

**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^t, LINO TESSAROLLO*, KRISTINA BORROR*, JAMES
RESAU*,
AND GEORGE F. VANDE WOUDE*^t

Protoonkogen *c-mos* oraz białko Mos

- Jeden z najważniejszych genów regulującym podziały mejotyczne u ssaków
- Produkt genu decyduje o przeżyciu komórki lub jej wejściu na szlak apoptozy
- Zarówno w przypadku oocytów, jak i komórek somatycznych produkt genu *c-mos*, kinaza proteinowa Mos, aktywuje aktywowaną mitogenem kinazę białkową MAPK
- Podczas dojrzewania oocytów szlak Mos/MAPK działa poprzez aktywację i stabilizację czynnika inicjującego dojrzewanie MPF
- W komórkach somatycznych ulegających transformacji nowotworowej aktywuje i stabilizuje onkoproteinę jądrową c-Fos.

Protoonkogen *c-mos* oraz białko Mos w oocytach *Xenopus*

- inicjatorem mejozy
- zaangażowany w aktywację i stabilizację MPF
- aktywuje MAPK
- aktywny składnik kompleksu CSF
- udowodniono również wzajemną zależność między szlakiem Mos/MAPK a MPF

Funkcje Mos u myszy:

- Homozygty z niedoborem mos ($MOS^{-/-}$) nie są zdolne do zatrzymania w metafazie II i ulegają aktywacji partenogenetycznej
- Za-uważono zmniejszoną płodność oraz wysoki odsetek występowania potworniaków jajnika

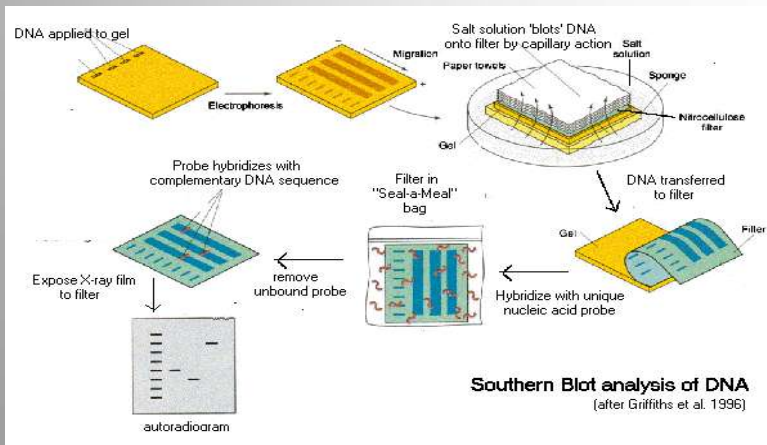


DOŚWIADCZENIE



MATERIAŁY I METODY

1. Populacja myszy z knockout'em genu *mos*
2. Zselekcjonowanie oocytów w GV
3. Hodowla
4. Sprawdzenie aktywności MAPK i histonu H1
5. Barwienie DAPI



