

©Borgis

Katarzyna Czajkowska, *Anna Ajduk

Wpływ starzenia na przebieg oscylacji $[Ca^{2+}]_i$ w zapłodnionych oocytach ssaków

The influence of aging on $[Ca^{2+}]_i$ oscillations in fertilized mammalian oocytes

Zakład Embriologii, Wydział Biologii, Uniwersytet Warszawski
Kierownik Zakładu: prof. dr hab. Marek Maleszewski

Słowa kluczowe

oocyt, oscylacje $[Ca^{2+}]_i$, starzenie poowulacyjne, starzenie matczyne

Keywords

oocyte, $[Ca^{2+}]_i$ oscillations, postovulatory aging, maternal aging

Konflikt interesów Conflict of interest

Brak konfliktu interesów
None

Adres/address:

*Anna Ajduk
Zakład Embriologii, Wydział Biologii,
Uniwersytet Warszawski
ul. Miecznikowa 1, 02-096 Warszawa
tel. +48 (22) 554-12-39
aajduk@biol.uw.edu.pl

WSTĘP

Wzrost stężenia wolnych jonów wapnia w cytoplazmie ($[Ca^{2+}]_i$) jest uniwersalnym i powszechnym sposobem przekazywania sygnału w komórkach eukariotycznych, gdzie uczestniczy w regulacji procesów, takich jak egzocytoza, apoptoza, funkcjonowanie mitochondriów czy kurczliwość cytoszkieletu (1). Szczególnie ciekawy przykład wykorzystania wzrostu $[Ca^{2+}]_i$ do przekazywania sygnału występuje u ssa-

Streszczenie

Wniknięcie plemnika do oocytu wywołuje trwające kilka godzin oscylacje cytoplazmacyjnego stężenia wolnych jonów wapnia ($[Ca^{2+}]_i$). Oscylacje te inicjują i organizują w czasie szereg procesów kluczowych dla aktywacji rozwoju zarodkowego. Jednym z czynników, które mogą zaburzyć homeostazę jonów Ca^{2+} w oocycie, jest proces starzenia. W wypadku oocytów wyróżniamy dwa typy starzenia: starzenie poowulacyjne polega na nadmiernym wydłużeniu okresu między owulacją a zapłodnieniem, natomiast starzenie matczyne związane jest z wiekiem samicy. W niniejszej pracy przedstawimy pokrótce molekularny mechanizm odpowiedzialny za powstawanie oscylacji $[Ca^{2+}]_i$ w zapłodnionym oocycie oraz funkcje, jakie te oscylacje pełnią w komórce. Omówimy także dokładnie wpływ procesu starzenia poowulacyjnego i matczynego na regulację homeostazy Ca^{2+} oraz przebieg oscylacji $[Ca^{2+}]_i$. Zagadnienie to jest szczególnie istotne w kontekście medycyny reprodukcyjnej, gdyż zarówno starzenie poowulacyjne, jak i matczyne, negatywnie wpływa na jakość oocytów, a co za tym idzie na płodność kobiet i efektywność technik wspomaganego rozrodu.

Summary

A fertilizing sperm triggers oscillations of the intracytoplasmic concentration of free calcium ions ($[Ca^{2+}]_i$) in the oocyte. $[Ca^{2+}]_i$ oscillations last for a few hours and are involved in initiation and temporal organization of several processes crucial for the activation of embryonic development. One of the factors that can distort the Ca^{2+} homeostasis in oocytes is aging. We can distinguish two types of oocyte aging: postovulatory aging occurs when the interval between ovulation and fertilization is excessively extended, whereas maternal aging is connected with advanced reproductive age of the female. In this paper, we briefly describe the molecular mechanism underlying generation of $[Ca^{2+}]_i$ oscillations in a fertilized oocyte and present their functions in the embryo. Moreover, we thoroughly discuss the influence of postovulatory and maternal aging on Ca^{2+} homeostasis and a pattern of $[Ca^{2+}]_i$ oscillations. The issue raised in this review is particularly important in the context of reproductive medicine, as both postovulatory and maternal aging affects the quality of oocytes and, consequently, the fertility of females and effectiveness of assisted reproductive technology procedures.

ków w procesie pobudzenia zapłodnionego oocytu do rozwoju. Plemnik wnosi do cytoplazmy oocytu enzym fosfolipazę C zeta, wywołujący w oocycie oscylacje $[Ca^{2+}]_i$ (2). W zależności od gatunku ssaków $[Ca^{2+}]_i$ wzrasta w zapłodnionym oocycie cyklicznie co 10-60 minut, inicjując procesy, takie jak wznowienie i ukończenie mejozy (oocyty są zapładniane w stadium metafazy II podziału mejotycznego), wytworzenie bloku przeciwko polispermii, intensyfikacja produkcji ATP

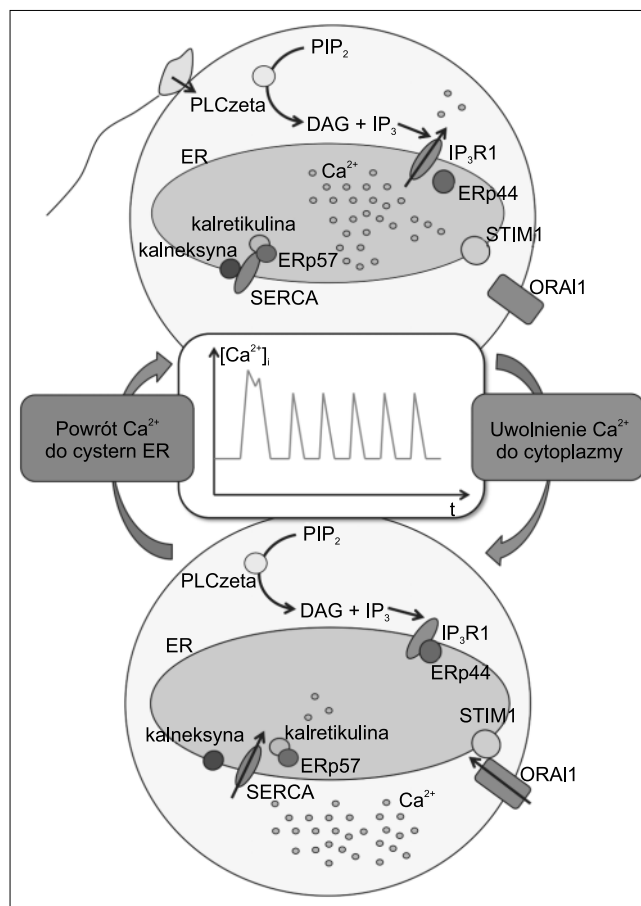
czy dalszy rozwój zarodka (3, 4). Na przebieg oscylacji $[Ca^{2+}]_i$ może wpływać starzenie oocytu – poowulacyjne (polegające na wydłużeniu odstępu między owulacją a zapłodnieniem) lub matczyne (związane z wiekiem samicy). W niniejszej pracy przedstawimy aktualne informacje dotyczące mechanizmu i roli oscylacji $[Ca^{2+}]_i$ w oocytach, a także wpływu starzenia na ich przebieg.

