

CYCLIN DEPENDENT KINASE 5 (CDK 5) IN DEVELOPING OVARIAN FOLLICLES, OOCYTES AND EMBRYOS OF MOUSE

CYKLIN DEPENDENTNÍ KINÁZA 5 (CDK 5) VE VYVÍJEJÍCÍCH SE OVARIÁLNÍCH FOLIKULECH, OOCYTECH A EMBRYÍCH MYŠI

Špicarová Z., Míčková M., Kohoutek J., Hampl A.

Laboratoř molekulární embryologie, Agronomická fakulta, Mendelova zemědělská a lesnická univerzita v Brně, Zemědělská 1, 613 00 Brno, Česká republika.

E-mail: zuzana.spic@post.cz

ABSTRACT

Cyclin dependent kinase 5 (CDK5) is a member of the cyclin dependent kinase family. Despite of its close sequence homology to CDK1, CDK5 is not involved in cell cycle regulation. Its function is linked primarily to development and function of nervous system. Unlike other members of the CDK family, CDK5 is active only when complexed with p35 and/or p39 proteins instead of standard cyclin. We and others observed high expression of CDK5 in mouse ovaries. To address this expression in more detail, spatiotemporal distribution of CDK5 in developing ovarian follicles, growing and meiotically maturing oocytes, and in early embryos was determined. In growing oocytes the level of CDK5 continuously increases until reaching its maximum in fully grown GV stage oocytes. After resumption of meiotic maturation the level of CDK5 slightly decreases and then stays constant until the first mitotic division. Significantly lower level of CDK5 compared to oocytes and 2-cell embryos was observed in blastocysts. Dramatic changes were observed in localization of CDK5. While CDK5 is localized to the nucleus of primary oocyte and to the granulosa cells in preantral follicles, granulosa cells of antral follicles are completely CDK5 negative. After resumption of meiotic maturation CDK5 becomes localized to metaphase spindles, in both metaphase I and II. After fertilization CDK5 is detected in male and female pronuclei. This nuclear localisation is lost in 2-cell embryos.

ABSTRAKT

Cyklin dependentní kináza 5 (CDK5) patří do rodiny cyklin dependentních kináz. Přes vysokou sekvenční homologii s CDK 1 se nepodílí na regulaci buněčného cyklu. Její funkce je spjata především s vývojem a funkcemi nervového systému. Narozdíl od dalších členů rodiny CDK aktivovaných cyklinem, je CDK5 aktivní v komplexu s proteinem p35 a/nebo

p39. V naší i jiných laboratořích byla pozorována vysoká exprese CDK5 v myším ovariu. Pro detailnější charakterizaci této exprese jsme analyzovali časovou a prostorovou distribuci CDK5 během vývoje ovariálního folikulu, v rostoucích a meioticky maturujících oocytech a během časně embryogeneze. V rostoucích oocytech hladina CDK5 kontinuálně vzrůstá, až dosáhne svého maxima v zcela dorostlých oocytech ve stadiu zárodečného váčku. Její hladina roste s během růstu oocyty, nejvyšší hodnoty dosáhne v zcela dorostlých GV oocytech. Se znovuzahájením meiózy mírně klesá a zůstává konstantní až do prvního mitotického dělení. Výrazně nižší hladina CDK5 v porovnání s oocyty a dvoubuněčnými embryi byla pozorována v blastocystách. Výraznější změny byly zaznamenány v lokalizaci CDK5. Zatímco v preantrálních folikulech byla CDK5 lokalizována v jádře primárního oocyty i v granulózních buňkách folikulu, ve zralém antrálním folikulu byly granulózní buňky CDK5 negativní. Po znovuzahájení meiózy je možné pozorovat kumulaci CDK 5 kolem metafázního vřeténka v metafázi I i metafázi II. Po fertilizaci je CDK 5 detekována v samčím a samičím prvojádře. Jaderná lokalizace CDK5 v dvoubuněčných embryích chybí.

ÚVOD

Samčí i samičí pohlavní buňky (gamety) jsou narození od somatických buněk haploidní. Redukce genetického materiálu probíhá během jedinečného typu buněčného cyklu-meiózy.

Od mitotického buněčného dělení s fázemi G1-S-G2-M se meióza liší tím, že po interfázi následují dvě M fáze bez syntetické fáze.

