

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

N.J Winston

Prezentacja Michała Piątka

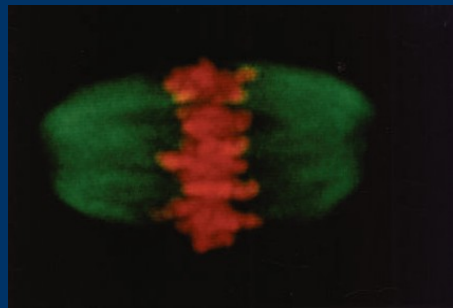


## *Wprowadzenie*

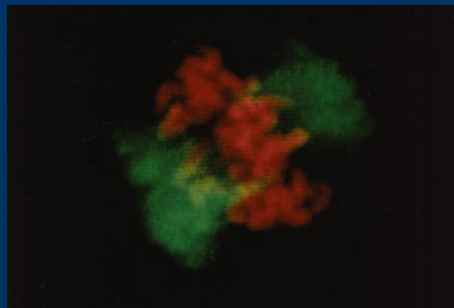
- Dojrzałe owulwoane oocyty są w bloku metafazy II podziału
  - Oocyty wychodzą z bloku gdy zostaną aktywowane przez zapłodnienie lub partenogenetycznie co wyzwala szereg przejściowych zmian stężenia jonów wapnia wewnątrz komórki
  - Inhibitor wrzecion NOCODAZOL powoduje depolaryzację mikrotubul.---> degeneracja wrzeciona
  - Cyklina B i enzym ją rozkładający znajdują się na wrzecionie
- 
-