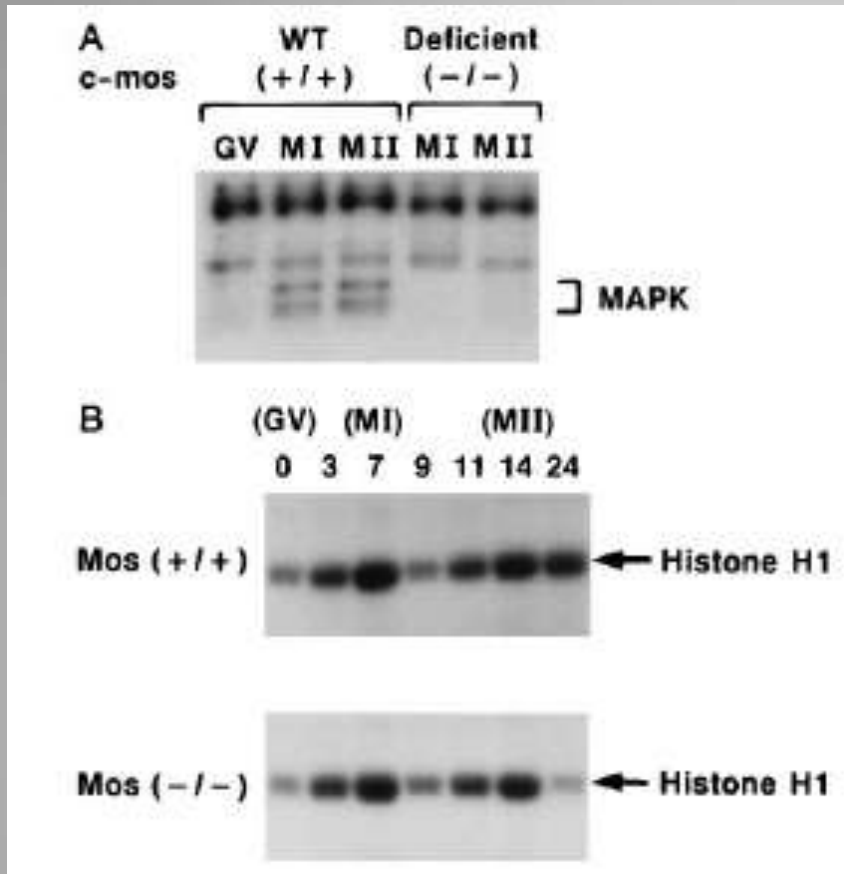
MATERIAŁY I METODY

1. 0,4% BSA ; 38,5 ° C ; 5% CO₂
2. IBMX
3. Przemycanie z IBMX
4. Zdjęcie osłonki przejrzystej z użyciem kwaśnego roztworu Tyrode
5. 1,8% paraformaldehydem w PBS, 40 min.
6. 1% Triton X-100 w PBS, 20 min.
7. Przemycanie 0,1% Tween 20 w PBS, 20 min.
8. Inkubacja z PBS zawierającym 3% BSA, 10% surowicy kóz, i 0,1% Tween 20 (blokowanie roztworu), 1h, 37 ° C.
9. Inkubacja z przeciwciałami, po 1h, 37 ° C
10. DAPI
11. Aktywność histonu H1 oraz kinazy MAPK.

WYNIKI

Czy MAPK jest aktywowany w nokautach Mos -/- ?

- badanie z mieliną jako substratem pokazało, że aktywacja MAPK podczas dojrzewania oocytów myszy zależy wyłącznie od obecności Mos
- badanie aktywności kinazy p34cd2 poprzez pomiar H1 wskazuje na jej spadek po 24h od wznowienia mejozy
- aktywacja MPF i regulacja wydają się być niezależne od Mos i / lub MAPK i MPF nie aktywuje ścieżki MAPK



MAPK i histon H1 w MOS^{-/-}

(A) aktywność MAPK mierzono przy zasadowym białku mielinie jako substrat. 20 oocytów wybrano na 0 h (GV), 7 godzin (MI), i 14 godzin (MII) po wznowieniu meiotycznego dojrzewania. W MOS + / + oocytów, wysoka aktywność MAPK została wykryta w zarówno MI i MII. Natomiast aktywność MAPK nie wykryta w fazie MI lub MII u MOS^{-/-}