U obratlovců se samičí gamety vyvíjí z primordiálních zárodečných buněk. Ve vyvíjejících se ováriích dochází k mitotické proliferaci oogonií a jejich diferenciaci na primární oocyty, které vstupují do meiotického dělení. Jako primární oocyt se označuje tetraploidní buňka, jejíž vývoj je zastaven v diplotene profáze prvního meiotického dělení. Primární oocyt roste a stává se tzv. meioticky kompetentní, tj. schopný úspěšně dokončit meiotické dělení. Primární oocyt obsahuje relativně velké jádro, tzv. zárodečný váček (germinal vesicle, GV), proto je také označován jako oocyt ve stadiu GV. Dokončením prvního meiotického dělení vznikají dvě diploidní buňky- sekundární oocyt a první polární tělísko. Sekundární oocyt ihned vstupuje do druhého meiotického dělení a jeho vývoj je zastaven v metafázi druhého meiotického dělení. Až fertilizace, nebo partenogenetická aktivace zahájí dokončení meiózy, tedy vstup do anafáze a vyloučení druhého polárního tělíska. Celý tento složitý děj je velmi přesně a koordinovaně řízen sítí signálních molekul,

především kináz, přičemž klíčovou roli v něm hraje tzv. MPF (M-phase promoting faktor) sestávající z komplexu cyklin dependentní kinázy 1 (CDK 1) a cyklinu B.

Vývoj oocyty je velmi úzce spjat s dalším typem buněk ovarií. Jde o somatické folikulární buňky obklopující oocyt, s kterým vytváří tzv. folikul. Nejjednodušším typem je primordiální folikul (folikulární buňky jsou dlaždicovité, vytváří kolem oocyty jednu vrstvu), z něhož se vyvíjí jednovrstevný primární folikul (folikulární buňky jsou kubické). Folikulární buňky se dále dělí a vytváří kolem oocyty tzv. *stratum granulosum*, jde o primární mnohovrstevný folikul. Po rozestoupení folikulárních buněk, vytvoření dutiny (*antrum*) vyplněné folikulární tekutinou, vzniká konečný typ-Graafův folikul.

Cyklin dependentní kináza 5 (CDK 5) je enzym patřící do rodiny cyklin dependentních kináz. Na rozdíl od většiny CDK se CDK 5 neuplatňuje při regulaci průchodu buňky buněčným cyklem. Dosud prostudované funkce CDK 5 souvisí s vývojem a funkcí nervového systému. CDK 5 se podílí na diferenciaci neuronů, migraci, apoptóze. CDK 5 byla dále identifikována jako regulátor exocytózy (Fletcher et al., 1999) a endocytózy (Tan et al., 2003). Kromě nervové soustavy byla CDK 5 identifikována jako regulátor svalové diferenciaci u drápatky (Philpott et al., 1997)

CDK 5 nemá narozdíl od ostatních CDK aktivujícího regulačního partnera cyklinového typu. Hlavními aktivačními partnery CDK 5 jsou p35 a p39. Během apoptózy dochází

k proteolytickému štěpení p35 kalcainem na aktivnější p25 (Patrick et. al., 1999). CDK 5 se může vázat i s cyklinem D (Guidato et al., 1998) a cyklinem E (Miyajima et al., 1995), ale tyto komplexy nevykazují kinázovou aktivitu.

METODIKA

V experimentech byl použit biologický materiál izolovaný ze samic F1 generace, které byly získány křížením samců kmene BALB/c a samic kmene C57BL/6J.

Zvířata byla usmrcena cervikální dislokací.

Rostoucí oocyty byly získány z ovarií myší starých 13, 15 a 19 dní. Ovaria byla vyjmuta do media a pomocí injekční jehly roztrhána. Skleněnou pipetou byly sklizeny oocyty s dobře viditelným zárodečným váčkem.

