

The exit of mouse oocytes from meiotic M-phase requires an intact spindle during intracellular calcium release

**Nicola J. Winston, Orla McGuinness, Martin H. Johnson and
Bernard Maro**

Opracowała Katarzyna Krawczak

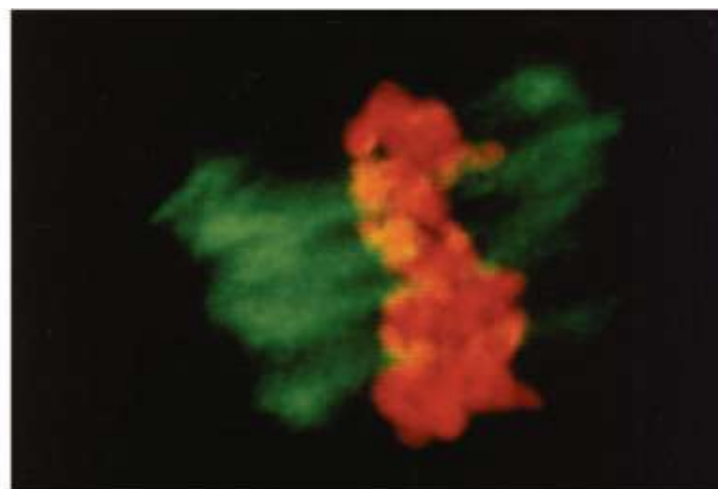
Co wiadomo?

- Owulowane oocyty są zatrzymane w metafazie II podziału mejotycznego do czasu zapłodnienia
- Zapłodnieniu towarzyszy początek oscylacji stężenia Ca^{2+} w cytoplazmie
- Degradacji ulega cyklina B, a w następstwie spada aktywność MPF

Nokodazol

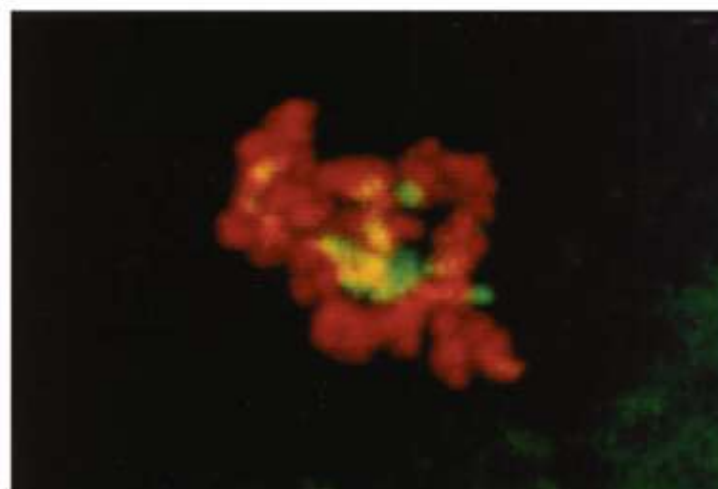
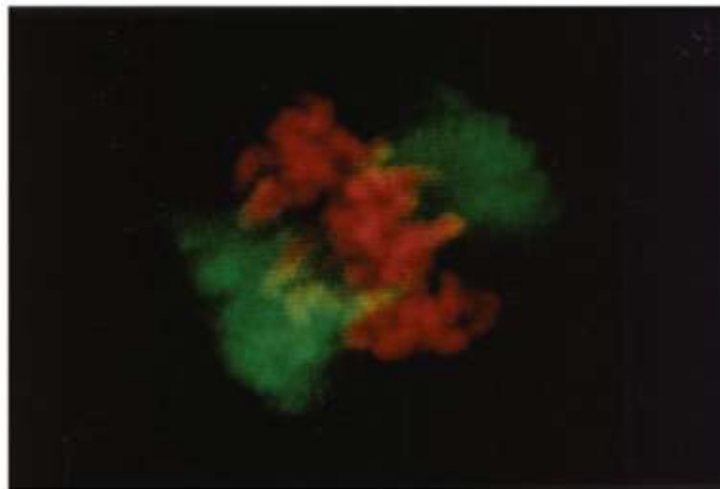
- Blokuje polimeryzację mikrotubuli
- Oocyty przechowywane w nokodazolu nie wchodzi w interfazę
- Zanika wrzeciono podziałowe
- Podczas inkubacji z nokodazolem chromosomy przesuwają się pod błonę; po jego usunięciu powstaje kilka mniejszych wrzecion podziałowych

kontrola



1 min

3 min



6 min

Materiały i metody:

