

ROLA JONÓW WAPNIA W AKTYWACJI ROZWOJU ZARODKOWEGO SSAKÓW*

THE ROLE OF CALCIUM IONS IN ACTIVATION OF THE MAMMALIAN EMBRYO DEVELOPMENT

Anna AJDUK

Zakład Embriologii, Instytut Zoologii, Wydział Biologii, Uniwersytet Warszawski

Streszczenie: Zapłodnienie prowadzi do powstania w oocycie myszy oscylacji cytoplazmatycznego stężenia wolnych jonów Ca^{2+} ($[\text{Ca}^{2+}]_i$). Oscylacje te powstają w sposób zależny od 1,4,5-trójfosforanu inozytolu (IP_3) produkowanego przez plemnikową izoformę fosfolipazy C, fosfolipazę C zeta (PLC zeta). Trwają przez kilka godzin, aż do momentu utworzenia się przedjądźrzy. Zdolność do generowania w odpowiedzi na zapłodnienie długotrwałych oscylacji $[\text{Ca}^{2+}]_i$ kształtuje się w oocytach myszy w czasie dojrzewania mejotycznego, czyli w okresie od zakończenia profazy pierwszego podziału mejotycznego do stadium metafazy drugiego podziału mejotycznego. Poniższa praca ma na celu omówienie roli, jaką wywołane zapłodnieniem oscylacje $[\text{Ca}^{2+}]_i$ pełnią w aktywacji rozwoju zarodkowego. Przedstawiony został mechanizm inaktywacji MPF i wznowienia mejozy oraz powstania bloku przeciwko polispermii. Opisano także wpływ oscylacji $[\text{Ca}^{2+}]_i$ na gospodarkę energetyczną komórki, translację matczynego mRNA i poimplantacyjny rozwój zarodkowy.

Słowa kluczowe: wapń, zapłodnienie, rozwój zarodkowy, mysz, ssak, oocyt, mejoza, MPF, blok przeciwko polispermii.

Summary: Fertilization of a mouse oocyte triggers oscillations of the concentration of free calcium ions in ooplasm ($[\text{Ca}^{2+}]_i$). Calcium oscillations are generated in a process involving inositol 1,4,5-triphosphate (IP_3) produced by phospholipase C zeta (PLC zeta), a sperm specific isoform of phospholipase C. Calcium transients last for several hours until the time of pronuclei formation. The ability to generate and sustain long-lasting oscillations of $[\text{Ca}^{2+}]_i$ is developed in oocytes during meiotic maturation, i.e. in a period between the completion of prophase of the first meiotic division and metaphase of the second meiotic division. This work focuses on the role of sperm-induced oscillations of $[\text{Ca}^{2+}]_i$ in the activation of the embryo development. The mechanisms of MPF inactivation and block to polyspermy are presented. Moreover, the link between calcium oscillations and ATP synthesis, translation of maternal mRNAs and postimplantation embryo development is described.

Key words: calcium, fertilization, embryonic development, mouse, mammal, meiosis, MPF, block to polyspermy.

*Praca finansowana z grantu promotorskiego KBN nr 2P04C 047 30.

1. WPROWADZENIE

Oocyty w jajniku dojrzałej płciowo samicy myszy (a także innych ssaków, w tym człowieka) są zablokowane w stadium profazy pierwszego podziału mejotycznego (profazy I). W warunkach *in vivo* wyrzut produkowanego przez przysadkę hormonu lutenizującego prowadzi do wznowienia mejozy przez część oocytów. Dochodzi w nich wówczas do rozpadu otoczki jądrowej jądra profazowego (tzw. pęcherzyka zarodkowego) oraz do uformowania płytki metafazowej i wrzeciona podziałowego metafazy I. Następnie oocyty przechodzą pierwszy podział mejotyczny i ich rozwój ulega ponownemu zablokowaniu, tym razem w stadium metafazy drugiego podziału mejotycznego (metafazy II). Wtedy też oocyty są owulowane, czyli uwalniane z jajnika do jajowodu i mogą ulec zapłodnieniu. Wyjątek stanowią oocyty ssaków z rodziny psowatych, takich jak psy i lisy. Oocyty tych gatunków są owulowane w stadium profazy I, a stadium metafazy II osiągają dopiero w jajowodach. Zdarza się zatem, że zapłodnieniu ulegają tu oocyty niedojrzałe (czyli takie, które nie osiągnęły stadium metafazy II). Jednak w większości przypadków oocyty psowatych, podobnie jak oocyty innych gatunków ssaków, są zapładniane w stadium metafazy II [59].

W wyniku fuzji gamet plemnik wnosi do cytoplazmy oocytu czynnik aktywujący, fosfolipazę C zeta, która prowadzi do powstania w oocycie oscylacji cytoplazmatycznego stężenia wolnych jonów wapniowych ($[Ca^{2+}]_i$). To właśnie te oscylacje umożliwiają aktywację oocytu, czyli ukończenie drugiego podziału mejotycznego i przejście do interfazy pierwszego podziału zarodkowego. Oscylacje $[Ca^{2+}]_i$ prowadzą również do powstania bloku przeciwko polispermii oraz regulują ekspresję pewnych białek i tym samym wpływają na późniejsze etapy rozwoju zarodkowego. Celem niniejszej pracy jest przedstawienie mechanizmu powstawania oscylacji $[Ca^{2+}]_i$ w zapłodnionym oocycie oraz przybliżenie procesów przez nie wywołanych. Pokróćce został też opisany sposób, w jaki oocyty nabywają w czasie dojrzewania mejotycznego (tj. w okresie między zakończeniem profazy I a metafazą II) zdolności do generowania oscylacji $[Ca^{2+}]_i$ w czasie zapłodnienia. Przygotowując tę pracę opierałam się głównie na danych uzyskanych w doświadczeniach przeprowadzonych na oocytach i zarodkach myszy, ale przedstawione poniżej procesy przebiegają w podobny sposób u wielu innych gatunków ssaków, w tym u człowieka.

