



Available online at www.sciencedirect.com



Developmental Biology 316 (2008) 124–134

DEVELOPMENTAL
BIOLOGY

www.elsevier.com/developmentalbiology

Generation of mouse oocytes defective in cAMP synthesis and degradation: Endogenous cyclic AMP is essential for meiotic arrest

Sergio Vaccari^{a,1}, Kathleen Horner^{a,1}, Lisa M. Mehlmann^b, Marco Conti^{a,*}

^a *Division of Reproductive Biology, Department of Obstetrics and Gynecology Stanford University 94305, USA*

^b *Department of Cell Biology, University of Connecticut Health Center, Farmington, CT 06032, USA*

Received for publication 19 September 2007; revised 11 January 2008; accepted 11 January 2008

Available online 26 January 2008

Iwo Kuciński

Embriologia eksperymentalna ssaków 2010

Wstęp teoretyczny

- Od lat wiadomo, że poziom cAMP jest kluczowy dla regulacji dojrzewania oocytów u ssaków
- cAMP → PKA → hamowanie MPF (specyficzna fosforylacja Cdk1)
- Uważano, że oocyt nie jest w stanie wyprodukować odpowiedniej ilości cAMP, żeby zahamować dojrzewanie
- cAMP może migrować z komórek follikularnych do oocytu (po stymulacji FSH)
- Model: przerwanie połączenia z kom. follikularnymi stymuluje dojrzewanie
- Inaktywacja PDE (Pde3a) powodują permanentne zahamowanie dojrzewania
- Dysrupcja GPR3 prowadzi do przedwczesnego GVBD (poprzednie semina)ria)
- Nie wiadomo jednak nic o poziomach cAMP w myszach $Gpr3^{-/-}$

Materiały i metody

- Gpr3^{+/-} C57BL/6
- Pde3a^{-/-} C57BL/6 x 129Sv
- Izolacja pęcherzyków: przedantralnych, antralnych i przedowulacyjnych: z myszy 22-23 dniowych (hormon PMSG podany 42-44h przed sekcją)
- Izolacja pęcherzyków przedantralnych: z myszy 11-12dniowych
- Sekcja jajników: z myszy 22 dniowych (hormon PMSG podany 42-44h przed sekcją)
- Mikroiniekcje: przeciwciała przeciwko Gs, oglinoukleotydy morpholino (oocyty z myszy 22-dniowych)
- Pomiar cAMP: z myszy 11-12 dniowych, radioimmunoassay
- Metabolic coupling assay: z myszy 11-12 dniowych, całe pęcherzyki względem samych oocytów, [³H] urydyna