- Barwienie immunocytochemiczne
- Badanie aktywności kinazy histonu H1
- Badanie poziomu stężenia wapnia wewnątrzkomórkowego metodą fura-2



zapłodnione w obecności
nokodazolu

aktywowane

etanołem

jonoforem

przeniesienie do pożywki
bez jonów wapnia

pozostawione

przeniesione do
pożywki z wapniem

przeniesienie do
pożywki z BAPTA

- 1) kontrola
- 2) aktywowane etanołem
- 3) aktywowane etanołem w obecności nokodazolu
- 4) stymulowane przez 15 min nokodazolem, następnie aktywowane etanołem w obecności nokodazolu
- 5) stymulowane przez 30 min nokodazolem, następnie aktywowane etanołem w obecności nokodazolu
- 6) stymulowane przez 60 min nokodazolem, następnie aktywowane etanołem w obecności nokodazolu



Wyniki

Aktywność kinazy histonu H1

Spindle requirement during oocyte activation

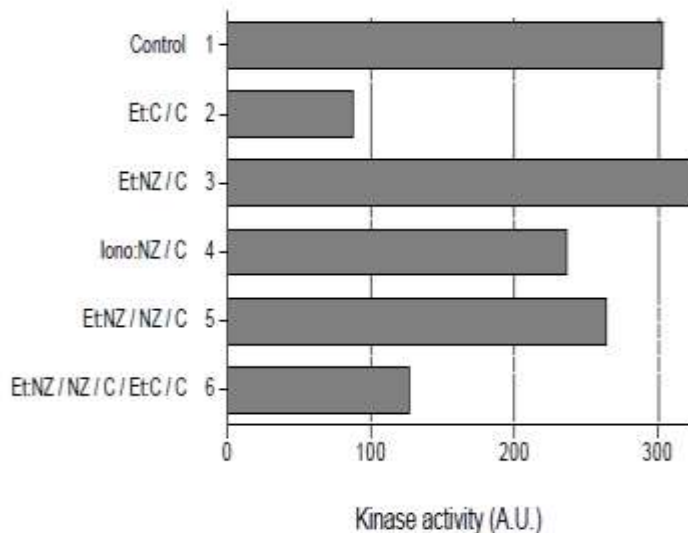


Fig. 3. Values for the activity of the histone H1 kinase in control unactivated oocytes (1), oocytes activated in ethanol (2), oocytes exposed to an ethanol (3 and 5) or ionophore (4) activation stimulus in the presence of nocodazole, and oocytes exposed first to ethanol in the presence and then in the absence of nocodazole (6). All oocytes cultured in medium M2 + BSA + nocodazole for 1 hour and then: control, collected immediately; Et:C, ethanol in M2 + BSA (6 minutes); /, followed by: C, M2 + BSA alone (1 hour); Et:NZ, ethanol in M2 + BSA + nocodazole (6 minutes); Iono:NZ, calcium ionophore A23187 in M2 + BSA + nocodazole (5 minutes); NZ, M2 + BSA + nocodazole (1 hour). A.U., arbitrary units.