Z 24 denních myší, 46-48h po hormonální stimulaci PMSG, byla vypreparována ovaria do 35 mm petriho misky s MEM/BSA mediem. Poté byla injekčními jehlami roztrhána a pomocí skleněné pipety byly vybrány komplexy zralých GV oocytů s granulózními

buňkami *corona radiata*. Automatickou pipetou byly komplexy opakovaně nasávány a vypouštěny, dokud se z oocyty neuvolnily granulózní buňky. Takto získané GV oocyty byly buďto sklizeny, nebo ponechány v mediu a kultivovány v 5% atmosféře CO₂ při 37°C. Oocyty vstoupily do meiotické maturace a po 7h byly sklizeny oocyty v metafázi prvního meiotického dělení (MI). Oocyty v metafázi druhého meiotického dělení (MII) jsme získali z vejcovodů myši nastimulovaných nejprve PMSG a po 46-48h byly myši nastimulovány hCG. Po 15h byly z vejcovodů izolovány kumuly MII oocytů s expandovanými granulózními buňkami. Působením hyaluronidázy (100 µg/ml, 5 min) došlo k uvolnění MII oocytů.

Embrya byla získána *in vitro* fertilizací (IVF). Kumuly MII oocytů s expandovanými granulózními buňkami byly přeneseny do MEM media s 5% FCS. Poté byly promyty v MEM/BSA mediu a přeneseny do media s kapacitovanými spermii. Byla sklizena tato stadia : 6h po IVF jednobuněčná embrya s rozlišitelnými prvojádry, 24h po IVF dvoubuněčná embrya a 72h po IVF blastocysty. Všechny oocyty a embrya byla kultivována v MEM/BSA mediu v 5% atmosféře CO₂ při 37°C. Pouze pro růst embrya do stadia blastocysty byla dvoubuněčná embrya přenesena do KSOM media, kde byla dále kultivována v 5% atmosféře CO₂ při 37°C.

Analýza přítomnosti a množství CDK 5 byla provedena western blot analýzou. Buňky byly promyty v PBS, lyzovány 2x Leammlí pufrům do konečného objemu 14 µl a 5 min povařeny. Každý vzorek obsahoval 15 oocytů, respektive embryí. Proteiny byly separovány na 10% polyakrylamidovém gelu v přítomnosti SDS (SDS-PAGE) 70-80 min při 150V. Proteiny byly z gelu přeneseny na PVDF membránu (elektroblotting, 1h, 100V). Membrána byla blokována 1h v 5% odtučněném mléce, inkubována přes noc při 4°C s primární protilátkou (polyklonální králičí Ab, sc-173) ředěnou 1:1000 v mléce. Membrána byla promyta 4x10min v TBST, inkubována se sekundární protilátkou ředěnou 1:5000 konjugovanou s křenovou peroxidázou (anti králičí, PNIM 0831) 1h při pokojové teplotě a 4x10min promyta v TBST. Po přidání ECL substrátu proběhla chemiluminiscenční reakce, proteiny byly zviditelněny na filmu.

Pro imunohistochemickou analýzu byly použity řezy ovarií. Ovaria byla fixována ve 4% paraformaldehydu přes noc při 4°C. Po opláchnutí v PBS byla odvodněna vzestupnou etanolovou řadou (65%, 80%, 95%, 3x100% EtOH, po 1h při 4°C). Dále byla inkubována v rozpuštěném polyesterovém vosku přes noc. Ovaria byla zalita voskem do bločků, které byly po zatuhnutí vosku nařezány na mikrotomu. Řezy byly umístěny na podložní sklo. Pro odstranění vosku byly 3x10min promyty ve 100% EtOH. Rehydratace řezů proběhla v