MOLEKULARNY MECHANIZM OSCYLACJI $[Ca^{2+}]_i$

Wprowadzona do oocytu przez plemnik fosfolipaza C zeta hydrolizuje 4,5-bisfosforan fosfatidyloinozytolu (PIP_2) do diacyloglicerolu (DAG) oraz 1,4,5-trisfosforanu inozytolu (IP_3). IP_3 przyłącza się do umiejscowionych na powierzchni retikulum endoplazmatycznego (ER) receptorów, które pełnią funkcję kanałów Ca^{2+} . W komórkach ssaków występują trzy różne izoformy receptora IP_3 , jednak w oocytach występują przede wszystkim receptory typu pierwszego (IP_3R1) (5). Związanie się IP_3 z receptorem IP_3R1 prowadzi do otwarcia kanału Ca^{2+} i uwolnienia jonów Ca^{2+} ze światła cystern ER do cytoplazmy. Gdy $[Ca^{2+}]_i$ wzrasta powyżej pewnego poziomu, dochodzi do inhibicji IP_3R1 i aktywacji ATP-zależnej pompy Ca^{2+} SERCA, co prowadzi do wychwytu Ca^{2+} z cytoplazmy z powrotem do ER. Gdy $[Ca^{2+}]_i$ spada, dochodzi do inhibicji SERCA, aktywacji IP_3R1 i ponownego wyrzutu jonów Ca^{2+} do cytoplazmy (3). Badania na oocytach płazów (modelowym zwierzęciem jest tu żaba szponiasta, *Xenopus laevis*) oraz na komórkach somatycznych wykazały, że ważną funkcję w regulacji aktywności SERCA i IP_3R1 pełnią białka światła ER. Przykładowo, kalretikulina umożliwia wiązanie w pobliżu pompy SERCA oksydoreduktazy ERp57, która to z kolei w odpowiedzi na wysokie stężenie jonów Ca^{2+} w cysternach ER katalizuje zmianę konformacji i inhibicję SERCA (6, 7). Innym białkiem hamującym czynność SERCA, gdy ER jest wypełnione jonami Ca^{2+} , jest kalneksyna (8). Z kolei białko ERp44 oddziałuje z receptorem IP_3R1 i hamuje jego aktywność, gdy stężenie jonów Ca^{2+} w ER spada, uniemożliwiając wypływ wszystkich jonów Ca^{2+} z ER do cytoplazmy (ryc. 1) (9).

Aby oscylacje $[Ca^{2+}]_i$ mogły trwać przez odpowiednio długi czas, niezbędny jest także napływ Ca^{2+} do oocytu ze środowiska zewnętrznego. Napływ ten jest regulowany poprzez mechanizm SOCE (ang. *store-operated calcium entry*), aktywowany, gdy dochodzi do opróżnienia wewnątrzkomórkowych magazynów ER (1). Jego kluczowym elementem w oocytach jest białko STIM1, zlokalizowane w błonie ER i będące sensorem stężenia Ca^{2+} w świetle ER. Pod wpływem opróżnienia ER z Ca^{2+} STIM1 aktywuje kanały Ca^{2+} obecne w błonie komórkowej oocytu, w tym kanał ORAI1, i umożliwia napływ jonów Ca^{2+} ze środowiska zewnętrznego (ryc. 1) (10-12).

U ssaków wywołane zapłodnieniem oscylacje $[Ca^{2+}]_i$ utrzymują się przez kilka-kilkanaście godzin. U myszy zaczynają się one po 1-2 minutach od momentu fuzji błon oocytu i plemnika i trwają 3-5 godzin, do momen-



Ryc. 1. Mechanizm generowania oscylacji $[Ca^{2+}]_i$ w oocytach ssaków. Plemnik wprowadza do cytoplazmy oocytu fosfolipazę C zeta (PLCzeta), która hydrolizuje PIP_2 do DAG i IP_3 . IP_3 wiąże się z receptorem IP_3R1 , pełniącym też funkcję kanału Ca^{2+} , umożliwiając wypływ jonów Ca^{2+} ze światła retikulum endoplazmatycznego (ER) do cytoplazmy. W tym samym czasie aktywność pompy SERCA jest hamowana przez kalneksynę, kalretikulinę i ERp57. Gdy stężenie jonów Ca^{2+} w cytoplazmie oocytu wzrasta, a w świetle ER maleje, aktywność IP_3R1 zostaje zahamowana m.in. przez interakcje z ERp44. Białka kalneksyna, kalretikulina i ERp57 odłączają się od SERCA, aktywując pompę i umożliwiając powrót jonów Ca^{2+} z powrotem do światła ER. Dodatkowo opróżnienie ER z jonów Ca^{2+} aktywuje napływ Ca^{2+} ze środowiska zewnętrznego do komórki. Proces ten jest regulowany przez białko STIM1 aktywujące błonowy kanał wapniowy ORAI1. Cyklicznie powtarzający się wypływ jonów Ca^{2+} do cytoplazmy i ich powrót do światła ER tworzy oscylacje $[Ca^{2+}]_i$ aktywujące rozwój zarodkowy ssaków.

tu rozpoczęcia interfazy pierwszego cyklu zarodkowego, czyli wytworzenia przedjądrzy (jąder interfazowych zygoty) (13, 14). Głównym mechanizmem wygaszania oscylacji $[Ca^{2+}]_i$ jest sekwestracja fosfolipazy C zeta przez przedjądrza (15, 16). W interfazie dochodzi też do defosforylacji IP_3R1 , hamującej czynność receptora i sprzyjającej zanikowi oscylacji $[Ca^{2+}]_i$ (17). Co więcej, pod wpływem wiązania IP_3 receptory IP_3R1 ulegają z czasem ubikwitynacji i degradacji (18).