# Wpływ nocodazolu na wrzeciona barwienie immunocytochemiczne (na zielono tubuliny na czerwono chromosomy)

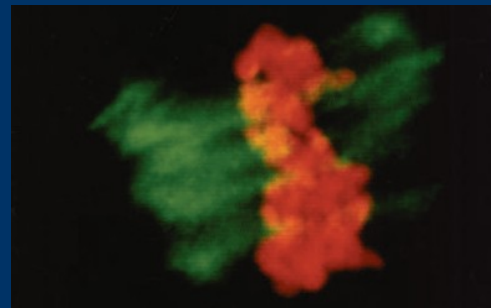
- Widok z boku



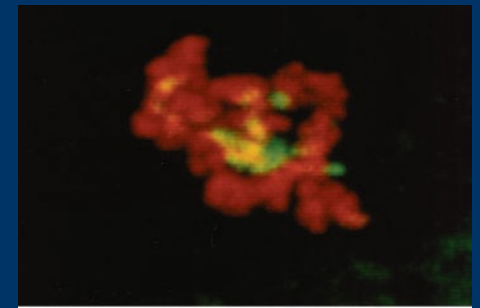
kontrolna



po 1min w nocodazolu

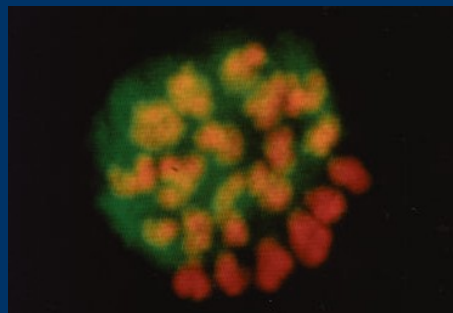


po 3 min w nocodazolu

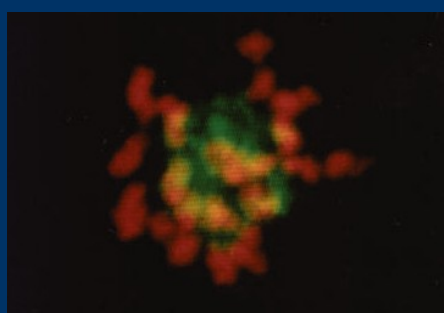


po 6min w nocodazolu

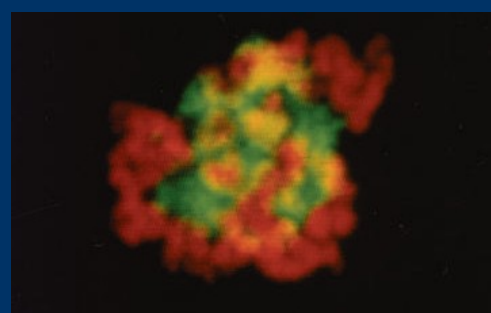
- Widok z góry



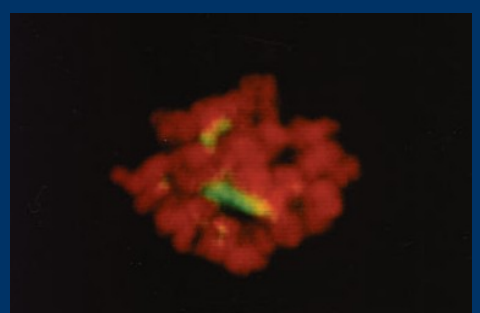
kontrolna



po 1min w nocodazolu



po 3 min w nocodazolu



po 6min w nocodazolu



## **CEL:**

- Zbadać czy wyjście oocyty z M fazy wymaga niezniszczonego wrzeciona
  
  - Zbadać czy wyrzuty jonów wapniowych wewnątrz komórki wpływają na wyjście oocyty z M fazy
- 
-

## *Materiały i metody użyte w doświadczeniach*

- 6-10 tygodniowym samicą podano 5ul surowicy gonadotropowej ciężarnej klaczy(PMSG) i ludzka gonadotropinę kosmówkową(hCG) 48 godzin przed śmiercią
  - Oocyt uzyskano z cummulusów przez nakłucie bańki jajowodu w 13 godzinie po podaniu hCG
- 
-

## Oocyty użyte do aktywacji alkoholem

- Cummulus z pecherzyka jajowodu został przepłukany z komórek folikularnych i usunięto osłonki przejrzyste
- Hodowla przez 4-5 godzin w kropli pożywki M2+BSA pod kropla parafiny w 37stC
- Po 18 godzinach od padania hCG
  - część oocytów poddana została aktywacja etanolem
    - BEZ obecności NOCODAZOLU
    - W obecności NOCODAZALU
  - pozostałe oocyty podzielono na 3 grupy które były trzymane w pożywce z NOCODAZOLEM na
    - 15min przed aktywacja etanolem w obecności NOCODAZOLU
    - 30 min przed aktywacja etanolem w obecności NOCODAZOLU
    - 60 min przed aktywacja etanolem w obecności NOCODAZOLU

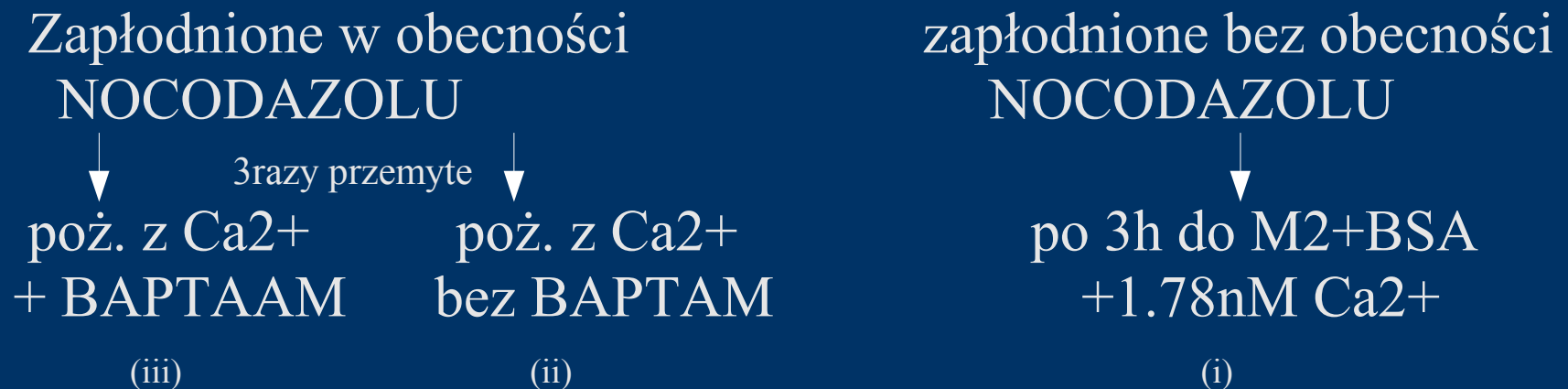
następnie oocyty przemyto z etanolu i umieszczono hodowli w pożywce M2+BSA inkubując 6 godzin

---

---

## Oocyty użyte do aktywacji przez zapłodnienie *in vitro*

- Pochodziły z cummulusów z jajowodów tych samych myszy co oocyty użyte do aktywacji etanolem
- Były oczyszczone lub bez osłonki przejrzystej
- Inkubowano je przez godzinę
- W 13,5 godzinie po podaniu hCG oocyty były zapładniane w kroplach pożywki zawierającej płodowa surowicę cielecą FCS w obecności albo braku obecności nocodazolu