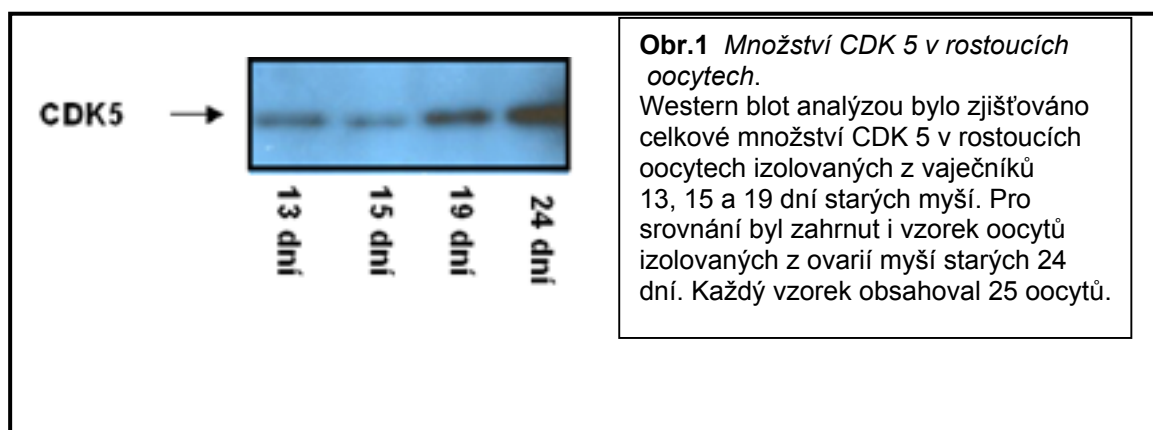
sestupné etanolové řadě (95%, 80%, 70% EtOH po 5 min). Dalším krokem byla inkubace v blokovacím roztoku (PBS+1%BSA+ 0,05% Tween+ 0,01% NaN₃) 1h při pokojové teplotě. V primární protilátce (sc-173) ředěné 1:200 byly řezy ponechány přes noc při 4°C. Po promytí 3x15 min v PBS+0,05%Tween byly řezy inkubovány se sekundární protilátkou konjugovanou s FITC (sc-xxxx) ředěnou 1:200. DNA je barvena propidium jodidem 5 min. Po opláchnutí v PBS+0,05% Tween byly řezy zality mowiolem a přikryty krycím sklem. Protilátky byly ředěny blokovacím roztokem.

Pro imunocytochemickou analýzu byly oocyty a embrya zbaveny *zona pellucida* inkubací s proteázou (1mg/ml). Buňky byly opláchnuty v PBS+PVP a fixovány ve 4% paraformaldehydu (přes noc, 4°C). Po opláchnutí v PBS+PVP byly buňky dofixovány v roztoku 95% etanolu + 1% kyseliny octové (30min, 4°C) a sestupnou etanolovou řadou (90%, 75%, 50% etanol) převedeny do PBS+PVP. V blokovacím roztoku (1% BSA, 0,1% Triton-X v PBS, pH 7,4) došlo k permeabilizaci plazmatické membrány (1h při pokojové teplotě). Buňky byly inkubovány s primární protilátkou anti-CDK 5 (polyklonální králíčí, sc-173) ředěnou 1:300 v roztoku PBS+ 3%NGS+ 0,05%BSA+ 0,01%NaN₃ + 0,05%TWEEN (4°C, přes noc). Následující den byly buňky promyty 4x15min v PBS+PVP a inkubovány v sekundární protilátce konjugované s FITC (Alexa fluor 488) ředěné 1:300 v PBS+PVP (1h, při pokojové teplotě). Po promytí 4x15min v PBS+PVP byly buňky převedeny do mowiolu, poté přeneseny na podložní sklo, zakápnuty mowiolem a 1μl propidium jodidu a přikryty krycím sklíčkem.

