

NITRIC OXIDE-DEPENDENT ACTIVATION OF IN VITRO MATURED PIG OOCYTES

Aktivace prasečích oocytů dozrálých in vitro signální kaskádou závislou na oxidu dusnatém

Milan ETRYCH¹, Jaroslav PETR²

¹ KVD AF ČZU; ² VÚŽV UHŘÍNĚVES, ODDĚLENÍ REPRODUKČNÍ BIOLOGIE

Souhrn, klíčová slova

Navodili jsme partenogenetickou aktivaci prasečích oocytů dozrálých v podmínkách in vitro a kultivovaných v přítomnosti různých donorů oxidu dusnatého (SNAP a nitroprusid). Rovněž mikroinjekce syntázy oxidu dusnatého (NOS) spolu s jejím fyziologickým aktivátorem kalmodulem (KAL) navodilo partenogenetickou aktivaci. Specifická této NO-dependentní partenogenetické aktivace byla potvrzena použitím inhibitoru NOS L-NAME a jeho neúčinného konformeru D-NAME. L-NAME potlačil NO-dependentní partenogenetickou aktivaci, zatímco D-NAME nemělo žádný efekt. Z dostupných literárních pramenů vyplývá, že naše výsledky jsou prvním důkazem NO-dependentní partenogenetické aktivace oocytů obratlovců. Předpokládáme, že NO-dependentní partenogenetická aktivace by mohla být využita pro potřeby různých biotechnologií, např. klonování.

Oocyt, prase, meioza, oxid dusnatý, aktivace

Summary, keywords

We were able to induce parthenogenetic activation in pig oocytes matured in vitro and cultured with different nitric oxide donors (SNAP or nitroprusside). Also microinjection of nitric oxide synthase (NOS) with its physiological activator calmodulin (CAL) induced parthenogenetic activation in in vitro matured pig oocytes. The specificity of this NO-dependent parthenogenetic activation was confirmed using NOS-inhibitor L-NAME and its inactive conformer D-NAME. L-NAME suppressed NO-dependent parthenogenetic activation, but D-NAME had no any effect. Based on our best knowledge, our data are the first evidence for NO-dependent parthenogenetic activation in vertebrate oocytes. We suggest the usage of NO-dependent activation regimens for various biotechnologies, e.g. cloning.

Oocyte, pig, meiosis, nitric oxide, parthenogenetic activation

Introduction – Úvod

Reprodukční biotechnologie mohou významně napomoci ve zvýšení účinnosti šlechtění i při získávání živočišných produktů vyšší kvality nebo produktů zcela nových. Účinnost těchto postupů je ale velmi nízká. To je důsledek velmi omezených znalostí o biologických procesech probíhajících ve vajíčcích hospodářsky významných živočišných druhů. NO-dependentní regulace výstupu meiozy z metafáze II byla popsána u bezobratlých (Kuo et al., 2000). V naší studii jsme testovali hypotézu, že NO-dependentní signální kaskáda je plně funkční u oocytů savců, konkrétně prasete. Řada odborníků se domnívá, že aktivaci této kaskády by bylo možné využít např. při klonování (Solter, 2000).

Methods - Metody

Pro studii byly použity oocyty odebrané z ovárií prasniček poražených na jatkách. Oocyty byly kultivovány 48 hodin v modifikovaném médiu M199 a následně vystaveny aktivačnímu ošetření. Mikroinjekce byla provedena na inverzním mikroskopu IMT-2 pomocí mikromanipulátorů a mikroinjektorů Narishige.

Results - discussion – Výsledky - diskuse

Prasečí oocyty dozrálé v podmínkách in vitro jsou v přítomnosti donorů oxidu dusnatého (NO) partenogeneticky aktivovány. V našich pokusech byly oocyty úspěšně aktivovány NO-donorem SNAP (2 mM - 78% aktivovaných oocytů) i dihydrátem nitroprusidu sodného (1mM - 61% aktivovaných oocytů). Tyto výsledky naznačily, že na aktivaci savčích oocytů

se aktivně podílí NO-dependentní signální kaskáda. K ověření této domněnky jsme využili mikroinjekci syntázy oxidu dusnatého (NOS) spolu s kalmodulem (KAL), jež je přirozeným aktivátorem tohoto enzymu. Při injekci 10 pl roztoku obsahujícího 0,00014 ng NOS/ml a 1,4 mg KAL/ml bylo pozorováno 57% aktivovaných oocytů. Injekce samotné NOS či KAL neměla žádný efekt. Naopak, pokud byly oocyty po injekci NOS+KAL vystaveny účinku 1 mM L-NAME (inhibitoru NOS), dosáhl podíl aktivovaných oocytů jen 9%.

NO-dependentní aktivace oocytů byla doposud známa jen u bezobratlých (Kuo et al., 2000). Naše data poprvé jasně dokazují, že tato signální kaskáda je aktivní i u savčích oocytů. Účinné aktivační stimuly jsou vyhledávány především v souvislosti s jejich uplatněním pro potřeby reprodukčních biotechnologií. Předpokládáme, že NO-dependentní aktivace by mohla nalézt uplatnění např. při klonování prasat, která má zatím jen velmi nízkou účinnost (Polejaeva et al., 2000).

References - Použitá literatura

- Kuo R.C., Baxter G.T., Thompson S.H., Stricker S.A., Patton C., Bonaventura J., Epel D.: NO is necessary and sufficient for egg activation at fertilization. *Nature* 406: 633-636, 2000.
- Polejaeva IA, Chen SH, Vaught TD, Page RL, Mullins J, Ball S, Dai Y, Boone J, Walker S, Ayares DL, Colman A, Campbell KH.: Cloned pigs produced by nuclear transfer from adult somatic cells. *Nature* 407: 86-90, 2000.
- Solter D.: Mammalian cloning: advances and limitations. *Nature Review Genetics* 1: 200-207, 2000.

Práce zpracována v rámci interního grantu 21230/1312/213117