## *Oocyty użyte do aktywacji przez zapłodnienie in vitro c.d.*

Pozostałą część oocytów zapładnianych w obecności  
NOCODOZOLU

umieszczono w pożywkach M2-BSA bez  $\text{Ca}^{2+}$  ale z nocodazolem.  
Po 30 minutach osunięto inhibitor i połowę umieszczono w  
pożywce bez  $\text{Ca}^{2+}$  a druga połowę w pożywce zawierającej jony  
wapnia. W ten sposób otrzymano 5 grup komórek badanych

- (i) Kontrolna
  - (ii) Akt. z nocodazolem bez BAPTAM
  - (iii) Akt. z nocodazolem i z BAPTAM
  - (iv) Akt. z nocodazolem potem w poź. bez  $\text{Ca}^{2+}$  i bez inhibitora
  - (v) Akt z nocodazolem potem w pożywce bez  $\text{Ca}^{2+}$  i bez inhibitora  
a potem do poź. Z  $\text{Ca}^{2+}$
- 
-



## *Rozwój oocytów był badany barwieniem immunocytochemicznym i zdefiniowano go na 2 grupy*

- AKTYWNE u oocytów aktywowanych etanolem 1 przedjądrze  
u oocytów zapłodnionych 2 przedjądrza  
u oocytów zapłodnionych w obecność nocodozolu  
3 lub więcej przedjądrzy
- NIEAKTYWNE u oocytów poddanych działaniu NOCODAZOLU  
które mają jedną lub więcej grup skondensowanych chromosomów  
połączonych z wrzecionami metafazowymi

# ***NOCODAZOL zapobiega aktywacji oocytów podczas stymulacji etanolem***

**Table 1. Incidence of activation in groups of oocytes activated parthenogenetically in the presence or absence of nocodazole or after pre-treatment with nocodazole**

Activation medium (6 min)	Nocodazole pre-treatment (min)	Incidence of activation (%)	Number of experiments
(i) Control	0	0/193 (0)	7
(ii) Ethanol only	0	141/184 (71)	7
(iii) Ethanol and nocodazole	0	60/175 (36)	6
(iv) Ethanol and nocodazole	15	0/49 (0)	1
(v) Ethanol and nocodazole	30	0/66 (0)	2
(vi) Ethanol and nocodazole	60	0/65 (0)	3

## ***NOCODAZOL zapobiega aktywacji oocytów***

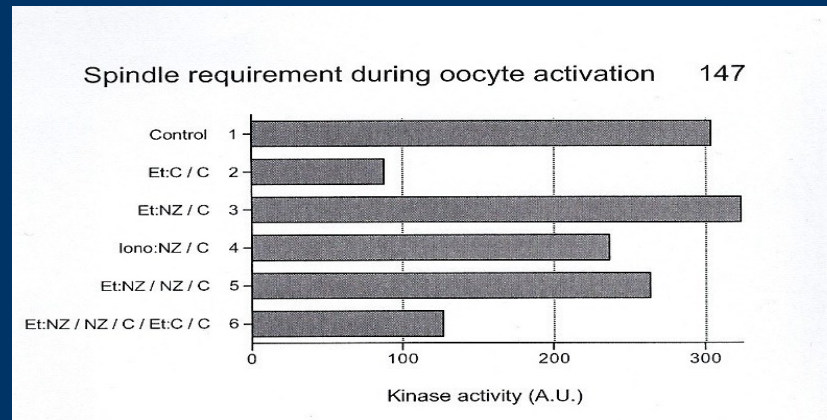
### Oocyty aktywowane

	w obecności Nocodazolu	przy braku obecności nocodazolu
-aktywowane Etanolem	36% aktywnych	71% aktywnych
- aktywowane Jonoforem A23187	5% aktywnych	51% aktywnych
Poziom aktywnosci Kinazy histonów H1	wysoki	niski

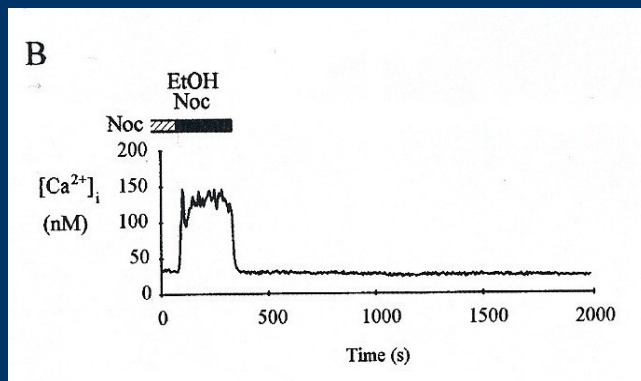
Aktywność kinazy histonów H1 wysoka jest w oocytach kontrolnych które nie uległy aktywacji więc można stwierdzić że oocyty nie przechodzą do interfazy jeśli mają wysoką aktywność tego enzymu

