NPPC* a *NPR2*) byl proveden alespoň na třech vzorcích, které byly vytvořeny nezávisle na sobě v různé dny. Real-time RT-PCR byla prováděna v duplikacích. Pro statistické výpočty byl použit program GraphPad Prism version 4 (GraphPad Software, San Diego, USA). Rozdíly byly považovány za signifikantní při $P < 0,05$.

4 VÝSLEDKY

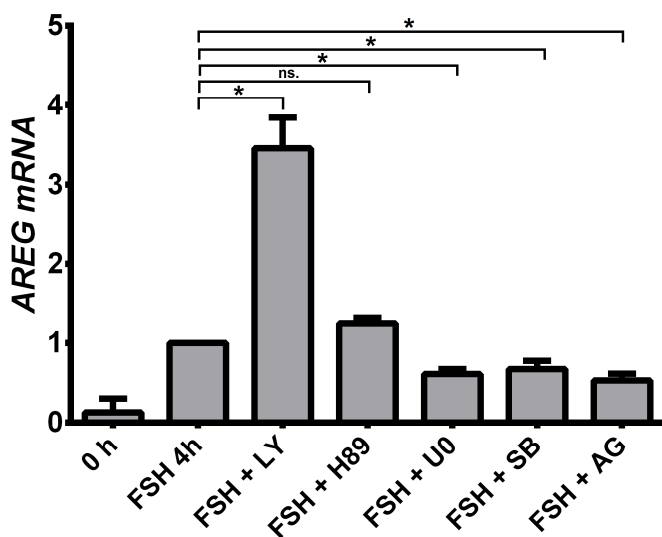
Výsledky prezentované v této práci jsou součástí dvou článků, které byly přijaty po drobných úpravách k publikaci (rukopisy v příloze):

- Procházka, Blaha, Němcová: Signaling pathways regulating FSH- and amphiregulin-induced meiotic resumption and cumulus cell expansion in the pig. *Reproduction*
- Blaha, Procházka, Němcová: Cyclic Guanosine Monophosphate Does Not Inhibit Mitogen-Activated Protein Kinase Signaling and Expression of Cumulus Expansion-Related Genes in Porcine Cumulus-Oocyte Complexes. *Journal of Reproduction and Development*

4.1 Efekt inhibitorů vybraných signálních molekul na expresi *AREG*, *EREG*, *HAS2*, *PTGS2* a *TNFAIP6*

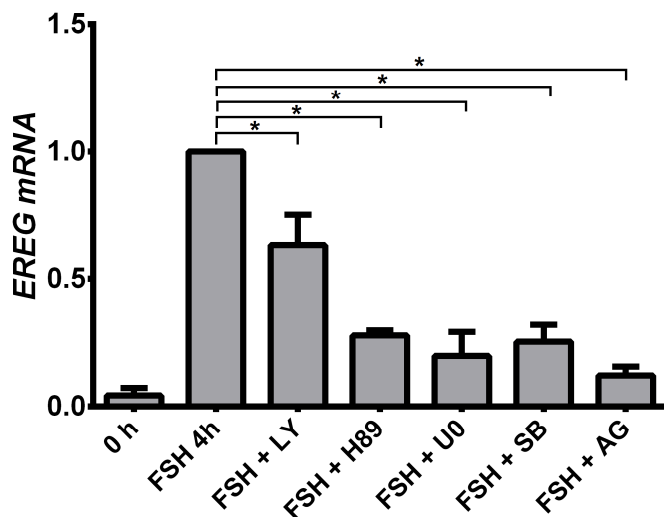
4.1.1 Efekt inhibitorů na expresi *AREG* v COC indukovanou FSH

FSH zvýšil expresi *AREG* v prasečích COC po 4 h kultivace. Inhibitor PKA (H89) neměl na expresi *AREG* signifikantní vliv. Inhibitory MAPK3/1 (U0), MAPK14 (SB) a ERBB1 (AG) signifikantně potlačily expresi *AREG* v porovnání s FSH 4 h. Inhibitor PI3K (LY) expresi zvýšil.



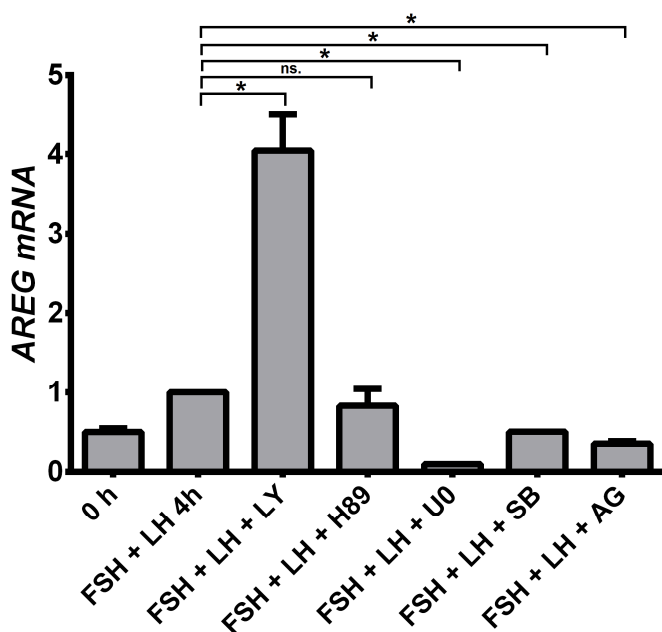
4.1.2 Efekt inhibitorů na expresi *EREG* v COC indukovanou FSH

FSH zvýšil expresi *EREG* v prasečích COC po 4 h kultivace. Všechny použité inhibitory PI3K (LY), PKA (H89), MAPK3/1 (U0), MAPK14 (SB) a ERBB1 (AG) signifikantně potlačily expresi *EREG* v porovnání s FSH 4 h.



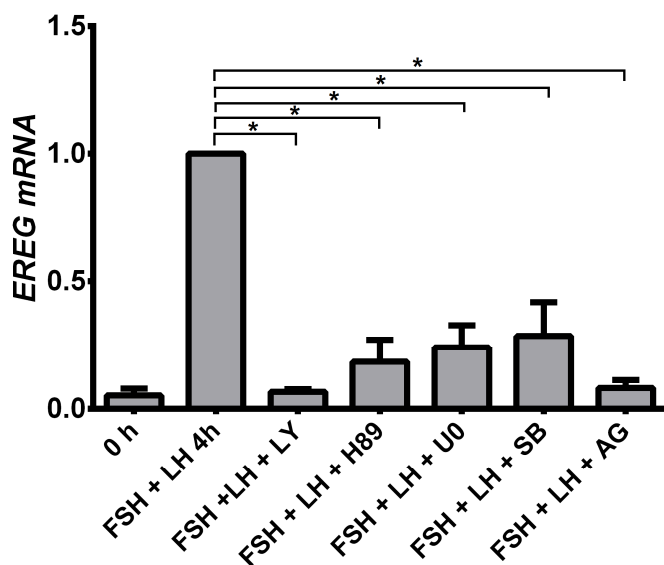
4.1.3 Efekt inhibitorů na expresi *AREG* v MGC indukovanou FSH a LH

FSH a LH zvýšily expresi *AREG* v prasečích MGC po 4 h kultivace. Inhibitor PKA (H89) neměl na expresi *AREG* signifikantní vliv. Inhibitory MAPK3/1 (U0), MAPK14 (SB) a ERBB1 (AG) signifikantně potlačily expresi *AREG* v porovnání s FSH+LH 4 h. Inhibitor PI3K (LY) expresi výrazně zvýšil.



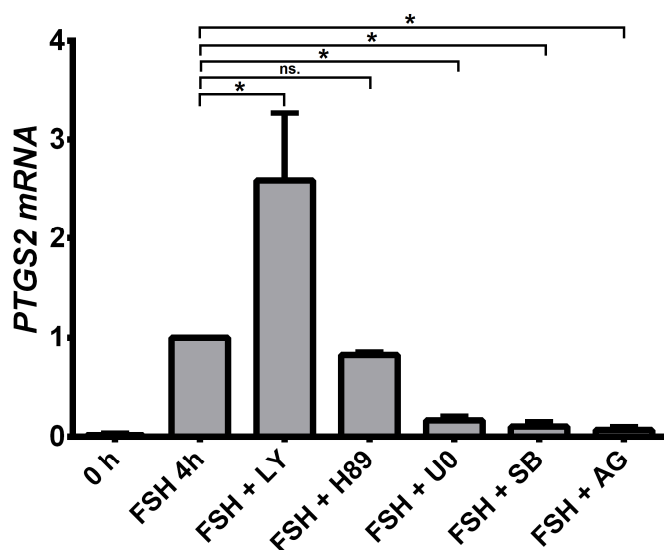
4.1.4 Efekt inhibitorů na expresi *EREG* v MGC indukovanou FSH a LH

FSH a LH zvýšily expresi *EREG* v prasečích MGC po 4 h kultivace. Všechny použité inhibitory PI3K (LY), PKA (H89), MAPK3/1 (U0), MAPK14 (SB) a ERBB1 (AG) signifikantně potlačily expresi *EREG* v porovnání s FSH+LH 4 h. Efekt inhibitoru PI3K (LY) byl větší než ten, který byl pozorován u COC.



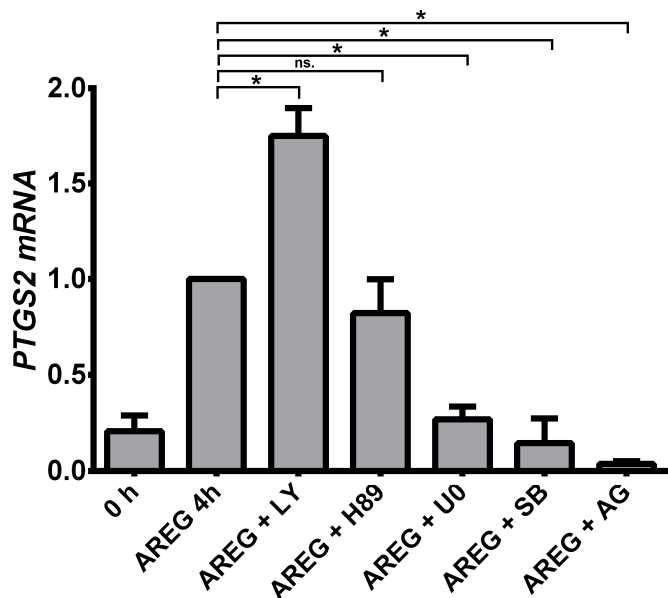
4.1.5 Efekt inhibitorů na expresi *PTGS2* v COC indukovanou FSH

FSH zvýšil expresi *PTGS2* v prasečích COC po 4 h kultivace. Inhibitor PKA (H89) neměl na expresi *PTGS2* signifikantní vliv. Inhibitory MAPK3/1 (U0), MAPK14 (SB) a ERBB1 (AG) signifikantně potlačily expresi *PTGS2*, zatímco inhibitor PI3K (LY) tuto expresi zvýšil (vše v porovnání s FSH 4 h).



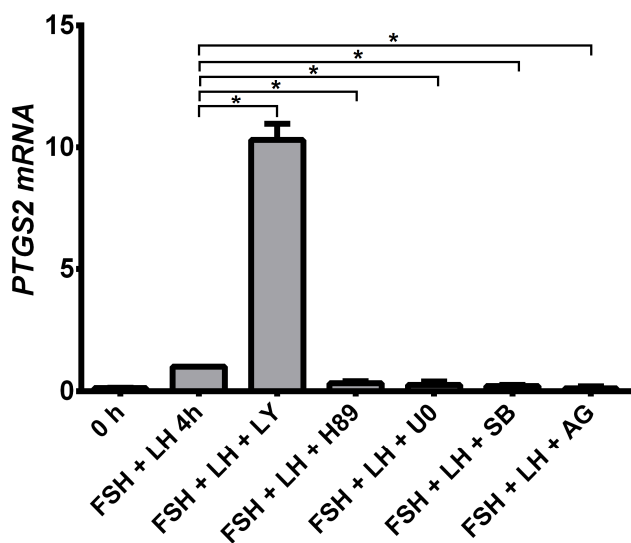
4.1.6 Efekt inhibitorů na expresi *PTGS2* v COC indukovanou AREG

AREG zvýšil expresi *PTGS2* v prasečích COC po 4 h kultivace. Inhibitor PKA (H89) neměl na expresi *PTGS2* signifikantní vliv. Inhibitory MAPK3/1 (U0), MAPK14 (SB) a ERBB1 (AG) signifikantně potlačily expresi *PTGS2*, zatímco inhibitor PI3K (LY) tuto expresi zvýšil (vše v porovnání s AREG 4 h).



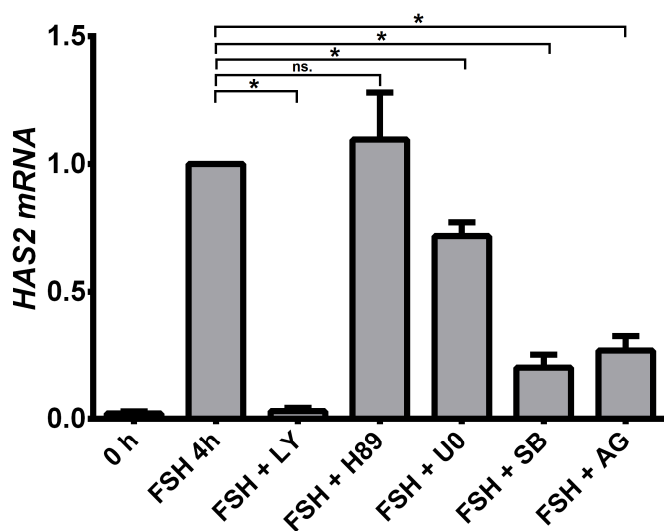
4.1.7 Efekt inhibitorů na expresi *PTGS2* v MGC indukovanou FSH a LH

FSH a LH zvýšily expresi *PTGS2* v MGC po 4 h kultivace. Inhibitory PKA (H89), MAPK3/1 (U0), MAPK14 (SB) a ERBB1 (AG) signifikantně potlačily expresi *PTGS2*, zatímco inhibitor PI3K (LY) tuto expresi zvýšil (vše v porovnání s FSH+LH 4 h).



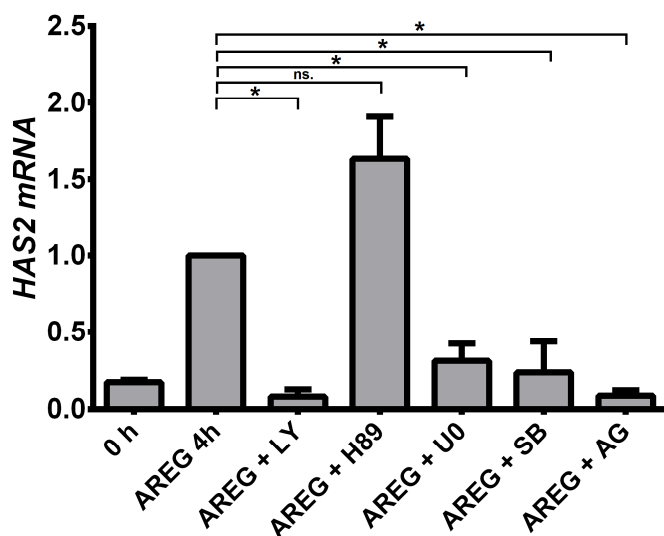
4.1.8 Efekt inhibitorů na expresi *HAS2* v COC indukovanou FSH

FSH zvýšil expresi *HAS2* v prasečích COC po 4 h kultivace. Inhibitor PKA (H89) neměl na expresi *HAS2* signifikantní vliv. Inhibitory MAPK3/1 (U0), MAPK14 (SB), PI3K (LY) a ERBB1 (AG) signifikantně potlačily expresi *HAS2* v porovnání s FSH 4 h. Největší efekt měl inhibitor PI3K (LY).