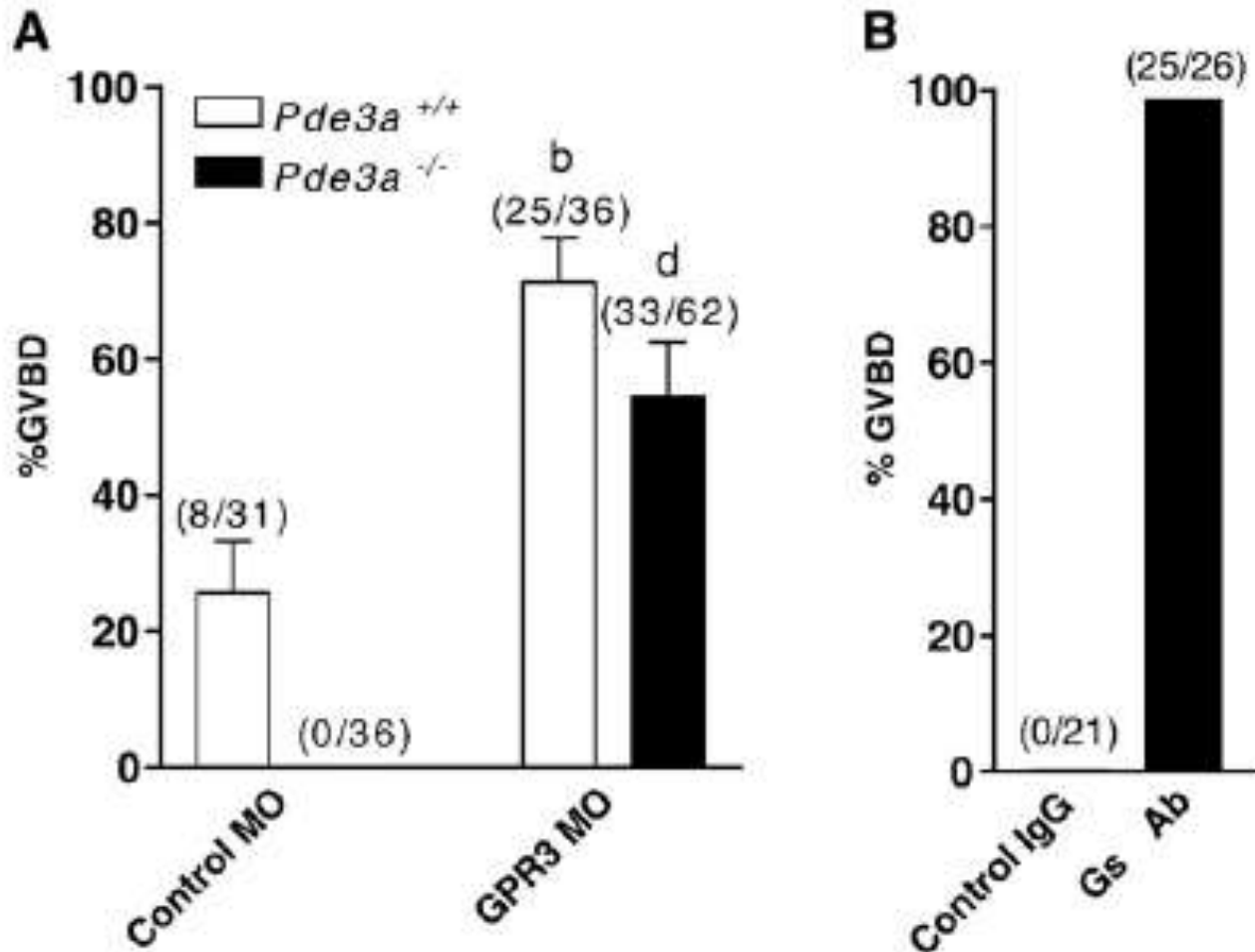
Fenotyp myszy $Gpr3^{-/-}$ $Pde3a^{-/-}$

Table 1

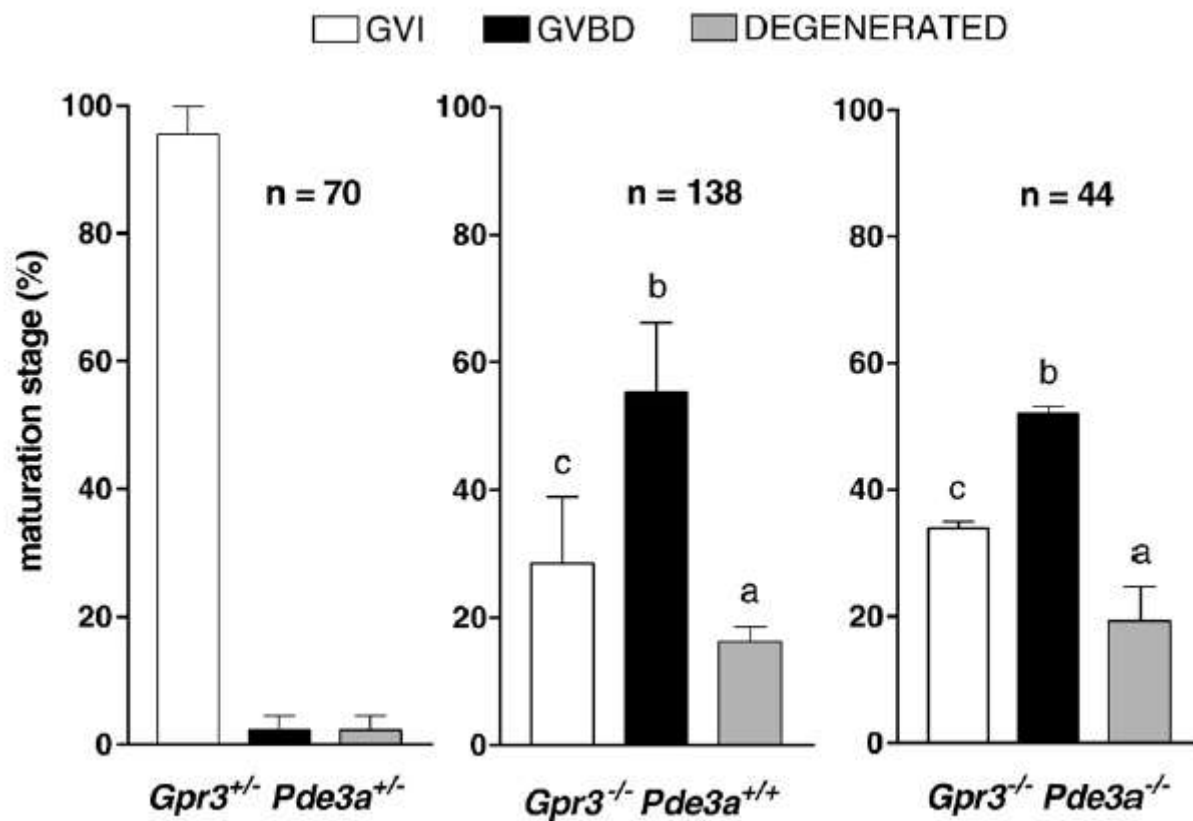
Crossing between females of different genotypes with wild type males