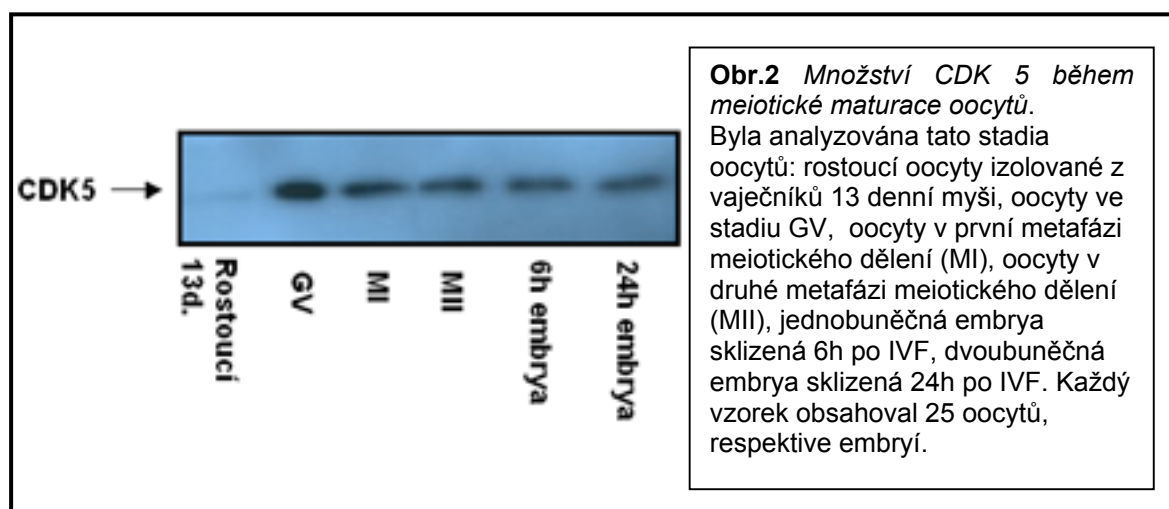
VÝSLEDKY A DISKUZE

Jelikož v myším ovariu bylo detekováno velké množství CDK 5, chtěli jsme tento jev charakterizovat blíže. Ovarium obsahuje více typů buněk. Kromě rostoucích a zralých GV oocytů tu jsou i buňky somatické a to buňky tvořící folikuly a buňky stromální.

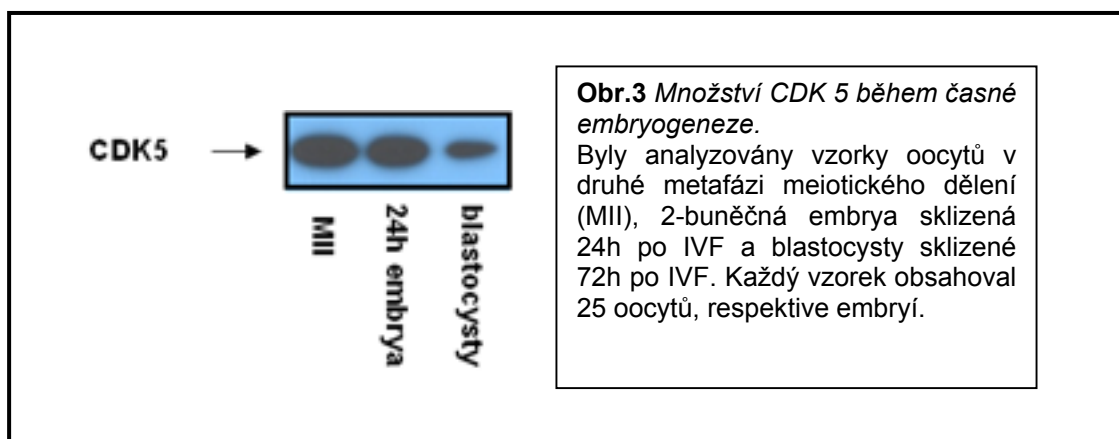
Nejdříve jsme se zaměřili na stav CDK 5 v oocytech. Western blot analýzou jsme detekovali CDK 5 během růstu, tedy během získávání meiotické kompetence oocyty. Pro tento experiment jsme použili GV oocyty izolované z myší 13, 15 a 19 dní starých. Pro porovnání jsme do analýzy zahrnuli i GV oocyty plně dorostlé, tj. oocyty z 24 denních myší. Z obr.1 je zřejmé, že množství CDK 5 roste kontinuálně se zvětšujícím se objemem oocyty.



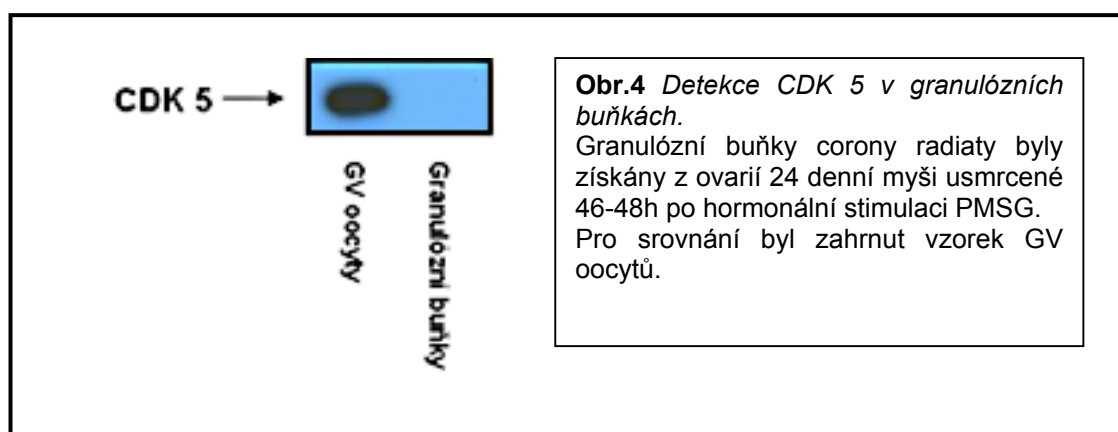
Dále jsme detekovali množství CDK 5 během meiotické maturace (obr.2). Sklidili jsme oocyty ve stadiu GV a oocyty v metafázi prvního (MI) a druhého (MII) meiotického dělení. Zároveň jsme sledovali i hladinu CDK 5 po fertilizaci oocyty a po prvním mitotickém dělení. Po vstupu oocyty do MI fáze hladina CDK 5 mírně klesá a zůstává konstantní během MII fáze po fertilizaci a po prvním mitotickém dělení.