## NOCODAZOL zapobiega aktywacji oocytów

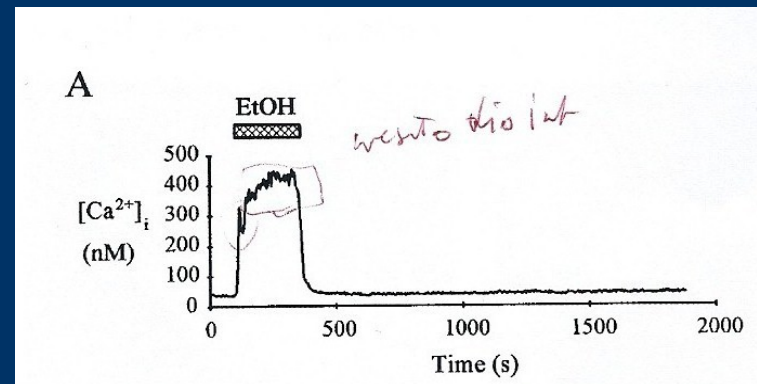
- Aktywność kinazy histonów H1 wysoka jest w oocytach kontrolnych które nie uległy aktywacji więc można stwierdzić że oocyty nie przechodzą do interfazy jeśli mają wysoką aktywność tego enzymu



- W obu przypadkach (aktywacji z lub bez nocodozolu) stwierdzono wystąpienie pojedynczych wyrzutów jonów wapnia po których  
W nocodazolu bez nocodazolu



