

Jak utrzymać oocyt w ryzach, czyli o roli *Gpr3* w komórce

Published in final edited form as:

Dev Biol. 2005 December 15; 288(2): 397–404.

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

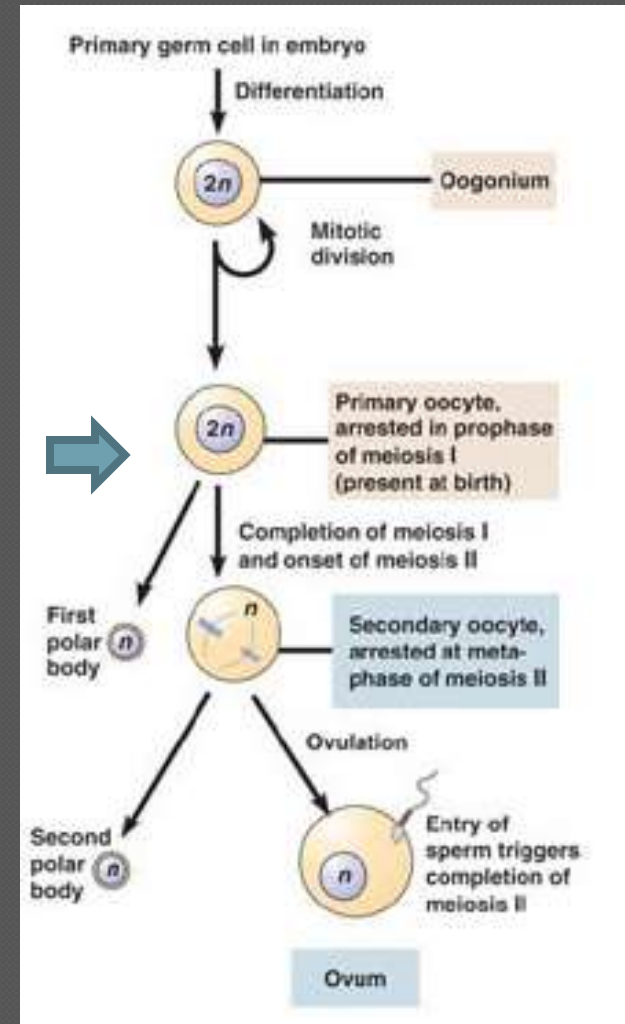
Lisa M. Mehlmann*

Department of Cell Biology, University of Connecticut Health Center, Farmington, CT 06032, USA

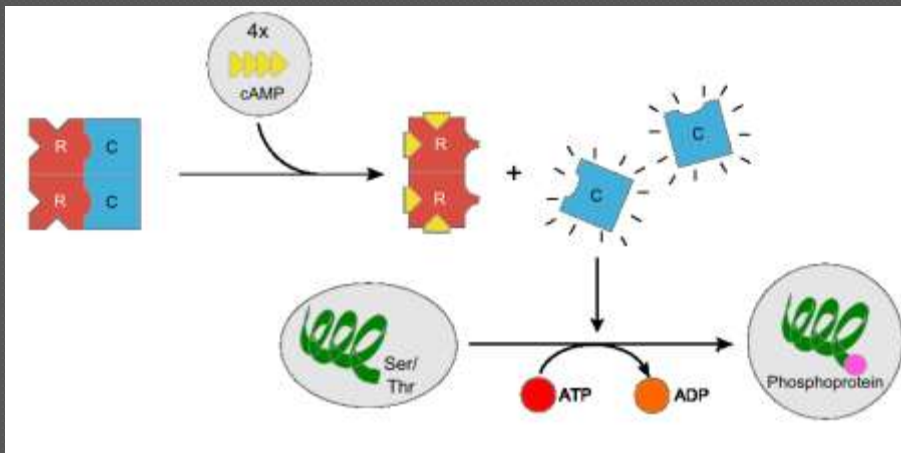
Olga Boryczka

Wstęp: oogeneza

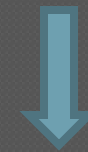
- Profaza I do momentu przedowulacyjnego wyrzutu LH
- Kluczowe: wysoki poziom cAMP w oocycie
- Poziom cAMP gwałtownie spada przy oddzieleniu oocytu od komórek pęcherzykowych