FUNKCJE OSCYLACJI $[Ca^{2+}]_i$

W zapłodnionym oocycie oscylacje $[Ca^{2+}]_i$ inicjują wiele procesów komórkowych. Wywołanie każdego z nich wymaga, by $[Ca^{2+}]_i$ było podniesione przez odpowiednio długi czas, to znaczy by doszło do odpowiedniej liczby wyrzutów Ca^{2+} . Do wznowienia

II podziału mejozy wystarczy nawet pojedynczy wyrzut Ca^{2+} , ale do jego poprawnego ukończenia i inicjacji interazy pierwszego cyklu zarodkowego potrzeba dłuższych oscylacji $[Ca^{2+}]_i$. Powtarzające się wyrzuty Ca^{2+} są też konieczne do ustanowienia bloku przeciwko polispermii, rozpoczęcia rekrutacji matczynej mRNA i syntezy nowych białek, potrzebnych do aktywacji genomu zarodkowego (19).

Do ukończenia mejozy w oocytach niezbędne jest obniżenie aktywności dwóch czynników: kompleksu MPF (ang. *M-phase promoting factor*), składającego się z cykliny B1 i kinazy CDK1 (ang. *cyclin-dependent kinase 1*), oraz kinazy MAP (4). Wzrost $[Ca^{2+}]_i$ aktywuje kinazę białkową CaMKII (ang. *Ca²⁺/calmodulin-dependent kinase II*) (20). Aktywna CaMKII wraz z kinazą PLK1 fosforyluje białko EMI2, będące inhibitorem białka CDC20 niezbędnego do aktywacji kompleksu inicjującego anafazę APC/C (ang. *anaphase promoting complex/cyclosome*). Ufosforylowane EMI2 zostaje skierowane do degradacji, uwalniając tym samym białko CDC20 i aktywując APC/C. Aktywacja APC/C, pełniącego w komórce funkcję ligazy ubikwityny, umożliwia degradację cykliny B1, prowadząc tym samym do spadku aktywności MPF, oraz sekuryny, pozwalając na rozdział chromatyd (21-23). CaMKII aktywuje też kinazę WEE1B, która fosforyluje kinazę CDK1, dodatkowo przyczynia się do inaktywacji MPF (24). Po pewnym czasie (w mysich zygotach po 2 godzinach od rozpoczęcia oscylacji) skutkuje to obniżeniem aktywności kinazy MAP (25).

Niektóre badania sugerują jednak mniej bezpośredni udział jonów Ca^{2+} w aktywacji rozwoju zarodka, wykazując, że rola wyrzutów Ca^{2+} polega głównie na inicjowaniu egzocytozy jonów cynku (26). Obniżenie stężenia jonów cynku w oocycie wystarcza do prawidłowej i całkowitej aktywacji oocytu, nawet przy braku oscylacji $[Ca^{2+}]_i$ (27). Aby zatem w pełni wyjaśnić mechanizm łączący oscylacje $[Ca^{2+}]_i$ ze wznowieniem mejozy i rozpoczęciem interazy pierwszego cyklu komórkowego zarodka, potrzeba dalszych badań.

Oscylacje $[Ca^{2+}]_i$ prowadzą także do powstania bloku przeciwko polispermii, indukując tzw. reakcję korową, czyli egzocytozę zawartości ziaren korowych do przestrzeni okołozótkowej otaczającej oocyt. Ziarna korowe wywodzą się z cystern aparatu Golgiego i są zlokalizowane w warstwie korykalnej cytoplazmy oocytu. Zawarte w nich enzymy, m.in. glikozyłazy i proteazy, modyfikują osłonkę przejrzystą, czyniąc ją nieprzenikalną dla plemników (28). Choć dokładny mechanizm łączący wzrost $[Ca^{2+}]_i$ i reakcję korową nie jest dokładnie poznany, wydaje się, że podwyższone $[Ca^{2+}]_i$ umożliwia reorganizację cytoszkieletu w warstwie korykalnej oocytu i przesunięcie się ziaren korowych pod błonę komórki. Ca^{2+} wraz z DAG powstałym w czasie hydrolizy PIP_2 aktywuje na przykład konwencjonalne kinazy białkowe C (ang. *conventional protein kinase C* – cPKC), które regulują strukturę cytoszkieletu oocytu poprzez oddziaływanie z białkami MARCKS (29, 30). Wzrost $[Ca^{2+}]_i$ aktywuje też kinazę

lekkich łańcuchów miozyny (ang. *myosin light chain kinase* – MLCK), co pobudza aktywność miozyny i najprawdopodobniej umożliwia przesuwanie się ziaren korowych w pobliże błony komórkowej wzdłuż filamentów aktynowych (31).

Wywołane wniknięciem plemnika oscylacje $[Ca^{2+}]_i$ przenoszą się również na teren mitochondriów, stymulując aktywność tych organelli. W czasie wzrostu $[Ca^{2+}]_i$ dochodzi najpierw do redukcji NAD^+ oraz flawoproteiny, a następnie do ich utlenienia w łańcuchu oddechowym, co pobudza produkcję ATP (32, 33). W czasie zapłodnienia poziom ATP w komórce wzrasta znacząco już w czasie pierwszego wyrzutu Ca^{2+} . Kolejny wzrost poziomu ATP następuje po ok. godzinie od zapłodnienia. Po zakończeniu oscylacji $[Ca^{2+}]_i$ ilość ATP wraca do poziomu wyjściowego (32, 33). ATP wykorzystywane jest do napędzania procesów komórkowych zachodzących w nowo powstałym zarodku, a także do podtrzymania oscylacji $[Ca^{2+}]_i$, np. poprzez umożliwienie funkcjonowania pompy SERCA (34).

Wywołany zapłodnieniem wzrost $[Ca^{2+}]_i$ reguluje również translację mRNA zgromadzonych w oocycie w czasie oogenezy, co z kolei warunkuje aktywację genomu zarodkowego (35, 36). Choć dokładny mechanizm tego procesu nie jest jeszcze poznany, wydaje się, że może być w niego zaangażowana kinaza CaMKII i fosforylowane przez nią białka CPEB (ang. *cytoplasmic polyadenylation element binding protein*) regulujące translację (37).

Liczba wyrzutów Ca^{2+} i ich sumaryczny czas trwania w czasie aktywacji oocytu wpływają też na późniejszy rozwój zarodków. Wzór ekspresji genów w zarodkach w stadium blastocysty, czyli tuż przed implantacją, w których eksperymentalnie wygaszono lub zintensyfikowano oscylacje $[Ca^{2+}]_i$ wkrótce po zapłodnieniu, jest inny niż w zarodkach kontrolnych. W pierwszym wypadku (wygaszenie oscylacji $[Ca^{2+}]_i$) odmiennej ekspresji ulegają geny kodujące białka zaangażowane w powstawanie i obróbkę mRNA, cykl komórkowy, a także w adhezję komórek, co może tłumaczyć zaburzenia w implantacji takich zarodków (38). W drugim wypadku (intensyfikacja oscylacji $[Ca^{2+}]_i$) zarejestrowano różnice w poziomie ekspresji genów regulujących metabolizm komórki. Dodatkowo takie zarodki znacznie słabiej rozwijały się po implantacji (38).