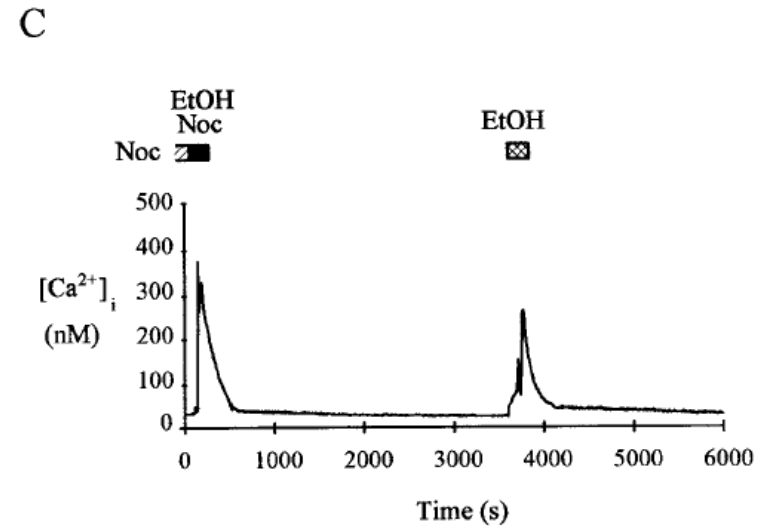
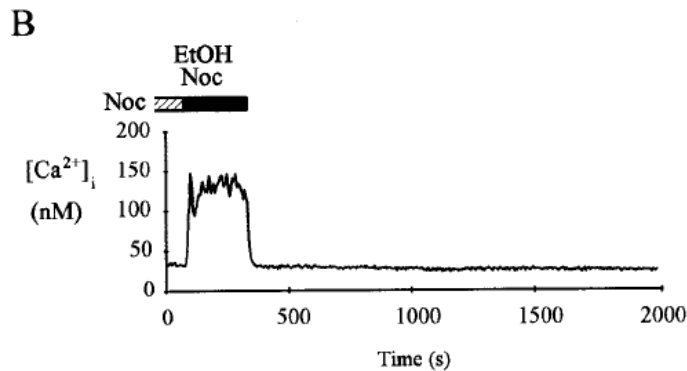
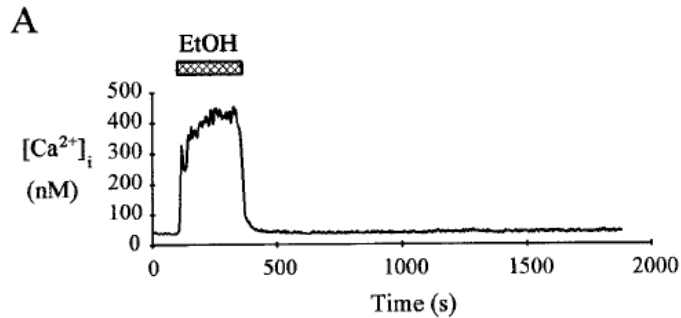
- Wysoka w nieaktywowanych oocytach
- Spada gwałtownie po aktywacji
- Oocyty po inkubacji z nokodazolem nie wykazują spadku aktywności
- Po godzinnej inkubacji w zwykłej pożywce, i po kolejnej aktywacji etanolem, aktywność kinazy spada

Aktywacja a nokodazol

Activation medium (6 min)	Nocodazole pre-treatment (min)	Incidence of activation (%)
(i) Control	0	0/193 (0)
(ii) Ethanol only	0	141/184 (71)
(iii) Ethanol and nocodazole	0	60/175 (36)
(iv) Ethanol and nocodazole	15	0/49 (0)
(v) Ethanol and nocodazole	30	0/66 (0)
(vi) Ethanol and nocodazole	60	0/65 (0)

- Żaden z oocytów inkubowanych z nokodazolem przed ekspozycją na etanol nie został aktywowany!
- Wykazano wyższy odsetek aktywacji oocytów aktywowanych etanolem niż etanolem z dodatkiem nokodazolu.

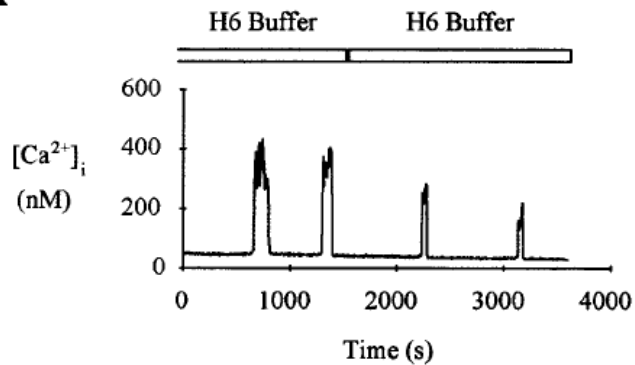
Zmiany stężenia wewnątrzkomórkowego wapnia



