

Oocyte-specific expression of Gpr3 is required for the maintenance of meiotic arrest in mouse oocytes

Lisa M. Mehlmann

Opracowała:
Barbara Świerczek

Oocyt – dojrzewanie

- Początek mejozy – embriogeneza;
 - Pierwszy blok – profaza I;
 - Na skutek wydzielania hormonu LH – wznowienie mejozy;
 - Drugi blok – mejoza II;
 - W wypadku zapłodnienia – dokończenie podziału
-
-

Mechanizm bloku

cAMP → aktywacja kinazy A →



fosforylacja CDK1

Hormon LH – spadek stężenia cAMP w komórce.

Kontrola poziomu cAMP

receptor GPR3 → białko Gs → cyklaza

adenylowa



cAMP



Komórki pęcherzykowe

- zwiększają produkcję cAMP, aktywując GPR3
(obecnie nieprawda)

Czy...

- blokują aktywność fosfodiesteraz (wydzielanie cGMP)
-
-

GPR3 - znaczenie

- Myszy pozbawione genu *Gpr3* – spontaniczne zachodzenie mejozy
- Blok mejozy po wstrzyknięciu RNA kodującego ten gen do oocyty

Rola GPR3 zawartego w komórkach pęcherzykowych?

Badania

Cel:

- Stwierdzenie, czy za blok mejozy odpowiada GPR3 w cytoplazmie oocyty, czy komórek pęcherzykowych

Materiał:

- Myszy szczepu B6SJLF1, niedojrzałe płciowo (oocyty z komórkami pęcherzykowymi), dojrzałe płciowe (wyizolowane oocyty)

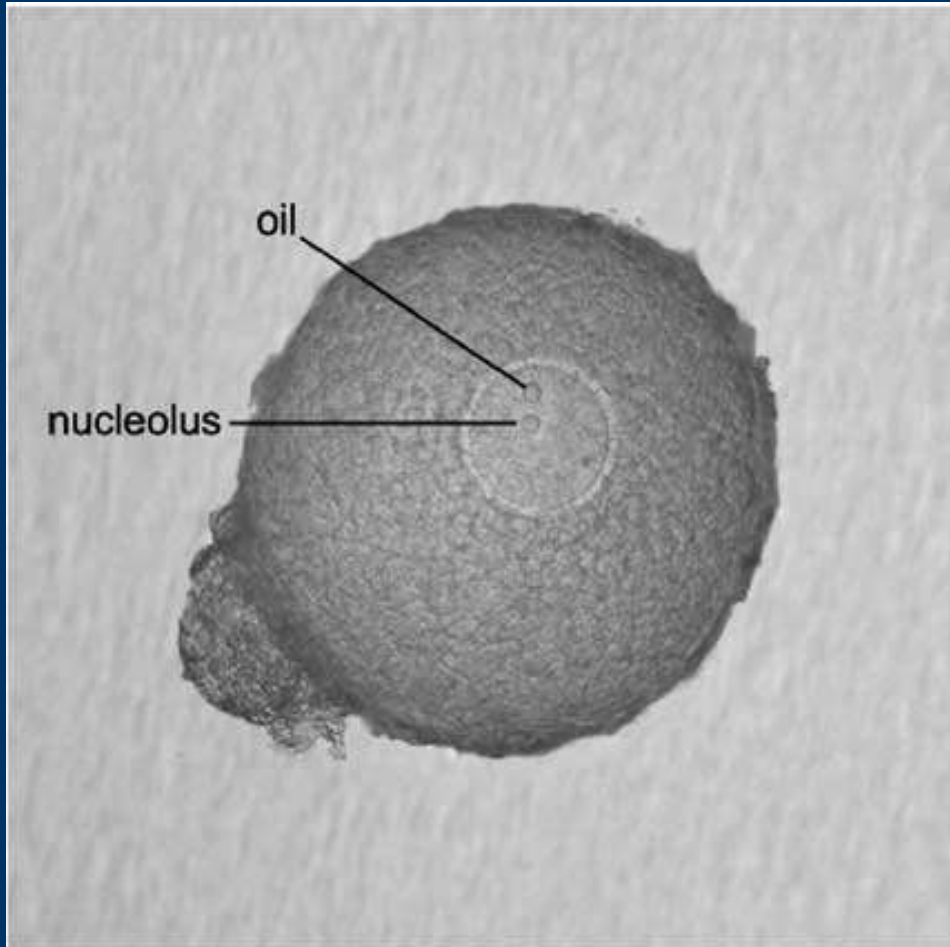
Metody

- Pęcherzyki i oocyty izolowane, z których część poddawano mikroinjekcji specyficznych siRNA, pozostałe – brak manipulacji
 - Hodowane na pożywce MEM, z dodatkiem hormonu FSH (wzrost pęcherzyków)
 - Oocyty wyizolowane dbcAMP – zapobiega spontanicznemu dojrzewaniu oocytów
 - Oocyty z komórkami pęcherzykowymi - ~72 h, oocyty wyizolowane ~26-45 h
-
-