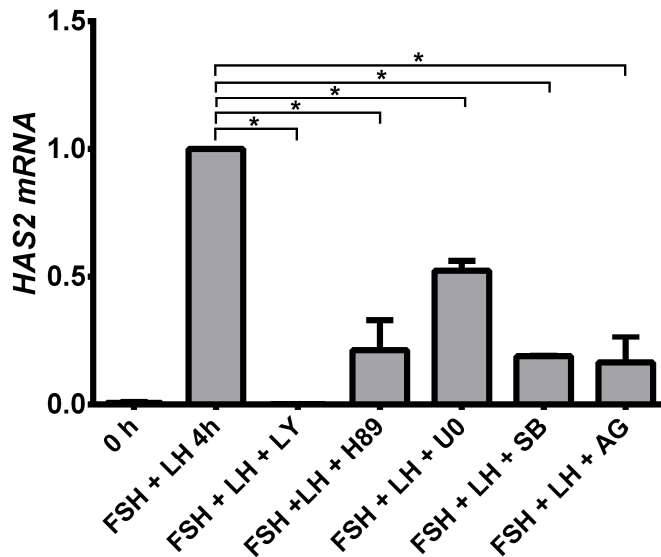
4.1.9 Efekt inhibitorů na expresi *HAS2* v COC indukovanou AREG

AREG zvýšil expresi *HAS2* v prasečích COC po 4 h kultivace. Inhibitor PKA (H89) neměl na expresi *HAS2* signifikantní vliv. Inhibitory MAPK3/1 (U0), MAPK14 (SB), PI3K (LY) i ERBB1 (AG) signifikantně potlačily expresi *HAS2* v porovnání s AREG 4 h.



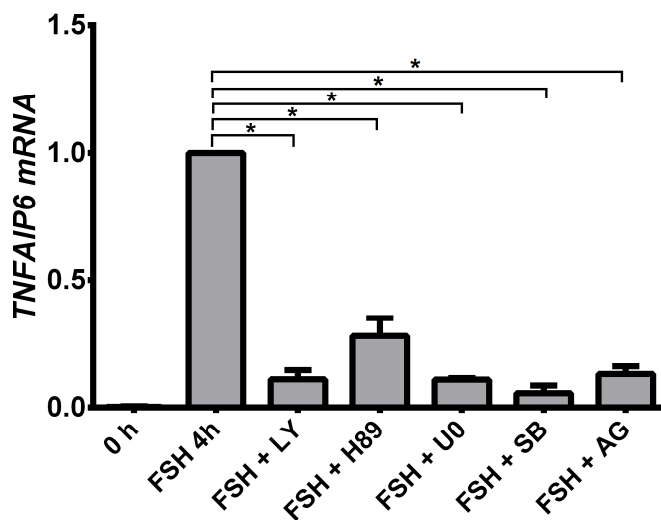
4.1.10 Efekt inhibitorů na expresi *HAS2* v MGC indukovanou FSH a LH

FSH a LH zvýšily expresi *HAS2* v prasečích MGC po 4 h kultivace. Inhibitory PKA (H89), MAPK3/1 (U0), MAPK14 (SB), PI3K (LY) i ERBB1 (AG) signifikantně potlačily expresi *HAS2* v porovnání s FSH+LH 4 h. Největší vliv měl inhibitor PI3K (LY).



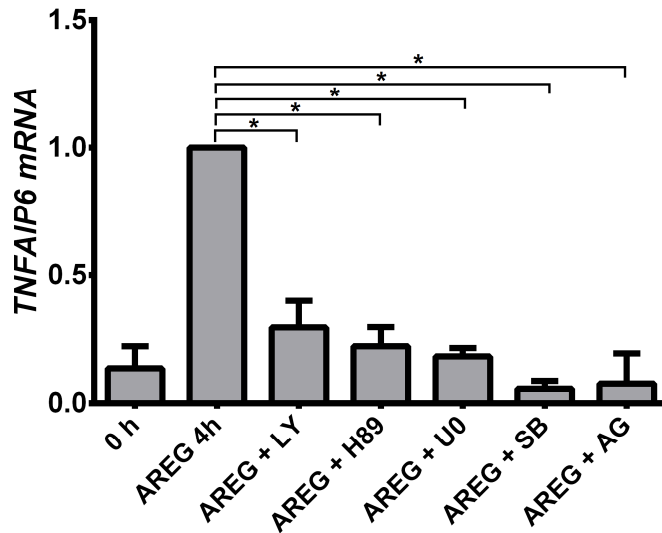
4.1.11 Efekt inhibitorů na expresi *TNFAIP6* v COC indukovanou FSH

FSH zvýšil expresi *TNFAIP6* v prasečích COC po 4 h kultivace. Inhibitory PKA (H89), MAPK3/1 (U0), MAPK14 (SB), PI3K (LY) i ERBB1 (AG) signifikantně potlačily expresi *TNFAIP6* v porovnání s FSH 4 h.



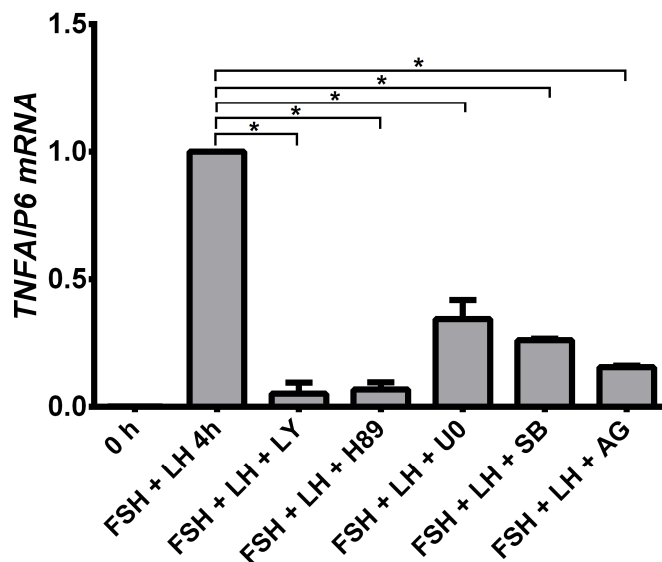
4.1.12 Efekt inhibitorů na expresi *TNFAIP6* v COC indukovanou AREG

AREG zvýšil expresi *TNFAIP6* v prasečích COC po 4 h kultivace. Inhibitory PKA (H89), MAPK3/1 (U0), MAPK14 (SB), PI3K (LY) i ERBB1 (AG) signifikantně potlačily expresi *TNFAIP6* v porovnání s AREG 4 h.



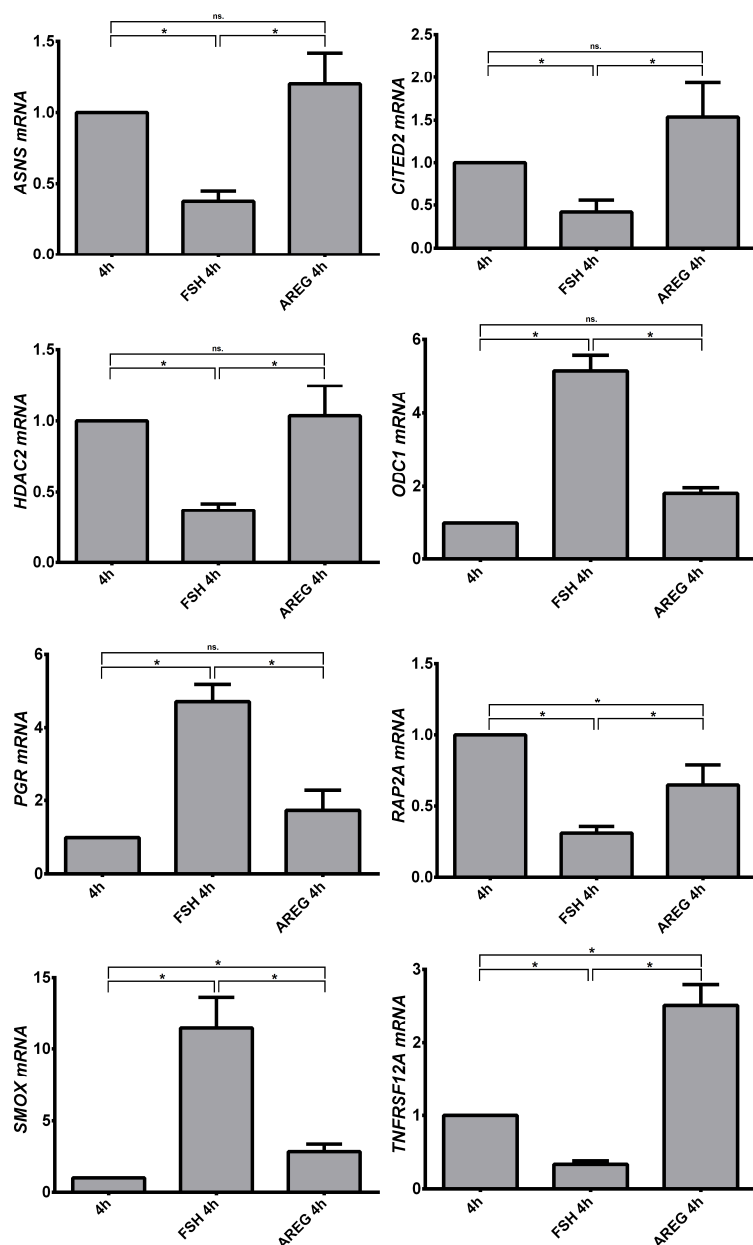
4.1.13 Efekt inhibitorů na expresi *TNFAIP6* v MGC indukovanou FSH a LH

FSH a LH zvýšily expresi *TNFAIP6* v MGC po 4 h kultivace. Inhibitory PI3K (LY), PKA (H89), MAPK3/1 (U0), MAPK14 (SB) i ERBB1 (AG) signifikantně potlačily expresi *TNFAIP6* v porovnání s FSH+LH 4 h.



4.2 Ověření exprese genů vybraných na základě výsledků z mikročipu

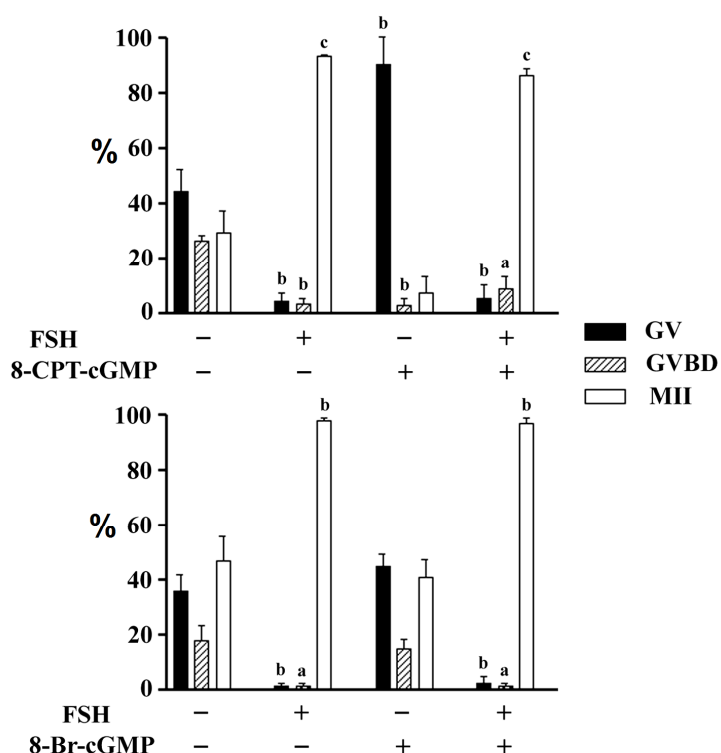
Pomocí mikročipu byly zjištěny geny, jejichž exprese se liší v prasečích COC kultivovaných 4 h s AREG, nebo FSH. Pomocí real-time RT-PCR byly zjištěné výsledky ověřovány u vybraných genů. V souladu s výsledky z mikročipu byla exprese *ASNS*, *CITED2*, *HDAC2*, *RAP2A* a *TNFRSF12A* po AREG signifikantně vyšší než po FSH. Expresa *ODC1*, *PGR* a *SMOX* byla po FSH naopak signifikantně vyšší než po AREG.



4.3 Vliv analogů cGMP na zrání oocytů a expanzi kumulu

4.3.1 Vliv analogů cGMP na zrání oocytů

Efekt FSH a analogů cGMP byl porovnáván s kontrolní skupinou oocytů, které byly kultivovány 44 h bez FSH a bez analogů. 8-CPT-cGMP významně zvýšil podíl oocytů, které zůstaly ve stádiu zárodečného váčku, ale jeho efekt byl překonán FSH. 8-Br-cGMP neměl na spontánní maturaci bez FSH vliv. Meiotické zrání indukované FSH jím rovněž nebylo ovlivněno. Sloupce označené indexem se významně liší od kontrolní skupiny kultivované bez FSH a analogu (a, $P < 0.05$; b, $P < 0.01$; c, $P < 0.001$).



4.3.2 Vliv analogů cGMP na expanzi kumulu

Expanze kumulu u COC (24 h) indukovaná FSH nebyla ovlivněna analogy cGMP. Úsečka odpovídá 400 μm .