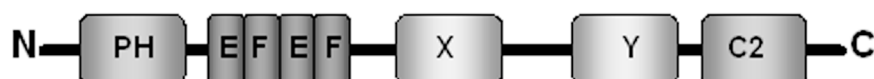
2. POWSTANIE OSCYLACJI $[Ca^{2+}]_i$

Pierwotnie zakładano, że oscylacje stężenia wolnych jonów Ca^{2+} w cytoplazmie oocytu ($[Ca^{2+}]_i$) powstają na skutek związania się plemnika z receptorami błonowymi oocytu, które poprzez ścieżkę sygnałową zależną od białek G i/lub kinaz tyrozynowych aktywują fosfolipazy C (beta lub gamma), co prowadzi do zależnego od IP_3 wzrostu $[Ca^{2+}]_i$ [17, 27, 62]. Obecnie przeważa opinia, że u ssaków za aktywację

PLC zeta



PLC delta

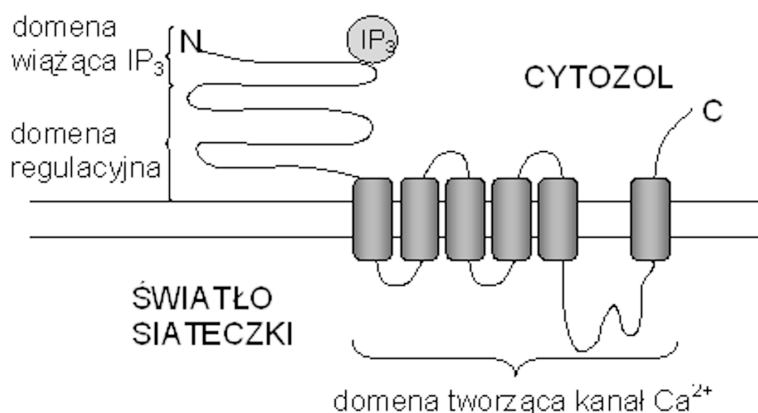


RYCINA 1. Struktura fosfolipaz C zeta i delta. PLC zeta, podobnie jak inne fosfolipazy C ma cztery domeny typu *EF-hand*, domeny katalityczne X i Y oraz domenę C2; w przeciwieństwie do pozostałych fosfolipaz C, np. PLC delta, nie ma jednak domeny PH

oocyty odpowiada plemnikowy czynnik aktywujący (SOAF, z ang. *Sperm-derived Oocyte Activating Factor*), który dostaje się do cytoplazmy oocyty w wyniku fuzji gamet. Do roli SOAF kandydowało wiele białek: oscylina, skrócona forma receptora c-kit – tr-kit (z ang. *truncated c-kit*), różne izoformy fosfolipazy C [54, 65]. Badania sprzed kilku lat dowodzą, że plemnikowym czynnikiem aktywującym jest fosfolipaza C zeta – PLC zeta (ang. *Phospholipase C zeta*), izoforma fosfolipazy C specyficzna tylko dla plemników [50, 66]. Enzym ten, podobnie jak pozostałe fosfolipazy C, ma dwie domeny katalityczne: X i Y, cztery domeny typu *EF-hand* i domenę C2, nie ma natomiast domeny PH (ryc. 1) [58]. Domeny katalityczne X i Y odpowiadają za reakcję hydrolizy 4,5-dwufosforanu fosfatydylinozytolu (PIP_2) do diacyloglicerolu (DAG) i 1,4,5-trójfosforanu inozytolu (IP_3). Domeny typu *EF-hand* wiążą jony Ca^{2+} (aktywność PLC zeta podobnie jak i pozostałych fosfolipaz C zależy od jonów Ca^{2+}), a także prawdopodobnie utrzymują odpowiednią konformację domen katalitycznych. Domena C2 zakotwicza PLC zeta w błonach lipidowych, a więc w bezpośrednim sąsiedztwie PIP_2 – substratu enzymu, i prawdopodobnie zastępuje domenę PH, która w innych izoformach PLC odpowiada za wiązanie substratu [32, 51, 66].

IP_3 powstały w reakcji katalizowanej przez PLC zeta wiąże się z receptorami w błonach siateczki śródplazmatycznej. W komórkach ssaków występują 3 różne izoformy receptora IP_3 , jednak w oocytach obficie występuje jedynie receptor typu I ($\text{IP}_3\text{R1}$). Receptory te mają formę tetramerów. Na N-końcu pojedynczego łańcucha aminokwasowego znajduje się domena wiążąca IP_3 , zaś na C-końcu – 6 domen transbłonowych tworzących kanał wapniowy i lokujących receptor w błonach siateczki śródplazmatycznej (ryc. 2) [55, 56]. $\text{IP}_3\text{R1}$ ma także liczne miejsca fosforylacji dla kinaz fazy M, takich jak MPF i MAPK [36, 41].

Związanie IP_3 przez receptor umożliwia otwarcie kanału wapniowego i wyrzut zgromadzonych w cysternach siateczki jonów Ca^{2+} do cytoplazmy [49]. Prowadzi to do zmiany $[\text{Ca}^{2+}]_i$, która w oocytach ssaków ma postać trwających kilka godzin oscylacji [43]. Powstanie oscylacji $[\text{Ca}^{2+}]_i$ jest wynikiem sposobu, w jaki jony Ca^{2+} regulują działanie



RYCINA 2. Struktura pojedynczego łańcucha aminokwasowego receptora IP_3 typu 1. W pojedynczym łańcuchu aminokwasowym receptora IP_3 (receptor występuje w formie tetrameru) wyróżnia się trzy domeny: domenę wiążącą IP_3 , domenę regulacyjną oraz składającą się z sześciu transbłonowych helis domenę tworzącą kanał Ca^{2+} .

receptorów IP_3 . Wzrost $[Ca^{2+}]_i$ powyżej pewnego poziomu prowadzi do zamknięcia kanału wapniowego, dzięki czemu przewagę zdobywa proces transportu jonów Ca^{2+} z powrotem do cystern siateczki. Za transport ten odpowiadają zlokalizowane w błonach siateczki zależne od ATP pompy Ca^{2+} . Obniżenie $[Ca^{2+}]_i$ prowadzi do ponownego otwarcia kanałów wapniowych i kolejnego wyrzutu Ca^{2+} do cytoplazmy [5, 56].

3. KSZTAŁTOWANIE SIĘ W OOCYTACH ZDOLNOŚCI DO GENEROWANIA OSCYLACJI $[Ca^{2+}]_i$

Zdolność do generowania oscylacji $[Ca^{2+}]_i$ w odpowiedzi na zapłodnienie kształtuje się w oocycie myszy w czasie dojrzewania meiotycznego, czyli w okresie od zakończenia profazy I do osiągnięcia stadium metafazy II. Wówczas to zmienia się m.in. struktura siateczki śródplazmatycznej, głównego zbiornika jonów Ca^{2+} w oocycie. W profazowych oocytach myszy cysterny siateczki są równomiernie rozproszone w cytoplazmie. W czasie dojrzewania siateczka śródplazmatyczna tworzy wokół chromatyny i formującego się wrzeciona podziałowego strukturę w kształcie pierścienia [19]. W transport cystern siateczki wchodzących w skład pierścienia zaangażowana jest dyneina, białko motoryczne związane z mikrotubulami [42]. Pierścień siateczki ulega rozproszeniu po zakończeniu I podziału meiotycznego, a jego funkcja nie jest jeszcze do końca poznana [19]. W czasie przejścia między metafazą I a metafazą II cysterny siateczki śródplazmatycznej przemieszczają się wzdłuż mikrofilamentów aktynowych w rejon podbłonowy, co prowadzi do powstania gęstej, kortykalnej sieci skupisk (ang. *clusters*) cystern siateczki, struktury charakterystycznej dla oocytów w stadium metafazy II. Zgrupowania te nie formują się

