

Wpływ Mos na rozmiar i degradację I ciała kierunkowego.

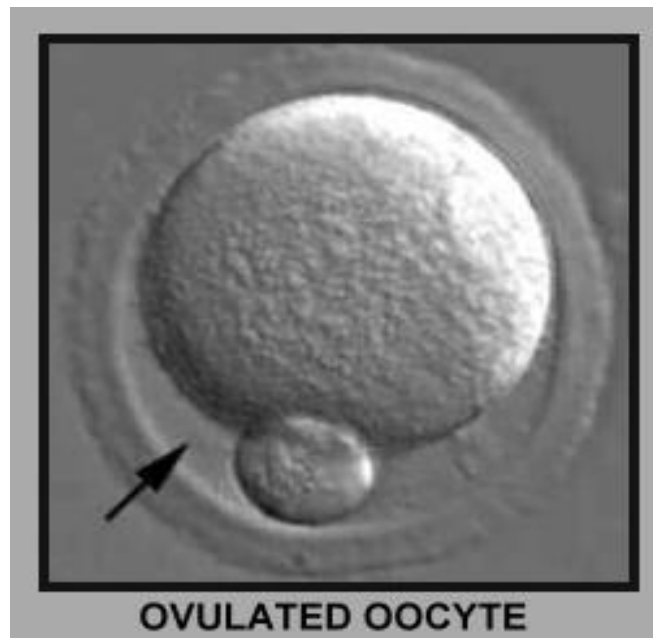
The Mos/mitogen-activated protein kinase (MAPK)
pathway
regulates the size and degradation of the first polar
body in
maturing mouse oocytes.

Wstępne informacje o Mos:

- Protoonkogen kinazy serynowo-treoninowej, aktywuje kinazę MAP poprzez bezpośrednią fosforylację.
- U *Xenopus* składnik CSF.
- Wysoka ekspresja *mos* w oocytach podlegających dojrzewaniu.
- Kieruje apoptozą komórek somatycznych.

Co nowego o Mos?

- Naukowcy potwierdzili doświadczalnie, że Mos ma wpływ na degradację I c.k., czas trwania oraz na jego rozmiar.



Materiały i metody: Populacja mysich samic z nokautem *mos* (Mos -/-)

- Wektor z markerem selekcyjnym- oporność na neomycynę- wstawiony do fragmentu DNA kodującego Mos.
- Kasetka kinazy tymidynowej wprowadzona na zewn. sekwencji genomowej jako marker selekcji negatywnej.
- Wprowadzenie konstruktów do komórek zarodkowych drogą elektroporacji.
- Southern blot.

Hodowla oocytów:

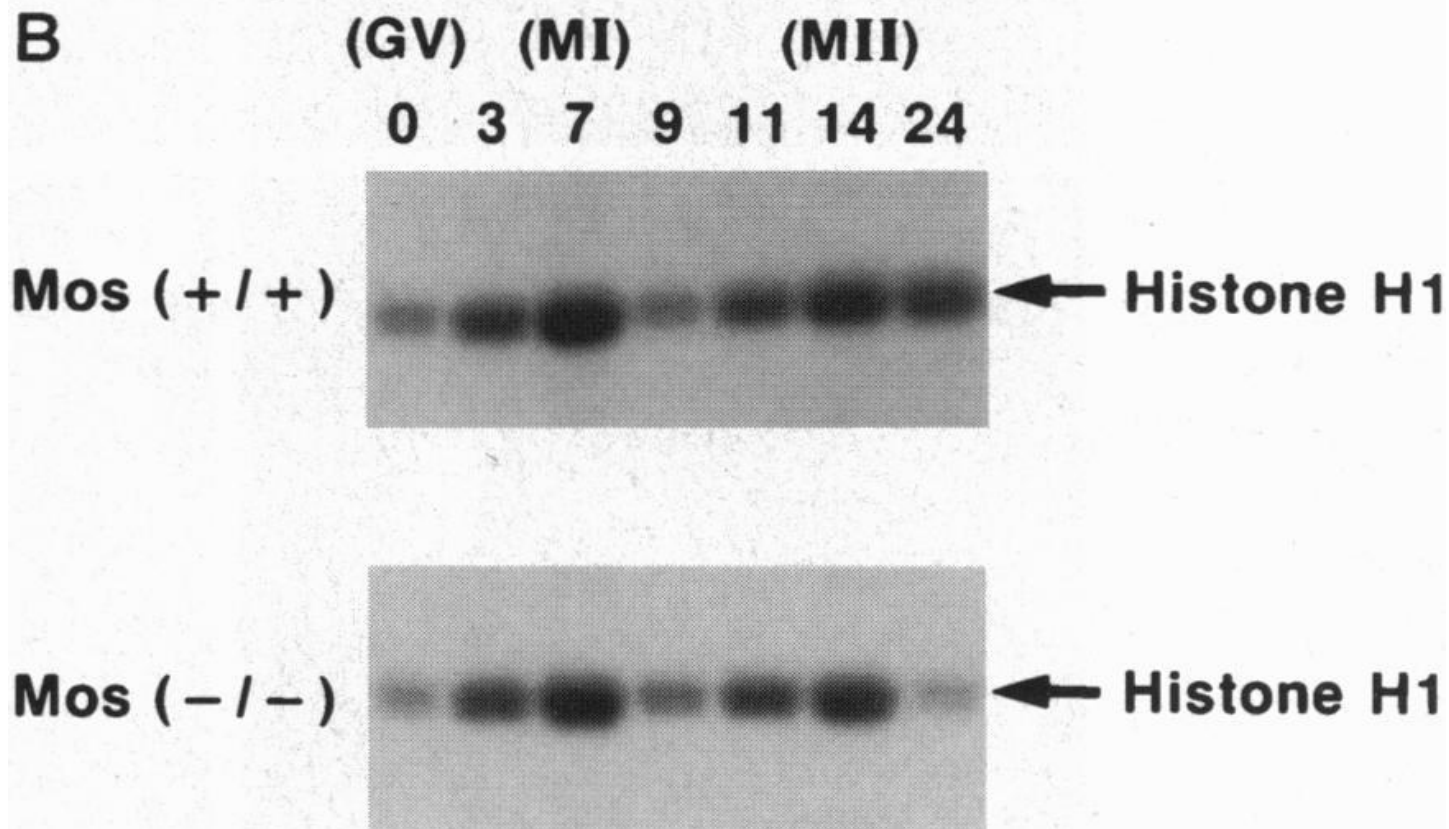
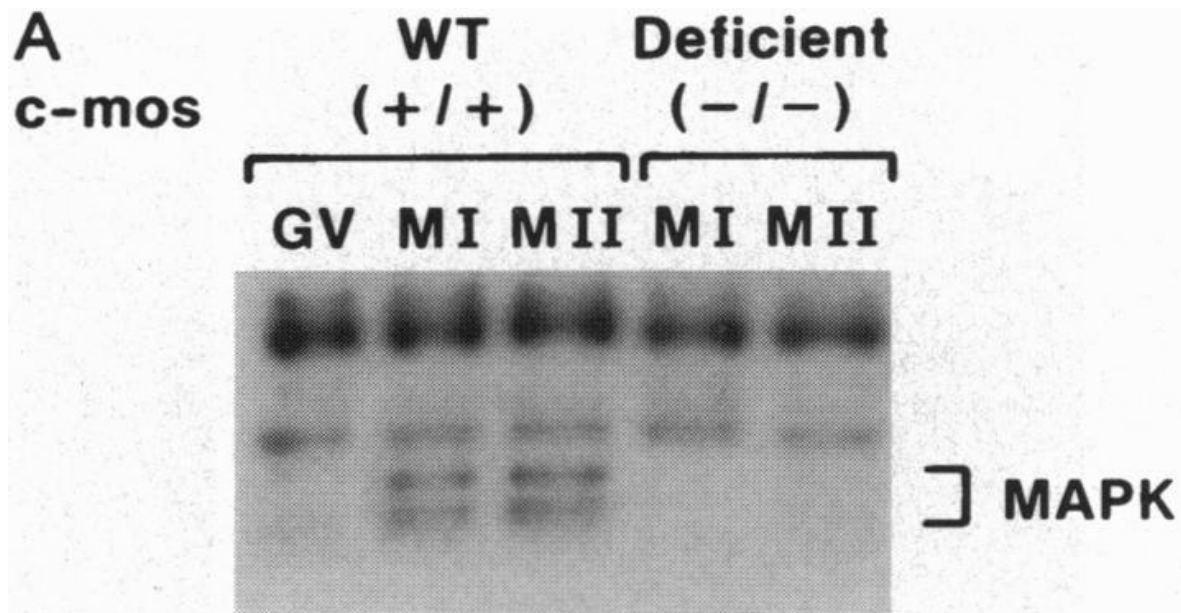
- Podanie 5 jednostek gonadotropiny surowicy ciężarnej klaczy 3-4 tyg. samicom
- Izolacja oocytow po 45-48h
- Hodowla w medium Whitten'sa (0,4 % BSA, wilgotne warunki)
- Wzbogacenie hodowli o 0.1mM IBMX (hamowanie dojrzewania mejotycznego)
- Oczyszczenie i dalsza hodowla.