Jednym z czynników zaburzających przebieg oscylacji $[Ca^{2+}]_i$ i w rezultacie pogarszających potencjał rozwojowy zarodków jest proces starzenia. W wypadku oocytów wyróżniamy starzenie poowulacyjne, związane z nadmiernym wydłużeniem okresu między owulacją a zapłodnieniem, oraz starzenie matczyne, wynikające z późnego wieku reprodukcyjnego samicy.

WPŁYW STARZENIA POOWULACYJNEGO NA OSCYLACJE $[Ca^{2+}]_i$

W naturalnych warunkach oocytu są zapładniane wkrótce po owulacji. U myszy optymalny czas dla zapłodnienia trwa do 8-12 godzin po owulacji, natomiast u człowieka zapłodnienie powinno wystąpić w czasie

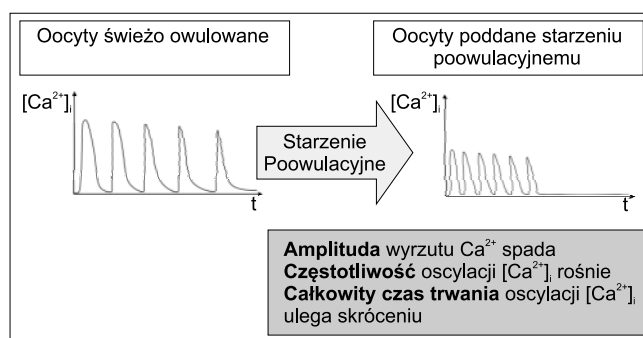
krótszym niż 24 godziny od owulacji (39, 40). Terminem „starzenie poowulacyjne” określa się wydłużający się czas między owulacją a zapłodnieniem. Często dochodzi do niego w wyniku stosowania technik wspomaganego rozrodu – czy to przy sztucznym zapłodnieniu zwierząt hodowlanych, czy przy leczeniu niepłodności u ludzi. Zmiany towarzyszące starzeniu poowulacyjnemu negatywnie wpływają na przebieg zapłodnienia i dalszy rozwój zarodka (40). Istnieją też doniesienia sugerujące, że mogą one prowadzić do problemów zdrowotnych (np. do skrócenia długości życia, problemów z płodnością i aktywnością psycho-motoryczną) u urodzonych zwierząt, a nawet ich potomstwa (41).

W trakcie starzenia poowulacyjnego dochodzi do spadku aktywności MPF i kinazy MAP w oocytach, co prowadzi do ich zwiększonej podatności na spontaniczną (bez udziału plemnika) aktywację (40, 42). Dodatkowo efektywność fuzji między oocytem a plemnikiem zostaje obniżona na skutek zmian w budowie błony komórkowej oraz kortykalnej warstwy cytoskieletu oocytu (43, 44), a także przedwczesnej reakcji korowej prowadzącej do tzw. stwardnienia osłonki przejrzystej (czyli uczynienia jej nieprzenikalną dla plemników) (45).

Starzenie poowulacyjne prowadzi też do zmian epigenetycznych w oocycie, które mogą wpływać negatywnie na potencjał rozwojowy przyszłego zarodka. Zmiany te przejawiają się m.in. w demetylacji genów podlegających piętnu genomowemu (imprintingowi) oraz nadmiernej acetylacji histonów (46, 47). W poddanych starzeniu oocytach obserwuje się też nieprawidłowości w ułożeniu chromosomów oraz budowie wrzeciona podziałowego (40). Niska jakość zarodków uzyskanych z oocytów poddanych starzeniu poowulacyjnemu może także wynikać ze związanej ze starzeniem dysfunkcji mitochondriów: obniżenia ich potencjału błonowego, napęcznienia matriks i spadku produkcji ATP (48, 49). Powszechnie uważa się, że jedną z głównych przyczyn zaburzeń procesów komórkowych związanych ze starzeniem jest stres tlenowy wywołany nagromadzeniem się w komórce reaktywnych form tlenu (ang. *reactive oxygen species* – ROS) (50). Rzeczywiście w czasie starzenia poowulacyjnego w warunkach *in vitro* poziom ROS w oocycie rośnie, a maleje stężenie czynników neutralizujących ROS, np. zredukowanej postaci glutationu (49, 51). Obserwowana jest też wzmożona peroksydacja lipidów błonowych (52).

Oprócz wymienionych powyżej procesów, starzenie poowulacyjne wpływa także znacząco na homeostazę Ca^{2+} w oocycie. W oocytach poddanych starzeniu zmniejszona jest ilość jonów Ca^{2+} zmagazynowanych w ER (53). Mniej jest w nich także mRNA kodującego białka SERCA2A i STIM1 (Sabat i Ajduk, dane niepublikowane). Ponadto w poddanych starzeniu poowulacyjnemu oocytach dochodzi do obniżenia funkcjonalności receptora IP_3R1 , związanej z jego częściową defosforylacją, zmianami w jego lokalizacji (większym rozproszeniem) oraz spadkiem jego wrażliwości na IP_3 (54). Zmiany te przyczyniają się do zaburzenia przebiegu

oscylacji $[Ca^{2+}]_i$ w zapłodnionych „starych” oocytach. Choć bazalne $[Ca^{2+}]_i$ w oocytach świeżo owulowanych i poddanych starzeniu jest taki sam (53), w oocytach poddanych starzeniu amplituda oscylacji $[Ca^{2+}]_i$ jest niższa niż w oocytach zapłodnionych wkrótce po owulacji (55). Co więcej, zwiększa się częstotliwość oscylacji, a skraca ich całkowity czas trwania (55, 56) (ryc. 2). Chociaż czas trwania pojedynczego wyrzutu Ca^{2+} jest podobny w oocytach „młodych” i poddanych starzeniu, dynamika wyrzutu ulega zmianie: szybkość wzrostu $[Ca^{2+}]_i$ i późniejszego spadku $[Ca^{2+}]_i$ w oocytach „starych” jest mniejsza niż w oocytach świeżo owulowanych (55). Może to być spowodowane mniej efektywnym działaniem IP_3R1 oraz SERCA. Ponieważ funkcjonowanie SERCA zależy od ATP, spowolnienie przepompowywania jonów Ca^{2+} z cytoplazmy do ER w oocytach poddanych starzeniu wiąże się najprawdopodobniej z typowym dla takich oocytów uszkodzeniem mitochondriów przez ROS i spadkiem ilości ATP.