♀ Genotype	Litters/month	Pups/litter
$Gpr3^{+/+} Pde3a^{+/+}$	0.8 ± 0.1^a	9.5 ± 0.7^a
$Gpr3^{+/-} Pde3a^{+/-}$	0.8 ± 0.1^a	10.2 ± 1.2^a
$Gpr3^{+/-} Pde3a^{-/-}$	0^b	0^b
$Gpr3^{-/-} Pde3a^{+/-}$	0.4 ± 0.1^c	4.6 ± 0.5^c
$Gpr3^{-/-} Pde3a^{-/-}$	0.3 ± 0.1^c	4.5 ± 0.5^c

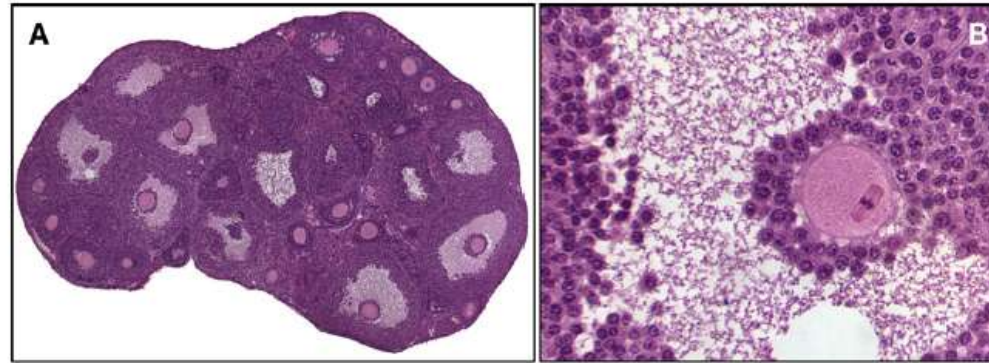
Przeciwciała anty Gs oraz anty GPR3 oligo w myszach $Pde3a^{-/-}$