A: COC kultivované v médiu bez FSH

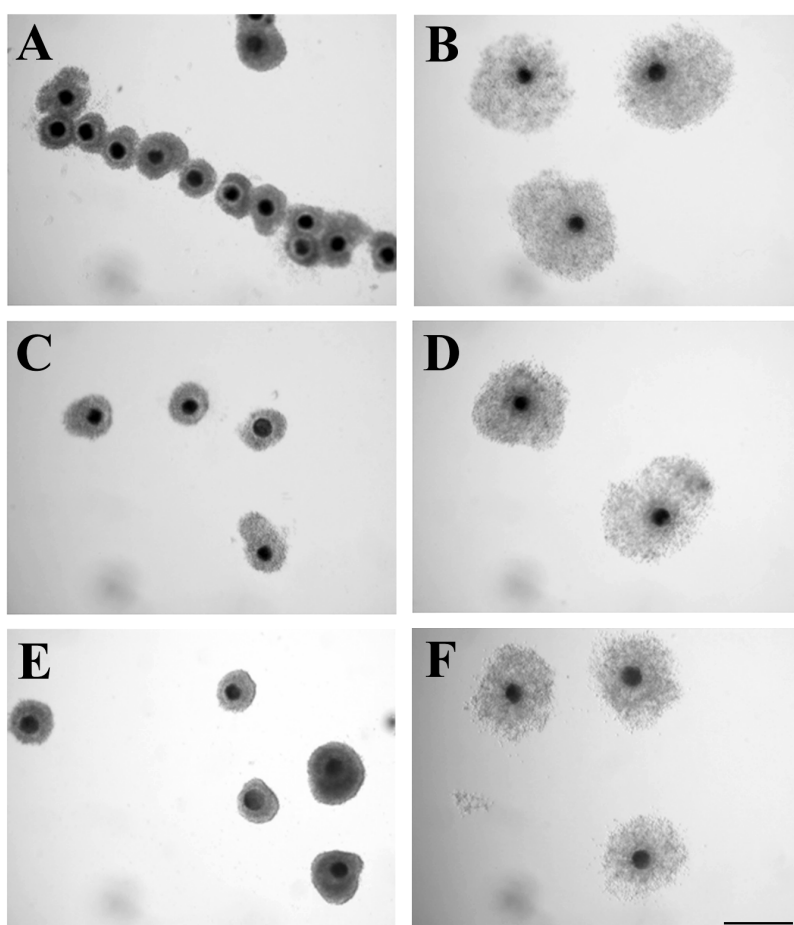
B: COC kultivované v médiu s FSH

C: COC kultivované s 8-CPT-cGMP

D: COC kultivované s FSH a 8-CPT-cGMP

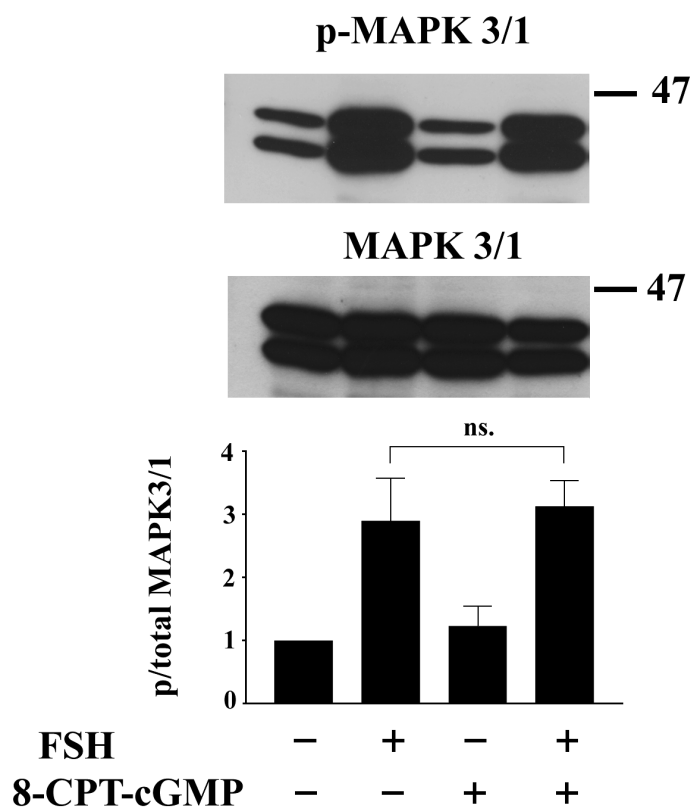
E: COC kultivované s 8-Br-cGMP

F: COC kultivované s FSH a 8-Br-cGMP



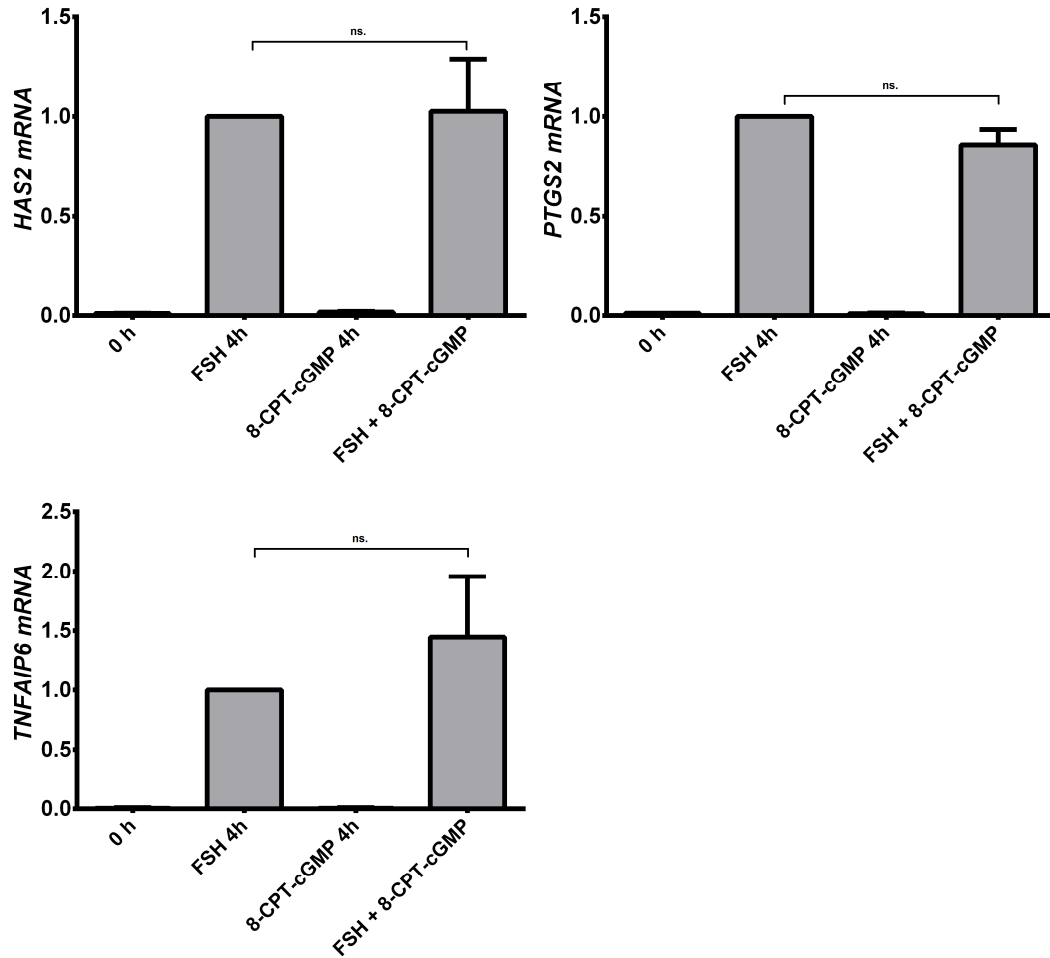
4.3.3 Vliv 8-CPT-cGMP na fosforylaci MAPK3/1 v COC indukovanou FSH

8-CPT-cGMP neměl signifikantní vliv na fosforylaci MAPK3/1 v prasečích COC indukovanou FSH. Relativní nárůst fosforylace MAPK3/1 byl vztažen ke kontrolním COC, které byly kultivovány bez analogů a bez FSH. Horní obrázek ukazuje reprezentativní výsledek, graf byl vytvořen na základě dat ze třech nezávislých experimentů.



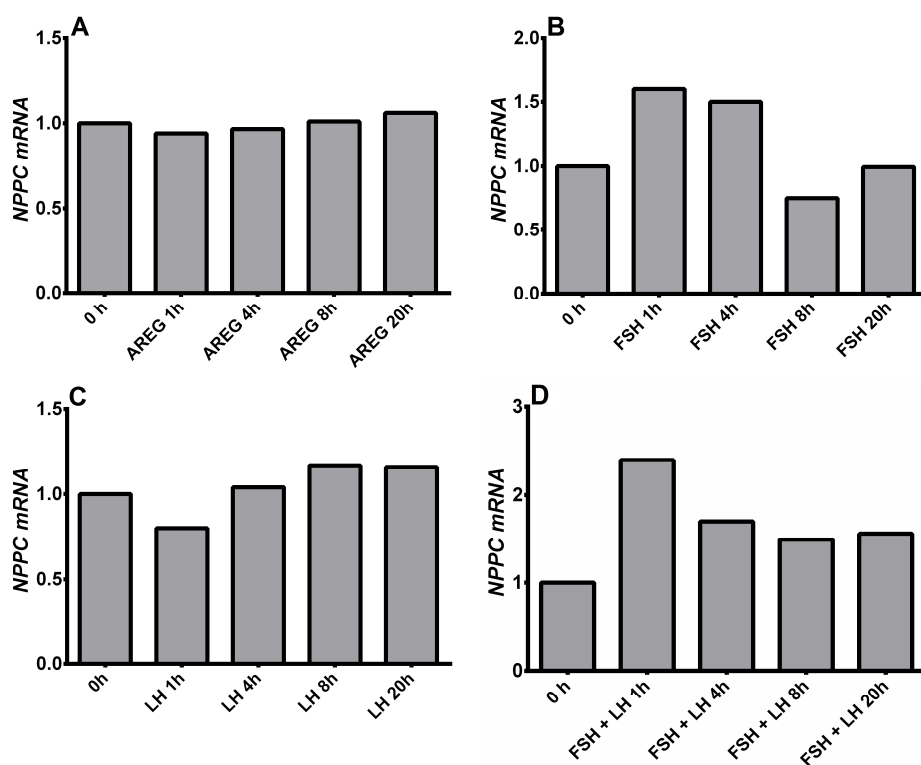
4.3.4 Vliv 8-CPT-cGMP na expresi *HAS2*, *PTGS2* a *TNFAIP6*

8-CPT-cGMP neměl signifikantní vliv na expresi genů důležitých pro expanzi kumulu (*HAS2*, *PTGS2*, *TNFAIP6*), která byla u prasečích COC indukována kultivací s FSH (4 h). Totožné výsledky byly získány i s 8-Br-cGMP (data neuložena).



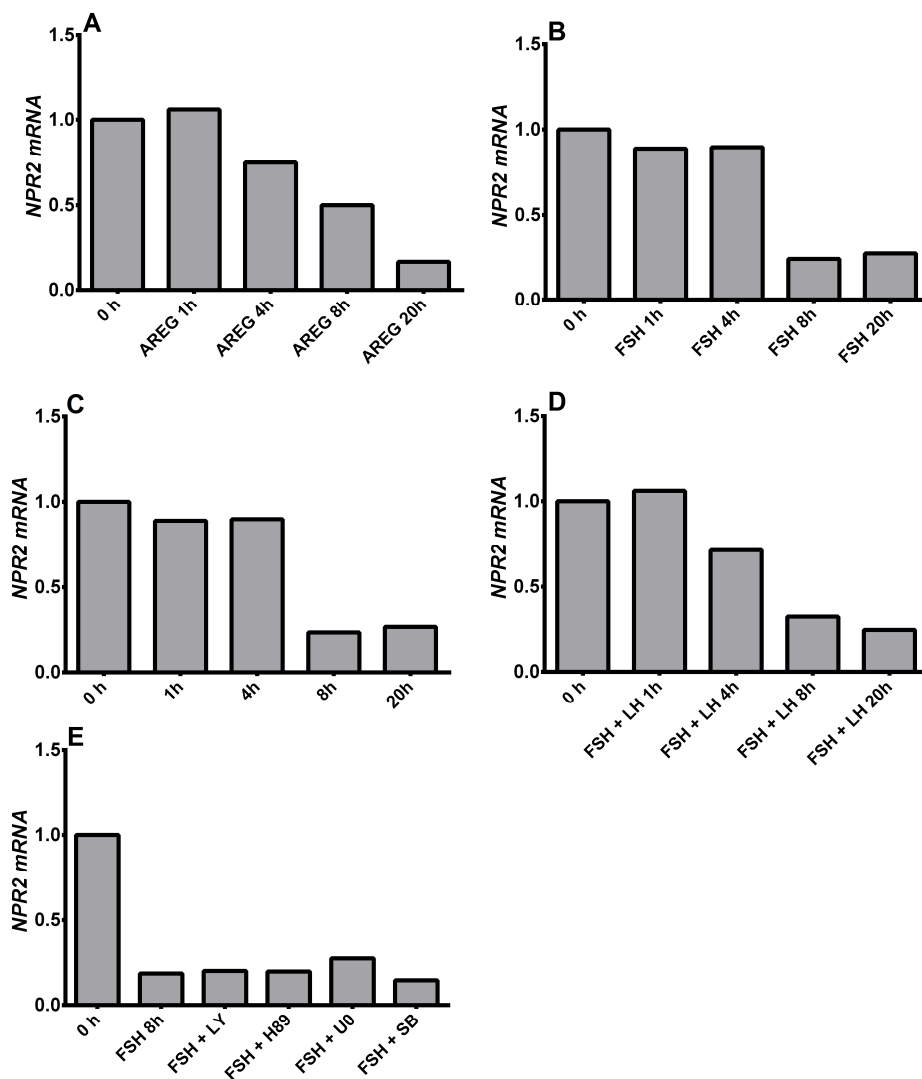
4.4 Expresa *NPPC*

V souvislosti s rolí natriuretického peptidu C pro udržování meiotického bloku myších oocytů byla zjišťována dynamika exprese *NPPC* v prasečích COC stimulovaných *in vitro* AREG (A) nebo FSH (B), respektive prasečích MGC stimulovaných *in vitro* LH (C) nebo FSH a LH (D). Předběžné výsledky naznačují, že *in vitro* nedochází k dramatickému snížení exprese *NPPC* v důsledku stimulace gonadotropiny nebo AREG. Nicméně prezentované výsledky jsou předběžné a je třeba je ověřit.



4.5 Expresse *NPR2*

Rovněž i exprese *NPR2* byla zjišťována u prasečích COC stimulovaných AREG (A), FSH (B) nebo nijak nestimulovaných (C) a v MGC stimulovaných FSH a LH (D). Předběžné výsledky naznačují, že exprese *NPR2* se během kultivace snižuje, avšak nezávisle na přítomnosti gonadotropinů nebo AREG. Inhibitory signálních molekul použité v této práci nemají na pokles exprese vliv (E). Nicméně prezentované výsledky jsou předběžné a je třeba je ověřit.



5 DISKUZE

5.1 Vliv inhibitorů PI3K, PKA, MAPK3/1, MAPK14 a ERBB1 na expresi genů důležitých pro expanzi kumulu

5.1.1 Exprese *AREG* a *EREG*

Exprese *AREG* a *EREG* je indukována FSH v prasečích COC. Inhibitor PKA H89 signifikantně snížil expresi *EREG*, ale nikoliv *AREG*. Toto zjištění je překvapivé vzhledem k tomu, že totožný inhibitor v poloviční koncentraci způsobil dramatické snížení exprese *AREG* i *EREG* v prasečích COC kultivovaných s FSH a LH 2,5 h (Yamashita *et al.*, 2009). Exprese *AREG* byla ale negativně ovlivněna inhibitory ERBB1 a MAPK3/1, což je v souladu s dříve publikovanou prací (Yamashita *et al.*, 2009). Rovněž exprese *EREG* byla snížena inhibitory ERBB1, MAPK3/1 a MAPK14. Zdá se tedy, že aktivace ERBB1 a MAPK3/1 (pravděpodobně autokrinně nebo parakrinně působícími peptidy rodiny EGF) je důležitá pro expresi *AREG* a *EREG*. Tyto výsledky jsou konzistentní s poznatkami o expresi *Areg* u *Ereg*^{-/-} myší (Kim *et al.*, 2011). U těchto myší je výrazně snížena exprese *Areg*. Rovněž v této práci prezentované výsledky naznačují, že aktivace PKA v kumulárních buňkách v důsledku stimulace FSH způsobí expresi *EREG*, uvolněný peptid aktivuje ERBB1 a v důsledku MAPK3/1, což pozitivně ovlivní expresi *EREG* i *AREG*. Výrazná inhibice exprese *AREG* v MGC v důsledku přítomnosti inhibitoru MAPK3/1 je další indicií pro tento závěr. Nelze rovněž vyloučit, že exprese *AREG* může být indukována i na PKA nezávislým mechanismem (Wayne *et al.*, 2007). Inhibitor PI3K překvapivě způsobil zvýšení exprese *AREG* v COC a signifikantní snížení exprese *EREG*. V MGC stimulovaných FSH a LH inhibitor PI3K rovněž zvýšil expresi *AREG*, zatímco exprese *EREG* byla dramaticky snížena. Výsledky prezentované v této práci se liší od těch, které byly dříve publikovány. V práci Yamashita *et al.* (2009) nemá totožný inhibitor signifikantní vliv na expresi *AREG* a *EREG* v prasečích COC stimulovaných FSH a LH a tento rozpor lze částečně připsat na vrub nižší koncentraci inhibitoru (20 μ M versus 25 μ M v této studii). Vzhledem k tomu, že inhibitor PI3K výrazně zvyšuje expresi určitých genů (*AREG*, *PTGS2*), expresi jiných naopak výrazně snižuje (*EREG*, *HAS2*, *TNFAIP6*), zdá se, že PI3K/PKB hraje roli v rámci signalizace spojené s expanzí kumulu u prasečích COC.

