

NITRIC OXIDE SYNTHASE EXPRESSION DURING PORCINE OOCYTES MEIOTIC MATURATION

Expres syntázy oxidu dusnatého v průběhu meiotického zrání prasečích oocytů

Eva CHMELÍKOVÁ¹, Jaroslav PETR², Markéta SEDMÍKOVÁ¹

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

Souhrn, klíčová slova

V naší práci jsme se zabývali expresí jednotlivých izoform NO-syntázy během meiotického zrání prasečích oocytů. V oocytech byla detekována eNOS a iNOS, obě izoformy byly nalezeny v oocytech ve stádiu zárodečného váčku a metafáze I. V oocytech ve stádiu metafáze II nebyly tyto dvě izoformy detekovány. nNOS izoforma nebyla nalezena v žádném stádiu meiotického zrání oocytů prasete.

Oocyty, NO-syntáza (NOS), NOS izoformy, prase, western blot

Summary, keywords

The aim of our work was to study the expression of NOS isoforms during meiotic maturation of porcine oocytes. eNOS and iNOS isoforms were detected in the stage of germinal vesicle and metaphase I stage of meiotic maturation. However, no eNOS and iNOS we found in the metaphase II stage. nNOS was not detected in any stages of meiotic maturation.

Oocytes, NO-synthase (NOS), NOS isoforms, pig, western blotting

Úvod

Izotypy NO-syntázy (NOS) produkují v buňkách oxid dusnatý (NO), jež je významnou signální molekulou (Biswas *et al.*, 1998). NO-syntáza se vyskytuje ve třech základních izoformách. Konstituční izoformy – endoteliální NOS (eNOS) a nervová (nNOS) - jsou kalmodulin a kalcium dependentní, produkují pouze malá množství oxidu dusnatého po krátkou dobu (Lowenstein *et al.*, 1992; Bredt *et al.*, 1991). Indukovatelná izoforma (iNOS) zajišťuje stálou produkci NO po dlouhou dobu, je produkována mnoha typy buněk, často ji indukují cytokiny a endotoxiny (Moncada *et al.*, 1991). NO produkované NO-syntázami ve vaječniku je zapojen do procesu řízení folikulogeneze, ovulace, meiotického zrání a aktivace oocytů (Hattori *et al.*, 2000; Kuo *et al.*, 2000; Jablonka-Shariff *et al.*, 1997).

Metody

Prasečí oocyty byly získávány aspirací z vaječníků a poté v podmínkách *in vitro* kultivovány v modifikovaném médiu M199 při 39°C a 5% CO₂. Pro detekci proteinů byly použity oocyty ve 3 stádiích meiotického zrání (0 hodin kultivace – stádiem zárodečného váčku, 24 hodin kultivace – metafáze I a 48 hodin kultivace – metafáze II). Oocyty byly zbaveny kumulárních buněk pipetováním přes skleněnou pipetu a lyzovány v lyzačním pufru. Proteiny z oocytů byly nejprve SDS-PAGE elektroforézou rozděleny v 10% polyakrylamidovém gelu a poté byly přeneseny na nitrocelulósovou membránu. Membrána byla blokována 5% odtučněným mlékem a inkubována s primárními specifickými protilátkami (Alexis Biochemicals, USA) a sekundární protilátkou. Vizualizace proteinů byla provedena chemiluminiscenčně pomocí ECL kitu (ICN Biomedicals, Inc.).

Výsledky - diskuse

V prasečích oocytech jsme detekovali dvě izoformy NO-syntázy – eNOS a iNOS. Obě byly nalezeny v oocytech ve stádiu zárodečného váčku a metafázi I. V oocytech v metafázi II nebyla nalezena žádná z izoform NOS. V prasečích oocy-

tech zjistil přítomnost těchto dvou izoform také Hattori *et al.* (2002), analyzoval však pouze proteiny získané z rostoucích oocytů. Přítomnost eNOS a iNOS byla potvrzena rovněž v oocytech potkanů a myši (Gouge *et al.*, 1998; Purcell *et al.*, 1999; Jablonka-Shariff *et al.*, 2000). Abe *et al.* (1999) detekovali v myších oocytech také mRNA pro nNOS.

NOS/NO se podílí na řízení meiotického zrání oocytů (Jablonka-Shariff *et al.*, 1997; Hattori *et al.*, 2000; Kuo *et al.*, 2000), čemuž nasvědčují i naše výsledky. Ze tří známých izotypů NO-syntázy se zřejmě na meiotickém zrání oocytů prasete podílejí pouze eNOS a iNOS.

Použitá literatura

- Abe K., Matsuoka K., Inoue N., Taga M., Kato T. *Biomed. Res.* –Tokyo 20, 61-65, 1999.
- Biswas S., Kabir S.N., Pal A.K.: *Journal of Reproduction and Fertility*, 114 (1): 157-161, 1998.
- Bredt D.S., Hwang P.M., Glatt C.E., Lowenstein C., Reed R.R., Snyder S.H. *Nature* 351, 714-718, 1991.
- Gouge R.C., Marshburn P., Gordon B.E., Nunley W, Huet Hudson Y.M. *Biol. reprod.*, 58, 875-879, 1998.
- Hattori M.-A., Nishida N., Takesue K., Kato Y., Fujihara N. J. *Mol. Endocrinol.* 24, 65-73, 2000.
- Hattori M.-A., Nishida N., Takesue K., Kato Y., Fujihara N. J. 2002, in press.
- Jablonka-Shariff A., Olson L.M.: *Endocrinology* 138, 460-480, 1997.
- Jablonka-Shariff A., Olson L.M. *Mol. Reprod. Dev.* 55, 412-421, 2000.
- Kuo R.C., Baxter G.T., Thompson S.H., Stricker S.A., Patton C., Bonaventura J., Epel D. *Nature* 406, 633-636, 2000.
- Lowenstein C.J., Glatt C.S., Bredt D.S., Snyder S.H. *Proc. Nat. Acad. Sci. USA* 89, 6711-6715, 1992.
- Moncada S., Palmer R.M., Higgs E.A.: *Pharmacol. Rev.* 43, 109-142, 1991.
- Purcell T.L., Given R., Chwalisz K., Garfield R.E. *Mol. Hum. Reprod.*, 5, 467-475, 1999.

The study was supported by grant FRVŠ 21230/1161/211625.