Ryc. 2. Wpływ starzenia poowulacyjnego na wzór oscylacji $[Ca^{2+}]_i$ w oocytach myszy

Starzenie poowulacyjne prowadzi w zapłodnionych oocytach myszy do obniżenia amplitudy wyrzutów Ca^{2+} , zwiększenia ich częstotliwości, a także skrócenia całkowitego czasu ich trwania.

Co ciekawe, w wielu oocytach poddanych starzeniu poowulacyjnemu wywołane zapłodnieniem oscylacje $[Ca^{2+}]_i$, zamiast aktywować rozwój zarodka, prowadzą do fragmentacji i śmierci komórki (56). Wydaje się, że jest to spowodowane zwiększoną częstotliwością oscylacji, wywołujących w komórce podobne skutki co długotrwałe podwyższone $[Ca^{2+}]_i$. Badania na komórkach somatycznych wskazują, że nadmierny wzrost $[Ca^{2+}]_i$ może powodować uwolnienie do cytoplazmy cytochromu c, spadek potencjału błonowego mitochondriów i aktywację kaskady kaspaz, prowadząc do apoptozy komórki (57). Rzeczywiście w oocytach poddanych starzeniu spada ekspresja antyapoptotycznego czynnika Bcl-2, hamującego uwalnianie cytochromu c (56). Wydaje się więc, że wrażliwość starzonych poowulacyjnie oocytów na indukcję apoptozy przez oscylacje $[Ca^{2+}]_i$ może wynikać z obniżonego poziomu białek o działaniu antyapoptotycznym.

WPŁYW STARZENIA MATCZYNEGO NA OSCYLACJE $[Ca^{2+}]_i$

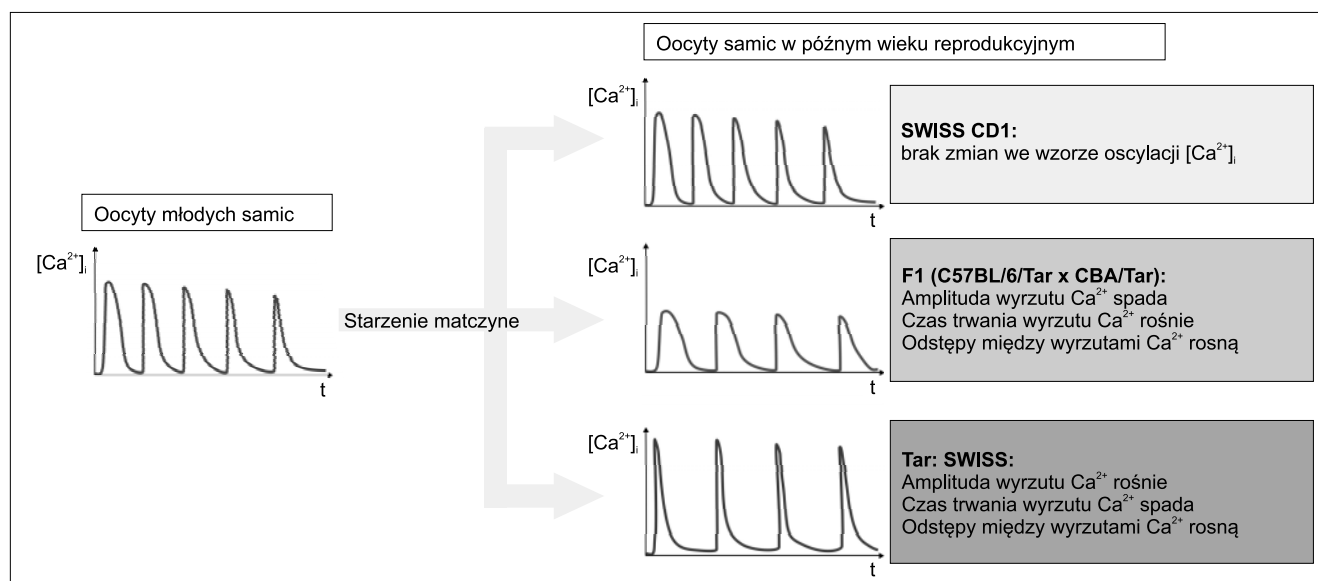
Terminem „starzenie matczyne” określa się proces, w którym oocyt starzeje się w jajnikach samic wraz

z osiąganiem przez nią coraz bardziej zaawansowanego wieku rozrodczego. W czasie starzenia matczynego jakość oocytów spada, co prowadzi do obniżonego potencjału rozwojowego zarodków (np. fragmentacji zarodków na wczesnych etapach rozwoju, podwyższonej częstości apoptozy w blastocystach, problemów z implantacją) i w rezultacie przyczynia się do obniżonej płodności u kobiet po 35 roku życia (58). W oocytach w metafazie II izolowanych od samic w późnym wieku reprodukcyjnym zmienia się profil ekspresji pewnych genów, m.in. genów zaangażowanych w funkcjonowanie mitochondriów, regulację cyklu komórkowego czy organizację cytoszkieletu, (59, 60). Może to być skutkiem zarówno zaburzonego procesu akumulacji, jak i degradacji matczynej RNA. Wyraźne różnice między oocytami młodymi i starszymi samic są również widoczne na poziomie proteomu (61). Wśród białek, których ilość znacząco się zmienia wraz z wiekiem samicy, znajdują się przede wszystkim białka związane z funkcjonowaniem aparatu jądrowego. Skutkuje to często obserwowanymi w „starych” oocytach zaburzeniami organizacji i funkcjonowania chromosomów oraz wrzeczona podziałowego, a co za tym idzie – zwiększoną częstością występowania aneuploidii. Ponadto w oocytach poddanych starzeniu matczynemu zmianie ulega skład fosfolipidowy komórki, co zmniejsza integralność błony komórkowej (62). W oocytach starszych samic myszy obserwowane są również nieprawidłowości dotyczące mitochondriów, takie jak: zmniejszona liczba grzebieni mitochondrialnych, zwiększone tempo mutacji w mitochondrialnym DNA, spadek potencjału błonowego i aktywności metabolicznej mitochondriów, obniżone stężenie ATP oraz zmiany w homeostazie Ca^{2+} mitochondriów (63).