Immunofluorescencja

- Kwasowy r-r Tyroda
- 1,8 % paraformaldehyd w PBS (40 min.)
- Permabilizacja 1% Triton X-100 w PBS (10 min.)
- Oczyszczanie 0.1 % Tween 20 w PBS (20 min.)
- Inkubacja w PBS z 3% BSA, 10% kozim serum, 0.1% Tween 20 (1h 37st.)
- Inkubacja z przeciwciałami typu I i II
- Doobarwianie DAPI
- Obserwacja w mikroskopie konfokalnym Zeiss

REZULTATY:

- U mutantów brak aktywności MAPK, a zatem aktywacja MAPK podczas dojrzewania oocytów **zależy od obecności Mos.**
- Zaobserwowano różnice w stadium 24h między mutantem a typem dzikim w aktywności kinazy p34 mierząc H1.
- Obszerne zmiany w wyglądzie pierwszego ciała kierunkowego, czasie jego trwania.



Mos, a I ciałko kierunkowe.

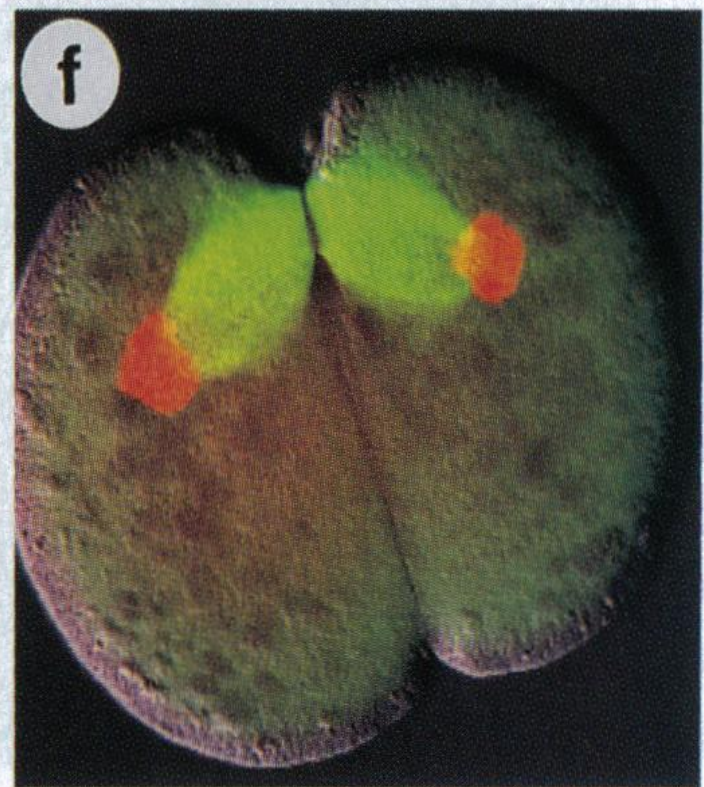
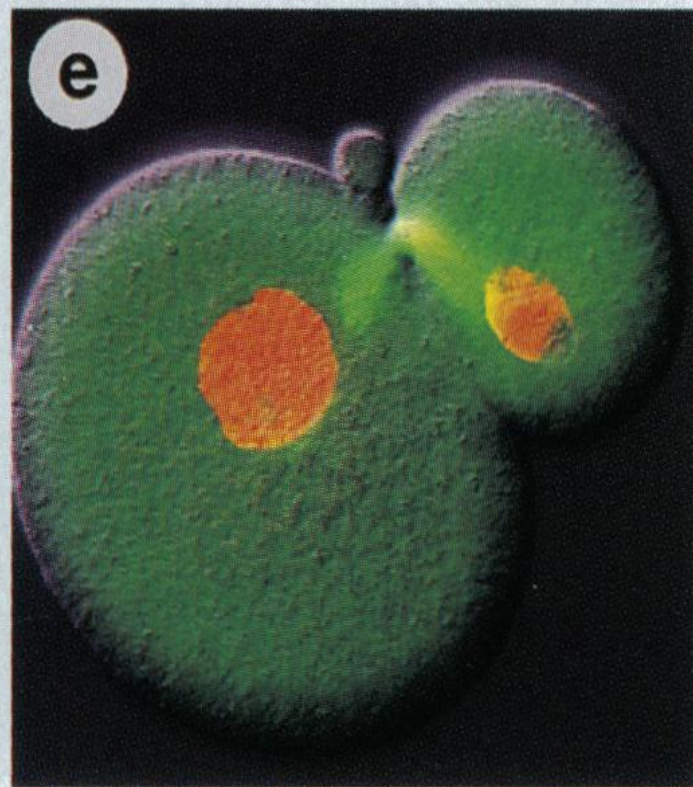
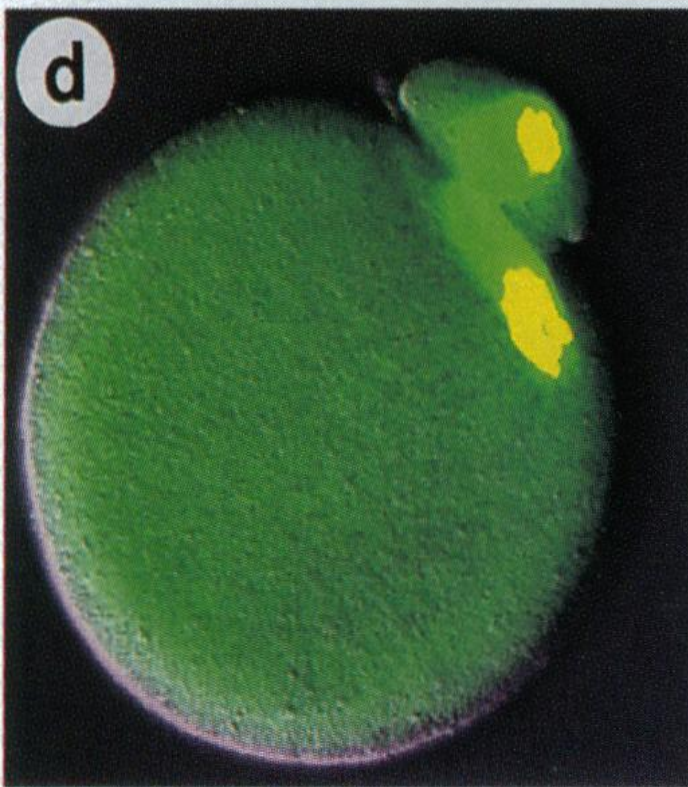
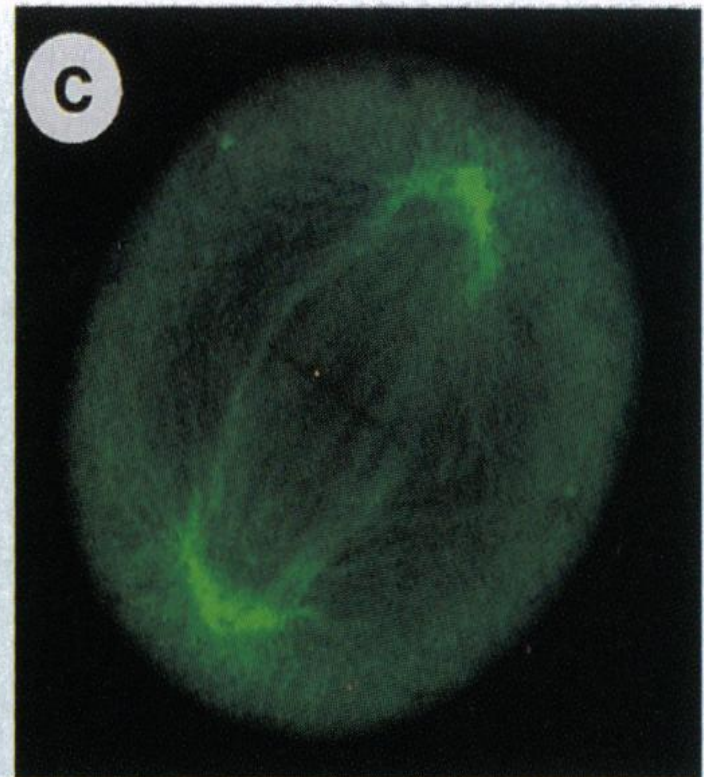
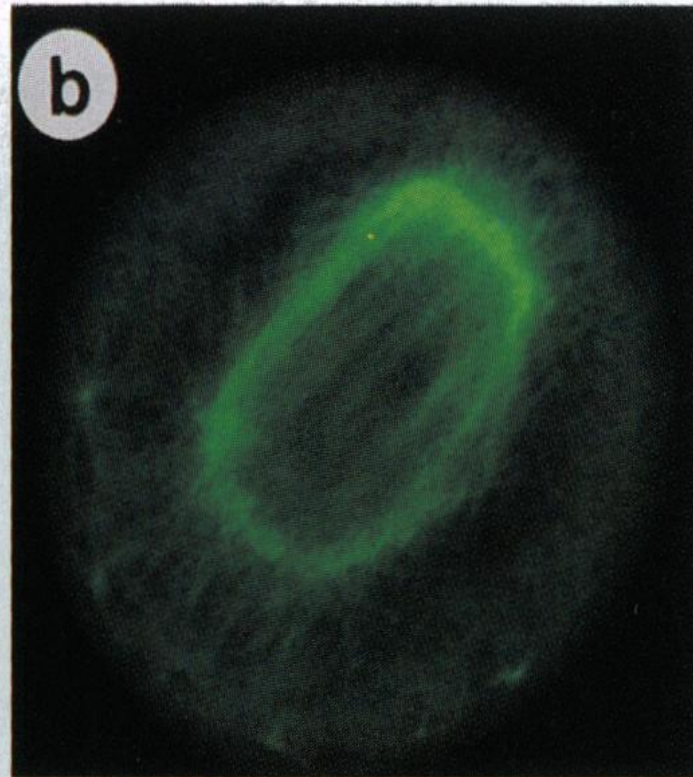