Během časného embryonálního vývoje byla sledována hladina CDK 5 v dvoubuněčných embryích a blastocystách (obr 3.). Pro porovnání byl zařazen i vzorek MII oocytů. Jak již bylo řečeno, po oplození a první mitóze se množství CDK 5 nemění, až ve stadiu blastocysty dochází k dramatickému poklesu CDK 5. Je však možné, že tento úbytek je zapříčiněn nestejnorodostí buněk blastocysty. Embryonálních kmenové buňky, které se izolují z ICM blastocyst, vykazují vysoký obsah CDK 5. Je proto možné, že k celkové hladině CDK 5 blastocyst přispívá jen určité procento buněk.

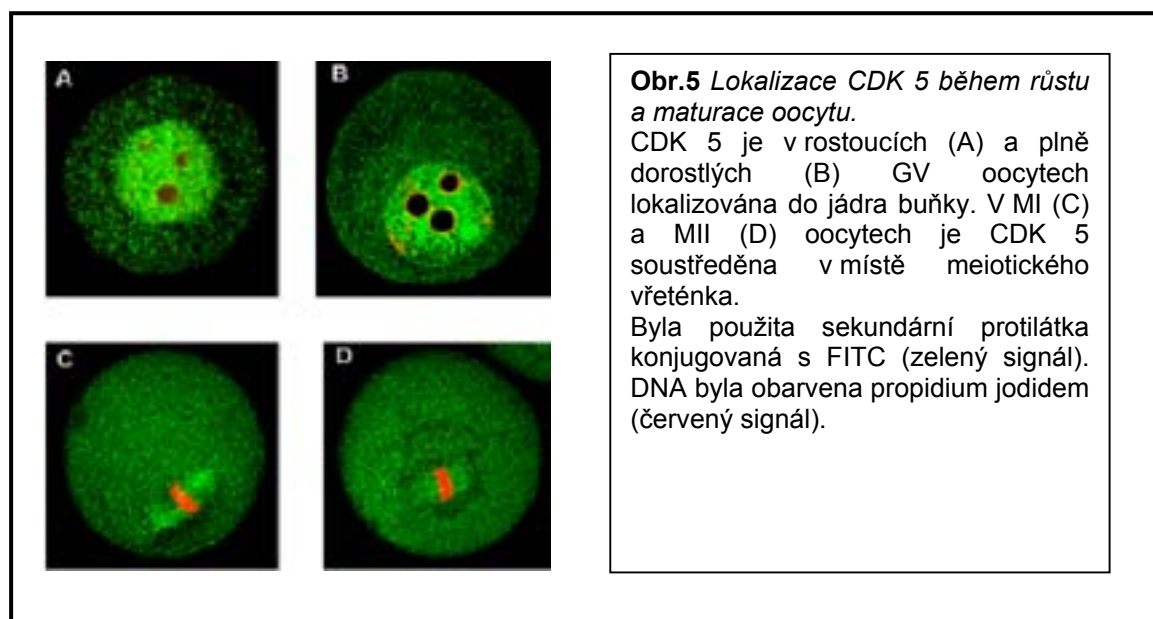


Pokusili jsme se detekovat CDK 5 v granulózních buňkách corony radiaty. V lyzátu z tohoto typu buněk jsme CDK 5 nedetekovali (obr.4).