Co ciekawe, wiele wskazuje na to, że owulowane oocyty myszy w późnym wieku reprodukcyjnym ulegają przyspieszonemu, w porównaniu do oocytów młodych myszy, starzeniu poowulacyjnemu. W czasie

starzenia poowulacyjnego w oocytach od starszych myszy dochodzi do szybszego spadku aktywności MPF. Takie oocyty są zatem bardziej podatne na spontaniczną aktywację, a także, jak się wydaje, skierowanie na ścieżkę apoptozy niż poddane starzeniu poowulacyjnemu oocyty młodych myszy (42). W związku z tym okres, gdy może dojść do skutkującego poprawnym rozwojem zarodkowym zapłodnienia, jest skrócony w wypadku oocytów pochodzących od samic w późnym wieku reprodukcyjnym.

Opisane powyżej zmiany zachodzące w oocytach poddanych starzeniu matczynemu dotyczą wielu ważnych aspektów funkcjonowania komórki. Powstało zatem pytanie, czy starzenie matczyne wpływa także na mechanizmy regulujące homeostazę Ca^{2+} w oocytach myszy, a w rezultacie na przebieg wywołanych zapłodnieniem oscylacji $[Ca^{2+}]_i$. Zgodnie z wynikami badań Haverfield i współpracowników (64) ilość Ca^{2+} zmagazynowana w ER oocytu nie zmienia się pod wpływem starzenia matczynego. Po sztucznym obniżeniu $[Ca^{2+}]_i$, oocyty poddane starzeniu matczynemu wykazywały jednak mniejszą zdolność do pobierania Ca^{2+} ze środowiska zewnętrznego. Co ciekawe, zmiany te nie doprowadziły do zaburzenia wzoru oscylacji $[Ca^{2+}]_i$ wywołanych zapłodnieniem – czas trwania, liczba czy amplituda wyrzutów Ca^{2+} generowanych w odpowiedzi na plemnik były takie same, co w oocytach pochodzących od młodych samic (ryc. 3). W oocytach izolowanych ze starych samic oscylacje $[Ca^{2+}]_i$ zaindukowane partenogenetycznie przez inkubację w roztworze $SrCl_2$ charakteryzowały się jednak niższą częstotliwością oraz krótszym całkowitym czasem trwania niż te obserwowane w oocytach młodych samic. Wyniki badań prowadzonych w naszym zespole nie do końca potwierdzają te obserwacje i wskazują, że wpływ starzenia matczynego na homeostazę jonów Ca^{2+} w oocytach może zależeć od tła genetycznego.



Ryc. 3. Wpływ starzenia matczynego na wzór oscylacji $[Ca^{2+}]_i$ w zapłodnionych oocytach myszy. Starzenie matczyne wpływa na wzór oscylacji $[Ca^{2+}]_i$ w zapłodnionych oocytach myszy w sposób zależny od tła genetycznego zwierząt. W oocytach myszy Swiss CD1 starzenie matczyne nie zaburza wzoru oscylacji $[Ca^{2+}]_i$, (64), podczas gdy w oocytach myszy F1 (C57BL/6/Tar x CBA/Tar) i myszy Tar:Swiss istotnie zmienia ich amplitudę, częstotliwość, a także czas trwania pojedynczego wyrzutu Ca^{2+} .

Doświadczenia Haverfield i współpracowników (64) zostały wykonane na oocytach myszy Swiss CD1. Z kolei w naszych badaniach wykorzystaliśmy materiał pochodzący od myszy Tar:Swiss oraz myszy będących pierwszym pokoleniem (F1) krzyżówki szczepów C57BL/6/Tar i CBA/Tar. W zapłodnionych oocytach uzyskanych od samic F1 w późnym wieku rozrodczym poszczególne wyrzuty Ca^{2+} mają niższą amplitudę i są rzadsze, lecz trwają dłużej niż w zapłodnionych oocytach pochodzących od młodych samic F1. Także w wypadku oocytów pochodzących od samic Tar:Swiss częstotliwość oscylacji $[Ca^{2+}]_i$ jest niższa w oocytach „starych” niż w oocytach „młodych”. Jednak w „starych” oocytach samic Tar:Swiss zapłodnienie indukuje wyrzuty Ca^{2+} o wyższej amplitudzie, lecz krótszym czasie trwania niż w oocytach młodych samic Tar:Swiss (ryc. 3). Co więcej, podczas gdy w poddanych starzeniu matczynemu oocytach myszy F1 dochodzi do nieznacznego obniżenia ilości transkryptów dla białek zaangażowanych w utrzymywanie homeostazy wapniowej, w „starych” oocytach samic Tar:Swiss dochodzi głównie do zwiększenia ich ilości (Czajkowska i Ajduk, dane niepublikowane).

PODSUMOWANIE

Wywołane zapłodnieniem oscylacje $[Ca^{2+}]_i$ wywołują w oocycie takie procesy, jak wznowienie i ukończenie mejozy, wytworzenie bloku przeciwko polisper-

mii i aktywacja rozwoju zarodkowego. Homeostaza jonów Ca^{2+} w oocycie jest więc ważna dla prawidłowego przebiegu zapłodnienia i dalszego losu zarodka. Zarówno nadmierne wydłużenie okresu między owulacją a zapłodnieniem, często towarzyszące procedurom wspomaganego rozrodu, jak i zaawansowany reprodukcyjny wiek matki, mogą prowadzić do rozregulowania mechanizmu odpowiedzialnego za utrzymanie homeostazy Ca^{2+} w oocytach, a tym samym do zaburzenia wzoru oscylacji $[Ca^{2+}]_i$ indukowanych przez wniknięcie plemnika. To z kolei może być jedną z przyczyn obniżonych zdolności rozwojowych zarodków uzyskanych z oocytów poddanych starzeniu. Badania poświęcone mechanizmowi regulacji homeostazy Ca^{2+} w oocytach oraz wpływowi, jaki może na niego wyrzucić starzenie poowulacyjne lub matczyne, dają zatem szansę na udoskonalenie metod wspomaganego rozrodu zwierząt i leczenia niepłodności u ludzi.

Podziękowania

Dziękujemy Panu Profesorowi Markowi Maleszewskiemu za uwagi do manuskryptu. Praca została sfinansowana z grantu „Sonata” Narodowego Centrum Nauki (UMO-2012/07/D/NZ5/04301) dla AA i z wewnątrzwydziałowego grantu DSM (dotacji MNiSW na badania dla młodych naukowców) dla KCz.