Wstęp: rola cAMP



Aktywacja kinazy
białkowej A (PKA)



Kaskada fosforylacji



Fosforylacja
(=inaktywacja)
CDK1

Aktywna forma CDK1 pozwala na kontynuację podziałów komórkowych.

Skąd wziąć cAMP?

GPR3 – receptor sprzężony z białkiem G



Aktywacja białka G_s



Aktywacja cyklazy adenylowej

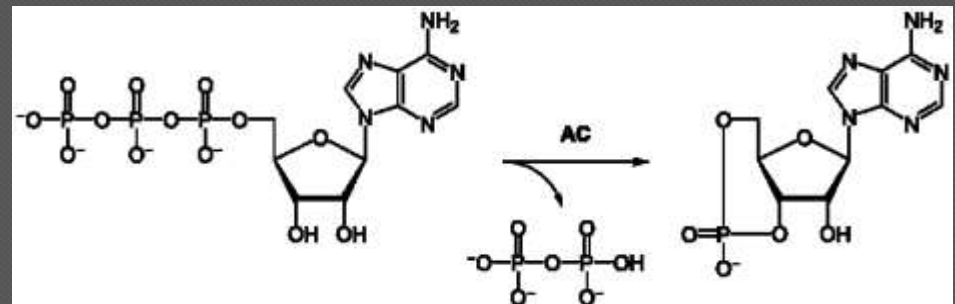


Synteza cAMP

GPR3 G protein-coupled receptor 3 [*Homo sapiens*]
Gene ID: 2827, updated on 9-Aug-2011

Summary

Official Symbol: GPR3 provided by HGNC
Official Full Name: G protein-coupled receptor 3 provided by HGNC
Primary source: HGNC:4484
See related: Ensembl:ENSG00000181773, HPRD:02587, MIM:600241
Gene type: protein coding
RefSeq status: PROVISIONAL
Organism: [Homo sapiens](#)
Lineage: Eukaryota; Metazoa; Chordata; Craniata; Vertebrata; Euteleostomi; Mammalia; Eutheria; Euarchontoglires; Primates; Haplorhini; Catarrhini; Hominidae; Homo
Also known as: ACCA



Mysi knock-out Gpr3

- Oocyty Gpr3 ^{-/-} wznowiają mejozę niezależnie od obecności LH
- Blok mejotyczny może być utrzymany przez nastrzyknięcie oocytu RNA kodującym GPR3

Czy komórki pęcherzykowe byłyby w stanie zapewnić oocytowi odpowiedni poziom cAMP?