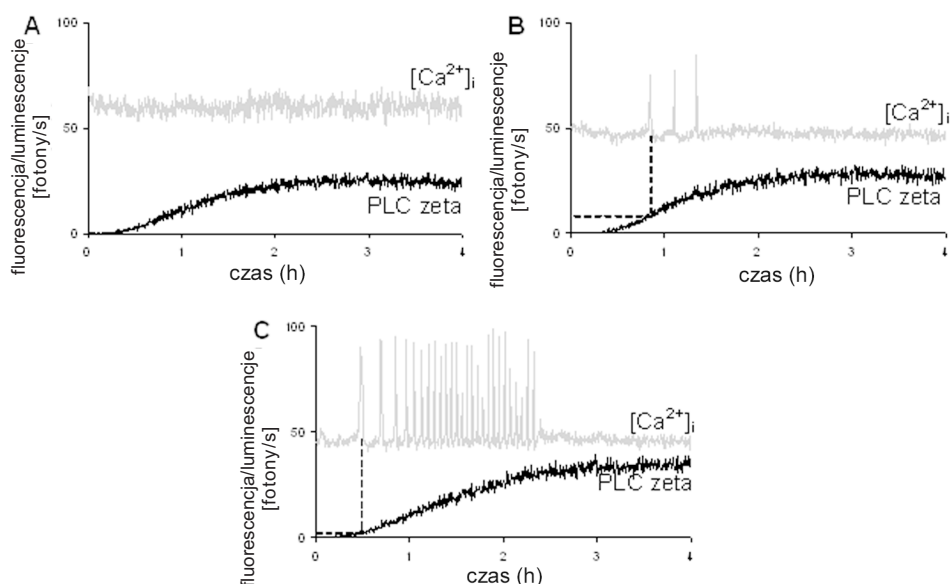
jedynie w rejonie wrzeczona podziałowego [18, 19] (przegląd starszych publikacji na ten temat w [30]).

W dojrzewających oocytach zwiększa się także liczba IP_3R1 . Białko to tworzy wyraźne agregaty zlokalizowane głównie w skupiskach cystern siateczki śródplazmatycznej [30, 37]. Zahamowanie ekspresji IP_3R1 przy użyciu RNAi obniżało zdolność oocytów do generowania oscylacji $[Ca^{2+}]_i$ w odpowiedzi na zapłodnienie – rejestrowano w nich mniej wyrzutów Ca^{2+} niż w oocytach kontrolnych, krócej trwał też pierwszy wyrzut Ca^{2+} [74]. Nieliczne wyrzuty Ca^{2+} zaobserwowano także, gdy zapłodnieniu poddano oocyty, w których w czasie dojrzewania wywołano degradację IP_3R1 (degradację wywołuje stymulacja receptora przez IP_3 bądź przez adenofostynę A, związek będący agonistą IP_3 , por. rozdz. 5) [28, 37].

W czasie dojrzewania IP_3R1 ulega modyfikacjom potranslacyjnym. Ostatnie badania wykazały, że receptory te są wówczas fosforylowane przez kinazę MAP. Modyfikacja ta wpływa pozytywnie na zdolność receptora do pośredniczenia w wytwarzaniu oscylacji $[Ca^{2+}]_i$ [36]. Być może w regulacji receptorów IP_3 bierze też udział MPF. W receptorach tych znaleziono bowiem sekwencje rozpoznawane przez CDK1 (z ang. *Cyclin-Dependent Kinase I*), kinazę wchodzącą w skład MPF [41]. IP_3R1 ma także potencjalne miejsca fosforylacji dla kinazy II zależnej od Ca^{2+} i kalmoduliny – CaMKII (z ang. *Ca^{2+}/Calmodulin-Dependent Kinase II*) czy kinaz białkowych A, C i G [55, 56]. Nie wiadomo jednak, czy biorą one udział w regulacji działania receptorów IP_3 w oocytach. Badania z zastosowaniem inhibitorów powyższych kinaz wykazały bowiem, że ich aktywność nie jest konieczna do powstania w oocytach wyrzutów Ca^{2+} indukowanych przez IP_3 [37].

Niektórzy badacze sugerują również, że w czasie dojrzewania oocytu wzrasta stężenie jonów Ca^{2+} zgromadzonych w cysternach siateczki śródplazmatycznej. Wskazują na to wyniki doświadczeń z użyciem jonoforów Ca^{2+} . Wzrost $[Ca^{2+}]_i$ w oocytach niedojrzałych poddanych działaniu jonoforu jest mniejszy niż w traktowanych w ten sam sposób oocytach w metafazie II [30].

Zmiany w strukturze siateczki śródplazmatycznej, liczbie, regulacji i lokalizacji receptorów IP_3 oraz ewentualny wzrost stężenia jonów Ca^{2+} w komórce przyczyniają się do wzrostu podatności oocytów na działanie plemnikowego czynnika aktywującego. Oocyty dojrzewające, (czyli takie, które wznowiły mejozę, lecz nie osiągnęły jeszcze stadium metafazy II) bądź to wcale nie generują oscylacji $[Ca^{2+}]_i$ w odpowiedzi na PLC zeta, bądź też obserwuje się w nich mniej wyrzutów Ca^{2+} niż w oocytach dojrziałych (w metafazie II). W oocytach nastrzykniętych komplementarnym RNA (cRNA) kodującym PLC zeta w czasie dojrzewania pierwszy wyrzut Ca^{2+} trwa zazwyczaj krócej niż w oocytach nastrzykniętych dopiero w stadium metafazy II. Ponadto oocyty dojrzewające rozpoczynają oscylacje $[Ca^{2+}]_i$ przy wyższym poziomie ekspresji PLC zeta niż oocyty dojrziałe (ryc. 3) [Ajduk, Maleszewski, Swann, dane niepublikowane]. Obserwacje te są zgodne z wynikami wcześniejszych badań, w których zapładniano oocyty w różnych stadiach mejozy: w zapłodnionych eksperymentalnie oocytach w profazie I odpowiedź wapniowa była słabsza niż ta zarejestrowana po zapłodnieniu oocytów w metafazie II [30]. Wydaje się także, iż właśnie dzięki kortykalnym skupiskom cystern siateczki i