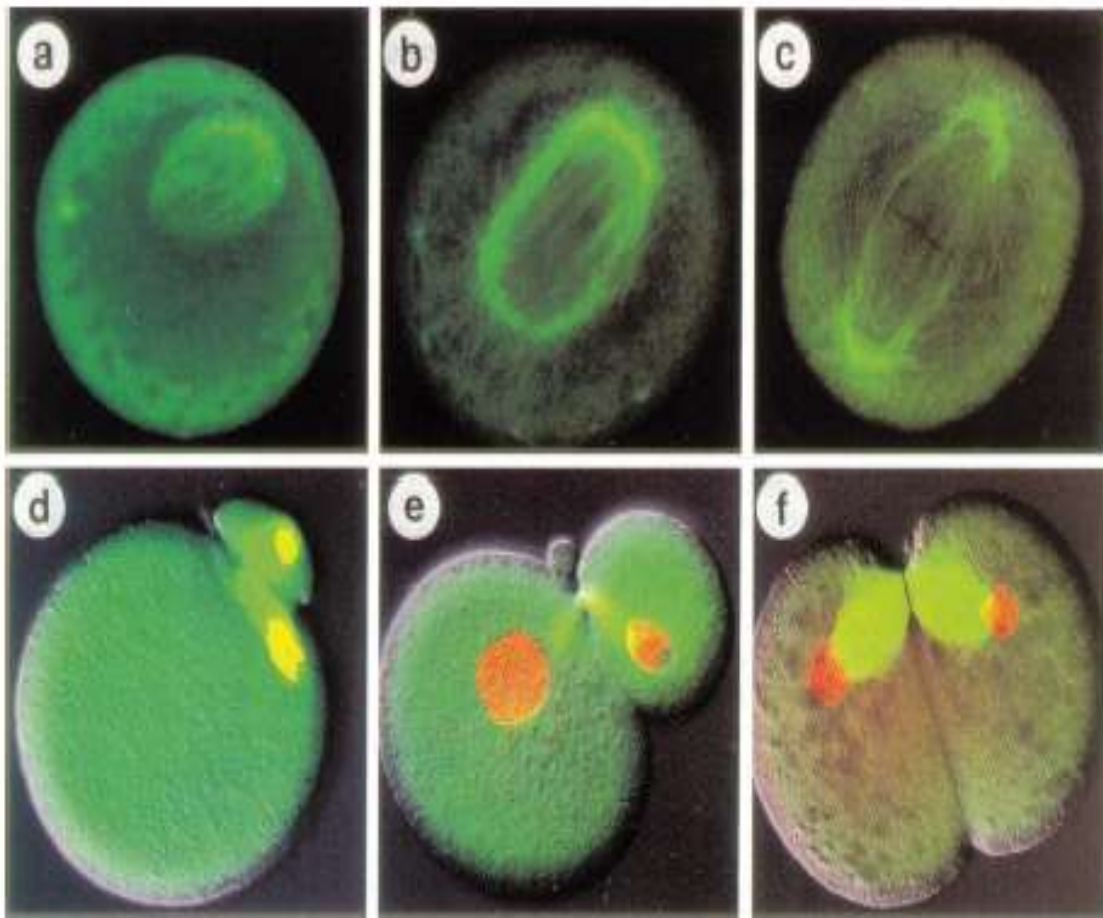
(B) histon H1. Dziesięć oocytów wybranych w każdym wskazanym punkcie czasu meiotycznego dojrzewania. nie były oczywiste różnice w kinetyce lub poziomie histonów Aktywacji kinazy H1 pomiędzy MOS + / + i MOS^{-/-} oocytów, z wyjątkiem sytuacji z dramatycznym spadkiem MOS^{-/-} oocytów po MII (24 h).

WYNIKI c.d.

-20-30% MOS-/-

oocytów wyrzuca nienormalnie duże c.k.

-długotrwałe utrzymywanie się I c.k. ,
dodatkowe jego podziały,
prowadzące do partenogenezy