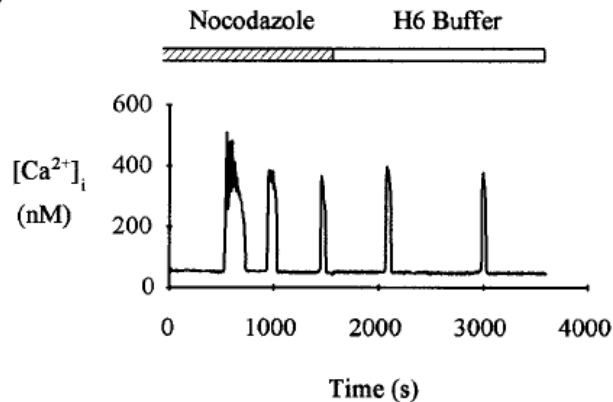
W oocytach poddanych ponownej aktywacji etanolem zaobserwowano kolejne uwolnienie wapnia oraz wyrzucenie II ciała kierunkowego.

Oocyty zapłodnione w obecności nokodazolu:

A

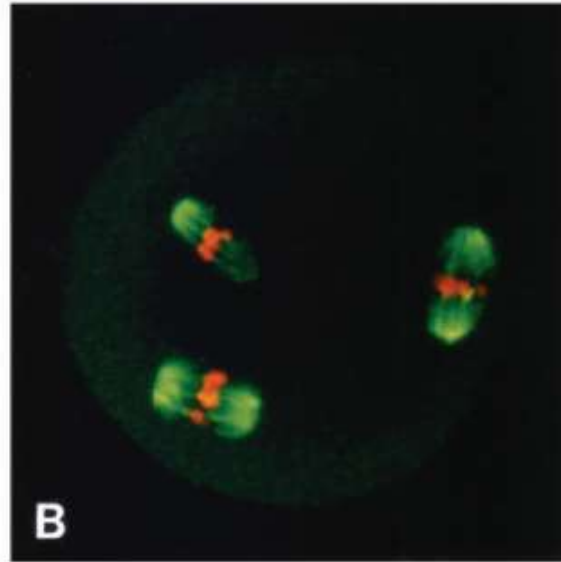
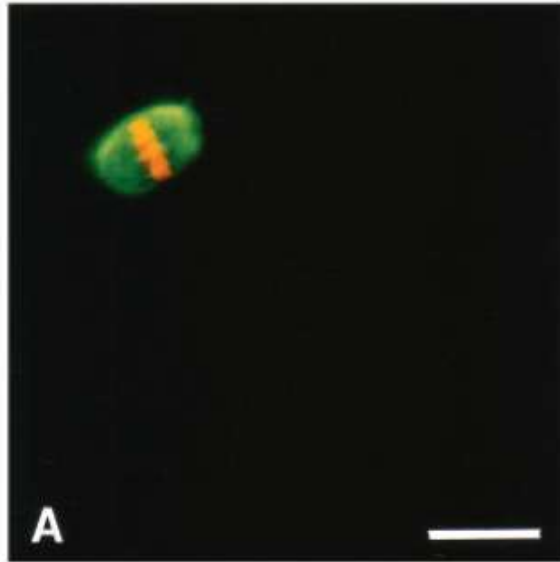