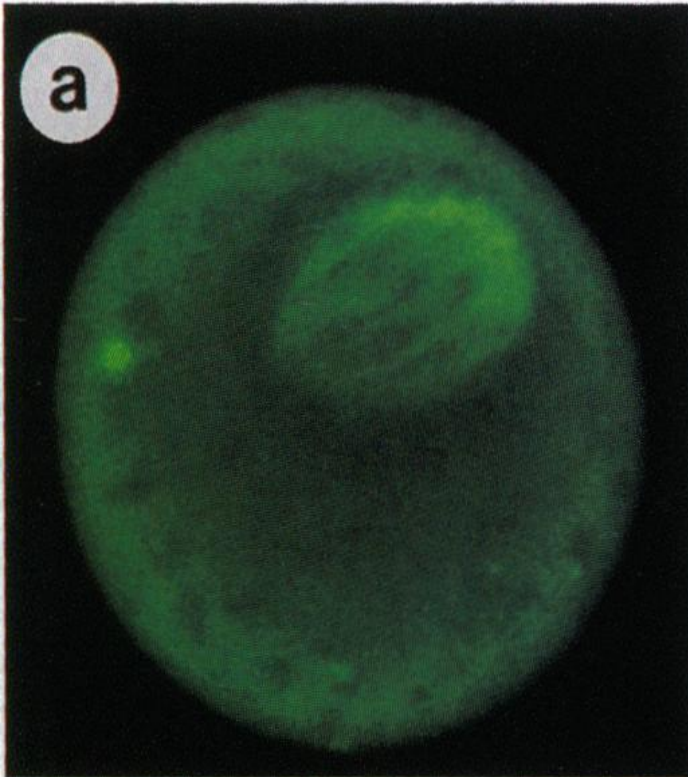
- deformacja I c.k.
- I c.k. ulega dodatkowym podziałom
- pod koniec metafazy I 20-30 % oocytów ma nienormalnie wydłużone ciałko kierunkowe
 - związek z defektem wrzeciona podziałowego, które nie przesuwa się do powierzchni komórki
- podatność na dzieworództwo
- komórki z dwoma jądrami
- długo utrzymujące się I c.k.
- zapłodnienie dwujadrazastego oocytu u ludzi prawdopodobnie przyczyną mozaikowości łożyska.