PIŚMIENNICTWO

- Parekh AB: Decoding cytosolic Ca^{2+} oscillations. *Trends Biochem Sci* 2011; 36: 78-87.
- Saunders CM, Larman MG, Parrington J et al.: PLC zeta: a sperm-specific trigger of Ca^{2+} oscillations in eggs and embryo development. *Development* 2002; 129: 3533-3544.
- Ajduk A, Małagocki A, Maleszewski M: Cytoplasmic maturation of mammalian oocytes: development of a mechanism responsible for sperm-induced Ca^{2+} oscillations. *Reprod Biol* 2008; 8: 3-22.
- Sanders JR, Swann K: Molecular triggers for egg activation at fertilization in mammals. *Reproduction* 2016, REP-16, doi: 10.1530/REP-16-0123.
- Fissore RA, Longo FJ, Anderson E et al.: Differential distribution of inositol triphosphate receptor isoforms in mouse oocytes. *Biol Reprod* 1999; 60: 49-57.
- John LM, Lechleiter JD, Camacho P: Differential modulation of SERCA2 isoforms by calreticulin. *J Cell Biol* 1998; 142: 963-973.
- Li Y, Camacho P: Ca^{2+} -dependent redox modulation of SERCA 2b by ERp57. *J Cell Biol* 2004; 164: 35-46.
- Roderick HL, Lechleiter JD, Camacho P: Cytosolic phosphorylation of calnexin controls intracellular Ca^{2+} oscillations via an interaction with SERCA2b. *J Cell Biol* 2000; 149: 1235-1248.
- Higo T, Hattori M, Nakamura T et al.: Subtype-specific and ER lumenal environment-dependent regulation of inositol 1,4,5-trisphosphate receptor type 1 by ERp44. *Cell* 2005; 120: 85-98.
- Koh S, Lee K, Wang C et al.: STIM1 regulates store-operated Ca^{2+} entry in oocytes. *Dev Biol* 2009; 330: 368-376.
- Gómez-Fernández C, Pozo-Guisado E, Gañán-Parra M et al.: Relocalization of STIM1 in mouse oocytes at fertilization: early involvement of store-operated calcium entry. *Reproduction* 2009; 138: 211-221.
- Wang C, Lee K, Gajdócsi E et al.: Orai1 mediates store-operated Ca^{2+} entry during fertilization in mammalian oocytes. *Dev Biol* 2012; 365: 414-423.
- Lawrence Y, Whitaker M, Swann K: Sperm-egg fusion is the prelude to the initial Ca^{2+} increase at fertilization in the mouse. *Development* 1997; 124: 233-241.
- Marangos P, FitzHarris G, Carroll J: Ca^{2+} oscillations at fertilization in mammals are regulated by the formation of pronuclei. *Development* 2003; 130: 1461-1472.
- Larman MG, Saunders CM, Carroll J et al.: Cell cycle-dependent Ca^{2+} oscillations in mouse embryos are regulated by nuclear targeting of PLC-zeta. *J Cell Sci* 2004; 117: 2513-2521.
- Yoda A, Oda S, Shikano T et al.: Ca^{2+} oscillation-inducing phospholipase C zeta expressed in mouse eggs is accumulated to the pronucleus during egg activation. *Dev Biol* 2004; 268: 245-257.
- Lee B, Vermassen E, Yoon SY et al.: Phosphorylation of IP3R1 and the regulation of $[Ca^{2+}]_i$ responses at fertilization: a role for the MAP kinase pathway. *Development* 2006; 133: 4355-4365.
- Jellerette T, He CL, Wu H et al.: Down-regulation of the inositol 1,4,5-trisphosphate receptor in mouse eggs following fertilization or parthenogenetic activation. *Dev Biol* 2000; 223: 238-250.
- Ducibella T, Huneau D, Angelichio E et al.: Egg-to-embryo transition is driven by differential responses to Ca^{2+} oscillation number. *Dev Biol* 2002; 250: 280-291.
- Markoulaki S, Matson S, Ducibella T: Fertilization stimulates long-lasting oscillations of CAMKII activity in mouse eggs. *Dev Biol* 2004; 272: 15-25.
- Shoji S, Yoshida N, Amanai M et al.: Mammalian Emi2 mediates cytosolic arrest and transduces the signal for meiotic exit via Cdc20. *Embo J* 2006; 25: 834-845.
- Madgwick S, Hansen DV, Levasseur M et al.: Mouse Emi2 is required to enter meiosis II by reestablishing cyclin B1 during interkinesis. *J Cell Biol* 2006; 174: 791-801.
- Madgwick S, Nixon VI, Chang HY et al.: Maintenance of sister chromatid attachment in mouse eggs through maturation-promoting factor activity. *Dev Biol* 2004; 275: 68-81.
- Oh JS, Susor A, Conti M: Protein tyrosine kinase WEE1B is essential for metaphase II exit in mouse oocytes. *Science* 2011; 332: 462-465.
- Gonzalez-Garcia JR, Bradley J, Nomikos M et al.: The dynamics of MAPK inactivation at fertilization in mouse eggs. *J Cell Sci* 2014; 127: 2749-2760.
- Kim AM, Bernhardt ML, Kong BY et al.: Zinc sparks are triggered by fertilization and facilitate cell cycle resumption in mammalian eggs. *ACS Chem Biol* 2011; 6: 716-723.
- Suzuki T, Yoshida N, Suzuki E et al.: Full-term mouse development by abolishing Zn^{2+} -dependent metaphase II arrest without Ca^{2+} release. *Development* 2010; 137: 2659-2669.
- Liu M: The biology and dynamics of mammalian cortical granules. *Reprod Biol Endocrinol* 2011; 9: 149.
- Eliyahu E, Shtraizent N, Tsaadon A et al.: Association between myristoylated alanine-rich C kinase substrate (MARCKS) translocation and cortical granule exocytosis in rat eggs. *Reproduction* 2006; 131: 221-231.