5.1.2 Exprese *HAS2*, *PTGS2* a *TNFAIP6*

U myši je exprese *Has2*, *Ptgs2* a *Tnfaip6* závislá na aktivaci MAPK3/1 (Fan *et al.*, 2009). MAPK3/1 jsou důležité i u prasete, protože inhibitor MAPK3/1 snížil expresi *HAS2*, *PTGS2* a *TNFAIP6* indukovanou AREG i FSH a inhibitor ERBB1 měl podobný efekt. Inhibitor MAPK14 potlačil expresi výše zmíněných genů, a to jak po FSH, tak i AREG. Model navržený Shimada *et al.* (2006b) předpokládá, že MAPK14 je aktivována v souvislosti se signalizací cAMP, nikoliv ERBB1. Výsledky získané na *Mapk14^{gc/-}* myších také naznačují spojení mezi MAPK14 a cAMP (Liu *et al.*, 2010). Rovněž Yamashita *et al.* (2009) uvádí, že stejný inhibitor MAPK14 v totožné koncentraci (20 μ M) má vliv na expresi *HAS2*, *PTGS2* a *TNFAIP6* indukovanou v prasečích COC FSH a LH, ale nikoliv EGF. Výsledky prezentované v této práci naznačují, že MAPK14 hraje roli i expanzi kumulu indukované AREG. Je možné spekulovat o tom, že AREG zvýší expresi *PTGS2* a produkci PGE2 a inhibitor MAPK14 vlastně potlačuje efekt PGE2.

Inhibitor PI3K výrazně zvýšil expresi *PTGS2* a výrazně snížil expresi *HAS2* a *TNFAIP6* po FSH i AREG. Tyto poznatky jsou v souladu s tím, že inhibitor PI3K potlačuje expanzi kumulu (Park *et al.*, 2011; viz příložený rukopis). PGE2 indukuje fosforylaci PKB v kumulárních buňkách u myši (Takahashi *et al.*, 2006). Zvýšení exprese *PTGS2* v přítomnosti inhibitoru PI3K naznačuje kompenzační mechanismus, kterým dochází k vyšší produkci PGE2 a fosforylaci PKB. V kultuře krysích granulózniích buněk stimulovaných FSH a testosteronem způsobuje inhibitor PI3K zvýšení fosforylace MAPK14 (Gonzales-Robayna *et al.*, 2000), která je důležitá pro expresi *PTGS2*. IGF1 společně s FSH indukují fosforylaci PKB víc než FSH samotné, zvyšují produkci hyaluronanu a jeho retenci v kumulu (Němcová *et al.*, 2007), což rovněž indikuje význam PKB pro expresi *HAS2* a *TNFAIP6* v prasečích COC.

Je zajímavé, že inhibitor PKA nemá vliv na expresi *HAS2* a *PTGS2* indukovanou FSH nebo AREG, zatímco exprese *TNFAIP6* je tímto inhibitorem ovlivněna, a to i po stimulaci AREG, přičemž AREG nezpůsobuje aktivaci PKA v prasečích COC (Procházka *et al.*, 2011). PGE2 indukuje expresi *Tnfaip6* v myších COC podobně jako FSH, přičemž FSH i PGE2 aktivují PKA (Takahashi *et al.*, 2006). U *Ptgs2^{-/-}* a *Ptger2^{-/-}* myši stimulovaných PMSG a hCG je snížená exprese

Tnfaip6 (ale nikoliv *Has2*) v kumulárních buňkách (Ochsner *et al.*, 2003). Zda a jakým způsobem indukují prostaglandiny expresi *TNFAIP6* u prasete je téma pro další výzkum.

5.2 Ověření exprese genů vybraných na základě výsledků z mikročipu

Pomocí real-time RT-PCR byla studována exprese vybraných genů indukovaná v prasečích COC FSH, respektive AREG. Získané výsledky potvrzují, že FSH a AREG ovlivňují expresi vybraných genů odlišným způsobem.

FSH indukuje expresi *PGR*, *ODC1* a *SMOX* více než AREG. Význam receptoru progesteronu byl již zmíněn. Zjištění, že AREG neindukuje expresi *PGR* je překvapivé vzhledem k tomu, že u myši je pro expresi *Pgr* nutná aktivita MAPK3/1, kterou AREG indukuje (Fan *et al.*, 2009). Ornitindekarboxyláza s sperminoxidáza jsou enzymy metabolismu polyaminů. ODC1 je důležitá antiapoptická molekula v oocytech drápatky a absence způsobuje zvýšení reaktivních forem kyslíku (ROS) a vysokou aktivitu kaspáz (Zhou *et al.*, 2009). Inhibitor ODC1 (DFMO) blokuje maturaci oocytů drápatky (Sunkara *et al.*, 1981). Polyaminy putrescin a spermin, pro jejichž syntézu je ODC1 nutná, mohou eliminovat ROS (Zhou *et al.*, 2009). V souvislosti s možnou rolí NO-syntáz během maturace prasečích oocytů (viz dále) byla formulována i hypotéza, zda polyaminy nesnižují hladinu NO, a tak nezpůsobují znovuzahájení meiózy. Tato možnost se ale jeví (alespoň u myši) jako málo pravděpodobná. Samice myši, které nadměrně exprimují *Ssat1*, jehož produkt (spermidin/spermin N¹-acetyltransferáza 1) určuje rychlost katabolizmu polyaminů, jsou neplodné, protože jejich vaječníky obsahují pouze primární a sekundární folikuly, nikoliv však antrální (Pietilä *et al.*, 1997). Katabolizmu polyaminů se účastní i SMOX. Vedlejším produktem oxidativního štěpení sperminu na spermidin a 3-aminopropanal je peroxid vodíku (Wang *et Casero*, 2006). Peroxid vodíku indukuje expanzi kumulu ve folikulech myši kultivovaných *in vitro* podobně jako LH a efekt LH i peroxidu vodíku dramaticky potlačuje antioxidant (Shkolnik *et al.*, 2011). Peroxid vodíku překvapivě indukuje expresi *Cebpb*, *Has2* a *Tnfaip6* ve folikulech myši podobně jako LH, přičemž efekt peroxidu vodíku na expresi výše uvedených genů je výrazně potlačen inhibitorem PKA a MAPK3/1 (Shkolnik *et al.*, 2011). Role polyaminů a ROS během expanze kumulu může být zajímavým tématem pro budoucí výzkum.

Expres *ASNS*, *CITED2*, *HDAC2*, *RAP2A* a *TNFRSF12A* byla po AREG vyšší než po FSH, ale pouze exprese *TNFRSF12A* byla AREG výrazně stimulována. Expres *Tnfrsf12a* je u myši závislá na RUNX2 (Pregizer *et al.*, 2007). Transkripční faktory RUNX1/2 jsou u myši indukovány IL6 (Liu *et al.*, 2009b) a u krysy hCG (Park *et al.*, 2010) a zřejmě hrají roli v expanzi kumulu. Ligand TNFRSF12A (TNFSF12) injikovaný do krys stimulovaných PSMG a hCG inhiboval produkci progesteronu mechanismem nezávislým na cAMP a zdá se, že TNFRSF12A se svým ligandem brání nadměrné luteinizaci preovulačních folikulů (De *et al.*, 2006). Tyto výsledky jsou v souladu se zjištěním, že AREG ani EREG nezvyšují syntézu progesteronu u prasečích COC jako FSH (Procházka *et al.*, 2011). Nicméně pro sekreci progesteronu je nezbytná i aktivace kofilinu, která je závislá na PKA (Karlson *et al.*, 2010). TNFRSF12A a jeho ligand hrají roli mimo jiné v remodelaci tkání v důsledku zranění a v zánětlivých procesech (Winkles, 2008). Kumulární buňky myši vykazují podobnosti s buňkami imunitního systému, jsou dokonce schopné fagocytovat bakterie (Shimada *et al.*, 2006a). Další výzkum zaměřený na roli TNFRSF12A, IL6 a dalších molekul spojovaných většinou s buňkami imunitního systému by mohl přinést nové poznatky o regulaci expanze kumulu.

5.3 Vliv analogů cGMP na zrání oocytů a expanzi kumulu

8-CPT-cGMP signifikantně zvýšil množství oocytů, které zůstaly během 44 h kultivace ve stádiu zárodečného vajíčka. Efekt 8-CPT-cGMP byl kompletně zrušen přidáním FSH do kultivačního média, takže 8-CPT-cGMP je schopen inhibovat pouze spontánní maturaci prasečích oocytů kultivovaných jako COC. Běžně používaný 8-Br-cGMP neměl na zrání oocytů signifikantní vliv. Tato zjištění jsou v rozporu s dříve publikovanými výsledky, že atriální natriuretický peptid A nebo 8-Br-cGMP inhibují zrání prasečích oocytů, ale pouze indukované FSH (Zhang *et al.*, 2005b). Vzniklý rozpor může být částečně vysvětlen tím, že ve výše zmíněné práci byla použita výrazně nižší koncentrace FSH (0,05 IU/ml). Je rovněž zajímavé, že 8-CPT-cGMP je považován za specifický aktivátor proteinkináz závislých na cGMP (PRKG), který neinhibuje na rozdíl od 8-Br-cGMP fosfodiesterázy inhibované cGMP (Butt *et al.*, 1992). Toto zjištění je další indicií pro možnou roli PRKG v udržování meiotického bloku u prasečích oocytů, jak naznačují i výsledky Zhang *et al.*, (2005a, 2005b). Zdá se tedy, že u prasete cGMP potlačuje zrání oocytů nejen inhibicí PDE3A, ale i aktivací PRKG. PRKG navíc hraje roli i v aktivaci

prasečích oocytů (Petr *et al.*, 2006). Nicméně rozdílné efekty 8-Br-cGMP a 8-CPT-cGMP mohou být způsobeny i tím, že 8-CPT-cGMP lépe prochází membránou a je stabilnější vůči fosfodiesterázám než 8-Br-cGMP (Butt *et al.*, 1992).

Žádný z analogů cGMP nebyl schopen inhibovat expanzi kumulu indukovanou FSH. Expres *HAS2*, *PTGS2* ani *TNFAIP6* nebyla v COC kultivovaných s analogem snížena. Rovněž fosforylace MAPK3/1 nebyla analogem ovlivněna. Zdá se tedy, že model navržený Sela-Abramovich *et al.* (2008) nemá u prasete oporu v experimentálních datech. Nicméně nelze vyloučit možnost, že samotný oxid dusnatý a jeho donory mohou expanzi inhibovat. NO může inhibovat konstitutivně aktivní RAS a RAF1 (Raines *et al.*, 2004), kinázovou aktivitu ERBB1 (Murillo-Carretero *et al.*, 2009), dokonce zvýšit aktivitu RAS (Ibiza *et al.*, 2008). Fakt, že NO může inhibovat nebo aktivovat významné signální molekuly, je zřejmě vysvětlením duálního efektu donorů NO (při nižší koncentraci stimulují, při vyšší inhibují) na meiotické zrání oocytů (Bilodeau-Goeseels, 2007; Bu *et al.*, 2003; Bu *et al.*, 2004). Expanze kumulu u prasete může být dokonce zvýšena kultivací s donorem NO nitroprusidem sodným (Tao *et al.*, 2004b), u myši může nitroprusid sodný, pravděpodobně díky vysoké koncentraci NO, oocyty prakticky zbavit kumulu (Bu *et al.*, 2004). Nicméně vzhledem k tomu, že v myším folikulu je majoritní guanylátcyklázou NPR2 (Robinson *et al.*, 2012), je otázkou, zda má možná regulace expanze oxidem dusnatým fyziologický význam.

Podobně otevřenou otázkou je role NO-syntáz (NOS1/2/3), které jsou detekovatelné přímo v oocytech myši (Huo *et al.*, 2005; Jablonka-Shariff *et al.*, 1998; Nishikimi *et al.*, 2001) i prasete (Hattori *et al.*, 2001; Chmelíková *et al.*, 2009; Kim *et al.*, 2005; Takesue *et al.*, 2003; Tao *et al.*, 2004a). U myši je NOS2 před rozpadem zárodečného váčku lokalizována kolem kondenzujících chromozomů, v MI a MII kolem chromozomů připojených k dělicímu vřeténku (Huo *et al.*, 2005). Oocyty *Nos3*^{-/-} myši vykazují abnormality během dělení, problémy s přechodem z MI do MII, přičemž podobný účinek má i inhibitor NO-syntáz L-NAME (Jablonka-Shariff *et al.*, 1998; 2000). NO rovněž potlačuje stárnutí oocytů (Goud *et al.*, 2006). U *Nos3*^{-/-} myši je také výrazně snížena schopnost ovulovat (Hefler *et al.*, 2002; Jablonka-Shariff *et al.*, 1998; Pallares *et al.*, 2008; Tempfer *et al.*, 2000).

Předběžné výsledky ukazují, že v prasečích COC i MGC jsou exprimovány NPR2 a NPPC, které jsou u myši spojovány s produkcí cGMP v kumulu. Expres

NPPC ale během kultivace neklesá. Exprese *NPR2* klesá v průběhu kultivace, ale nezávisle na přítomnosti FSH nebo AREG. Další výzkum bude zaměřen na vliv steroidních hormonů (estradiolu a progesteronu) a PKC na expresi těchto genů, respektive produkci cGMP v COC.

6 SOUHRN

Specifické inhibitory PKA, PI3K, MAPK3/1, MAPK14 a ERBB1 ovlivňují expresi genů *AREG* a *EREG* i expresi genů spojených s expanzí kumulu (*HAS2*, *PTGS2*, *TNFAIP6*). Inhibitor PKA překvapivě neovlivnil expresi *AREG*, ale měl vliv na expresi *EREG*, a tak se zdá, že exprese *AREG* je závislá na MAPK14, MAPK3/1 a ERBB1, ale nikoliv na aktivitě PKA. Exprese *EREG* je závislá i na aktivitě PKA. Inhibitor PI3K významným způsobem snižoval expresi *EREG*, *HAS2* a *TNFAIP6*, naopak významně zvyšoval expresi *AREG* a *PTGS2*. Přestože role PI3K/PKB není během expanze kumulu zcela jasná, zdá se, že se jedná o důležitou signální dráhu. Exprese *TNFAIP6* je negativně ovlivněna inhibitorem PKA, a to i při kultivaci s *AREG*, což naznačuje možnou roli prostaglandinů v indukci exprese *TNFAIP6* u prasete.

Pomocí real-time RT-PCR byly ověřena exprese vybraných genů v prasečích COC kultivovaných s FSH, respektive s *AREG*. Zatímco exprese *ODC1*, *PGR* a *SMOX* je indukována FSH, expresi *TNFRSF12A* vyvolává *AREG*.

Analog cGMP (8-CPT-cGMP) nemá vliv na expanzi kumulu, fosforylaci MAPK3/1 ani expresi *HAS2*, *PTGS2* a *TNFAIP6*. Nicméně nelze vyloučit, že samotný oxid dusnatý může expanzi inhibovat. Je však otázkou, zda k tomu nedochází v důsledku oxidativního stresu. NO je navíc velmi reaktivní a může ovlivňovat celou řadu důležitých signálních molekul. 8-CPT-cGMP inhibuje spontánní meiotickou maturaci prasečích oocytů kultivovaných jako COC, ale nemá signifikantní vliv na maturaci stimulovanou FSH. 8-Br-cGMP nemá signifikantní vliv ani na spontánní maturaci. Vzhledem k tomu, že 8-CPT-cGMP je považován za relativně specifický aktivátor PRKG, zdá se, že v prasečích oocytech může profázní blok udržovat i PRKG. Nicméně i tato hypotéza vyžaduje další ověření.