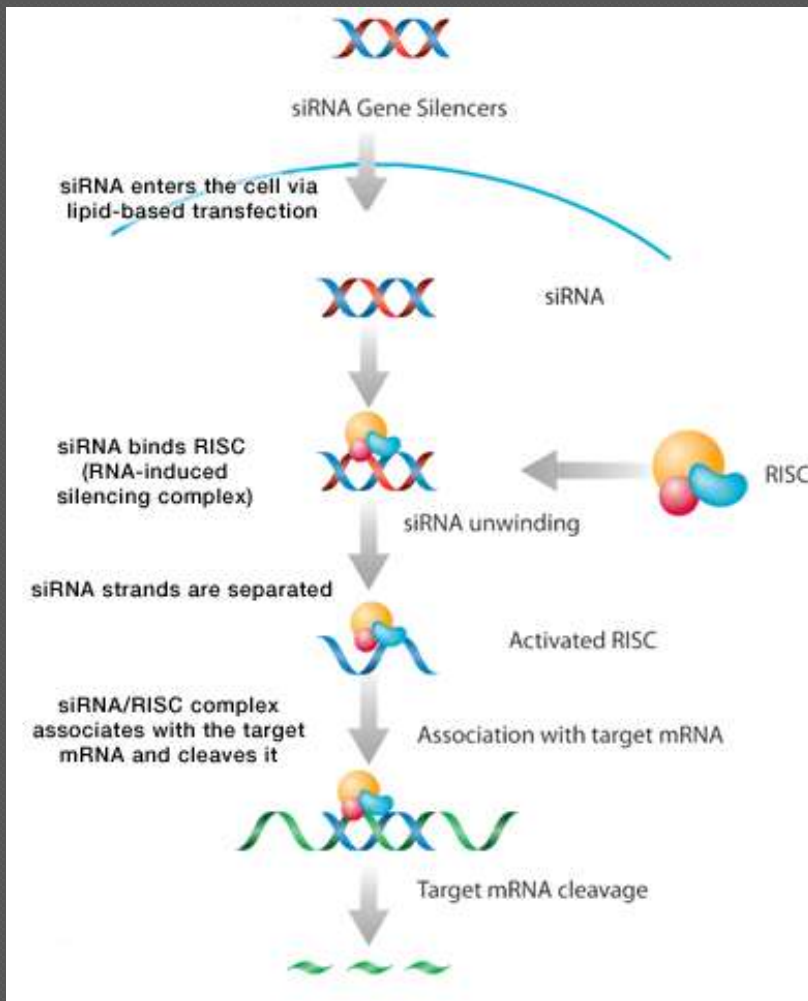
Cel pracy

The goal of the present study was to resolve the issue of whether GPR3 within the oocyte or from the surrounding somatic cells is required for the maintenance of meiotic arrest. The technique of RNA interference (RNAi), which involves the introduction of small, interfering double-stranded RNA (siRNA) into oocytes to trigger sequence-specific degradation of mRNA (Svoboda et al., 2000, 2001; Wianny and Zernicka-Goetz, 2000; Xu et al., 2003), was used to reduce levels of mRNA encoding *Gpr3* in follicle-enclosed oocytes. Specific reduction of *Gpr3* mRNA from mouse oocytes after 72 h of culture resulted in the loss of the ability of follicle-enclosed oocytes to maintain meiotic arrest. In contrast, RNAi was less effective when siRNA was introduced into isolated oocytes, which cannot be cultured beyond ~48 h and, therefore, undergo less turnover of RNA and protein.

Materiały i metody



siRNA



- Dwuniciowe RNA długości 20-25 nukleotydów

- Kompleks RISC namierza komplementarne mRNA i je tnie, uniemożliwiając translację

siRNA - mikroiniekcje

Oocyt w pęcherzyku:

- siRNA przeciwko *Gpr3* (5 nM, 50 nM)
- Zmutowane w 5 rejonach siRNA przeciwko *Gpr3* = *mutGpr3* (100 nM)
- siRNA przeciwko GAPDH = kontrola (100 nM)

Izolowane oocyty:

- siRNA przeciwko *Gpr3* (50 nM)