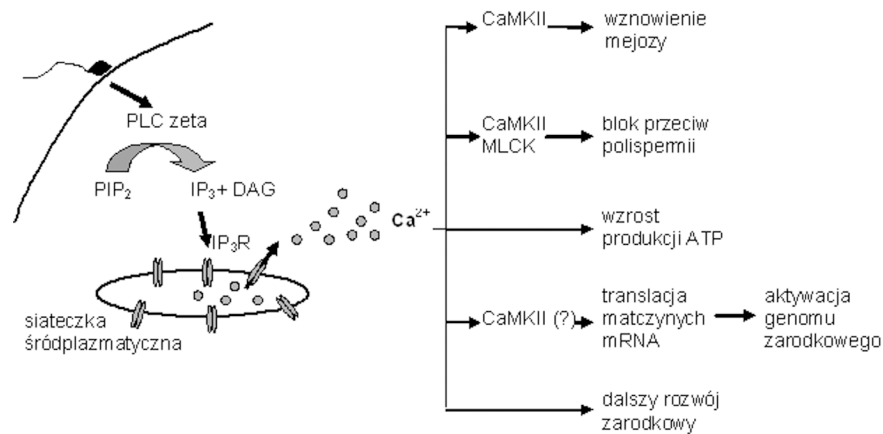


RYCINA 3. Odpowiedź wapniowa zarejestrowana w oocytach dojrzewających i dojrzałych (w metafazie II) nastrzykniętych mRNA PLC zeta. Oocyty dojrzewające i dojrzałe były nastrzykiwane fluorescencyjnym wskaźnikiem stężenia wolnych jonów Ca^{2+} oraz komplementarnym RNA kodującym PLC zeta skoniugowaną z lucyferazą. Następnie przy użyciu kamery PCC (z ang. *Photon Counting Camera*) zamontowanej do mikroskopu fluorescencyjnego rejestrowane były: fluorescencja świadcząca o $[Ca^{2+}]_i$ oraz luminescencja (światło powstające w reakcji katalizowanej przez lucyferazę) świadcząca o poziomie ekspresji PLC zeta-luc. Wykresy A-C przedstawiają przykładowe zapisy pomiarów fluorescencji ($[Ca^{2+}]_i$; szara linia) i luminescencji (PLC zeta-luc; czarna linia). Ponad 35% oocytów dojrzewających nie wytworzyło ani jednego wyrzutu Ca^{2+} w odpowiedzi na PLC zeta-luc (A), zaś prawie 30% wygenerowało jedynie 2–5 wyrzutów Ca^{2+} (3 wyrzuty Ca^{2+} na wykresie B). Większość (97%) oocytów dojrzałych wytworzyła natomiast ponad 6 wyrzutów Ca^{2+} (C). Średni poziom PLC zeta, przy którym oscylacje $[Ca^{2+}]_i$ zaczynały się w oocytach dojrzewających (B), był znacząco wyższy niż w przypadku oocytów dojrzałych (C)

receptorów IP_3 rejon podbłonowy ocytu jest bardziej wrażliwy na działanie plemnikowego czynnika aktywującego niż głębsze warstwy cytoplazmy [37]. Badania nad rozprzestrzenianiem się sygnału wapniowego dowiodły, że skupiska cystem siateczki i IP_3R1 są tymi miejscami, gdzie rozpoczyna się fala wzrostu $[Ca^{2+}]_i$ [10].

4. JONY Ca^{2+} JAKO CZYNNIK INICJUJĄCY WZNOWIENIE MEJOZY, BŁOK PRZECIWKO POLISPERMII I ROZWÓJ ZARODKOWY

Aby możliwa była inicjacja poszczególnych procesów związanych z aktywacją ocytu, stężenie jonów Ca^{2+} w cytoplazmie musi być podwyższone przez określony, inny dla każdego procesu czas [52, 53, 67]. Kontrolując eksperymentalnie liczbę wyrzutów Ca^{2+}



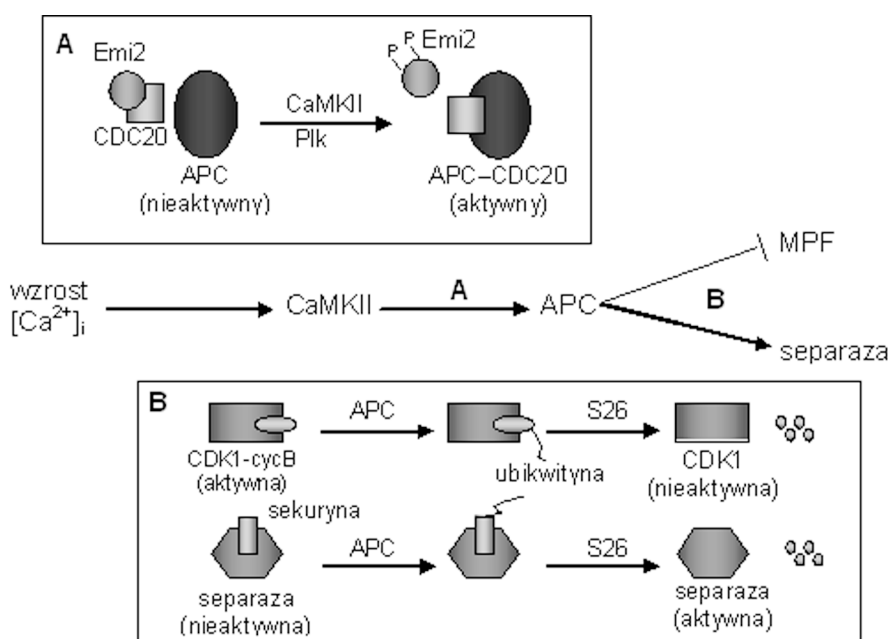
RYCINA 4. Schemat aktywacji oocyta: wzrost $[Ca^{2+}]_i$ wywołany przez PLC zeta prowadzi, poprzez aktywację m.in. CaMKII, do powstania bloku przeciwko polispermii, wznowienia mejozy, wzrostu produkcji ATP czy translacji matczynej mRNA; oscylacje $[Ca^{2+}]_i$ wpływają także na późniejszy rozwój zarodkowy

wykazano, że do rozpoczęcia reakcji korowej (czyli egzocytozy ziaren korowych, która zabezpiecza oocyt ssaka przed zapłodnieniem polispermicznym) wystarczy 1 wyrzut Ca^{2+} , do wznowienia mejozy – kilka wyrzutów Ca^{2+} , zaś do uformowania przedjądri oraz poprawnej ekspresji białek syntetyzowanych na podstawie matczynej mRNA – ok. 20 wyrzutów Ca^{2+} [8]. Dzięki tej zróżnicowanej wrażliwości na podwyższone $[Ca^{2+}]_i$ procesy towarzyszące aktywacji oocyta są odpowiednio rozłożone w czasie. Schemat aktywacji oocyta przedstawiono na rycinie 4.

4.1. Wznowienie mejozy

Czynnikiem warunkującym utrzymanie oocyta w stadium metafazy II podziału mejotycznego aż do momentu zapłodnienia jest MPF (z ang. *M-phase Promoting Factor*). Kompleks ten składa się z podjednostki katalitycznej – kinazy serynowej CDK1, zwanej też białkiem p34, oraz podjednostki regulatorowej – cykliny B. W stadium metafazy II degradacja cykliny B jest równoważona przez syntezę tego białka [50, 73]. Nadmiernej proteolizy cykliny B, a tym samym inaktywacji MPF, zapobiega tzw. czynnik cytostatyczny – CSF (z ang. *Cytostatic Factor*) (przegląd w [2, 46]). Ostatnio wykazano, iż aktywność CSF zależy od białka Emi2 (z ang. *Early Mitotic Inhibitor 2*). Emi2 hamuje aktywność APC (z ang. *Anaphase Promoting Complex*), kompleksu odpowiedzialnego za ubikwitynację m.in. cykliny B i skierowanie jej do degradacji w proteosomie. Wiąże ono bowiem białko CDC20, będące aktywatorem APC [57, 63, 68].