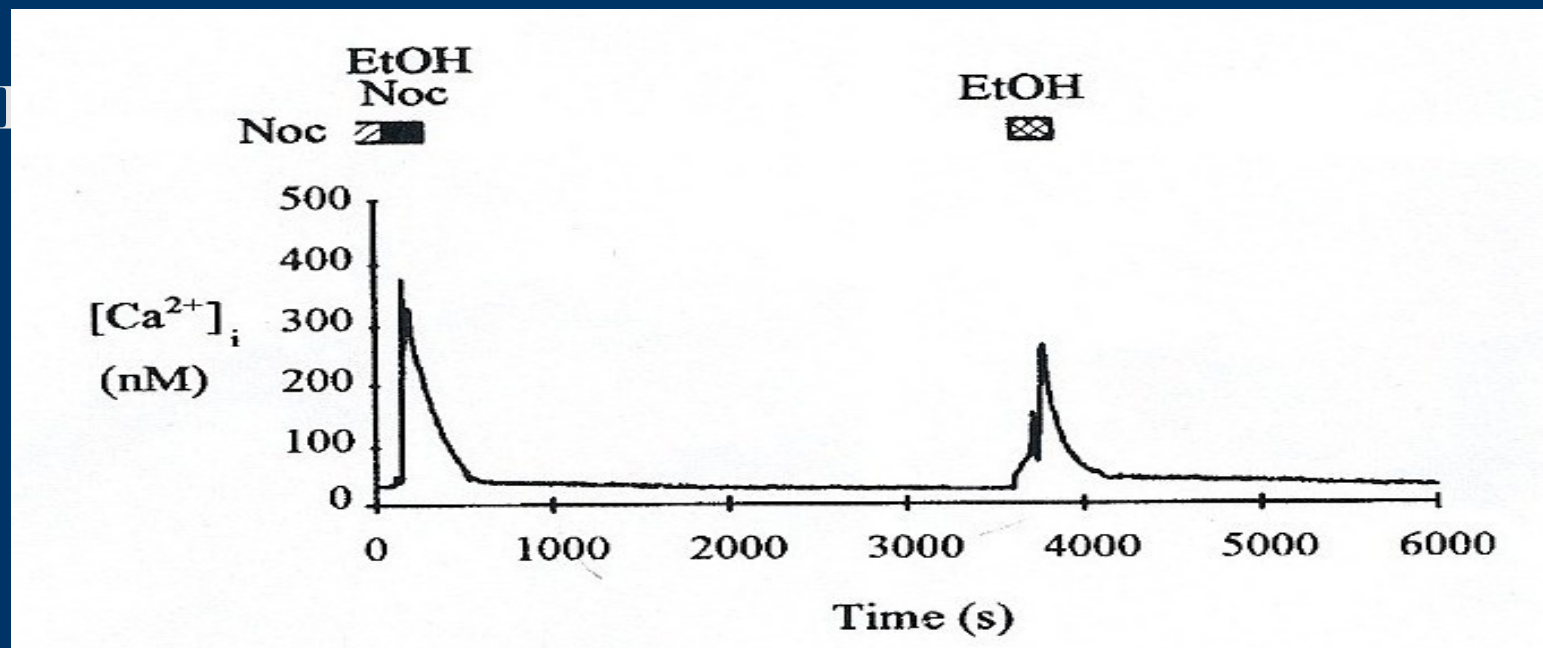
Nie przeszły do inetrfazy



przeszły do interfazy

## **NOCODAZOL zapobiega aktywacji oocytów**

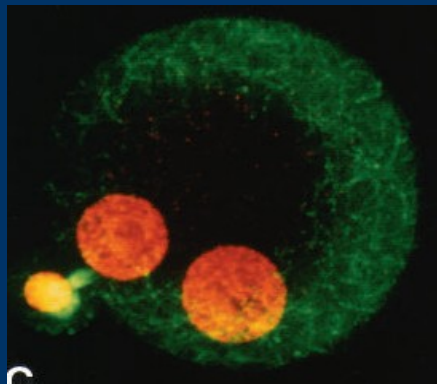
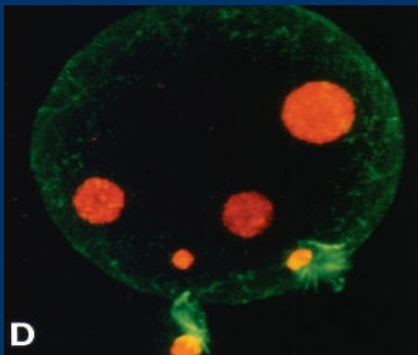
Postanowiono sprawdzić czy oocyty aktywowane partenogenetycznie w nocodazolu po usunięciu inhibitora przejdą do interfazy ?



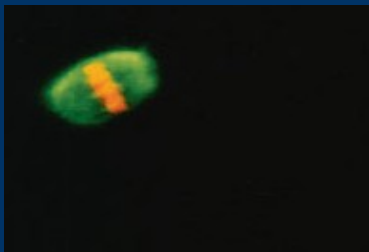
Po godzinie od usniecia z nocodazolu wrzeczona miały czas na odbudowanie się i **mogły przejść do interfazy jeśli były poddane aktywacji po raz drugi bez obecności inhibitora !!!!!!!**

## Zapłodnienie oocyty indukuje wyrzuty wapnia nawet w obecności nocodazolu

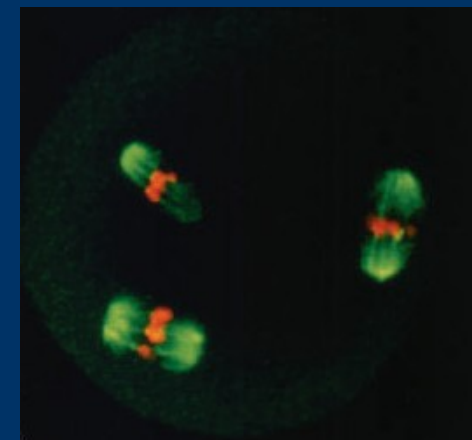
- Oocyty zapłodnione w obecność nocodazolu dokończają podział mejotyczny dopiero po usunięciu inhibitora wyrzucając kilka ciałek kierunkowych, tworząc przedjądrza i sieć interfazowych mikrotubul