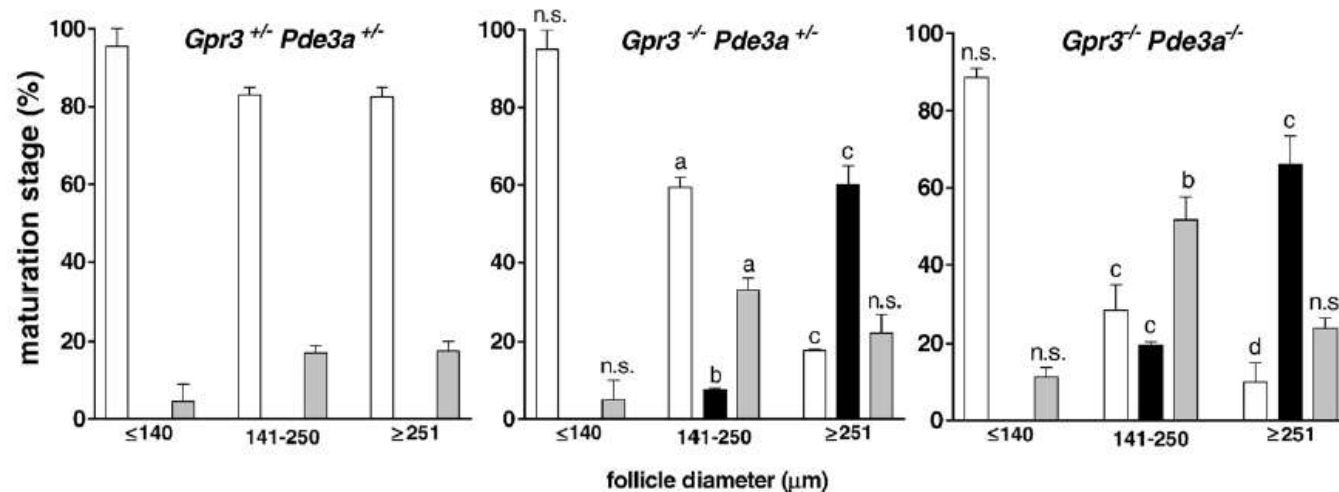
Dojrzewanie oocytów u myszy $Gpr3^{-/-}$ $Pde3a^{-/-}$ w hodowli



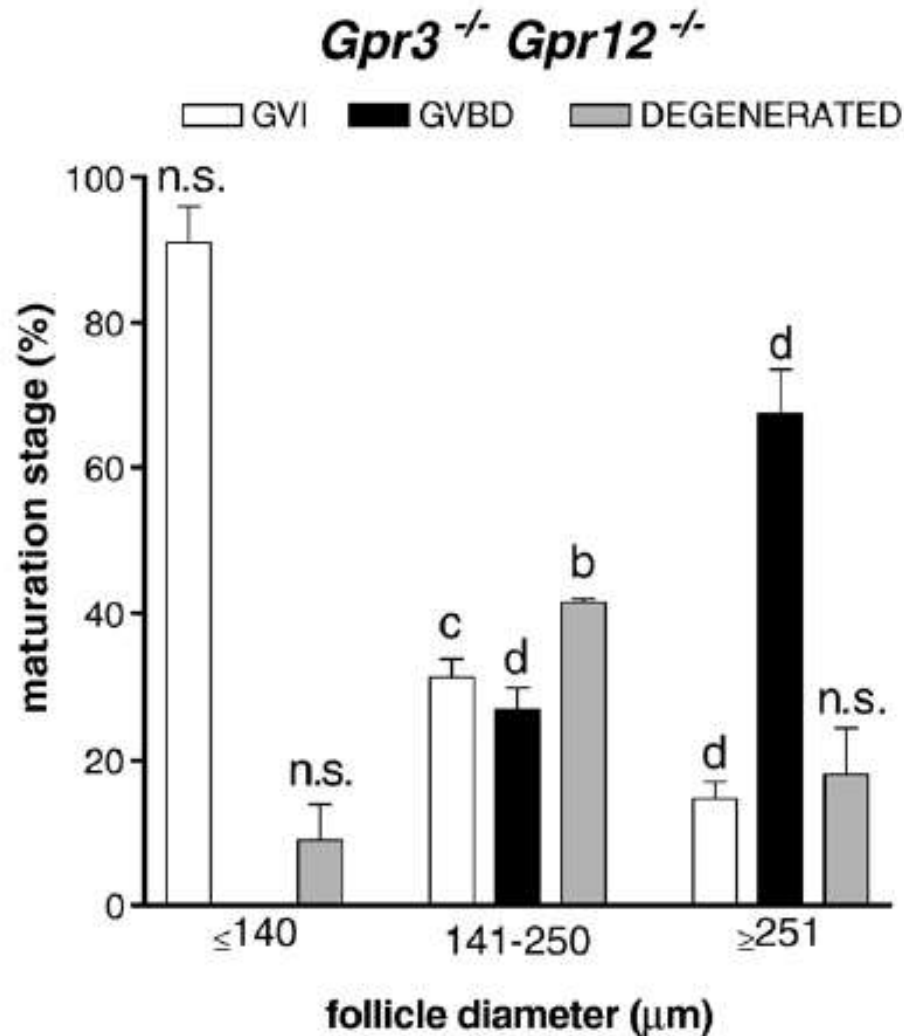
Dojrzewanie oocytów u myszy $Gpr3^{-/-}$ $Pde3a^{-/-}$ w jajniku