Wznowienie mejozy w zapłodnionym oocycie związane jest ze wzrostem aktywności kinazy zależnej od Ca^{2+} i kalmoduliny (CaMKII) (ryc. 5) [31, 39]. Wywołane zapłodnieniem oscylacje $[Ca^{2+}]_i$ prowadzą do zmian w aktywności tego enzymu: rośnie ona wraz ze wzrostem $[Ca^{2+}]_i$ i wraz ze spadkiem $[Ca^{2+}]_i$ się obniża [44,

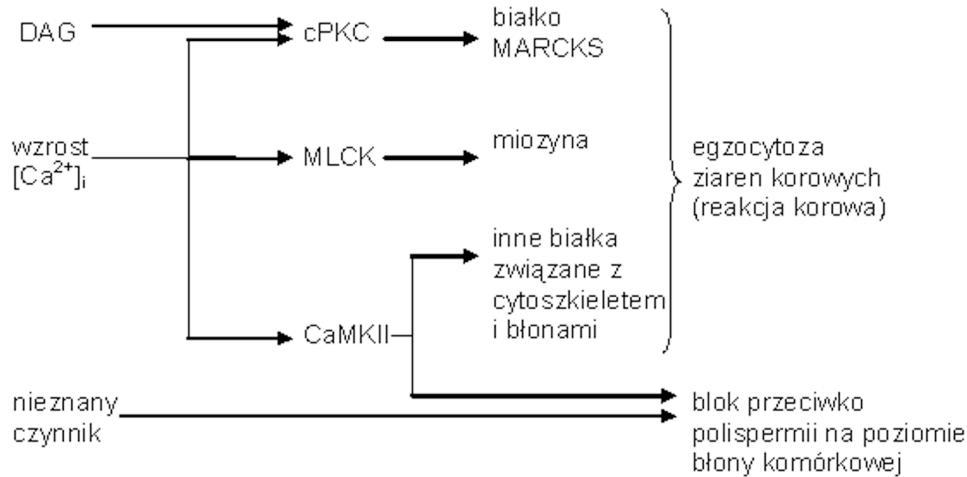


RYCINA 5. Mechanizm umożliwiający wznowienie mejozy w zapłodnionym oocycie: wzrost $[Ca^{2+}]_i$ prowadzi do aktywacji CaMKII, co z kolei umożliwia aktywację APC; ubiquitynacja katalizowana przez APC powoduje degradację cykliny B oraz sekury, co skutkuje wznowieniem mejozy przez oocyt (szczegóły w tekście)

45]. CaMKII wraz z kinazą Plk1 (z ang. *Polo-like Kinase 1*) fosforyluje białko Emi2 [24, 61], co umożliwia jego degradację i pełną aktywację kompleksu APC. Kinaza Plk1 jest aktywna w oocycie już w czasie metafazy II, jednak by mogła przyłączyć resztę fosforanową do białka Emi2, musi zostać ono wpierw ufosforylowane przez CaMKII, aktywowaną dopiero w czasie zapłodnienia [24, 57, 61]. Aktywacja APC prowadzi do degradacji w proteosomie S26 takich białek, jak: cyklina B [38, 50] czy sekury [40]. Proteoliza cykliny B powoduje obniżenie aktywności MPF i umożliwia rozpoczęcie anafazy II. Degradacja sekury prowadzi natomiast do uwolnienia separazy, enzymu, który indukuje rozdział chromatyd [33, 70]. W ten sposób dochodzi do ukończenia II podziału mejotycznego i rozpoczęcia interfazy I podziału zarodkowego.

4.2. Powstanie bloku przeciwko polispermii

Oscylacje $[Ca^{2+}]_i$ inicjują także reakcję korową, czyli egzocytozę zawartości ziaren korowych do przestrzeni okołozótkowej (tj. przestrzeni między oocytą a osłonką przejrzystą). Ziarna (granule) korowe wywodzą się z aparatu Golgiego i są nagromadzone w podpowierzchniowej warstwie oocytu w czasie jego wzrostu i dojrzewania. Zawarte w nich enzymy modyfikują osłonkę przejrzystą. Uwolniona z granul glikozylaza modyfikuje białko ZP3 osłonki, co uniemożliwia wiązanie się z osłonką



RYCINA 6. Mechanizm powstania bloku przeciwko polispermii: wzrost $[Ca^{2+}]_i$ prowadzi do aktywacji CaMKII, MLCK oraz konwencjonalnych PKC (razem z diacyloglicerolem). Kinazy te fosforylują białka związane z cytoszkieletem (w tym np. białko MARCKS czy miozynę), umożliwiając zajście reakcji korowej. Wzrost $[Ca^{2+}]_i$ przyczynia się także do powstania bloku przeciwko polispermii na poziomie błony komórkowej

nowych plemników; z kolei proteaza powoduje lizę białek ZP2, które odpowiadają za „przytrzymywanie” plemników już związanych [75].

Reakcja korowa, podobnie jak wznowienie mejozy, związana jest z aktywnością CaMKII. Wyniki badań prowadzonych na komórkach somatycznych sugerują, że CaMKII fosforyluje białka kotwiczące w korteksie pęcherzyki wydzielnicze (do których zaliczają się w oocyty ziarna korowe), co umożliwia ich odłączenie i transport pod błonę komórki [13, 23]. W transporcie ziaren korowych biorą udział mikrofilamenty aktynowe. Motorem zapewniającym przesuwanie się ziaren wzdłuż mikrofilamentów jest miozyna II. Białko to jest aktywowane na skutek fosforylacji katalizowanej przez kinazę lekkich łańcuchów miozyny – MLCK (z ang. *Myosin Light Chain Kinase*). Aktywność MLCK, podobnie jak aktywność CaMKII, zależy od Ca^{2+} i kalmoduliny [9, 47].

Badania przeprowadzone na oocytach szczura wykazały, że w przebieg reakcji korowej mogą być także zaangażowane konwencjonalne kinazy białkowe C – cPKC (z ang. *conventional Protein Kinase C*) [14, 16]. Aktywność tych kinaz zależy od jonów Ca^{2+} oraz diacyloglicerolu, zatem ulegają one aktywacji po zapłodnieniu. Konwencjonalne PKC fosforylują wiele białek wchodzących w skład cytoszkieletu [35], tym samym mogą więc regulować jego strukturę i umożliwiać zajście reakcji korowej [14, 16]. Aktywna cPKC fosforyluje w oocytach białko MARCKS (z ang. *Myristoylated Alanin-rich C Kinase Substrate*) siećujące mikrofilamenty aktynowe, powodując ich przemieszczenie z rejonu podbłonowego w głąb korteksu [15]. Prawdopodobnie pozwala to na transport ziaren korowych bezpośrednio pod błonę komórkową, co z kolei warunkuje egzocytozę tych ziaren.