zapłodniony bez obecności nocodazolu



niezapłodnione bez obecności nocodazolu



niezapłodnione w obecności nocodazolu

## Zapłodnienie oocyty indukuje wyrzuty wapnia nawet w obecności nocodazolu

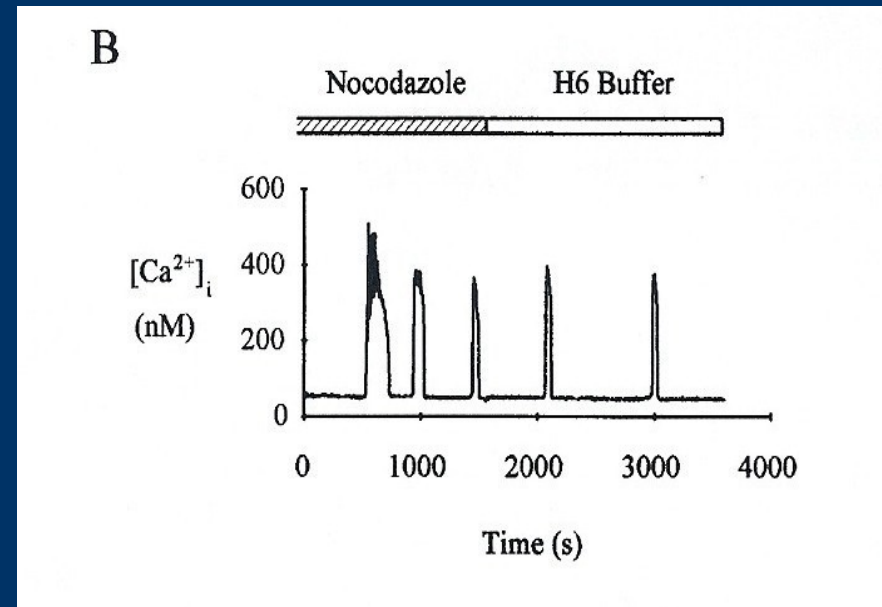
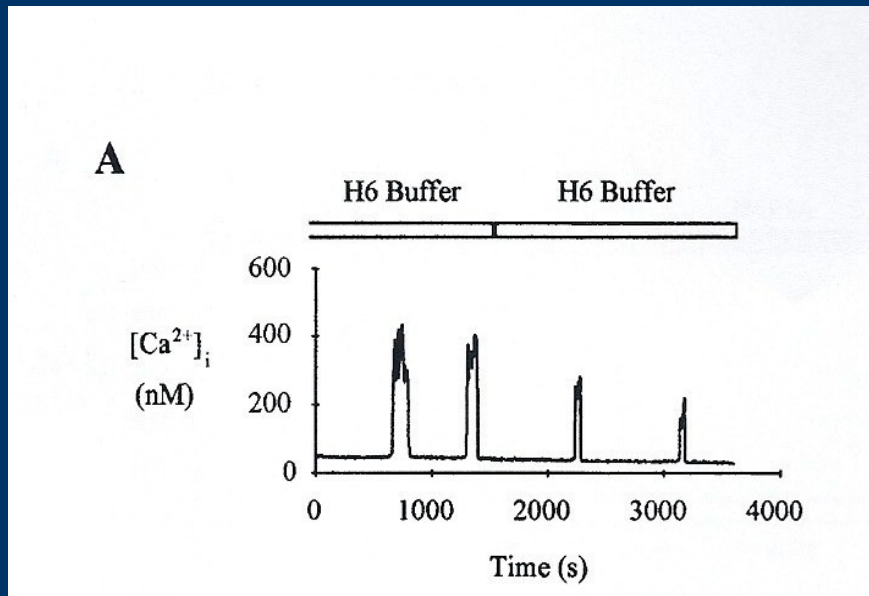
**Table 2. Incidence of activation in groups of oocytes inseminated in the presence of nocodazole and then removed to medium with or without calcium or the calcium buffering agent BAPTA-AM**

Treatment group	Incidence of activation (%)	Number of experiments	Mean $\pm$ s.d.
(i)Control	185/447 (41)	6	44.6 $\pm$ 16.5
(ii)Nocodazole, then control	105/429 (24)	6	25.0 $\pm$ 7.6
(iii)Nocodazole, then BAPTA-AM	2/249 (1)	3	0.9 $\pm$ 1.0
(iv)Nocodazole, then Ca (-)*	12/226 (5)	4	5.4 $\pm$ 2.7
(v)Nocodazole, then Ca (-)* then Ca (+)†	63/217 (29)	4	31.2 $\pm$ 10.6

\*Ca (-), calcium-free medium.

†Ca (+), calcium-containing medium.

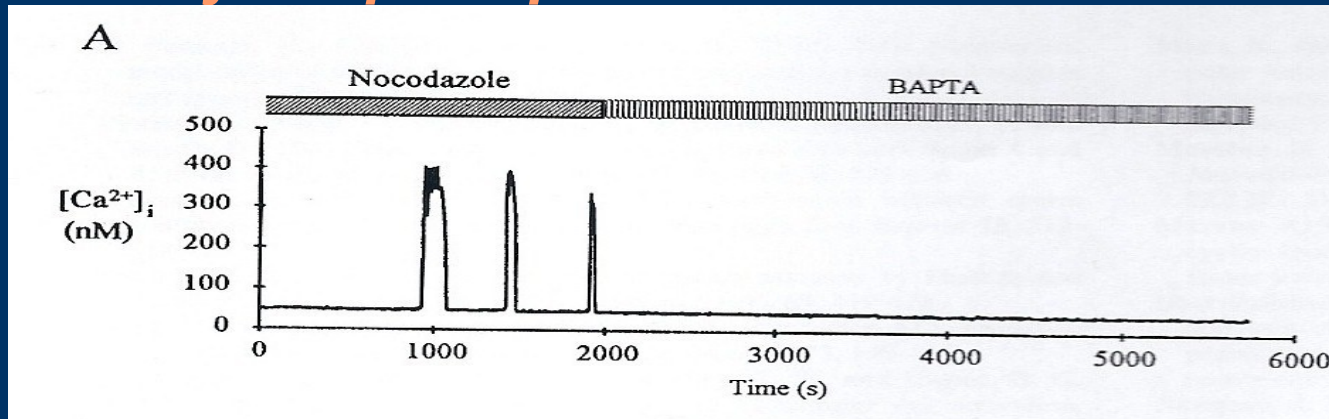
## Zapłodnienie oocyty indukuje wyrzuty wapnia nawet w obecności nocodazolu