NPPC a *NPR2*, které u myši hrají klíčovou úlohu v rámci produkce cGMP kumulárními buňkami, jsou rovněž exprimovány v prasečích COC a MGC. Předběžné výsledky však naznačují, že exprese *NPPC* se *in vitro* po stimulaci gonadotropiny ani *AREG* nemění. Exprese *NPR2* klesá, ale pravděpodobně nezávisle na přítomnosti gonadotropinů nebo *AREG*. Zajímavým námětem pro další výzkum je možná role steroidních hormonů v regulaci exprese *NPPC* a *NPR2*, respektive v syntéze cGMP.

7 SEZNAM LITERATURY

- ABBEY-HOSCH, S. E., SMIRNOV, D. & POTTER, L. R. **2005**. Differential regulation of NPR-B/GC-B by protein kinase c and calcium. *Biochem Pharmacol*, 70, 686-694.
- ACKERT, C. L., GITTENS, J. E., O'BRIEN, M. J., EPPIG, J. J. & KIDDER, G. M. **2001**. Intercellular communication via connexin43 gap junctions is required for ovarian folliculogenesis in the mouse. *Dev Biol*, 233, 258-270.
- AKAKI, Y., YOSHIOKA, K., NOGUCHI, M., HOSHI, H. & FUNAHASHI, H. **2009**. Successful piglet production in a chemically defined system for in-vitro production of porcine embryos: dibutyryl cyclic amp and epidermal growth factor-family peptides support in-vitro maturation of oocytes in the absence of gonadotropins. *J Reprod Dev*, 55, 446-453.
- ASHKENAZI, H., CAO, X., MOTOLA, S., POPLIKER, M., CONTI, M. & TSAFRIRI, A. **2005**. Epidermal growth factor family members: endogenous mediators of the ovulatory response. *Endocrinology*, 146, 77-84.
- 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, 593-599.
- BILODEAU-GOESEELS, S. **2007**. Effects of manipulating the nitric oxide/cyclic GMP pathway on bovine oocyte meiotic resumption in vitro. *Theriogenology*, 68, 693-701.
- BILODEAU-GOESEELS, S., SASSEVILLE, M., GUILLEMETTE, C. & RICHARD, F. J. **2007**. Effects of adenosine monophosphate-activated kinase activators on bovine oocyte nuclear maturation in vitro. *Mol Reprod Dev*, 74, 1021-1034.
- BROWN, H. M., DUNNING, K. R., ROBKER, R. L., BOERBOOM, D., PRITCHARD, M., LANE, M. & RUSSELL, D. L. **2010**. ADAMTS1 cleavage of versican mediates essential structural remodeling of the ovarian follicle and cumulus-oocyte matrix during ovulation in mice. *Biol Reprod*, 83, 549-557.
- BU, S., XIA, G., TAO, Y., LEI, L. & ZHOU, B. **2003**. Dual effects of nitric oxide on meiotic maturation of mouse cumulus cell-enclosed oocytes in vitro. *Mol Cell Endocrinol*, 207, 21-30.
- BU, S., XIE, H., TAO, Y., WANG, J. & XIA, G. **2004**. Nitric oxide influences the maturation of cumulus cell-enclosed mouse oocytes cultured in spontaneous maturation medium and hypoxanthine-supplemented medium through different signaling pathways. *Mol Cell Endocrinol*, 223, 85-93.
- BUTT, E., NOLTE, C., SCHULZ, S., BELTMAN, J., BEAVO, J. A., JASTORFF, B. & WALTER, U. **1992**. Analysis of the functional role of cGMP-dependent protein kinase in intact human platelets using a specific activator 8-para-chlorophenylthio-cGMP. *Biochem Pharmacol*, 43, 2591-2600.
- CARULLI, D., PIZZORUSSO, T., KWOK, J. C., PUTIGNANO, E., POLI, A., FOROSTYAK, S., ANDREWS, M. R., DEEPA, S. S., GLANT, T. T. & FAWCETT, J. W. **2010**. Animals lacking link protein have attenuated perineuronal nets and persistent plasticity. *Brain*, 133, 2331-2347.

- CHEN, D., ZHANG, Y., YI, Q., HUANG, Y., HOU, H., HAO, Q., COOKE, H. J., LI, L., SUN, Q. & SHI, Q. **2012**. Regulation of asymmetrical cytokinesis by cAMP during meiosis I in mouse oocytes. *PLoS One*, 7, e29735.
- CHEN, J. & DOWNS, S. M. **2008**. AMP-activated protein kinase is involved in hormone-induced mouse oocyte meiotic maturation in vitro. *Dev Biol*, 313, 47-57.
- CHEN, J., HUDSON, E., CHI, M. M., CHANG, A. S., MOLEY, K. H., HARDIE, D. G. & DOWNS, S. M. **2006**. AMPK regulation of mouse oocyte meiotic resumption in vitro. *Dev Biol*, 291, 227-238.
- CHEN, X., ZHOU, B., YAN, J., XU, B., TAI, P., LI, J., PENG, S., ZHANG, M. & XIA, G. **2008**. Epidermal growth factor receptor activation by protein kinase C is necessary for FSH-induced meiotic resumption in porcine cumulus-oocyte complexes. *J Endocrinol*, 197, 409-419.
- CHEN, Z. J., YU, L. & CHANG, C. H. **1998**. Stimulation of membrane-bound guanylate cyclase activity by 17-beta estradiol. *Biochem Biophys Res Commun*, 252, 639-642.
- CHMELIKOVA, M., SEDMIKOVA, M., PETR, J., KOTT, T., LANSKA, V., TUMOVA, L., TICHOVSKA, H. & JESETA M. **2009**. Expression and localization of nitric oxide synthase isoforms during porcine oocyte growth and acquisition of meiotic competence. *Czech J Anim Sci* 54, 137-149.
- CILLO, F., BREVINI, T. A., ANTONINI, S., PAFFONI, A., RAGNI, G. & GANDOLFI, F. **2007**. Association between human oocyte developmental competence and expression levels of some cumulus genes. *Reproduction*, 134, 645-650.
- COUSE, J. F., YATES, M. M., DEROO, B. J. & KORACH, K. S. **2005**. Estrogen receptor-beta is critical to granulosa cell differentiation and the ovulatory response to gonadotropins. *Endocrinology*, 146, 3247-3262.
- DE, A., PARK, J. I., KAWAMURA, K., CHEN, R., KLEIN, C., RAUCH, R., MULDER, S. M., SOLLEWIJN GELPK, M. D. & HSUEH, A. J. **2006**. Intraovarian tumor necrosis factor-related weak inducer of apoptosis/fibroblast growth factor-inducible-14 ligand-receptor system limits ovarian preovulatory follicles from excessive luteinization. *Mol Endocrinol*, 20, 2528-2538.
- DELGHANDI, M. P., JOHANNESSEN, M. & MOENS, U. **2005**. The cAMP signalling pathway activates CREB through PKA, p38 and MSK1 in NIH 3T3 cells. *Cell Signal*, 17, 1343-1351.
- DILUIGI, A., WEITZMAN, V. N., PACE, M. C., SIANO, L. J., MAIER, D. & MEHLMANN, L. M. **2008**. Meiotic arrest in human oocytes is maintained by a Gs signaling pathway. *Biol Reprod*, 78, 667-672.
- DOWNS, S. M. & CHEN, J. **2008**. EGF-like peptides mediate FSH-induced maturation of cumulus cell-enclosed mouse oocytes. *Mol Reprod Dev*, 75, 105-114.
- DYCE, P. W., ZHU, H., CRAIG, J. & LI, J. **2004**. Stem cells with multilineage potential derived from porcine skin. *Biochem Biophys Res Commun*, 316, 651-658.
- EMMEN, J. M., COUSE, J. F., ELMORE, S. A., YATES, M. M., KISSLING, G. E. & KORACH, K. S. **2005**. In vitro growth and ovulation of follicles from ovaries of estrogen receptor (ER)-alpha and ER-beta null mice indicate a role for ER-beta in follicular maturation. *Endocrinology*, 146, 2817-2826.

- EPPIG, J. J., WIGGLESWORTH, K., PENDOLA, F. & HIRAO, Y. **1997**. Murine oocytes suppress expression of luteinizing hormone receptor messenger ribonucleic acid by granulosa cells. *Biol Reprod*, 56, 976-984.
- FAN, H. Y., LIU, Z., JOHNSON, P. F. & RICHARDS, J. S. **2011**. CCAAT/enhancer-binding proteins (C/EBP)- α and - β are essential for ovulation, luteinization, and the expression of key target genes. *Mol Endocrinol*, 25, 253-268.
- FAN, H. Y., LIU, Z., SHIMADA, M., STERNECK, E., JOHNSON, P. F., HEDRICK, S. M. & RICHARDS, J. S. **2009**. MAPK3/1 (ERK1/2) in ovarian granulosa cells are essential for female fertility. *Science*, 324, 938-941.
- FREUDZON, L., NORRIS, R. P., HAND, A. R., TANAKA, S., SAEKI, Y., JONES, T. L., RASENICK, M. M., BERLOT, C. H., MEHLMANN, L. M. & JAFFE, L. A. **2005**. Regulation of meiotic prophase arrest in mouse oocytes by GPR3, a constitutive activator of the Gs G protein. *J Cell Biol*, 171, 255-265.
- FÜLÖP, C., SZÁNTÓ, S., MUKHOPADHYAY, D., BÁRDOS, T., KAMATH, R. V., RUGG, M. S., DAY, A. J., SALUSTRI, A., HASCALL, V. C., GLANT, T. T. & MIKECZ, K. **2003**. Impaired cumulus mucification and female sterility in tumor necrosis factor-induced protein-6 deficient mice. *Development*, 130, 2253-2261.
- GERSHON, E., HOURVITZ, A., REIKHAV, S., MAMAN, E. & DEKEL, N. **2007**. Low expression of COX-2, reduced cumulus expansion, and impaired ovulation in SULT1E1-deficient mice. *FASEB J*, 21, 1893-1901.
- GONZALEZ-ROBAYNA, I. J., ALLISTON, T. N., BUSE, P., FIRESTONE, G. L. & RICHARDS, J. S. **1999**. Functional and subcellular changes in the A-kinase-signaling pathway: relation to aromatase and Sgk expression during the transition of granulosa cells to luteal cells. *Mol Endocrinol*, 13, 1318-1337.
- GONZALEZ-ROBAYNA, I. J., FALENDER, A. E., OCHSNER, S., FIRESTONE, G. L. & RICHARDS, J. S. **2000**. Follicle-Stimulating hormone (FSH) stimulates phosphorylation and activation of protein kinase B (PKB/Akt) and serum and glucocorticoid-Induced kinase (Sgk): evidence for A kinase-independent signaling by FSH in granulosa cells. *Mol Endocrinol*, 14, 1283-1300.
- GOUD, A. P., GOUD, P. T., DIAMOND, M. P., GONIK, B. & ABU-SOUD, H. M. **2006**. Activation of the cGMP signaling pathway is essential in delaying oocyte aging in diabetes mellitus. *Biochemistry*, 45, 11366-11378.
- GRANOT, I. & DEKEL, N. **1997**. Developmental expression and regulation of the gap junction protein and transcript in rat ovaries. *Mol Reprod Dev*, 47, 231-9.
- HAN, S. J., CHEN, R., PARONETTO, M. P. & CONTI, M. **2005**. Wee1B is an oocyte-specific kinase involved in the control of meiotic arrest in the mouse. *Curr Biol*, 15, 1670-1676.
- HAN, S. J., VACCARI, S., NEDACHI, T., ANDERSEN, C. B., KOVACINA, K. S., ROTH, R. A. & CONTI, M. **2006**. Protein kinase B/Akt phosphorylation of PDE3A and its role in mammalian oocyte maturation. *EMBO J*, 25, 5716-5725.
- HANNA, C. B., YAO, S., WU, X. & JENSEN, J. T. **2012**. Identification of phosphodiesterase 9A as a cyclic guanosine monophosphate-specific phosphodiesterase in germinal vesicle oocytes: a proposed role in the resumption of meiosis. *Fertil Steril*, 98, 487-495.e1.

- HARRIS, R. C., CHUNG, E. & COFFEY, R. J. **2003**. EGF receptor ligands. *Exp Cell Res*, 284, 2-13.
- HATTORI, M. A., TAKESUE, K., KATO, Y. & FUJIHARA, N. **2001**. Expression of endothelial nitric oxide synthase in the porcine oocyte and its possible function. *Mol Cell Biochem*, 219, 121-126.
- HEFLER, L. A. & GREGG, A. R. **2002**. Inducible and endothelial nitric oxide synthase: genetic background affects ovulation in mice. *Fertil Steril*, 77, 147-151.
- HINCKLEY, M., VACCARI, S., HORNER, K., CHEN, R. & CONTI, M. **2005**. The G-protein-coupled receptors GPR3 and GPR12 are involved in cAMP signaling and maintenance of meiotic arrest in rodent oocytes. *Dev Biol*, 287, 249-261.
- 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, 10501-10506.
- HORNER, K., LIVERA, G., HINCKLEY, M., TRINH, K., STORM, D. & CONTI, M. **2003**. Rodent oocytes express an active adenylyl cyclase required for meiotic arrest. *Dev Biol*, 258, 385-396.
- HSIEH, M., LEE, D., PANIGONE, S., HORNER, K., CHEN, R., THEOLOGIS, A., LEE, D. C., THREADGILL, D. W. & CONTI, M. **2007**. Luteinizing hormone-dependent activation of the epidermal growth factor network is essential for ovulation. *Mol Cell Biol*, 27, 1914-1924.
- HSIEH, M., THAO, K. & CONTI, M. **2011**. Genetic dissection of epidermal growth factor receptor signaling during luteinizing hormone-induced oocyte maturation. *PLoS One*, 6, e21574.
- HUNTER, M. G. **2000**. Oocyte maturation and ovum quality in pigs. *Rev Reprod*, 5, 122-130.
- HUO, L. J., LIANG, C. G., YU, L. Z., ZHONG, Z. S., YANG, Z. M., FAN, H. Y., CHEN, D. Y. & SUN, Q. Y. **2005**. Inducible nitric oxide synthase-derived nitric oxide regulates germinal vesicle breakdown and first polar body emission in the mouse oocyte. *Reproduction*, 129, 403-409.
- IBIZA, S., PÉREZ-RODRÍGUEZ, A., ORTEGA, A., MARTÍNEZ-RUIZ, A., BARREIRO, O., GARCÍA-DOMÍNGUEZ, C. A., VÍCTOR, V. M., ESPLUGUES, J. V., ROJAS, J. M., SÁNCHEZ-MADRID, F. & SERRADOR, J. M. **2008**. Endothelial nitric oxide synthase regulates N-Ras activation on the Golgi complex of antigen-stimulated T cells. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 105, 10507-10512.
- IEVOLI, E., LINDSTEDT, R., INFORZATO, A., CAMAIONI, A., PALONE, F., DAY, A. J., MANTOVANI, A., SALVATORI, G. & SALUSTRI, A. **2011**. Implication of the oligomeric state of the N-terminal PTX3 domain in cumulus matrix assembly. *Matrix Biol*, 30, 330-337.
- INFORZATO, A., RIVIECCIO, V., MORREALE, A. P., BASTONE, A., SALUSTRI, A., SCARCHILLI, L., VERDOLIVA, A., VINCENTI, S., GALLO, G., CHIAPPARINO, C., PACELLO, L., NUCERA, E., SERLUPI-CRESCENZI, O., DAY, A. J., BOTTAZZI, B., MANTOVANI, A., DE SANTIS, R. & SALVATORI, G. **2008**. Structural characterization of PTX3 disulfide bond network and its multimeric status in cumulus matrix organization. *J Biol Chem*, 283, 10147-10161.