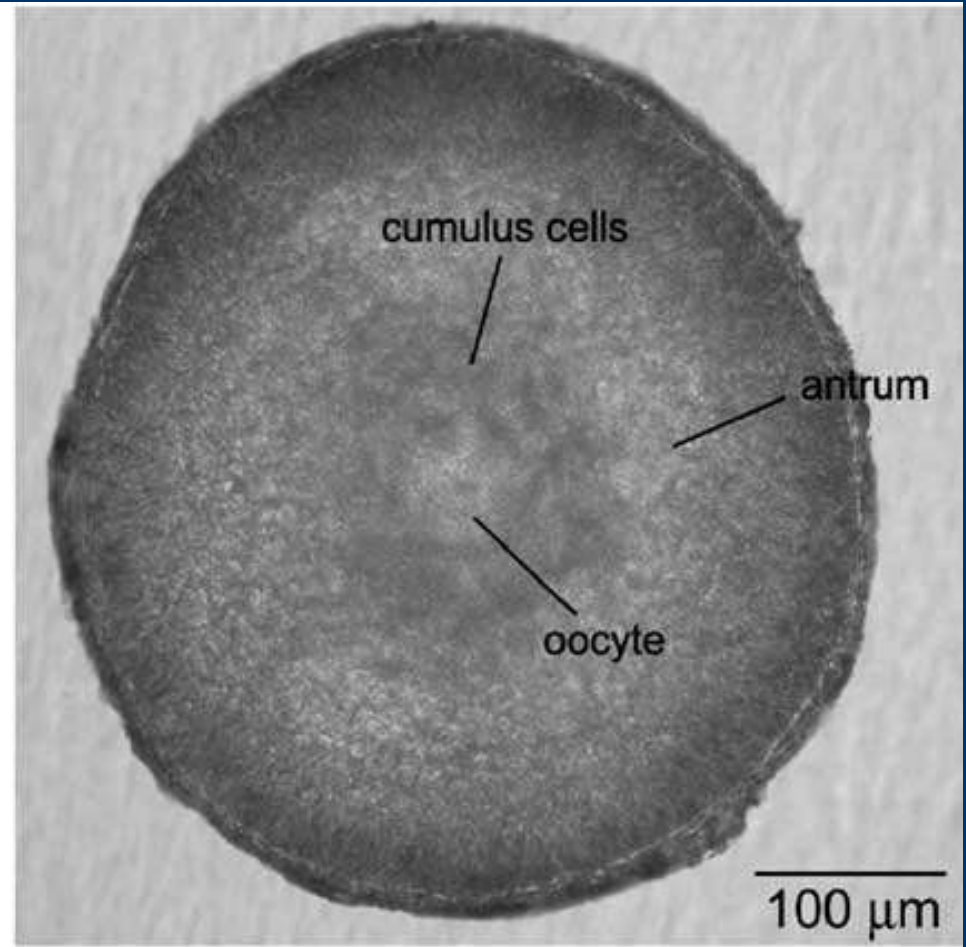
Oocyty

Cztery grupy oocytów:

- *Gpr3* siRNA
 - *mutGpr3* siRNA
 - GAPDH siRNA
 - oocyty bez wstrzykniętego siRNA
-
-