B



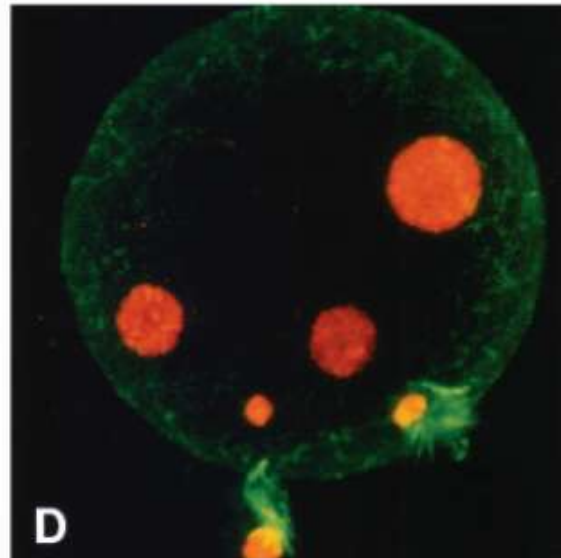
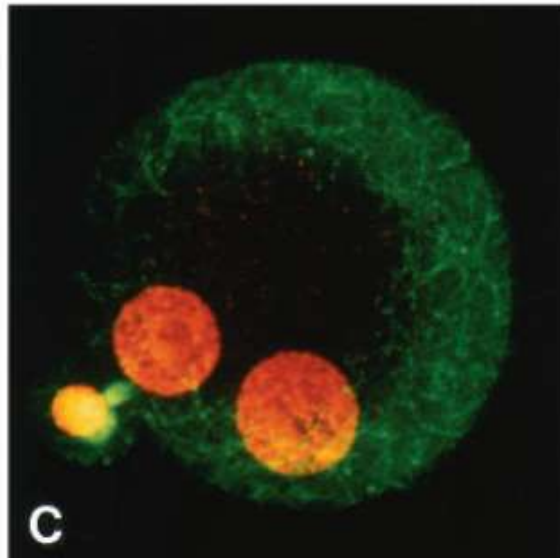
- Oocyty zostały zapłodnione, ale pozostały w metafazie II do czasu przeniesienia do pożywki bez nokodazolu
- Wrzecziono odtwarzane w ciągu godziny
- Wyrzucane są liczne ciała kierunkowe i powstaje kilka przedjądrzy
- Stężenie wapnia oscyluje w podobny sposób zarówno w kontroli jak i w obecności nokodazolu

Oocyt
niezapłodniony



Oocyt
niezapłodniony
inkubowany z
nokodazolem

Oocyt
zapłodniony



Oocyt
zapłodniony
inkubowany z
nokodazolem

Co z tym wapniem?

Treatment group	Incidence of activation (%)	Mean \pm s.d.
Control	185/447 (41)	44.6 \pm 16.5
Nocodazole, then control	105/429 (24)	25.0 \pm 7.6
Nocodazole, then BAPTA-AM	2/249 (1)	0.9 \pm 1.0
Nocodazole, then Ca (-)*	12/226 (5)	5.4 \pm 2.7
Nocodazole, then Ca (-)* then Ca (+)†	63/217 (29)	31.2 \pm 10.6

*Ca (-), calcium-free medium.
†Ca (+), calcium-containing medium.

- W oocytach przeniesionych do BAPTA nie zaobserwowano zmian poziomu wapnia.
- Wykazano, że obecność wapnia jest niezbędna do przejścia w interfazę.

Podsumowanie:

- **Oocyty zapłodnione w nokodazolu, nie mają prawidłowego wrzeciona podziałowego i nie wychodzą z metafazy II**
- W oocytach zapłodnionych cały czas po przeniesieniu trwają zmiany stężenia wapnia, w przeciwieństwie do oocytów aktywowanych etanolem gdzie pojawia się pojedynczy wyrzut Ca^{2+}
- Usunięcie z nokodazolu powoduje wznowienia cyklu mejozytycznego w oocytach zapłodnionych
- **Przy braku wapnia, mimo usunięcia nokodazolu i odnowieniu wrzeciona podziałowego, oocyty nie podjęły przejścia do interfazy**
- Po przeniesieniu do pożywki z wapniem zapłodnione oocyty kontynuują dojrzewanie i przechodzą do interfazy.

Wyjaśnienie:

- Do wyjścia z metafazy wymagana jest degradacja cykliny B i dezaktywacja MPF
- Mechanizmu degradacji cykliny B zachodzi tylko podczas podwyższonego stężenia wapnia
- Degradacja cykliny B wymaga obecności prawidłowego wrzeciona



Dziękuję za uwagę.