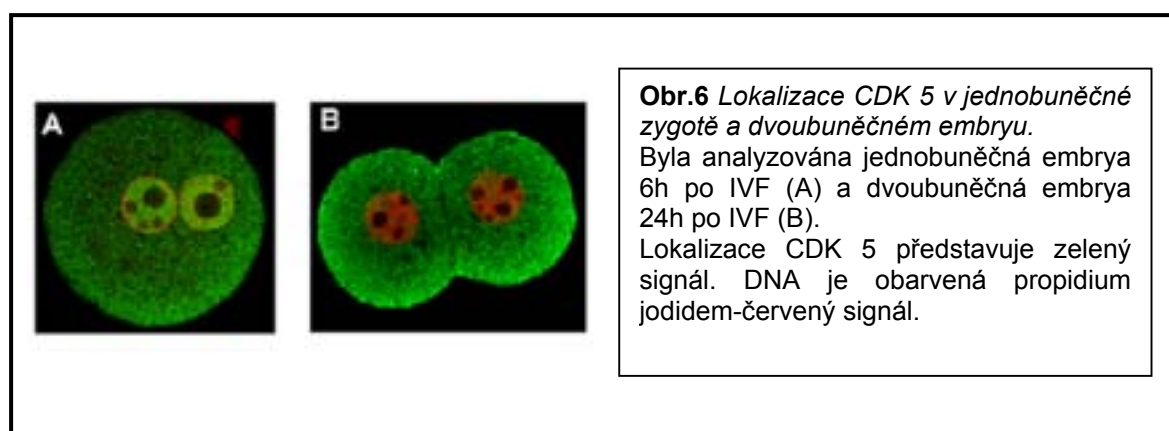


Dalším krokem byla prostorová lokalizace CDK 5 v oocytech. Fixované oocyty byly imunofluorescenčně značeny a analyzovány pomocí konfokálního mikroskopu. V každém experimentu byly použity jako negativní kontrola oocyty neznačené primární protilátkou.

Jak v rostoucích, (obr.5A) tak ve zralých GV oocytech (obr.5B) byla CDK 5 lokalizována v jádře buňky. Po vstupu do MI fáze, tedy po rozpadu jaderné membrány, kondenzaci chromozomů a tvorbě mikrotubulárního vřeténka, se CDK 5 kumuluje kolem vřeténka (obr.5B). Stejný jev je možné pozorovat i v oocytech zastavených v MII fázi (obr.5C).

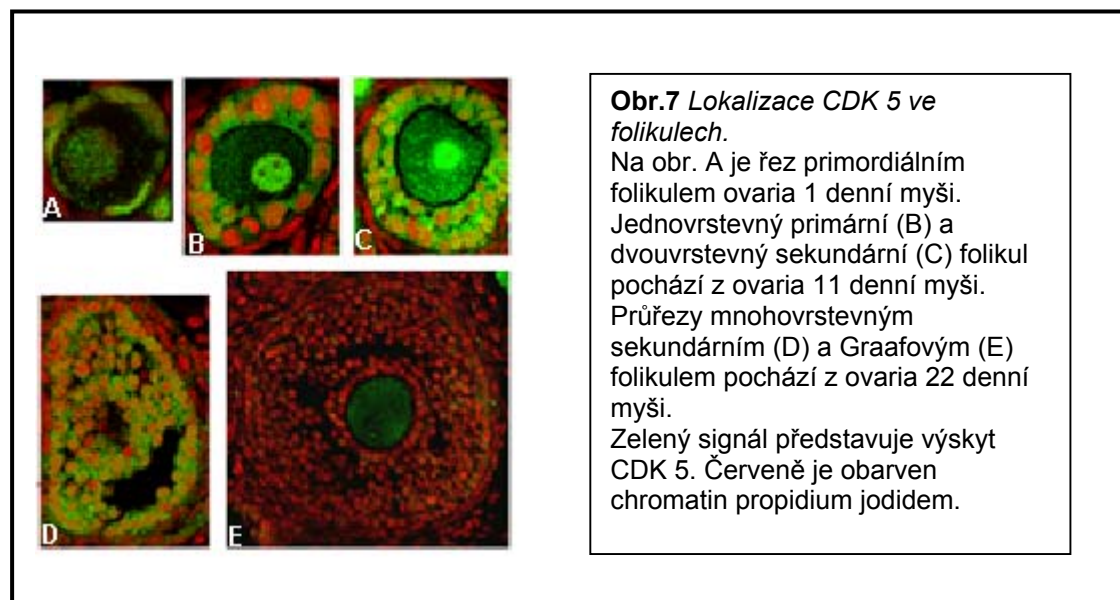


Po fertilizaci oocyty je CDK 5 soustředěna v samčím i samičím prvojádře zygoty (obr.6A). Po prvním mitotickém dělení dochází k vymizení signálu pro CDK 5 v jádře a CDK 5 je možné identifikovat v cytoplazmě (obr.6B).