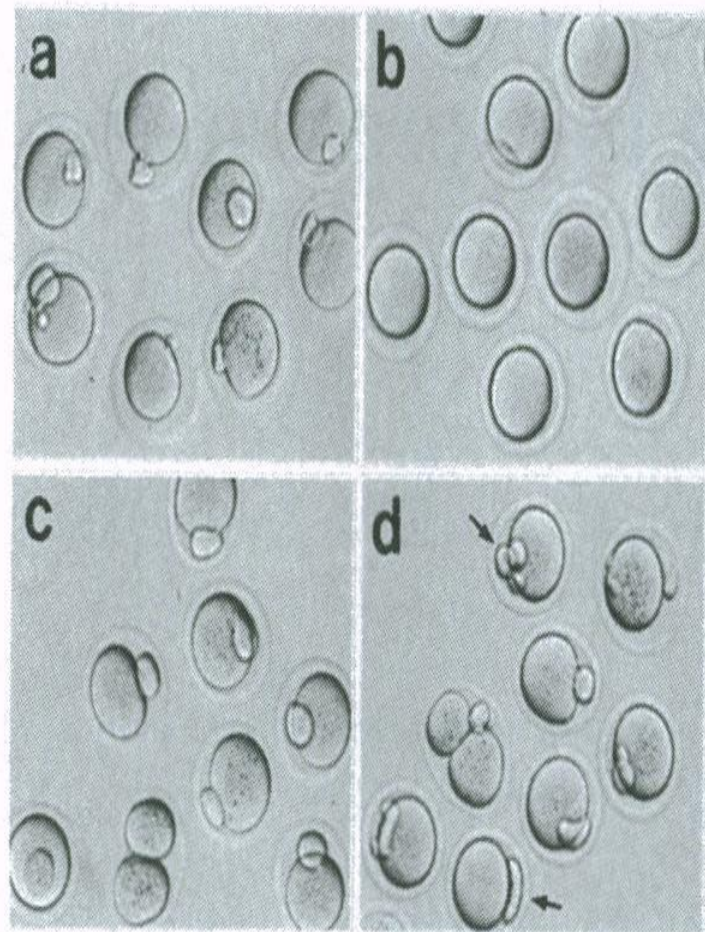
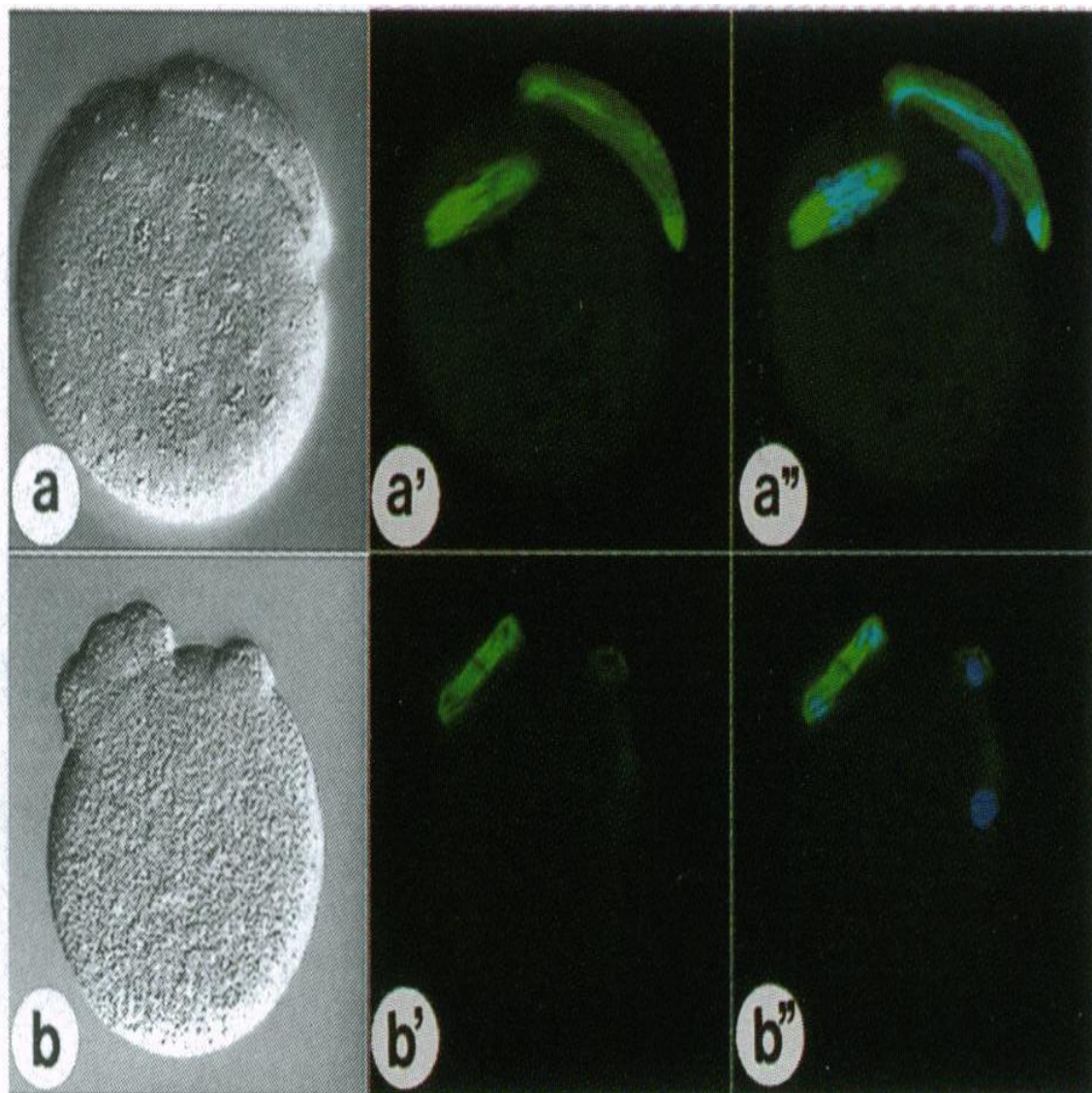
Table 1. Abnormal first polar body formation in $MOS^{-/-}$ oocytes