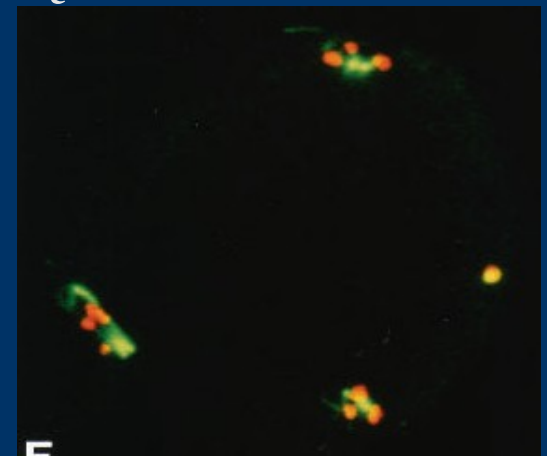
stwierdzono że oocyty zapłodnione w obecności nocodazalu jak i bez obecności inhibitora wyrzucają jony wapnia a wzory tych wyrzut są niemal identyczne i nie zmieniają się po usunięciu inhibitora



## Zapobieganie wyrzutów jonów wapnia blokuje aktywację oocytów po zapłodnieniu



- Oocyty zapłodnione w nocodazolu a następnie usunięte z inhibitora i przeniesione do pożywki z BAPTAAM gr(iii) wykazują zanik wyrzutów jonów wapniowych w chwili gdy w pożywce znalazł się BAPTAAM->żaden oocyt nie wchodzi w interfazę
- Chromosomy kondensują grupując się w od 2-6 gródek blisko cortexu, ale nie tworzą
- w pełni normalnych wrzecion metafazowych



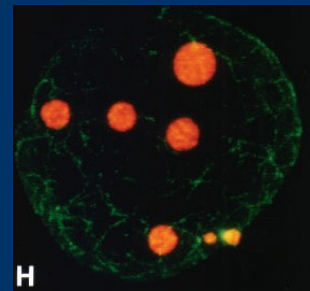
E

## Zapobieganie wyrzutów jonów wapnia blokuje aktywację oocytów po zapłodnieniu

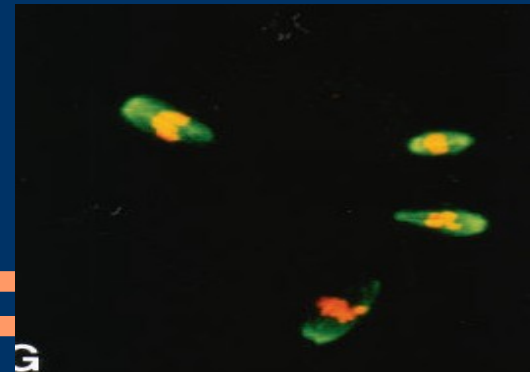
- 29% Oocytów zapłodnionych w obecności nocodazolu przeniesione najpierw do pożywki bez jonów wapnia a potem do pożywki z  $\text{Ca}^{2+}$  <grupa(v)> wyrzuciło wiele ciałek kierunkwoych