Distribuci CDK 5 v ovariích jsme provedli imunohistochemicky na řezech. Byla analyzována ovaria získaná z 1, 13, 22 denních a 5 měsíčních myši. Ovaria 1 denních myši obsahují pouze primordiální folikuly. Více než 90% všech těchto folikulů vykazovalo pozitivní signál na CDK 5 jak v oocytech, tak ve folikulárních buňkách obklopujících oocyt (obr.7A). V ovariích 11 denních myši se již vyskytuje více typů preantrálních folikulů (obr.7B, C). Jak jednovrstevné, tak vícevrstevné preantrální folikuly obsahují CDK 5 v jádrech rostoucích oocytů i v granulózních buňkách folikulů. Ovaria 22 denních myši jsou složena již ze všech typů folikulů, tedy z preantrálních i antrálních. Narozdíl od preantrálních

folikulů (obr.7D), granulózní buňky antrálních folikulů nevykazují přítomnost CDK 5 (obr.7E). Tuto skutečnost jsme již dříve prokázali western blot analýzou (obr.4). V ováriích 5 měsíční myši byla distribuce CDK 5 ve zmíněných typech folikulů obdobná.



Tato práce je zaměřena na popis CDK 5 v oocytech a folikulech. Vědomosti o kvantitě a lokalizaci nám můžou napovědět něco o funkci této molekuly ve sledovaných buňkách, nicméně pro určení přesné funkce je třeba provést další experimenty. Dalším krokem je identifikace vazebných partnerů CDK 5 imunoprecipitací, měření kinázové aktivity CDK 5, sledování změn ve vývoji oocyty, respektive embrya při zvýšené či snížené expresi CDK 5.

ZÁVĚR

Detekovali jsme CDK 5 v průběhu celého vývoje oocyty a v ranných embryích. Imunofluorescenčně byla CDK 5 identifikována i v granulózních buňkách preantrálních folikulů. Relativně velká množství i změny lokalizace CDK 5 ve folikulech, oocytech i embryích ukazují na to, že CDK 5 může hrát významnou roli v oogenezi či časně embryogenezi. Pro analýzu její funkce je nutné provést další experimenty .

SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY

- Fletcher A.I, Shuang R., Giovannucci D.R., Zhang L., Bittner M.A., Stuenkel E.L., 1999 : Regulation of exocytosis by cyclin-dependent kinase 5 via phosphorylation of Munc 18, *Dev. Neuroscience* 19: 172-183.
- Guidato S., McLoughlin D.M., Grierson A.J., Miller C.C.J., 1998 : Cyclin D2 interacts with cdk-5 and modulates cellular cdk-5/p35 activity, *Journal of Neurochemistry* 70 (1): 335-339.
- Miyajima M, Nornes HO, Neuman T, 1995: Cyclin E is expressed in neurons and forms complexes with cdk5, *Neuroreport*, 6(8):1130-2.
- Patrick GN, Zukerberg L, Nikolic M, de la Monte S, Dikkes P, Tsai LH.,1999: Conversion of p35 to p25 deregulates Cdk 5 activity and promotes neurodegeneration, *Nature* 402 :615-622.
- Philpott A., Porro E.B., Kirschner M.W., Tsai L.H., 1997 : The role of cyclin-dependent kinase 5 and a novel regulatory subunit in regulating muscle differentiation and patterning, *GENES & DEVELOPMENT* 11: 1409-1421.
- Tan TC, Valova VA, Malladi CS, Graham ME, Berven LA, Jupp OJ, Hansra G, McClure SJ, Sarcevic B, Boadle RA, Larsen MR, Cousin MA, Robinson PJ.,2002:CDK 5 is essential for synaptic vesicle endocytosis, *Nat.Cell Biol.* 5: 701-710.