- ITANO, N. & KIMATA, K. **2002**. Mammalian hyaluronan synthases. *IUBMB Life*, 54, 195-199.
- JABLONKA-SHARIFF, A. & OLSON, L. M. **1998**. The role of nitric oxide in oocyte meiotic maturation and ovulation: meiotic abnormalities of endothelial nitric oxide synthase knock-out mouse oocytes. *Endocrinology*, 139, 2944-2954.
- JABLONKA-SHARIFF, A. & OLSON, L. M. **2000**. Nitric oxide is essential for optimal meiotic maturation of murine cumulus-oocyte complexes in vitro. *Mol Reprod Dev*, 55, 412-421.
- JACKSON, L. F., QIU, T. H., SUNNARBORG, S. W., CHANG, A., ZHANG, C., PATTERSON, C. & LEE, D. C. **2003**. Defective valvulogenesis in HB-EGF and TACE-null mice is associated with aberrant BMP signaling. *EMBO J*, 22, 2704-2716.
- JANKOWSKI, M., REIS, A. M., MUKADDAM-DAHER, S., DAM, T. V., FAROOKHI, R. & GUTKOWSKA, J. **1997**. C-type natriuretic peptide and the guanylyl cyclase receptors in the rat ovary are modulated by the estrous cycle. *Biol Reprod*, 56, 59-66.
- JO, M. & CURRY, T. E. **2006**. Luteinizing hormone-induced RUNX1 regulates the expression of genes in granulosa cells of rat periovulatory follicles. *Mol Endocrinol*, 20, 2156-2172.
- KALMA, Y., GRANOT, I., GALIANI, D., BARASH, A. & DEKEL, N. **2004**. Luteinizing hormone-induced connexin 43 down-regulation: inhibition of translation. *Endocrinology*, 145, 1617-1624.
- 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, 645-654.
- KALOUS, J., SOLC, P., BARAN, V., KUBELKA, M., SCHULTZ, R. M. & MOTLIK, J. **2006**. PKB/AKT is involved in resumption of meiosis in mouse oocytes. *Biol Cell*, 98, 111-123.
- KARLSSON, A. B., MAIZELS, E. T., FLYNN, M. P., JONES, J. C., SHELDEN, E. A., BAMBURG, J. R. & HUNZICKER-DUNN, M. **2010**. Luteinizing hormone receptor-stimulated progesterone production by preovulatory granulosa cells requires protein kinase A-dependent activation/dephosphorylation of the actin dynamizing protein cofilin. *Mol Endocrinol*, 24, 1765-1781.
- KAWAMURA, K., CHENG, Y., KAWAMURA, N., TAKAE, S., OKADA, A., KAWAGOE, Y., MULDER, S., TERADA, Y. & HSUEH, A. J. **2011**. Pre-ovulatory LH/hCG surge decreases C-type natriuretic peptide secretion by ovarian granulosa cells to promote meiotic resumption of pre-ovulatory oocytes. *Hum Reprod*, 26, 3094-3101.
- KAWAMURA, K., KUMAGAI, J., SUDO, S., CHUN, S. Y., PISARSKA, M., MORITA, H., TOPPARI, J., FU, P., WADE, J. D., BATHGATE, R. A. & HSUEH, A. J. **2004**. Paracrine regulation of mammalian oocyte maturation and male germ cell survival. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 101, 7323-7328.
- 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, 9-21.

- KELTY, B. P. & CURRY, T. E. **2010**. Ovarian furin (proprotein convertase subtilisin/kexin type3): expression, localization, and potential role in ovulation in the rat. *Biol Reprod*, 83, 147-154.
- KILLOCK, D. J. & IVETIĆ, A. **2010**. The cytoplasmic domains of TNF α -converting enzyme (TACE/ADAM17) and L-selectin are regulated differently by p38 MAPK and PKC to promote ectodomain shedding. *Biochem J*, 428, 293-304.
- KIM, H., MOON, C., AHN, M., LEE, Y., KIM, S., HA, T., JEE, Y. & SHIN, T. **2005**. Expression of nitric oxide synthase isoforms in the porcine ovary during follicular development. *J Vet Sci*, 6, 97-101.
- KIM, K., LEE, H., THREADGILL, D. W. & LEE, D. **2011**. Epiregulin-dependent amphiregulin expression and ERBB2 signaling are involved in luteinizing hormone-induced paracrine signaling pathways in mouse ovary. *Biochem Biophys Res Commun*, 405, 319-324.
- KIMURA, N., KONNO, Y., MIYOSHI, K., MATSUMOTO, H. & SATO, E. **2002**. Expression of hyaluronan synthases and CD44 messenger RNAs in porcine cumulus-oocyte complexes during in vitro maturation. *Biol Reprod*, 66, 707-717.
- KIYOSU, C., TSUJI, T., YAMADA, K., KAJITA, S. & KUNIEDA, T. **2012**. NPPC/NPR2 signaling is essential for oocyte meiotic arrest and cumulus oophorus formation during follicular development in the mouse ovary. *Reproduction*, 144, 187-193.
- KOBAYASHI, H., SUN, G. W., HIRASHIMA, Y. & TERAOKA, T. **1999**. Identification of link protein during follicle development and cumulus cell cultures in rats. *Endocrinology*, 140, 3835-3842.
- KOVO, M., SCHILLACE, R. V., GALIANI, D., JOSEFSBERG, L. B., CARR, D. W. & DEKEL, N. **2002**. Expression and modification of PKA and AKAPs during meiosis in rat oocytes. *Mol Cell Endocrinol*, 192, 105-113.
- LAFOREST, M. F., POULIOT, E., GUÉGUEN, L. & RICHARD, F. J. **2005**. Fundamental significance of specific phosphodiesterases in the control of spontaneous meiotic resumption in porcine oocytes. *Mol Reprod Dev*, 70, 361-372.
- LEDENT, C., DEMEESTERE, I., BLUM, D., PETERMANS, J., HÄMÄLÄINEN, T., SMITS, G. & VASSART, G. **2005**. Premature ovarian aging in mice deficient for Gpr3. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 102, 8922-8926.
- LEE, D., PEARSALL, R. S., DAS, S., DEY, S. K., GODFREY, V. L. & THREADGILL, D. W. **2004**. Epiregulin is not essential for development of intestinal tumors but is required for protection from intestinal damage. *Mol Cell Biol*, 24, 8907-8916.
- LEI, Z. M., MISHRA, S., ZOU, W., XU, B., FOLTZ, M., LI, X. & RAO, C. V. **2001**. Targeted disruption of luteinizing hormone/human chorionic gonadotropin receptor gene. *Mol Endocrinol*, 15, 184-200.
- LI, F., LIU, J., JO, M. & CURRY, T. E. **2011**. A role for nuclear factor interleukin-3 (NFIL3), a critical transcriptional repressor, in down-regulation of periovulatory gene expression. *Mol Endocrinol*, 25, 445-459.
- LI, H. K., KUO, T. Y., YANG, H. S., CHEN, L. R., LI, S. S. & HUANG, H. W. **2008a**. Differential gene expression of bone morphogenetic protein 15 and growth differentiation factor 9 during in vitro maturation of porcine oocytes and early embryos. *Anim Reprod Sci*, 103, 312-322.

- LI, M., LIANG, C. G., XIONG, B., XU, B. Z., LIN, S. L., HOU, Y., CHEN, D. Y., SCHATTEN, H. & SUN, Q. Y. **2008b**. PI3-kinase and mitogen-activated protein kinase in cumulus cells mediate EGF-induced meiotic resumption of porcine oocyte. *Domest Anim Endocrinol*, 34, 360-371.
- LI, Q., PANGAS, S. A., JORGEZ, C. J., GRAFF, J. M., WEINSTEIN, M. & MATZUK, M. M. **2008c**. Redundant roles of SMAD2 and SMAD3 in ovarian granulosa cells in vivo. *Mol Cell Biol*, 28, 7001-7011.
- LIM, H., PARIA, B. C., DAS, S. K., DINCHUK, J. E., LANGENBACH, R., TRZASKOS, J. M. & DEY, S. K. **1997**. Multiple female reproductive failures in cyclooxygenase 2-deficient mice. *Cell*, 91, 197-208.
- LINCOLN, A. J., WICKRAMASINGHE, D., STEIN, P., SCHULTZ, R. M., PALKO, M. E., DE MIGUEL, M. P., TESSAROLLO, L. & DONOVAN, P. J. **2002**. Cdc25b phosphatase is required for resumption of meiosis during oocyte maturation. *Nat Genet*, 30, 446-449.
- LIU, J., PARK, E. S. & JO, M. **2009a**. Runt-related transcription factor 1 regulates luteinized hormone-induced prostaglandin-endoperoxide synthase 2 expression in rat periovulatory granulosa cells. *Endocrinology*, 150, 3291-3300.
- LIU, N., MA, Y., LI, R., JIN, H., LI, M., HUANG, X., FENG, H. L. & QIAO, J. **2012**. Comparison of follicular fluid amphiregulin and EGF concentrations in patients undergoing IVF with different stimulation protocols. *Endocrine*. DOI: 10.1007/s12020-012-9706-z
- LIU, Z., DE MATOS, D. G., FAN, H. Y., SHIMADA, M., PALMER, S. & RICHARDS, J. S. **2009b**. Interleukin-6: an autocrine regulator of the mouse cumulus cell-oocyte complex expansion process. *Endocrinology*, 150, 3360-3368.
- LIU, Z., FAN, H. Y., WANG, Y. & RICHARDS, J. S. **2010**. Targeted disruption of Mapk14 (p38MAPKalpha) in granulosa cells and cumulus cells causes cell-specific changes in gene expression profiles that rescue COC expansion and maintain fertility. *Mol Endocrinol*, 24, 1794-1804.
- LOWTHER, K. M., NIKOLAEV, V. O. & MEHLMANN, L. M. **2011**. Endocytosis in the mouse oocyte and its contribution to cAMP signaling during meiotic arrest. *Reproduction*, 141, 737-747.
- LUETTEKE, N. C., QIU, T. H., FENTON, S. E., TROYER, K. L., RIEDEL, R. F., CHANG, A. & LEE, D. C. **1999**. Targeted inactivation of the EGF and amphiregulin genes reveals distinct roles for EGF receptor ligands in mouse mammary gland development. *Development*, 126, 2739-2750.
- LUGNIER, C. **2006**. Cyclic nucleotide phosphodiesterase (PDE) superfamily: a new target for the development of specific therapeutic agents. *Pharmacol Ther*, 109, 366-398.
- LYDON, J. P., DEMAYO, F. J., FUNK, C. R., MANI, S. K., HUGHES, A. R., MONTGOMERY, C. A., SHYAMALA, G., CONNEELY, O. M. & O'MALLEY, B. W. **1995**. Mice lacking progesterone receptor exhibit pleiotropic reproductive abnormalities. *Genes Dev*, 9, 2266-2278.
- MAMAN, E., YUNG, Y., KEDEM, A., YERUSHALMI, G. M., KONOPNICKI, S., COHEN, B., DOR, J. & HOURVITZ, A. **2012**. High expression of luteinizing hormone receptors messenger RNA by human cumulus granulosa cells is in correlation with decreased fertilization. *Fertil Steril*, 97, 592-598.

- MASCIARELLI, S., HORNER, K., LIU, C., PARK, S. H., 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, 196-205.
- MAYES, M. A. & SIRARD, M. A. **2002**. Effect of type 3 and type 4 phosphodiesterase inhibitors on the maintenance of bovine oocytes in meiotic arrest. *Biol Reprod*, 66, 180-184.
- MCKENZIE, L. J., PANGAS, S. A., CARSON, S. A., KOVANCI, E., CISNEROS, P., BUSTER, J. E., AMATO, P. & MATZUK, M. M. **2004**. Human cumulus granulosa cell gene expression: a predictor of fertilization and embryo selection in women undergoing IVF. *Hum Reprod*, 19, 2869-2874.
- MEHLMANN, L. M. **2005**. Oocyte-specific expression of Gpr3 is required for the maintenance of meiotic arrest in mouse oocytes. *Dev Biol*, 288, 397-404.
- MEHLMANN, L. M., JONES, T. L. & JAFFE, L. A. **2002**. Meiotic arrest in the mouse follicle maintained by a Gs protein in the oocyte. *Science*, 297, 1343-1345.
- MEHLMANN, L. M., SAEKI, Y., TANAKA, S., BRENNAN, T. J., EVSIKOV, A. V., PENDOLA, F. L., KNOWLES, B. B., EPPIG, J. J. & JAFFE, L. A. **2004**. The Gs-linked receptor GPR3 maintains meiotic arrest in mammalian oocytes. *Science*, 306, 1947-1950.
- MEI, F. C., QIAO, J., TSYGANKOVA, O. M., MEINKOTH, J. L., QUILLIAM, L. A. & CHENG, X. **2002**. Differential signaling of cyclic AMP: opposing effects of exchange protein directly activated by cyclic AMP and cAMP-dependent protein kinase on protein kinase B activation. *J Biol Chem*, 277, 11497-11504.
- MOLYNEAUX, K. A., SCHAIBLE, K. & WYLIE, C. **2003**. GP130, the shared receptor for the LIF/IL6 cytokine family in the mouse, is not required for early germ cell differentiation, but is required cell-autonomously in oocytes for ovulation. *Development*, 130, 4287-4294.
- MORIKAWA, M., SEKI, M., KUME, S., ENDO, T., NISHIMURA, Y., KANO, K. & NAITO, K. **2007**. Meiotic resumption of porcine immature oocytes is prevented by ooplasmic G α functions. *J Reprod Dev*, 53, 1151-1157.
- MURILLO-CARRETERO, M., TORROGLOSA, A., CASTRO, C., VILLALOBO, A. & ESTRADA, C. **2009**. S-Nitrosylation of the epidermal growth factor receptor: a regulatory mechanism of receptor tyrosine kinase activity. *Free Radic Biol Med*, 46, 471-479.
- NAGYOVA, E., CAMAIONI, A., PROCHAZKA, R. & SALUSTRI, A. **2004**. Covalent transfer of heavy chains of inter-alpha-trypsin inhibitor family proteins to hyaluronan in in vivo and in vitro expanded porcine oocyte-cumulus complexes. *Biol Reprod*, 71, 1838-1843.
- NAGYOVA, E., CAMAIONI, A., SCSUKOVA, S., MLYNARCIKOVA, A., PROCHAZKA, R., NEMCOVA, L. & SALUSTRI, A. **2011**. Activation of cumulus cell SMAD2/3 and epidermal growth factor receptor pathways are involved in porcine oocyte-cumulus cell expansion and steroidogenesis. *Mol Reprod Dev*, 78, 391-402.
- NAGYOVA, E., NEMCOVA, L. & PROCHAZKA, R. **2009**. Expression of tumor necrosis factor alpha-induced protein 6 messenger RNA in porcine preovulatory ovarian follicles. *J Reprod Dev*, 55, 231-235.
- NAUTIYAL, J., STEEL, J. H., ROSELL, M. M., NIKOLOPOULOU, E., LEE, K., DEMAYO, F. J., WHITE, R., RICHARDS, J. S. & PARKER, M. G. **2010**.