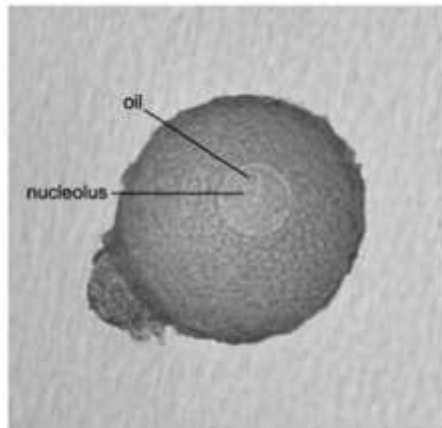
Wyniki: wzrost pęcherzyków

Table 1

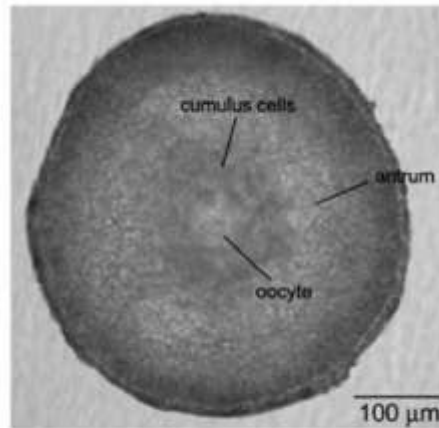
Average diameter of follicles grown in culture for at least a 3-day period

Group	Diameter (μm) (number of follicles)
Uninjected	276 ± 37 (165)
Low Gpr3 (5 nM)	236 ± 50 (26)
High Gpr3 (50 nM)	271 ± 35 (73)
mutGpr3 (100 nM)	269 ± 38 (42)
GAPDH (100 nM)	292 ± 40 (10)

Brak istotnych różnic – mikroiniekcje nie powodują zniszczenia pęcherzyków



Day 0



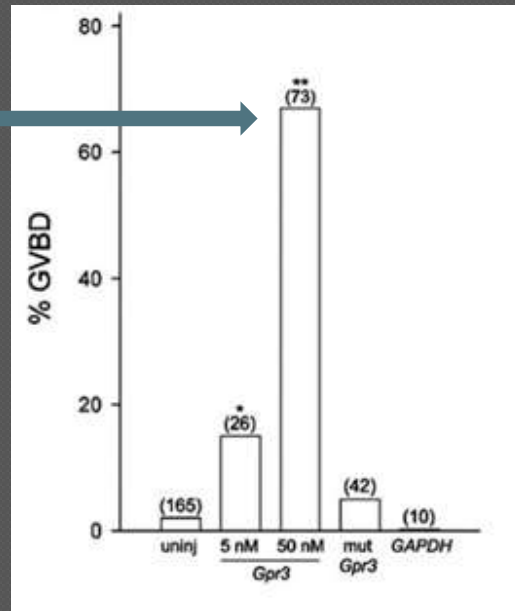
Day 3

Po mikroiniekcji pęcherzyki rosły – często również wytwarzały jamki.

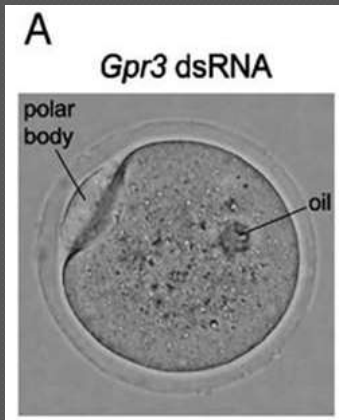
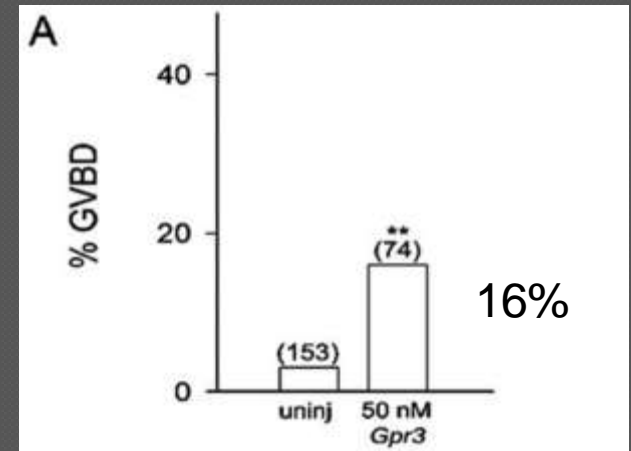
Wyniki: blok mejotyczny