wyszły z bloku M FAZY

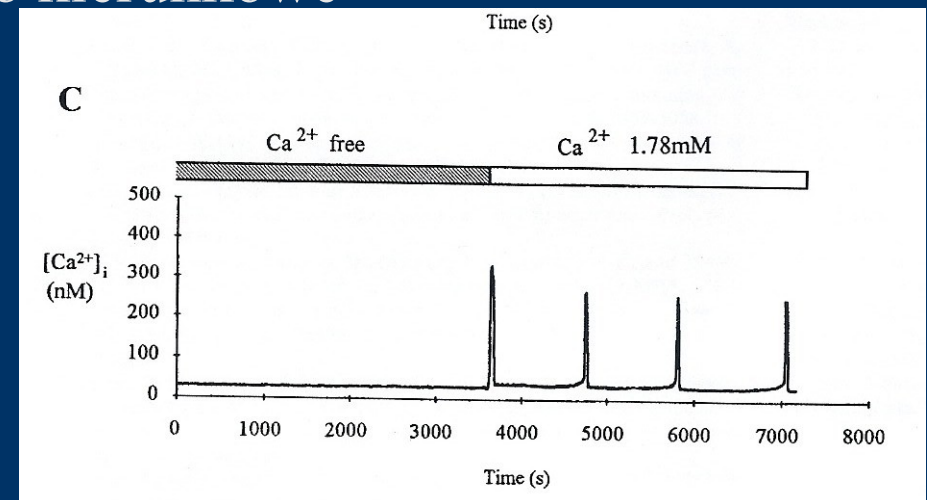
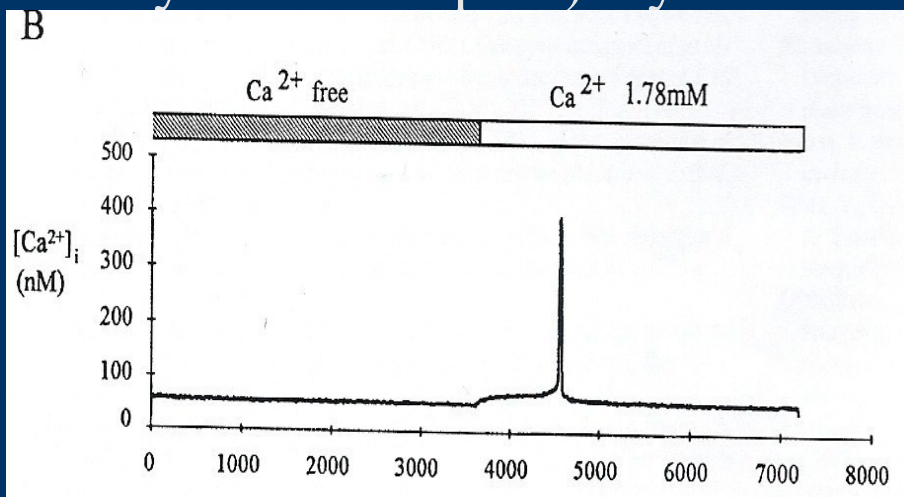


- W grupie (iv) czyli oocytów które były zapładniane w obecności nocodazolu a następnie umieszczone w pożywce bez jonów  $\text{Ca}^{2+}$  aktywacji uległo tylko 5% pozostałe nie dokończyły podziału i zostały w bloku M fazy  
Ich chromosomy były skondensowane  
I rozdzielone na grupki do których przymocowana były wrzeciona



## Zapobieganie wyrzutów jonów wapnia blokuje aktywację oocytów po zapłodnieniu

- Oocyty gr (iv) zapłodnione w obecności nocodazolu a następnie przeniesione do pożywki nie zawierającej  $\text{Ca}^{2+}$  nie wykazują uwalniania jonów wapniowych. Uwalnianie jonów następuje dopiero wtedy gdy przeniesiemy te oocyty do pożywki zawierającej wapń
- 8 badanych oocytów wykazywało uwalnianie wapnia w ten sposób ze 5 oocytów miało pojedynczy wyrzut jonów fig 6b
- A 3 miało wiele wyrzutów jonów wapniowych fig 6c po jednym oocycie z każdej grup ( z wieloma i pojedynczym wyrzutem wapnia) wyrzuciło ciało kierunkowe



## Wnioski

- Uwalnianie jonów wapniowych sprzyja degradacji cykliny b
  - Inhibitor wrzecion NOCODAZOL powoduje przedłużanie bloku M fazy poprzez degradacje wrzecion które muszą być nienaruszone aby cyklina B uległa degradacji która prowadzi do inaktywacji MPF
  - Oocyty aktywowane partenogenetycznie w obecność nocodazolu po usunięciu inhibitora nie wchodzą do interfazy w przeciwieństwie do do tych samych oocytów ale aktywowanych przez zapłodnienie co jest tłumaczone różnymi wzorami w oscylacji jonów  $Ca^{2+}$
  - Zapłodnione oocyty wykazują zdolność do aktywacji nawet po czasie jeśli warunki będą psprzyjające
  - W aktywacji partenogenetycznej w obecności nocodazolu dopiero druga aktywacja etanolem lub innym czynnikiem bez obecności nocodazolu prowadzi do wyjścia z m fazy
- 
-