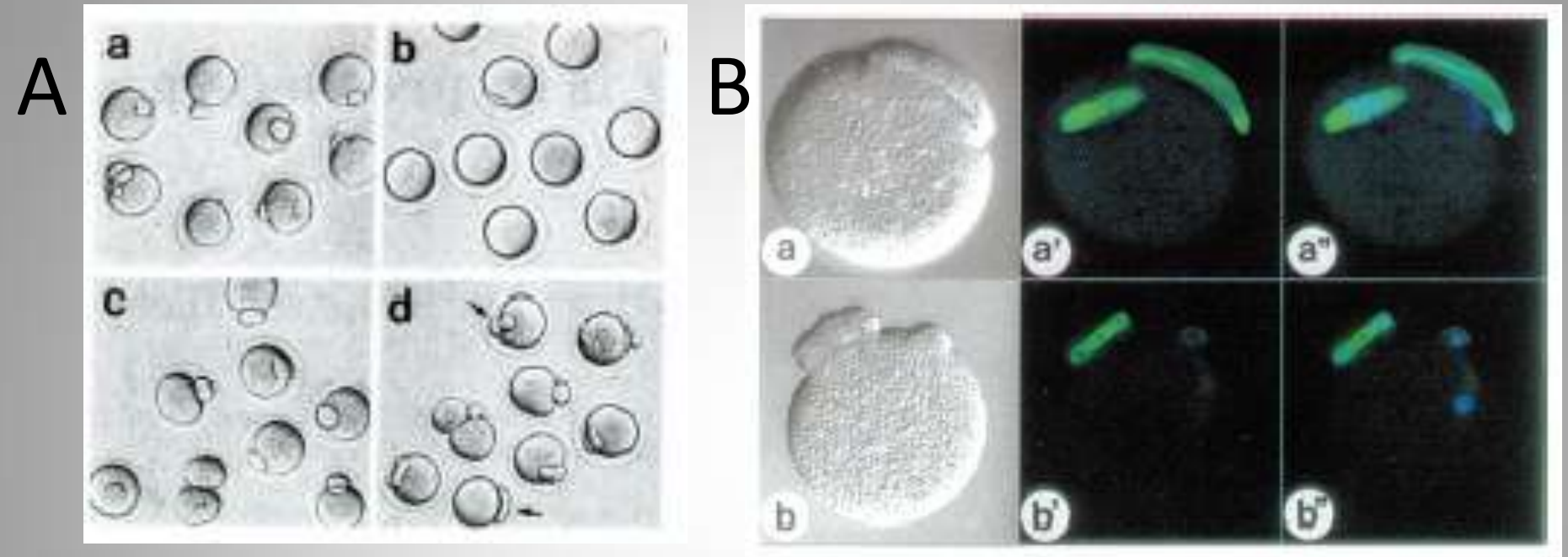
W kontroli MOS + / +
, jedno wrzeciono przy błonie
(a) i normalnej wielkości ciało (d).
Natomiast u MOS-/-
aparat wrzeciona obserwuje się
w centrum, a nie przy błonie (b,
c, e, f) :
duże ciała (b i e) i symetryczny podział
komórek
(c i f) są również pokazane.

Nieprawidłowe ustawienie aparatu wrzeciona i tworzenia I c.k. w MOS-/-
Oocyty zostały wybrane przed (na 8 godzin)
(ac) i po (9 godzin) (df) wyrzuceniem I c.k. barwiono anty-tubuliny YL ½ /
2 przeciwciała (zielony) i DAPI(czerwony).

Czas trwania I c.k.

	0	3	7	11
MOS +/- MOS+ / +	100 %	93%	12%	0%
MOS - / -	100 %	100 %	90%	90%

Trwałość I c.k. MOS-/-



(A) MOS + I + (część a) i MOS-/- (część c) ma I c.k.

8-9 godzin meiotycznego dojrzewania. Na 7 godzin po wyrzuceniu I c.k., większość MOS + I + ulegają degradacji (część b), podczas gdy MOS-/- (część d) pozostają nienaruszone, a także wydłużone i często poddawane dodatkowemu podziałowi (zaznaczone strzałkami).

(B) Dwa MOS-/- w 7 godzin po wyrzuceniu I c.k. barwiono anty-tubuliny (zielony)

i DAPI(niebieski). Części: A i B, Nomarski

obrazów; A 'i B', tubuliny; ''a''b'', tubuliny / DAPI.

Wnioski

- brak Mos / MAPK, u 20-30% oocytów powodem utraty zdolności do prawidłowego położenia aparatu wrzeciona kariokinetycznego
- Mos wpływa na reorganizacje mikrotubul
- ekspresja Mos / MAPK w komórkach somatycznych prowadzi do powstania dwujądrzastych komórek

Wnioski c.d.

- Mos / MAPK może powodować zaprogramowaną degenerację I c.k.
- Utrata Mos / MAPK i długoterminowa stabilność I c.k. w MOS-/- może stanowić alternatywę mechanizmu CPM (combined placental mosaicism)

Dziękuję za uwagę!



Paulina Swoboda