Day 0



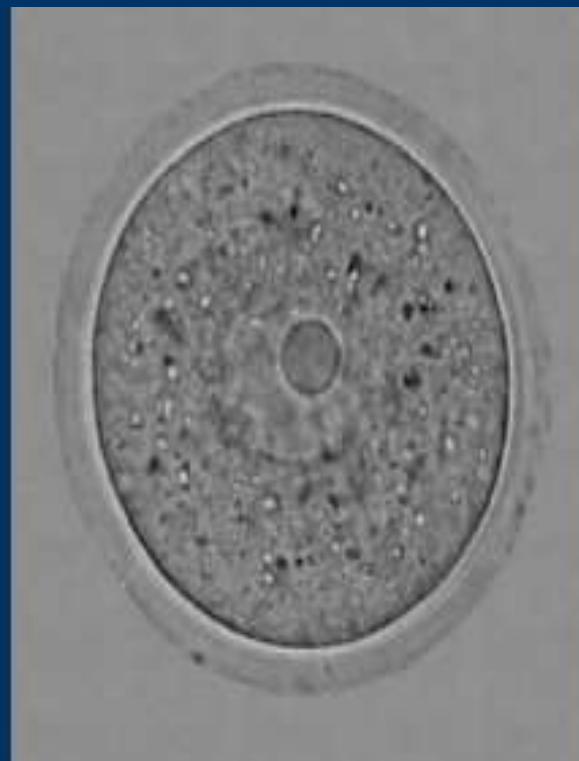
Day 3

Wyniki – oocyty otoczone komórkami pęcherzykowymi

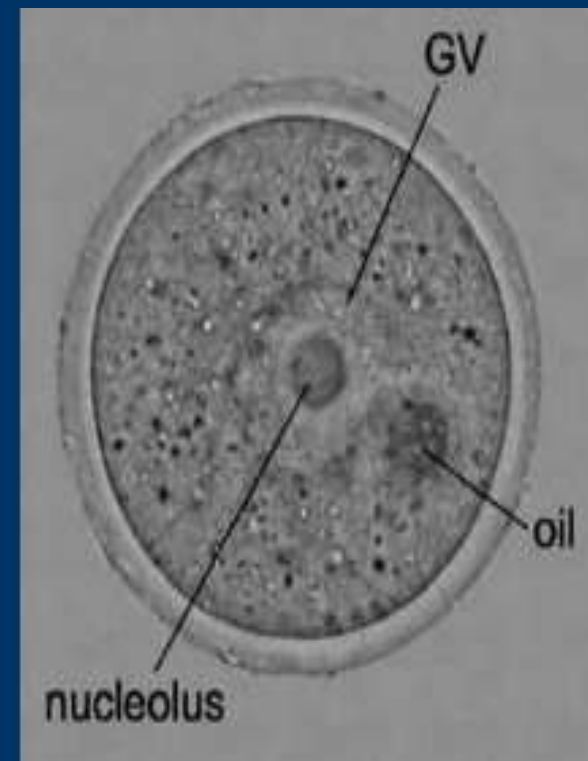
50 μ m



Gpr3 dsRNA

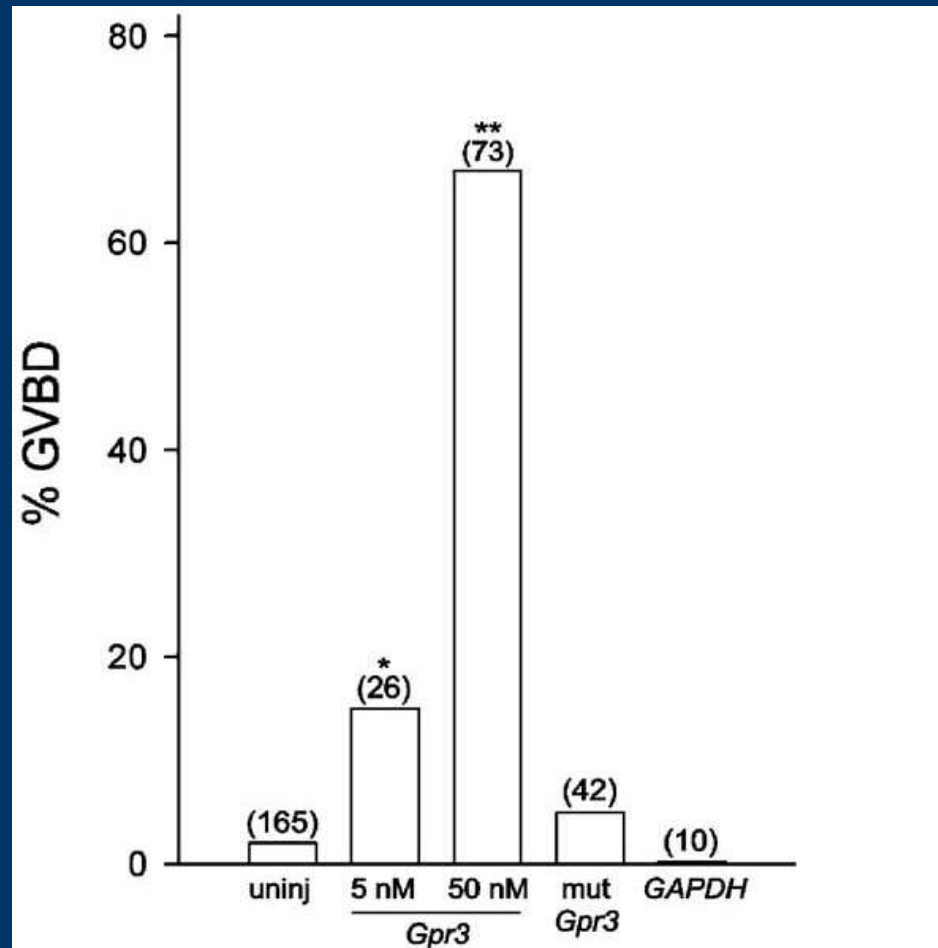


Uninjected



mut*Gpr3*dsRNA

Wyniki – dane liczbowe



Wyniki – oocyty wyizolowane

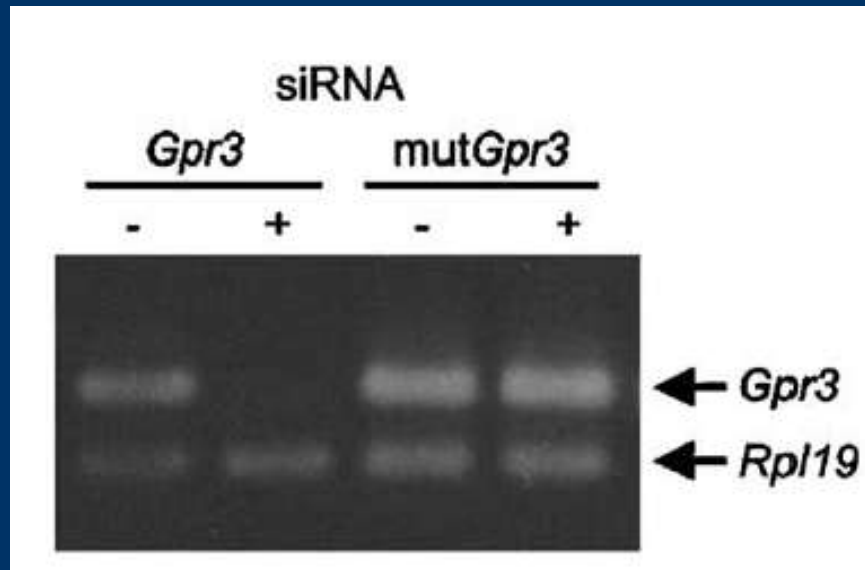
- Inkubacja tylko około 2 dni – oocyty przestają być zdolne do dojrzewania *in vitro*
- Tylko 16% oocytów kontynuowało mejozę

Specyficzna redukcja *Gpr3* mRNA

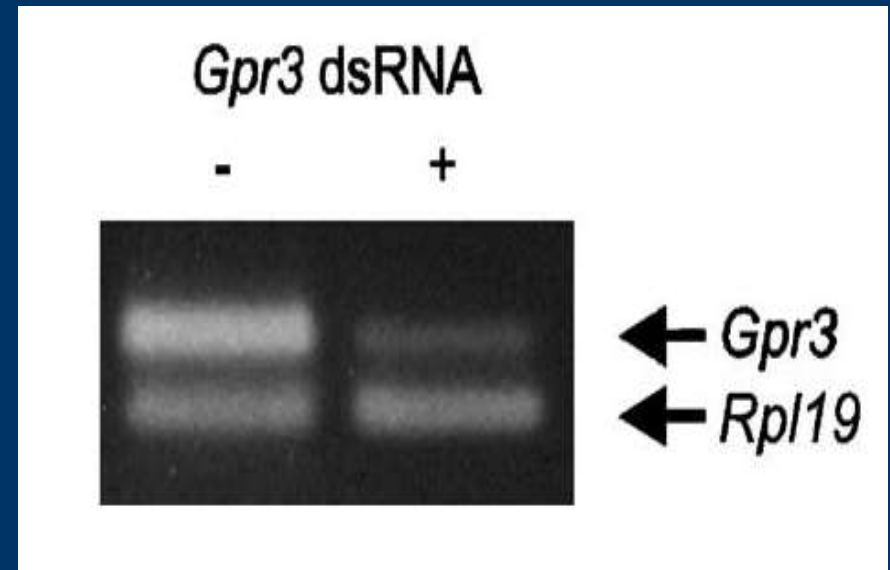
- Metoda PCR: kombinacja *Gpr3* i *Rpl19* (białko rybosomowe)
 - Ilość *Rpl19* mRNA bez zmian w oocytach po manipulacjach
 - *mutGpr3* siRNA – brak wpływu na ilość *Gpr3* mRNA
-
-

Redukcja *Gpr3*

- Oocyty z komórkami pęcherzykowymi



- Oocyty izolowane



Podsumowanie

- GPR3 w oocytach myszy głównie odpowiedzialne za blok podczas mejozy – ilość oocytów kontynuujących mejozę po mikroinjekcji dsRNA *Gpr3* zbliżona do efektu fenotypowego myszy pozbawionych genu
- Mniejsza skuteczność metody w przypadku oocytów izolowanych – krótszy czas inkubacji