30. Tsaadon L, Kaplan-Kraicer R, Shalgi R: Myristoylated alanine-rich C kinase substrate, but not Ca^{2+} /calmodulin-dependent protein kinase II, is the mediator in cortical granules exocytosis. *Reproduction* 2008; 135: 613-624.
31. Matson S, Markoulaki S, Ducibella T: Antagonists of myosin light chain kinase and of myosin II inhibit specific events of egg activation in fertilized mouse eggs. *Biol Reprod* 2006; 74: 169-176.
32. Dumollard R, Campbell K, Halet G et al.: Regulation of cytosolic and mitochondrial ATP levels in mouse eggs and zygotes. *Dev Biol* 2008; 316: 431-440.
33. Campbell K, Swann K: Ca^{2+} oscillations stimulate an ATP increase during fertilization of mouse eggs. *Dev Biol* 2006; 298: 225-233.
34. Dumollard R, Marangos P, Fitzharris G et al.: Sperm-triggered $[Ca^{2+}]_i$ oscillations and Ca^{2+} homeostasis in the mouse egg have an absolute requirement for mitochondrial ATP production. *Development* 2004; 131: 3057-3067.
35. Aoki F, Hara KT, Schultz RM: Acquisition of transcriptional competence in the 1-cell mouse embryo: requirement for recruitment of maternal mRNAs. *Mol Reprod Dev* 2003; 64: 270-274.
36. Hara KT, Oda S, Naito K et al.: Cyclin A2-CDK2 regulates embryonic gene activation in 1-cell mouse embryos. *Dev Biol* 2005; 286: 102-113.
37. Ivshina M, Lasko P, Richter JD: Cytoplasmic polyadenylation element binding proteins in development, health, and disease. *Annu Rev Cell Dev Biol* 2014; 30: 393-415.
38. Ozil JP, Banrezes B, Toth S et al.: Ca^{2+} oscillatory pattern in fertilized mouse eggs affects gene expression and development to term. *Dev Biol* 2006; 300: 534-544.
39. Wilcox AJ, Weinberg CR, Baird DD: Post-ovulatory ageing of the human oocyte and embryo failure. *Hum Reprod* 1998; 13: 394-397.
40. Miao YL, Kikuchi K, Sun QY et al.: Oocyte aging: cellular and molecular changes, developmental potential and reversal possibility. *Hum Reprod Update* 2009; 1: 1-13.
41. Tarin JJ, Pérez-Albalá S, Pérez-Hoyos S et al.: Postovulatory aging of oocytes decreases reproductive fitness and longevity of offspring. *Biol Reprod* 2002; 66: 495-499.
42. Tatone C, Carbone MC, Gallo R et al.: Age-associated changes in mouse oocytes during postovulatory *in vitro* culture: possible role for meiotic kinases and survival factor BCL2. *Biol Reprod* 2006; 74: 395-402.
43. Wortzman GB, Evans JP: Membrane and cortical abnormalities in post-ovulatory aged eggs: analysis of fertilizability and establishment of the membrane block to polyspermy. *Mol Hum Reprod* 2005; 11: 1-9.
44. Mackenzie AC, Kyle DD, McGinnis LA et al.: Cortical mechanics and myosin-II abnormalities associated with post-ovulatory aging: implications for functional defects in aged eggs. *Mol Hum Reprod* 2016; 22: 397-409.
45. Ducibella T, Duffy P, Reindollar R et al.: Changes in the distribution of mouse oocyte cortical granules and ability to undergo the cortical reaction during gonadotropin-stimulated meiotic maturation and aging *in vivo*. *Biol Reprod* 1990; 43: 870-876.
46. Liang XW, Zhu JQ, Miao YL et al.: Loss of methylation imprint of Snrpn in postovulatory aging mouse oocyte. *Biochem Biophys Res Commun* 2008; 371: 16-21.
47. Huang JC, Yan LY, Lei ZL et al.: Changes in histone acetylation during postovulatory aging of mouse oocyte. *Biol Reprod* 2007; 77: 666-670.
48. Wilding M, Dale B, Marino M et al.: Mitochondrial aggregation patterns and activity in human oocytes and preimplantation embryos. *Hum Reprod* 2001; 16: 909-917.
49. Hao Z, Liu S, Wu Y et al.: Abnormal changes in mitochondria, lipid droplets, ATP and glutathione content, and Ca^{2+} release after electro-activation contribute to poor developmental competence of porcine oocyte during *in vitro* ageing. *Reprod Fertil Dev* 2009; 21: 323-332.
50. Harman D: Aging: a theory based on free radical and radiation chemistry 1955.
51. Boerjan ML, De Boer P: First cell cycle of zygotes of the mouse derived from oocytes aged postovulation *in vivo* and fertilized *in vivo*. *Mol Reprod Dev* 1990; 25: 155-163.
52. Takahashi T, Takahashi E, Igarashi H et al.: Impact of oxidative stress in aged mouse oocytes on calcium oscillations at fertilization. *Mol Reprod Dev* 2003; 66: 143-152.
53. Takahashi T, Saito H, Hiroi M, Takahashi E: Effects of aging on inositol 1, 4, 5-triphosphate-induced Ca^{2+} release in unfertilized mouse oocytes. *Mol Reprod Dev* 2000; 55: 299-306.
54. Zhang N, Wakai T, Fissore R: Caffeine alleviates the deterioration of Ca^{2+} release mechanisms and fragmentation of *in vitro*-aged mouse eggs. *Mol Reprod Dev* 2011; 78: 684-701.
55. Igarashi H, Takahashi E, Hiroi M: Aging-related changes in calcium oscillations in fertilized mouse oocytes. *Mol Reprod Dev* 1997; 48: 383-390.
56. Gordo AC, Rodrigues P, Kurokawa M et al.: Intracellular calcium oscillations signal apoptosis rather than activation in *in vitro* aged mouse eggs. *Biol Reprod* 2002; 66: 1828-1837.
57. Szalai G, Krishnamurthy R, Hajnóczky G: Apoptosis driven by IP3-linked mitochondrial calcium signals. *EMBO J* 1999; 18: 6349-6361.
58. Qiao J, Wang ZB, Feng HL et al.: The root of reduced fertility in aged women and possible therapeutic options: current status and future prospects. *Mol Aspects Med* 2014; 38: 54-85.
59. Pan H, Ma P, Zhu W et al.: Age-associated increase in aneuploidy and changes in gene expression in mouse eggs. *Dev Biol* 2008; 316: 397-407.
60. Grondahl ML, Yding Andersen C, Bogstad J et al.: Gene expression profiles of single human mature oocytes in relation to age. *Hum Reprod* 2010; 25: 957-968.
61. Schwarzer C, Siatkowski M, Pfeiffer MJ et al.: Maternal age effect on mouse oocytes: new biological insight from proteomic analysis. *Reproduction* 2014; 148: 55-72.
62. Mok HJ, Shin H, Lee JW et al.: Age-Associated Lipidome Changes in Metaphase II Mouse Oocytes. *PLoS ONE* 2016; 11: e0148577.
63. Eichenlaub-Ritter U, Wieczorek M, Lüke S, Seidel T: Age related changes in mitochondrial function and new approaches to study redox regulation in mammalian oocytes in response to age or maturation conditions. *Mitochondrion* 2011; 11: 783-796.
64. Haverfield J, Nakagawa S, Love D et al.: Ca^{2+} dynamics in oocytes from naturally-aged mice. *Scientific Reports* 2016, 6.

otrzymano/received: 10.11.2016
zaakceptowano/accepted: 29.11.2016