	Total number of oocytes examined	Number of oocytes that extruded first polar body	Polar body phenotypes		
			Normal polar body	Large polar body	Symmetrical division
$MOS^{+/+}$, $MOS^{+/-}$	163	146/163 (90%)	146/146 (100%)	0	0
$MOS^{-/-}$	187	161/187 (86%)	126/161 (78%)*	21/161 (13%)	14/161 (9%)

Table 2. Comparison of kinetics of the first polar body degeneration in $MOS^{+/+}$, $MOS^{+/-}$, and $MOS^{-/-}$ oocytes

	No. oocytes that retained first polar body/no. total oocytes examined (%)			
	0 hr	3 hr	7 hr	11 hr
$MOS^{+/+}$, $MOS^{+/-}$	75/75 (100%)	70/75 (93%)	9/75 (12%)	0/75 (0%)
$MOS^{-/-}$	68/68 (100%)	68/68 (100%)	61/68* (90%)	61/68 ^c (90%)



A**B**

Bibliografia:

Proc. Natl. Acad. Sci. USA
Vol. 93, pp. 7032–7035, July 1996
Cell Biology

The Mos/mitogen-activated protein kinase (MAPK) pathway regulates the size and degradation of the first polar body in maturing mouse oocytes

TAESAENG CHOI*§, KENJI FUKASAWA*, RENPING ZHOU†, LINO TESSAROLLO*, KRISTINA BORROR*, JAMES RESAU*, AND GEORGE F. VANDE WOUDE*‡

*ABL–Basic Research Program, National Cancer Institute–Frederick Cancer Research and Development Center, P.O. Box B, Frederick, MD 21702; and

†Laboratory for Cancer Research, Department of Chemical Biology, College of Pharmacy–Frelinghuysen Road, Rutgers University, Piscataway, NJ 08855

Contributed by George F. Vande Woude, March 13, 1996