Zapłodnienie prowadzi także do powstania bloku przeciwko polispermii na poziomie błony komórkowej oocyty. U ssaków mechanizm tego bloku nie został jeszcze dokładnie zbadany. Przypuszczalnie wiąże się on z reorganizacją cytoszkieletu w strefie podbłonowej oocyty, bądź też z reorganizacją struktury białkowo-lipidowej błony komórkowej, co utrudnia/uniemożliwia związanie się plemnika z błoną komórkową oocyty [20]. Wiadomo, że towarzyszące zapłodnieniu oscylacje $[Ca^{2+}]_i$ oraz wzrost aktywności CaMKII są potrzebne, choć niewystarczające do wytworzenia bloku błonowego [21, 22, 48, 72] (przegląd starszych prac na ten temat w [20]). Pozostałe czynniki (czynniki?) niezbędne do rozwoju bloku błonowego pozostają nadal nieznane.

4.3. Zmiany w gospodarce energetycznej komórki

Oscylacje $[Ca^{2+}]_i$ wywołane zapłodnieniem powodują wzrost stężenia wolnych jonów Ca^{2+} w mitochondriach oocyty [11]. Badania prowadzone na komórkach somatycznych wykazały, że wzrost ten stymuluje w mitochondriach fosforylację oksydacyjną: aktywuje dehydrogenazy cyklu Krebsa, łańcuch oddechowy oraz syntazę ATP [4, 25]. W oocytach myszy wzrost $[Ca^{2+}]_i$ wzmacnia redukcję NAD^+ i flawoprotein w mitochondriach [12], a także produkcję ATP [6]. Zwiększenie poziomu syntezy ATP jest konieczne, by sprostać wysokiemu zapotrzebowaniu energetycznemu zarodka. Już samo podtrzymanie oscylacji $[Ca^{2+}]_i$ wymaga dużych ilości ATP (w transport jonów Ca^{2+} z cytoplazmy z powrotem do światła siateczki śródplazmatycznej zaangażowane są pompy zależne od ATP). Dodatkowo zapłodnienie prowadzi do aktywacji wielu szlaków sygnałowych oraz metabolizmu komórki, co również przyczynia się do zwiększonego zużycia ATP.

4.4. Ekspresja białek matczynych, aktywacja genomu zarodkowego i dalszy rozwój zarodka

Na skutek wywołanych przez zapłodnienie oscylacji $[Ca^{2+}]_i$ dochodzi do wzmożonej translacji szeregu zgromadzonych w oocycie mRNA, m.in. mRNA kodującego cyklinę A2, białko regulujące cykl komórkowy [9]. Sposób, w jaki zapłodnienie indukuje translację zgromadzonych w oocycie mRNA, nie jest jeszcze do końca poznany. Translacja wywołana zapłodnieniem wydaje się być związana z fosforylacją białek CPEB (z ang. *Cytoplasmic Polyadenylation Element Binding Protein*) [7]. Doświadczenia wykonane na komórkach nerwowych świadczą o tym, że białka CPEB mogą być fosforylowane przez CaMKII [3]. Translacja matczynego mRNA, a zwłaszcza mRNA kodującego cyklinę A2, warunkuje aktywację genomu zarodkowego [1, 26], która w przypadku zarodków myszy ma miejsce już w stadium 2-komórkowym.

Liczba wyrzutów Ca^{2+} i ich sumaryczny czas trwania w czasie aktywacji oocyty wpływają też na późniejszy rozwój zarodków [52, 67]. Mimo że pojedynczy duży wyrzut Ca^{2+} jest w stanie doprowadzić do wznowienia mejozy w oocycie i umożliwić rozwój przedimplantacyjny zarodka myszy [53, 67] (przegląd wcześniejszych prac na ten temat w [64]), to wydaje się, iż jedynie długotrwałe oscylacje $[Ca^{2+}]_i$ umożliwiają pełną realizację programu rozwojowego. Wzór ekspresji genów w zarodkach (w

stadium blastocysty), w których eksperymentalnie wygaszono oscylacje $[Ca^{2+}]_i$ wkrótce po zapłodnieniu, był inny niż w zarodkach kontrolnych. Odmiennej ekspresji ulegały geny kodujące białka zaangażowane w transkrypcję, modyfikację mRNA oraz regulujące cykl komórkowy/proliferyację [52]. Ponadto w zarodkach, w których oscylacje $[Ca^{2+}]_i$ trwały zbyt krótko, niższy był poziom ekspresji genów kodujących białka biorące udział w adhezji komórek (integryn, kadheryn, kolagenu), co przynajmniej częściowo tłumaczy zaburzenia w procesie implantacji takich zarodków [52, 67]. Co ciekawe, gdy w zapłodnionych oocytach zwiększono przy użyciu impulsów elektrycznych liczbę wyrzutów Ca^{2+} , rozwój zarodkowy także był zaburzony. Zauważono różnice w poziomie ekspresji genów kodujących białka związane z metabolizmem, a także istotne upośledzenie rozwoju poimplantacyjnego [52].

5. WYGASZANIE OSCYLACJI $[Ca^{2+}]_i$

Oscylacje $[Ca^{2+}]_i$ zanikają w okresie tworzenia się przedjądrzy, czyli jąder interfazowych I cyklu zarodkowego [43]. Związane jest to z gromadzeniem w powstających przedjądrzach PLC zeta [34, 76], co ogranicza dostęp enzymu do PIP_2 , hamując tym samym produkcję IP_3 . Transport PLC zeta do jądra komórkowego możliwy jest dzięki temu, że białko to ma sekwencję lokalizacji jądrowej – NLS (z ang. *Nuclear Localization Signal*) [34].

Gromadzenie się PLC zeta w przedjądrzach jest jednak tylko jedną z przyczyn wygasania oscylacji $[Ca^{2+}]_i$. Badania prowadzone na komórkach somatycznych wykazały, że wiązanie się IP_3 prowadzi do zmian w konformacji receptorów IP_3R1 , a następnie do ich ubiquitytacji [69] i degradacji przez proteosom [71]. Doświadczenia wykonane na oocytach myszy potwierdzają te wyniki. Zapłodnienie, któremu towarzyszy intensywna produkcja IP_3 , skutkuje zależną od proteosomu degradacją IP_3R1 [37]. Prowadzi to do stopniowego upośledzenia mechanizmu uwalniania Ca^{2+} z cystern siateczki do cytoplazmy. W interfazie dochodzi także do defosforylacji IP_3R1 , co dodatkowo hamuje powstawanie oscylacji $[Ca^{2+}]_i$ [29, 36].