- The nuclear receptor cofactor receptor-interacting protein 140 is a positive regulator of amphiregulin expression and cumulus cell-oocyte complex expansion in the mouse ovary. *Endocrinology*, 151, 2923-2932.
- NEMCOVA, L., NAGYOVA, E., PETLACH, M., TOMANEK, M. & PROCHAZKA, R. **2007**. Molecular mechanisms of insulin-like growth factor 1 promoted synthesis and retention of hyaluronic acid in porcine oocyte-cumulus complexes. *Biol Reprod*, 76, 1016-1024.
- NEWHALL, K. J., CRINITI, A. R., CHEAH, C. S., SMITH, K. C., KAUFER, K. E., BURKART, A. D. & MCKNIGHT, G. S. **2006**. Dynamic anchoring of PKA is essential during oocyte maturation. *Curr Biol*, 16, 321-327.
- NING, G., OUYANG, H., WANG, S., CHEN, X., XU, B., YANG, J., ZHANG, H., ZHANG, M. & XIA, G. **2008**. 3',5'-cyclic adenosine monophosphate response element binding protein up-regulated cytochrome P450 lanosterol 14alpha-demethylase expression involved in follicle-stimulating hormone-induced mouse oocyte maturation. *Mol Endocrinol*, 22, 1682-1694.
- NISHIKIMI, A., MATSUKAWA, T., HOSHINO, K., IKEDA, S., KIRA, Y., SATO, E. F., INOUE, M. & YAMADA, M. **2001**. Localization of nitric oxide synthase activity in unfertilized oocytes and fertilized embryos during preimplantation development in mice. *Reproduction*, 122, 957-963.
- NISHIMURA, T., FUJII, W., KANO, K., SUGIURA, K. & NAITO, K. **2012**. Analyses of the Involvement of PKA Regulation Mechanism in Meiotic Incompetence of Porcine Growing Oocytes. *Biol Reprod*. DOI:10.1095/biolreprod.112.101279
- NOGUEIRA, D., ALBANO, C., ADRIAENSSENS, T., CORTVRINDT, R., BOURGAIN, C., DEVROEY, P. & SMITZ, J. **2003**. Human oocytes reversibly arrested in prophase I by phosphodiesterase type 3 inhibitor in vitro. *Biol Reprod*, 69, 1042-1052.
- NOMA, N., KAWASHIMA, I., FAN, H. Y., FUJITA, Y., KAWAI, T., TOMODA, Y., MIHARA, T., RICHARDS, J. S. & SHIMADA, M. **2011**. LH-induced neuregulin 1 (NRG1) type III transcripts control granulosa cell differentiation and oocyte maturation. *Mol Endocrinol*, 25, 104-116.
- NORRIS, R. P., FREUDZON, M., MEHLMANN, L. M., COWAN, A. E., SIMON, A. M., PAUL, D. L., LAMPE, P. D. & JAFFE, L. A. **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, 3229-3238.
- NORRIS, R. P., FREUDZON, M., NIKOLAEV, V. O. & JAFFE, L. A. **2010**. Epidermal growth factor receptor kinase activity is required for gap junction closure and for part of the decrease in ovarian follicle cGMP in response to LH. *Reproduction*, 140, 655-662.
- NORRIS, R. P., RATZAN, W. J., FREUDZON, M., MEHLMANN, L. M., KRALL, J., MOVSESIAN, M. A., WANG, H., KE, H., NIKOLAEV, V. O. & JAFFE, L. A. **2009**. Cyclic GMP from the surrounding somatic cells regulates cyclic AMP and meiosis in the mouse oocyte. *Development*, 136, 1869-1878.
- NOUBANI, A., FAROOKHI, R. & GUTKOWSKA, J. **2000**. B-type natriuretic peptide receptor expression and activity are hormonally regulated in rat ovarian cells. *Endocrinology*, 141, 551-559.
- OCHSNER, S. A., RUSSELL, D. L., DAY, A. J., BREYER, R. M. & RICHARDS, J. S. **2003**. Decreased expression of tumor necrosis factor-alpha-stimulated gene 6 in cumulus cells of the cyclooxygenase-2 and EP2 null mice.

- Endocrinology*, 144, 1008-1019.
- OH, J. S., HAN, S. J. & CONTI, M. **2010**. Wee1B, Myt1, and Cdc25 function in distinct compartments of the mouse oocyte to control meiotic resumption. *J Cell Biol*, 188, 199-207.
- PALANISAMY, G. S., CHEON, Y. P., KIM, J., KANNAN, A., LI, Q., SATO, M., MANTENA, S. R., SITRUK-WARE, R. L., BAGCHI, M. K. & BAGCHI, I. C. **2006**. A novel pathway involving progesterone receptor, endothelin-2, and endothelin receptor B controls ovulation in mice. *Mol Endocrinol*, 20, 2784-2795.
- PALL, M., HELLBERG, P., BRÄNNSTRÖM, M., MIKUNI, M., PETERSON, C. M., SUNDFELDT, K., NORDÉN, B., HEDIN, L. & ENERBÄCK, S. **1997**. The transcription factor C/EBP-beta and its role in ovarian function; evidence for direct involvement in the ovulatory process. *EMBO J*, 16, 5273-5279.
- PALLARES, P., GARCIA-FERNANDEZ, R. A., CRIADO, L. M., LETELIER, C. A., ESTEBAN, D., FERNANDEZ-TORO, J. M., FLORES, J. M. & GONZALEZ-BULNES, A. **2008**. Disruption of the endothelial nitric oxide synthase gene affects ovulation, fertilization and early embryo survival in a knockout mouse model. *Reproduction*, 136, 573-579.
- PARK, E. S., LIND, A. K., DAHM-KÄHLER, P., BRÄNNSTRÖM, M., CARLETTI, M. Z., CHRISTENSON, L. K., CURRY, T. E. & JO, M. **2010**. RUNX2 transcription factor regulates gene expression in luteinizing granulosa cells of rat ovaries. *Mol Endocrinol*, 24, 846-858.
- PARK, J. Y., SU, Y. Q., ARIGA, M., LAW, E., JIN, S. L. & CONTI, M. **2004**. EGF-Like growth factors as mediators of LH action in the ovulatory follicle. *Science*, 303, 682-684.
- PARK, M. R., GUPTA, M. K., LEE, H. R., DAS, Z. C., UHM, S. J. & LEE, H. T. **2011**. Possible involvement of Class III phosphatidylinositol-3-kinase in meiotic progression of porcine oocytes beyond germinal vesicle stage. *Theriogenology*, 75, 940-950.
- PARK, O. K. & MAYO, K. E. **1991**. Transient expression of progesterone receptor messenger RNA in ovarian granulosa cells after the preovulatory luteinizing hormone surge. *Mol Endocrinol*, 5, 967-978.
- PARKER, D., FERRERI, K., NAKAJIMA, T., LAMORTE, V. J., EVANS, R., KOERBER, S. C., HOEGER, C. & MONTMINY, M. R. **1996**. Phosphorylation of CREB at Ser-133 induces complex formation with CREB-binding protein via a direct mechanism. *Mol Cell Biol*, 16, 694-703.
- PETR, J., RAJMON, R., CHMELÍKOVÁ, E., TOMÁNEK, M., LÁNSKÁ, V., PRIBÁNOVÁ, M. & JÍLEK, F. **2006**. Nitric-oxide-dependent activation of pig oocytes: the role of the cGMP-signalling pathway. *Zygote*, 14, 9-16.
- PIETILÄ, M., ALHONEN, L., HALMEKYTÖ, M., KANTER, P., JÄNNE, J. & PORTER, C. W. **1997**. Activation of polyamine catabolism profoundly alters tissue polyamine pools and affects hair growth and female fertility in transgenic mice overexpressing spermidine/spermine N1-acetyltransferase. *J Biol Chem*, 272, 18746-18751.
- PIRINO, G., WESCOTT, M. P. & DONOVAN, P. J. **2009**. Protein kinase A regulates resumption of meiosis by phosphorylation of Cdc25B in mammalian oocytes. *Cell Cycle*, 8, 665-670.
- POTTER, L. R. **2011**. Regulation and therapeutic targeting of peptide-activated receptor guanylyl cyclases. *Pharmacol Ther*, 130, 71-82.

- POTTER, L. R., YODER, A. R., FLORA, D. R., ANTOS, L. K. & DICKEY, D. M. **2009**. Natriuretic peptides: their structures, receptors, physiologic functions and therapeutic applications. *Handb Exp Pharmacol*, 341-366.
- PREGIZER, S., BARSKI, A., GERSBACH, C. A., GARCÍA, A. J. & FRENKEL, B. **2007**. Identification of novel Runx2 targets in osteoblasts: cell type-specific BMP-dependent regulation of Tram2. *J Cell Biochem*, 102, 1458-1471.
- PROCHÁZKA, 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, 797-803.
- PROCHÁZKA, R., NEMCOVA, L., NAGYOVA, E. & KANKA, J. **2004**. Expression of growth differentiation factor 9 messenger RNA in porcine growing and preovulatory ovarian follicles. *Biol Reprod*, 71, 1290-1295.
- PROCHÁZKA, R., NAGYOVA, E., RIMKEVICOVÁ, Z., NAGAI, T., KIKUCHI, K. & MOTLÍK, J. **1991**. Lack of effect of oocyectomy on expansion of the porcine cumulus. *J Reprod Fertil*, 93, 569-576.
- PROCHÁZKA, R., PETLACH, M., NAGYOVA, E. & NEMCOVÁ, L. **2011**. Effect of epidermal growth factor-like peptides on pig cumulus cell expansion, oocyte maturation, and acquisition of developmental competence in vitro: comparison with gonadotropins. *Reproduction*, 141, 425-435.
- RAINES, K. W., CAO, G. L., PORSUPHATANA, S., TSAI, P., ROSEN, G. M. & SHAPIRO, P. **2004**. Nitric oxide inhibition of ERK1/2 activity in cells expressing neuronal nitric-oxide synthase. *J Biol Chem*, 279, 3933-3940.
- RICHARD, F. J., TSAFRIRI, A. & CONTI, M. **2001**. Role of phosphodiesterase type 3A in rat oocyte maturation. *Biol Reprod*, 65, 1444-1451.
- ROBINSON, J. W., ZHANG, M., SHUHAIBAR, L. C., NORRIS, R. P., GEERTS, A., WUNDER, F., EPPIG, J. J., POTTER, L. R. & JAFFE, L. A. **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, 308-316.
- ROBKER, R. L., RUSSELL, D. L., ESPEY, L. L., LYDON, J. P., O'MALLEY, B. W. & RICHARDS, J. S. **2000**. Progesterone-regulated genes in the ovulation process: ADAMTS-1 and cathepsin L proteases. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 97, 4689-4694.
- RODRIGUEZ, K. F., COUSE, J. F., JAYES, F. L., HAMILTON, K. J., BURNS, K. A., TANIGUCHI, F. & KORACH, K. S. **2010**. Insufficient luteinizing hormone-induced intracellular signaling disrupts ovulation in preovulatory follicles lacking estrogen receptor-beta. *Endocrinology*, 151, 2826-2834.
- RUGG, M. S., WILLIS, A. C., MUKHOPADHYAY, D., HASCALL, V. C., FRIES, E., FÜLÖP, C., MILNER, C. M. & DAY, A. J. **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, 25674-25686.
- RUSSELL, D. L., DOYLE, K. M., OCHSNER, S. A., SANDY, J. D. & RICHARDS, J. S. **2003a**. Processing and localization of ADAMTS-1 and proteolytic cleavage of versican during cumulus matrix expansion and ovulation. *J Biol Chem*, 278, 42330-42339.
- RUSSELL, D. L., OCHSNER, S. A., HSIEH, M., MULDER, S. & RICHARDS, J. S. **2003b**. Hormone-regulated expression and localization of versican in the rodent ovary. *Endocrinology*, 144, 1020-1031.

- SALUSTRI, A., GARLANDA, C., HIRSCH, E., DE ACETIS, M., MACCAGNO, A., BOTTAZZI, B., DONI, A., BASTONE, A., MANTOVANI, G., BECK PECCOZ, P., SALVATORI, G., MAHONEY, D. J., DAY, A. J., SIRACUSA, G., ROMANI, L. & MANTOVANI, A. **2004**. PTX3 plays a key role in the organization of the cumulus oophorus extracellular matrix and in in vivo fertilization. *Development*, 131, 1577-1586.
- SANTIQUET, N. W., DEVELLE, Y., LAROCHE, A., ROBERT, C. & RICHARD, F. J. **2012**. Regulation of Gap Junctional Communication Between Cumulus Cells During In Vitro Maturation in Swine, a Gap-FRAP Study. *Biol Reprod*. DOI:10.1095/biolreprod.112.099754
- SASSEVILLE, M., CÔTÉ, N., GAGNON, M. C. & RICHARD, F. J. **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, 5568-5576.
- SASSEVILLE, M., CÔTÉ, N., GUILLEMETTE, C. & RICHARD, F. J. **2006**. New insight into the role of phosphodiesterase 3A in porcine oocyte maturation. *BMC Dev Biol*, 6, 47.
- SASSEVILLE, M., GAGNON, M. C., GUILLEMETTE, C., SULLIVAN, R., GILCHRIST, R. B. & RICHARD, F. J. **2009**. Regulation of gap junctions in porcine cumulus-oocyte complexes: contributions of granulosa cell contact, gonadotropins, and lipid rafts. *Mol Endocrinol*, 23, 700-710.
- SATO, Y., CHENG, Y., KAWAMURA, K., TAKAE, S. & HSUEH, A. J. **2012**. C-type natriuretic Peptide stimulates ovarian follicle development. *Mol Endocrinol*, 26, 1158-1166.
- 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, 30161-30170.
- SELA-ABRAMOVICH, S., CHOREV, E., GALIANI, D. & DEKEL, N. **2005**. Mitogen-activated protein kinase mediates luteinizing hormone-induced breakdown of communication and oocyte maturation in rat ovarian follicles. *Endocrinology*, 146, 1236-1244.
- SELA-ABRAMOVICH, S., EDRY, I., GALIANI, D., NEVO, N. & DEKEL, N. **2006**. Disruption of gap junctional communication within the ovarian follicle induces oocyte maturation. *Endocrinology*, 147, 2280-2286.
- 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, 1111-1118.
- SHEN, X. H., CUI, X. S., LEE, S. H. & KIM, N. H. **2012**. Interleukin-6 Enhances Porcine Parthenote Development In Vitro, through the IL-6/Stat3 Signaling Pathway. *J Reprod Dev*. DOI:10.1262/jrd.2012-015
- SHIMADA, M., HERNANDEZ-GONZALEZ, I., GONZALEZ-ROBANYA, I. & RICHARDS, J. S. **2006a**. Induced expression of pattern recognition receptors in cumulus oocyte complexes: novel evidence for innate immune-like functions during ovulation. *Mol Endocrinol*, 20, 3228-3239.
- SHIMADA, M., HERNANDEZ-GONZALEZ, I., GONZALEZ-ROBAYNA, I. & RICHARDS, J. S. **2006b**. Paracrine and autocrine regulation of epidermal growth factor-like factors in cumulus oocyte complexes and granulosa cells:

- key roles for prostaglandin synthase 2 and progesterone receptor. *Mol Endocrinol*, 20, 1352-1365.
- SHIMADA, M., MAEDA, T. & TERADA, T. **2001**. Dynamic changes of connexin-43, gap junctional protein, in outer layers of cumulus cells are regulated by PKC and PI 3-kinase during meiotic resumption in porcine oocytes. *Biol Reprod*, 64, 1255-1263.
- SHIMADA, M., NISHIBORI, M., ISOBE, N., KAWANO, N. & TERADA, T. **2003**. Luteinizing hormone receptor formation in cumulus cells surrounding porcine oocytes and its role during meiotic maturation of porcine oocytes. *Biol Reprod*, 68, 1142-1149.
- SHIMADA, M., NISHIBORI, M., YAMASHITA, Y., ITO, J., MORI, T. & RICHARDS, J. S. **2004a**. Down-regulated expression of A disintegrin and metalloproteinase with thrombospondin-like repeats-1 by progesterone receptor antagonist is associated with impaired expansion of porcine cumulus-oocyte complexes. *Endocrinology*, 145, 4603-4614.
- SHIMADA, M. & TERADA, T. **2001**. Phosphatidylinositol 3-kinase in cumulus cells and oocytes is responsible for activation of oocyte mitogen-activated protein kinase during meiotic progression beyond the meiosis I stage in pigs. *Biol Reprod*, 64, 1106-1114.
- SHIMADA, M., YAMASHITA, Y., ITO, J., OKAZAKI, T., KAWAHATA, K. & NISHIBORI, M. **2004b**. Expression of two progesterone receptor isoforms in cumulus cells and their roles during meiotic resumption of porcine oocytes. *J Mol Endocrinol*, 33, 209-225.
- SHIMADA, M., YANAI, Y., OKAZAKI, T., YAMASHITA, Y., SRIRAMAN, V., WILSON, M. C. & RICHARDS, J. S. **2007**. Synaptosomal-associated protein 25 gene expression is hormonally regulated during ovulation and is involved in cytokine/chemokine exocytosis from granulosa cells. *Mol Endocrinol*, 21, 2487-2502.
- SHIMAOKA, T., NISHIMURA, T., KANO, K. & NAITO, K. **2011**. Analyses of the regulatory mechanism of porcine WEE1B: the phosphorylation sites of porcine WEE1B and mouse WEE1B are different. *J Reprod Dev*, 57, 223-228.
- SHINDO, T., KURIHARA, H., KUNO, K., YOKOYAMA, H., WADA, T., KURIHARA, Y., IMAI, T., WANG, Y., OGATA, M., NISHIMATSU, H., MORIYAMA, N., OH-HASHI, Y., MORITA, H., ISHIKAWA, T., NAGAI, R., YAZAKI, Y. & MATSUSHIMA, K. **2000**. ADAMTS-1: a metalloproteinase-disintegrin essential for normal growth, fertility, and organ morphology and function. *J Clin Invest*, 105, 1345-1352.
- SHKOLNIK, K., TADMOR, A., BEN-DOR, S., NEVO, N., GALIANI, D. & DEKEL, N. **2011**. Reactive oxygen species are indispensable in ovulation. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 108, 1462-1467.
- SRIRAMAN, V., RUDD, M. D., LOHMANN, S. M., MULDER, S. M. & RICHARDS, J. S. **2006**. Cyclic guanosine 5'-monophosphate-dependent protein kinase II is induced by luteinizing hormone and progesterone receptor-dependent mechanisms in granulosa cells and cumulus oocyte complexes of ovulating follicles. *Mol Endocrinol*, 20, 348-361.
- STERNECK, E., TESSAROLLO, L. & JOHNSON, P. F. **1997**. An essential role for C/EBPbeta in female reproduction. *Genes Dev*, 11, 2153-2162.

- SU, Y. Q., SUGIURA, K. & EPPIG, J. J. **2009**. Mouse oocyte control of granulosa cell development and function: paracrine regulation of cumulus cell metabolism. *Semin Reprod Med*, 27, 32-42.
- SU, Y. Q., SUGIURA, K., LI, Q., WIGGLESWORTH, K., MATZUK, M. M. & EPPIG, J. J. **2010**. Mouse oocytes enable LH-induced maturation of the cumulus-oocyte complex via promoting EGF receptor-dependent signaling. *Mol Endocrinol*, 24, 1230-1239.
- SU, Y. Q., WU, X., O'BRIEN, M. J., PENDOLA, F. L., DENEGRE, J. N., MATZUK, M. M. & EPPIG, J. J. **2004**. Synergistic roles of BMP15 and GDF9 in the development and function of the oocyte-cumulus cell complex in mice: genetic evidence for an oocyte-granulosa cell regulatory loop. *Dev Biol*, 276, 64-73.
- SUN, G. W., KOBAYASHI, H., SUZUKI, M., KANAYAMA, N. & TERAO, T. **2003**. Follicle-stimulating hormone and insulin-like growth factor I synergistically induce up-regulation of cartilage link protein (Crtl1) via activation of phosphatidylinositol-dependent kinase/Akt in rat granulosa cells. *Endocrinology*, 144, 793-801.
- SUN, G. W., KOBAYASHI, H. & TERAO, T. **1999**. Expression of link protein during mouse follicular development. *J Histochem Cytochem*, 47, 1433-1442.
- SUNKARA, P. S., WRIGHT, D. A. & NISHIOKA, K. **1981**. An essential role for putrescine biosynthesis during meiotic maturation of amphibian oocytes. *Dev Biol*, 87, 351-355.
- SÁNCHEZ, F. & SMITZ, J. **2012**. Molecular control of oogenesis. *Biochim Biophys Acta*. DOI:10.1016/j.bbadis.2012.05.013
- TAKAHASHI, T., MORROW, J. D., WANG, H. & DEY, S. K. **2006**. Cyclooxygenase-2-derived prostaglandin E(2) directs oocyte maturation by differentially influencing multiple signaling pathways. *J Biol Chem*, 281, 37117-37129.
- TAKESUE, K., TABATA, S., SATO, F. & HATTORI, M. A. **2003**. Expression of nitric oxide synthase-3 in porcine oocytes obtained at different follicular development. *J Reprod Dev*, 49, 135-140.
- TAMURA, N., DOOLITTLE, L. K., HAMMER, R. E., SHELTON, J. M., RICHARDSON, J. A. & GARBERS, D. L. **2004**. Critical roles of the guanylyl cyclase B receptor in endochondral ossification and development of female reproductive organs. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 101, 17300-17305.
- TAO, J. Y., FU, Z., ZHANG, M. L., XIA, G., LEI, L. & WU, Z. L. **2005**. Nitric oxide influences the meiotic maturation of porcine oocytes cultured in hypoxanthine-supplemented medium. *J Anim Physiol Anim Nutr (Berl)*, 89, 38-44.
- TAO, Y., FU, Z., ZHANG, M., XIA, G., YANG, J. & XIE, H. **2004a**. Immunohistochemical localization of inducible and endothelial nitric oxide synthase in porcine ovaries and effects of NO on antrum formation and oocyte meiotic maturation. *Mol Cell Endocrinol*, 222, 93-103.
- TAO, Y., XIA, G., BO, S., ZHOU, B., ZHANG M. & WANG, F. **2004b**. Nitric Oxide Exerts Different Functions on Porcine Oocytes Cultured in Different Models, Which is Affected by Beta-mercaptoethanol. *Asian Australas J Anim Sci* 17, 317-324.
- TEMPFER, C., MORENO, R. M., O'BRIEN, W. E. & GREGG, A. R. **2000**. Genetic contributions of the endothelial nitric oxide synthase gene to ovulation and menopause in a mouse model. *Fertil Steril*, 73, 1025-1031.

- THOMAS, R. E., ARMSTRONG, D. T. & GILCHRIST, R. B. **2002**. Differential effects of specific phosphodiesterase isoenzyme inhibitors on bovine oocyte meiotic maturation. *Dev Biol*, 244, 215-225.
- TILLEY, S. L., AUDOLY, L. P., HICKS, E. H., KIM, H. S., FLANNERY, P. J., COFFMAN, T. M. & KOLLER, B. H. **1999**. Reproductive failure and reduced blood pressure in mice lacking the EP2 prostaglandin E2 receptor. *J Clin Invest*, 103, 1539-1545.
- TSAFRIRI, A., CHUN, S. Y., ZHANG, R., HSUEH, A. J. & CONTI, M. **1996**. Oocyte maturation involves compartmentalization and opposing changes of cAMP levels in follicular somatic and germ cells: studies using selective phosphodiesterase inhibitors. *Dev Biol*, 178, 393-402.
- TULLET, J. M., POCOOCK, V., STEEL, J. H., WHITE, R., MILLIGAN, S. & PARKER, M. G. **2005**. Multiple signaling defects in the absence of RIP140 impair both cumulus expansion and follicle rupture. *Endocrinology*, 146, 4127-4137.
- UENO, S., YOSHIDA, N. & NIIMURA, S. **2009**. Amount of hyaluronan produced by mouse oocytes and role of hyaluronan in enlargement of the perivitelline space. *J Reprod Dev*, 55, 496-501.
- VACCARI, S., HORNER, K., MEHLMANN, L. M. & CONTI, M. **2008**. Generation of mouse oocytes defective in cAMP synthesis and degradation: endogenous cyclic AMP is essential for meiotic arrest. *Dev Biol*, 316, 124-134.
- VACCARI, S., WEEKS, J. L., HSIEH, M., MENNITI, F. S. & CONTI, M. **2009**. Cyclic GMP signaling is involved in the luteinizing hormone-dependent meiotic maturation of mouse oocytes. *Biol Reprod*, 81, 595-604.
- VARANI, S., ELVIN, J. A., YAN, C., DEMAYO, J., DEMAYO, F. J., HORTON, H. F., BYRNE, M. C. & MATZUK, M. M. **2002**. Knockout of pentraxin 3, a downstream target of growth differentiation factor-9, causes female subfertility. *Mol Endocrinol*, 16, 1154-1167.
- VEITCH, G. I., GITTENS, J. E., SHAO, Q., LAIRD, D. W. & KIDDER, G. M. **2004**. Selective assembly of connexin37 into heterocellular gap junctions at the oocyte/granulosa cell interface. *J Cell Sci*, 117, 2699-2707.
- WANG, Y. & CASERO, R. A. **2006**. Mammalian polyamine catabolism: a therapeutic target, a pathological problem, or both? *J Biochem*, 139, 17-25.
- WAYNE, C. M., FAN, H. Y., CHENG, X. & RICHARDS, J. S. **2007**. Follicle-stimulating hormone induces multiple signaling cascades: evidence that activation of Rous sarcoma oncogene, RAS, and the epidermal growth factor receptor are critical for granulosa cell differentiation. *Mol Endocrinol*, 21, 1940-1957.
- WINKLES, J. A. **2008**. The TWEAK-Fn14 cytokine-receptor axis: discovery, biology and therapeutic targeting. *Nat Rev Drug Discov*, 7, 411-425.
- WIRRIE, E. E., SNARR, B. S., CHINTALAPUDI, M. R., O'NEAL, J. L., PHELPS, A. L., BARTH, J. L., FRESCO, V. M., KERN, C. B., MJAATVEDT, C. H., TOOLE, B. P., HOFFMAN, S., TRUSK, T. C., ARGRAVES, W. S. & WESSELS, A. **2007**. Cartilage link protein 1 (Crtl1), an extracellular matrix component playing an important role in heart development. *Dev Biol*, 310, 291-303.
- XU, P. & DERYNCK, R. **2010**. Direct activation of TACE-mediated ectodomain shedding by p38 MAP kinase regulates EGF receptor-dependent cell proliferation. *Mol Cell*, 37, 551-566.

- YAMASHITA, Y., HISHINUMA, M. & SHIMADA, M. **2009**. Activation of PKA, p38 MAPK and ERK1/2 by gonadotropins in cumulus cells is critical for induction of EGF-like factor and TACE/ADAM17 gene expression during in vitro maturation of porcine COCs. *J Ovarian Res*, 2, 20.
- YAMASHITA, Y., KAWASHIMA, I., GUNJI, Y., HISHINUMA, M. & SHIMADA, M. **2010**. Progesterone is essential for maintenance of Tace/Adam17 mRNA expression, but not EGF-like factor, in cumulus cells, which enhances the EGF receptor signaling pathway during in vitro maturation of porcine COCs. *J Reprod Dev*, 56, 315-23.
- YAMASHITA, Y., KAWASHIMA, I., YANAI, Y., NISHIBORI, M., RICHARDS, J. S. & 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, 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, 1073-1082.
- YANG, C. R., WEI, Y., QI, S. T., CHEN, L., ZHANG, Q. H., MA, J. Y., LUO, Y. B., WANG, Y. P., HOU, Y., SCHATTEN, H., LIU, Z. H. & SUN, Q. Y. **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, e38807.
- YING, C., YANG, Y. C., HONG, W. F., CHENG, W. T. & HSU, W. L. **2000**. Progesterone receptor gene expression in preimplantation pig embryos. *Eur J Endocrinol*, 143, 697-703.
- YOKOO, M., KIMURA, N. & SATO, E. **2010**. Induction of oocyte maturation by hyaluronan-CD44 interaction in pigs. *J Reprod Dev*, 56, 15-19.
- YOKOO, M. & SATO, E. **2004**. Cumulus-oocyte complex interactions during oocyte maturation. *Int Rev Cytol*, 235, 251-91.
- YOKOO, M., SHIMIZU, T., KIMURA, N., TUNJUNG, W. A., MATSUMOTO, H., ABE, H., SASADA, H., RODRIGUEZ-MARTINEZ, H. & SATO, E. **2007**. Role of the hyaluronan receptor CD44 during porcine oocyte maturation. *J Reprod Dev*, 53, 263-270.
- ZAMAH, A. M., HSIEH, M., CHEN, J., VIGNE, J. L., ROSEN, M. P., CEDARS, M. I. & CONTI, M. **2010**. Human oocyte maturation is dependent on LH-stimulated accumulation of the epidermal growth factor-like growth factor, amphiregulin. *Hum Reprod*, 25, 2569-2578.
- ZHANG, B., DING, J., LI, Y., WANG, J., ZHAO, Y., WANG, W., SHI, S., DONG, F., ZHANG, Z., SHI, F. & XU, Y. **2012**. The porcine Gpr3 gene: molecular cloning, characterization and expression level in tissues and cumulus-oocyte complexes during in vitro maturation. *Mol Biol Rep*, 39, 5831-5839.
- ZHANG, M., OUYANG, H. & XIA, G. **2009**. The signal pathway of gonadotrophins-induced mammalian oocyte meiotic resumption. *Mol Hum Reprod*, 15, 399-409.
- ZHANG, M., SU, Y. Q., SUGIURA, K., WIGGLESWORTH, K., XIA, G. & EPPIG, J. J. **2011**. Estradiol promotes and maintains cumulus cell expression

- of natriuretic peptide receptor 2 (NPR2) and meiotic arrest in mouse oocytes in vitro. *Endocrinology*, 152, 4377-4385.
- ZHANG, M., SU, Y. Q., SUGIURA, K., XIA, G. & EPPIG, J. J. **2010**. Granulosa cell ligand NPPC and its receptor NPR2 maintain meiotic arrest in mouse oocytes. *Science*, 330, 366-369.
- ZHANG, M., TAO, Y., XIA, G., XIE, H., HONG, H., WANG, F. & LEI, L. **2005a**. Atrial natriuretic peptide negatively regulates follicle-stimulating hormone-induced porcine oocyte maturation and cumulus expansion via cGMP-dependent protein kinase pathway. *Theriogenology*, 64, 902-916.
- ZHANG, M., TAO, Y., ZHOU, B., XIE, H., WANG, F., LEI, L., HUO, L., SUN, Q. & XIA, G. **2005b**. Atrial natriuretic peptide inhibits the actions of FSH and forskolin in meiotic maturation of pig oocytes via different signalling pathways. *J Mol Endocrinol*, 34, 459-472.
- ZHANG, Y., ZHANG, Z., XU, X. Y., LI, X. S., YU, M., YU, A. M., ZONG, Z. H. & YU, B. Z. **2008**. Protein kinase A modulates Cdc25B activity during meiotic resumption of mouse oocytes. *Dev Dyn*, 237, 3777-3786.
- ZHOU, Y., MA, C., KARMOUCH, J., KATBI, H. A. & LIU, X. J. **2009**. Antiapoptotic role for ornithine decarboxylase during oocyte maturation. *Mol Cell Biol*, 29, 1786-1795.
- ZHUO, L., YONEDA, M., ZHAO, M., YINGSUNG, W., YOSHIDA, N., KITAGAWA, Y., KAWAMURA, K., SUZUKI, T. & KIMATA, K. **2001**. Defect in SHAP-hyaluronan complex causes severe female infertility. A study by inactivation of the bikunin gene in mice. *J Biol Chem*, 276, 7693-7696.