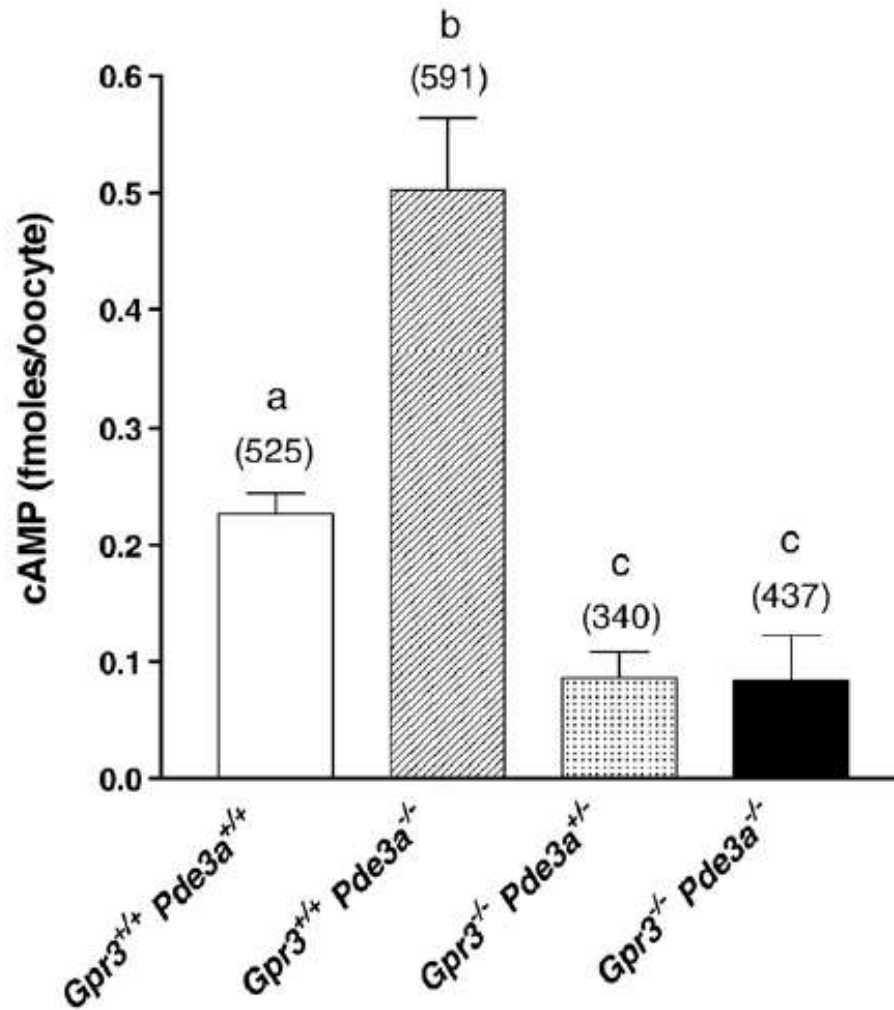
□ GVI ■ GVBD ▒ DEGENERATED



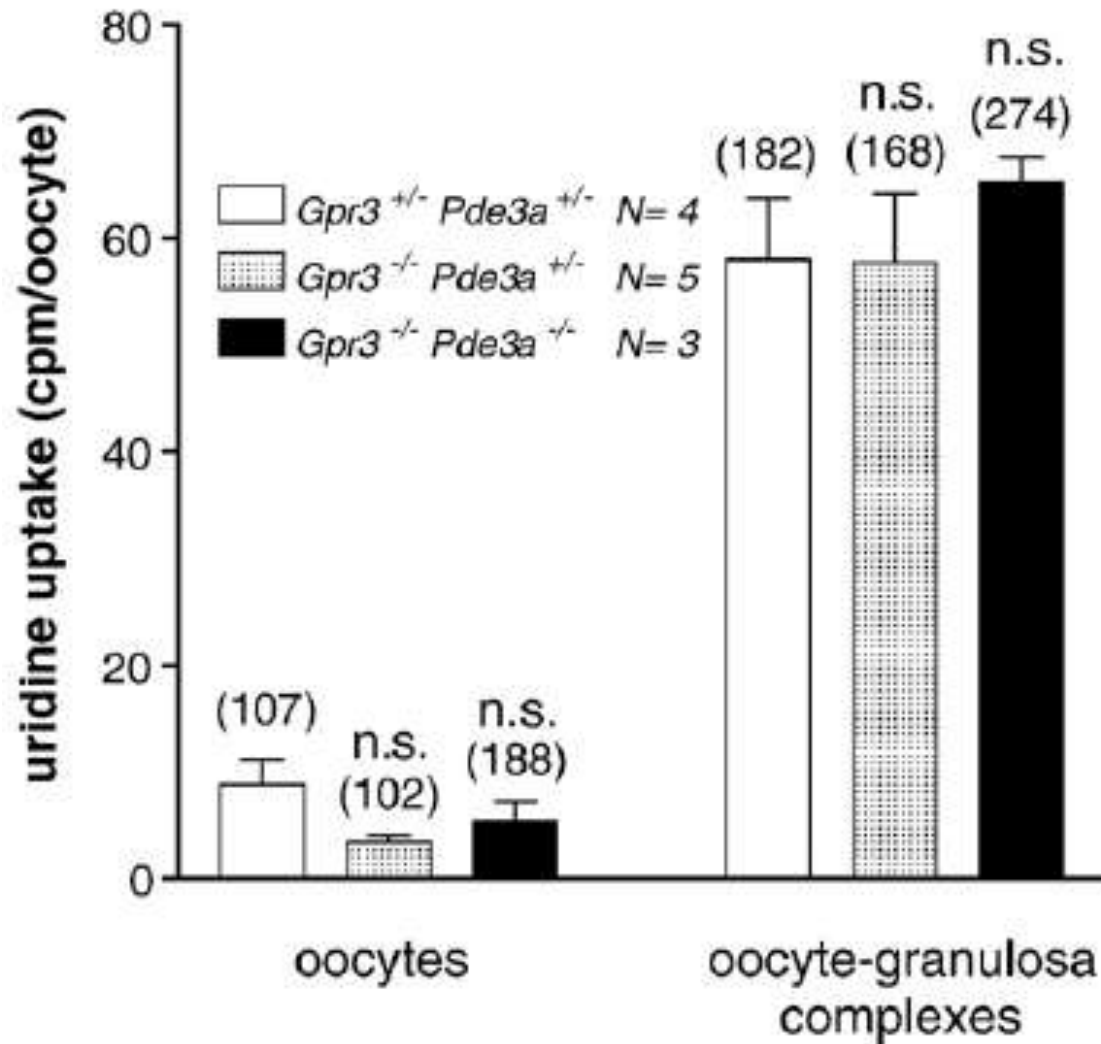
Gpr12 nie ma znaczącego wpływu na dojrzewanie oocytów



Pomiary stężenia cAMP w oocytach i kom. folikularnych



Złącza szczelinowe u myszy $Gpr3^{-/-}$ $Pde3a^{-/-}$



Wnioski

- Myszy $Gpr3^{-/-} Pde3a^{-/-}$ mają obniżoną płodność, ale są płodne ($Gpr3^{+/-} Pde3a^{-/-}$ są bezpłodne)
- Dojrzewanie oocytu jest zależne od receptora GPR3 i aktywnego białka Gs
- GPR3 ma dominującą funkcję nad Pde3a w dojrzewaniu oocytów
- Oocyt produkuje cAMP i to utrzymuje go w fazie GV ($Pde3a^{-/-}$ w hodowli pozbawione komórek follikularnych)
- Mutacje GPR3 oraz Pde3a nie mają wpływu na funkcjonowanie połączeń szczelinowych między oocytem a komórkami follikularnymi
- U myszy $Gpr3^{-/-}$ oraz $Pde3a^{-/-}$ jest również wyższa częstość oocytów zdegenerowanych
- cAMP pochodzące z komórek follikularnych nie jest wystarczające do utrzymania bloku mejotycznego