Zanikanie oscylacji $[Ca^{2+}]_i$ może być także związane z wywołanymi zapłodnieniem zmianami w strukturze siateczki śródplazmatycznej i w lokalizacji IP_3R1 . Mniej więcej w czasie, gdy ukończony zostaje II podział mejotyczny, skupiska cystern siateczki i IP_3R1 ulegają bowiem rozproszeniu, co osłabia zdolność oocytu do podtrzymywania oscylacji $[Ca^{2+}]_i$ [18].

6. PODSUMOWANIE

Oscylacje $[Ca^{2+}]_i$ pełnią niezwykle ważną funkcję w procesie aktywacji oocytu. Są sygnałem umożliwiającym wznowienie mejozy i powstanie bloku przeciw polispermii, wpływają także na rozwój zarodkowy. Choć badania ostatnich lat wyjaśniły szereg procesów związanych z zapłodnieniem i aktywacją rozwoju zarodkowego, wciąż wiele pytań pozostaje bez odpowiedzi. Nadal nie znamy

wszystkich enzymów biorących udział w szlakach sygnałowych zależnych od wapnia. Nie wiemy również, w jaki sposób oscylacje $[Ca^{2+}]_i$ inicjowane tuż po zapłodnieniu i trwające jedynie przez kilka godzin mogą regulować późniejsze etapy kształtowania się zarodka. Zagadnienia te są niewątpliwie jednymi z największych i najważniejszych wyzwań współczesnej biologii rozwoju. Ciągły rozwój nowych technik biologii molekularnej daje nadzieję na rozwiązanie wielu „wapniowych zagadek”, a tym samym na ustalenie przyczyn niektórych typów bezpłodności czy nieprawidłowości w rozwoju płodu.

PODZIĘKOWANIA

Dziękuję dr. hab. Markowi Maleszewskiemu za cenne uwagi dotyczące manuskryptu.

LITERATURA

- [1] 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.
- [2] ARCHACKA K, CIEMERYCH MA. Rola czynnika cytotatycznego w regulacji mejozy oocytów ssaków. *Post Biol Kom* 2006; **33**: 509–523.
- [3] ATKINS CM, NOZAKI N, SHIGERI Y, SODERLING TR. Cytoplasmic polyadenylation element binding protein-dependent protein synthesis is regulated by calcium/calmodulin-dependent protein kinase II. *J Neurosci* 2004; **24**: 5193–5201.
- [4] BALABAN RS. Cardiac energy metabolism homeostasis: role of cytosolic calcium. *J Mol Cell Cardiol* 2002; **34**: 1259–1271.
- [5] BERRIDGE MJ, BOOTMAN MD, RODERICK HL. Calcium signalling: dynamics, homeostasis and remodelling. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2003; **4**: 517–529.
- [6] CAMPBELL K, SWANN K. Ca^{2+} oscillations stimulate an ATP increase during fertilization of mouse eggs. *Dev Biol* 2006; **298**: 225–233.
- [7] DE MOOR CH, MEIJER H, LISSENDEN S. Mechanisms of translational control by the 3' UTR in development and differentiation. *Semin Cell Dev Biol* 2005; **16**: 49–58.
- [8] DUCIBELLA T, HUNEAU D, ANGELICHIO E, XU Z, SCHULTZ RM, KOPF GS, FISSORE R, MADOUX S, OZIL JP. Egg-to-embryo transition is driven by differential responses to Ca^{2+} oscillation number. *Dev Biol* 2002; **250**: 280–291.
- [9] DUCIBELLA T, SCHULTZ RM, OZIL JP. Role of calcium signals in early development. *Semin Cell Dev Biol* 2006; **17**: 324–332.
- [10] DUMOLLARD R, CARROLL J, DUPONT G, SARDET C. Calcium wave pacemakers in eggs. *J Cell Sci* 2002; **115**: 3557–3564.
- [11] DUMOLLARD R, DUCHEN M, SARDET C. Calcium signals and mitochondria at fertilisation. *Semin Cell Dev Biol* 2006; **17**: 314–323.
- [12] DUMOLLARD R, MARANGOS P, FITZHARRIS G, SWANN K, DUCHEN M, CARROLL J. 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.
- [13] EASOM RA. CaM kinase II: a protein kinase with extraordinary talents germane to insulin exocytosis. *Diabetes* 1999; **48**: 675–684.
- [14] ELIYAHU E, SHALGI R. A role for protein kinase C during rat egg activation. *Biol Reprod* 2002; **67**: 189–195.
- [15] ELIYAHU E, SHTRAIZENT N, TSAADON A, SHALGI R. Association between myristoylated alanine-rich C kinase substrate (MARCKS) translocation and cortical granule exocytosis in rat eggs. *Reproduction* 2006; **131**: 221–231.