67%

Spośród nich 64% stworzyło I ciało kierunkowe = zakończyły I podział mejotyczny



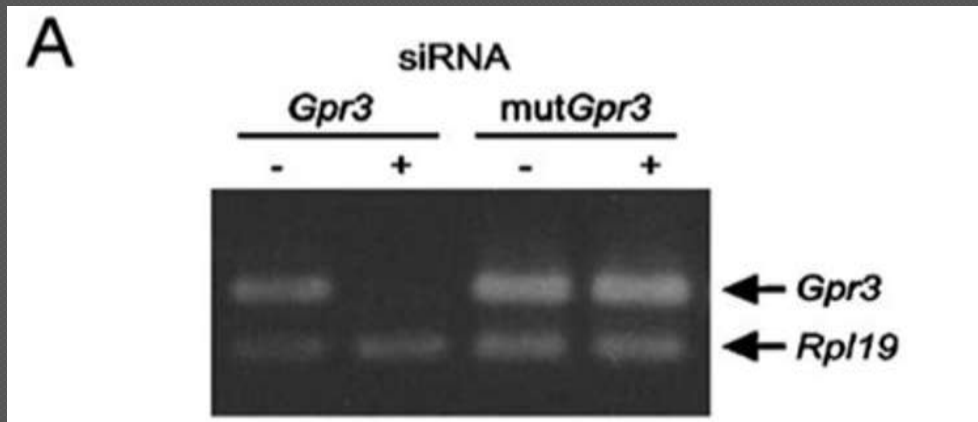
GVBD = Germinal Vesicle Breakdown



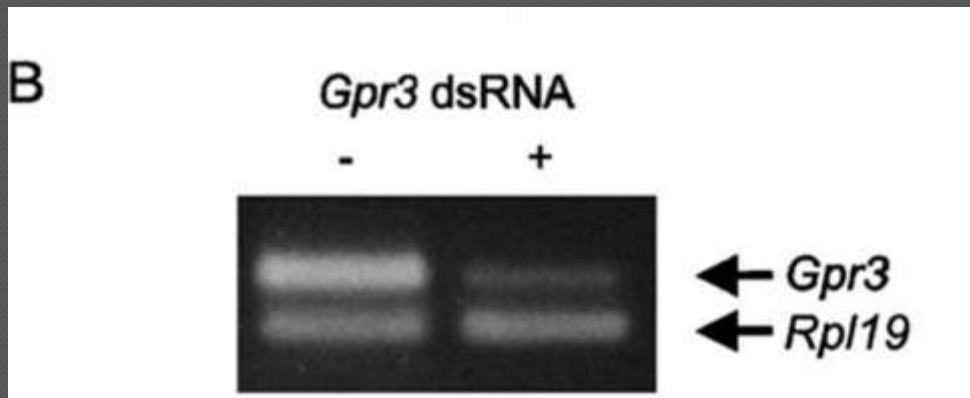
Oocyty w pęcherzykach

Izolowane oocyty

Wyniki: RT-PCR



Oocyty w pęcherzykach.
siRNA *Gpr3* – 10%
standardowej ekspresji



Oocyty izolowane – zbyt
krótko hodowane by
skutecznie
zdegradować mRNA
Gpr3

Dyskusja: metoda

- Fenotyp knock-outa *Gpr3*^{-/-} odpowiada siRNA *Gpr3*
- Dużo tańsza i prostsza niż myszy transgeniczne – gen siRNA na promotorze specyficznym dla oocyty
- Poziom *Gpr3* w komórce zbyt niski dla detekcji przeciwciałami

Podsumowanie

- Spadek poziomu *Gpr3* w oocycie powoduje wznowienie mejozy
- Endogenna produkcja cAMP jest kluczowa dla utrzymania bloku mejotycznego
- cAMP produkowane przez komórki pęcherzykowe nie jest wystarczające do utrzymania bloku mejotycznego