- [16] ELIYAHU E, TSAADON A, SHTRAIZENT N, SHALGI R. The involvement of protein kinase C and actin filaments in cortical granule exocytosis in the rat. *Reproduction* 2005; **129**: 161–170.
- [17] EVANS JP, KOPF GS. Molecular mechanisms of sperm-egg interactions and egg activation. *Andrologia* 1998; **30**: 297–307.
- [18] FITZHARRIS G, MARANGOS P, CARROLL J. Cell cycle-dependent regulation of structure of endoplasmic reticulum and inositol 1,4,5-trisphosphate-induced Ca^{2+} release in mouse oocytes and embryos. *Mol Biol Cell* 2003; **14**: 288–301.
- [19] FITZHARRIS G, MARANGOS P, CARROLL J. Changes in endoplasmic reticulum structure during mouse oocyte maturation are controlled by the cytoskeleton and cytoplasmic dynein. *Dev Biol* 2007; **305**: 133–144.
- [20] GARDNER AJ, EVANS JP. Mammalian membrane block to polyspermy: new insights into how mammalian eggs prevent fertilisation by multiple sperm. *Reprod Fertil Dev* 2006; **18**: 53–61.
- [21] GARDNER AJ, KNOTT JG, JONES KT, EVANS JP. CaMKII can participate in but is not sufficient for the establishment of the membrane block to polyspermy in mouse eggs. *J Cell Physiol* 2007; **212**: 275–280.
- [22] GARDNER AJ, WILLIAMS CJ, EVANS JP. Establishment of the mammalian membrane block to polyspermy: evidence for calcium-dependent and -independent regulation. *Reproduction* 2007; **133**: 383–393.
- [23] GRIFFITH LC, LU CS, SUN XX. CaMKII, an enzyme on the move: regulation of temporospatial localization. *Mol Interv* 2003; **3**: 386–403.
- [24] HANSEN DV, TUNG JJ, JACKSON PK. CaMKII and polo-like kinase 1 sequentially phosphorylate the cytostatic factor Emi2/XErp1 to trigger its destruction and meiotic exit. *Proc Natl Acad Sci USA* 2006; **103**: 608–613.
- [25] HANSFORD RG. Physiological role of mitochondrial Ca^{2+} transport. *J Bioenerg Biomembr* 1994; **26**: 495–508.
- [26] HARA KT, ODA S, NAITO K, NAGATA M, SCHULTZ RM, AOKI F. Cyclin A2-CDK2 regulates embryonic gene activation in 1-cell mouse embryos. *Dev Biol* 2005; **286**: 102–113.
- [27] JAFFE LA. First messengers at fertilization. *J Reprod Fertil Suppl* 1990; **42**: 107–116.
- [28] JEDRUSIK A, AJDUK A, POMORSKI P, MALESZEWSKI M. Mouse oocytes fertilised by ICSI during *in vitro* maturation retain the ability to be activated after refertilisation in metaphase II and can generate Ca^{2+} oscillations. *BMC Dev Biol* 2007; **7**: 72.
- [29] JELLERETTE T, KUROKAWA M, LEE B, MALCUIT C, YOON SY, SMYTH J, VERMASSEN E, DE SMEDT H, PARYS JB, FISSORE RA. Cell cycle-coupled $[\text{Ca}^{2+}]_i$ oscillations in mouse zygotes and function of the inositol 1,4,5-trisphosphate receptor-1. *Dev Biol* 2004; **274**: 94–109.
- [30] KLINE D. Activation of the mouse egg. *Theriogenology* 1996; **45**: 81–90.
- [31] KNOTT JG, GARDNER AJ, MADGWICK S, JONES KT, WILLIAMS CJ, SCHULTZ RM. Calmodulin-dependent protein kinase II triggers mouse egg activation and embryo development in the absence of Ca^{2+} oscillations. *Dev Biol* 2006; **296**: 388–395.
- [32] KOUCHI Z, SHIKANO T, NAKAMURA Y, SHIRAKAWA H, FUKAMI K, MIYAZAKI S. The role of EF-hand domains and C2 domain in regulation of enzymatic activity of phospholipase C zeta. *J Biol Chem* 2005; **280**: 21015–21021.
- [33] KUMADA K, YAO R, KAWAGUCHI T, KARASAWA M, HOSHIKAWA Y, ICHIKAWA K, SUGITANI Y, IMOTO I, INAZAWA J, SUGAWARA M, YANAGIDA M, NODA T. The selective continued linkage of centromeres from mitosis to interphase in the absence of mammalian separase. *J Cell Biol* 2006; **172**: 835–846.
- [34] LARMAN MG, SAUNDERS CM, CARROLL J, LAI FA, SWANN K. Cell cycle-dependent Ca^{2+} oscillations in mouse embryos are regulated by nuclear targeting of PLCzeta. *J Cell Sci* 2004; **117**: 2513–2521.
- [35] LARSSON C. Protein kinase C and the regulation of the actin cytoskeleton. *Cell Signal* 2006; **18**: 276–284.
- [36] LEE B, VERMASSEN E, YOON SY, VANDERHEYDEN V, ITO J, ALFANDARI D, DE SMEDT H, PARYS JB, FISSORE RA. Phosphorylation of IP₃R1 and the regulation of $[\text{Ca}^{2+}]_i$ responses at fertilization: a role for the MAP kinase pathway. *Development* 2006; **133**: 4355–4365.
- [37] LEE B, YOON SY, FISSORE RA. Regulation of fertilization-initiated $[\text{Ca}^{2+}]_i$ oscillations in mammalian eggs: a multi-pronged approach. *Semin Cell Dev Biol* 2006; **17**: 274–284.
- [38] MADGWICK S, HANSEN DV, LEVASSEUR M, JACKSON PK, JONES KT. Mouse Emi2 is required to enter meiosis II by reestablishing cyclin B1 during interkinesis. *J Cell Biol* 2006; **174**: 791–801.

- [39] MADGWICK S, LEVASSEUR M, JONES KT. Calmodulin-dependent protein kinase II, and not protein kinase C, is sufficient for triggering cell-cycle resumption in mammalian eggs. *J Cell Sci* 2005; **118**: 3849–3859.
- [40] MADGWICK S, NIXON VL, CHANG HY, HERBERT M, LEVASSEUR M, JONES KT. Maintenance of sister chromatid attachment in mouse eggs through maturation-promoting factor activity. *Dev Biol* 2004; **275**: 68–81.
- [41] MALATHI K, KOHYAMA S, HO M, SOGHIOIAN D, LI X, SILANE M, BERENSTEIN A, JAYARAMAN T. Inositol 1,4,5-trisphosphate receptor (type 1) phosphorylation and modulation by Cdc2. *J Cell Biochem* 2003; **90**: 1186–1196.
- [42] MALLIK R, GROSS SP. Molecular motors: strategies to get along. *Curr Biol* 2004; **14**: R971–982.
- [43] 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.
- [44] MARKOULAKI S, MATSON S, ABBOTT AL, DUCIBELLA T. Oscillatory CaMKII activity in mouse egg activation. *Dev Biol* 2003; **258**: 464–474.
- [45] MARKOULAKI S, MATSON S, DUCIBELLA T. Fertilization stimulates long-lasting oscillations of CaMKII activity in mouse eggs. *Dev Biol* 2004; **272**: 15–25.
- [46] MASUI Y. From oocyte maturation to the *in vitro* cell cycle: the history of discoveries of Maturation-Promoting Factor (MPF) and Cytostatic Factor (CSF). *Differentiation* 2001; **69**: 1–17.
- [47] 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.
- [48] McAVEY BA, WORTZMAN GB, WILLIAMS CJ, EVANS JP. Involvement of calcium signaling and the actin cytoskeleton in the membrane block to polyspermy in mouse eggs. *Biol Reprod* 2002; **67**: 1342–1352.
- [49] MIYAZAKI S, SHIRAKAWA H, NAKADA K, HONDA Y. Essential role of the inositol 1,4,5-trisphosphate receptor/ Ca^{2+} release channel in Ca^{2+} waves and Ca^{2+} oscillations at fertilization of mammalian eggs. *Dev Biol* 1993; **158**: 62–78.
- [50] NIXON VL, LEVASSEUR M, McDOUGALL A, JONES KT. Ca^{2+} oscillations promote APC/C-dependent cyclin B1 degradation during metaphase arrest and completion of meiosis in fertilizing mouse eggs. *Curr Biol* 2002; **12**: 746–750.
- [51] NOMIKOS M, BLAYNEY LM, LARMAN MG, CAMPBELL K, ROSSBACH A, SAUNDERS CM, SWANN K, LAI FA. Role of phospholipase C-zeta domains in Ca^{2+} -dependent phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate hydrolysis and cytoplasmic Ca^{2+} oscillations. *J Biol Chem* 2005; **280**: 31011–31018.
- [52] OZIL JP, BANREZES B, TOTH S, PAN H, SCHULTZ RM. Ca^{2+} oscillatory pattern in fertilized mouse eggs affects gene expression and development to term. *Dev Biol* 2006; **300**: 534–544.
- [53] OZIL JP, MARKOULAKI S, TOTH S, MATSON S, BANREZES B, KNOTT JG, SCHULTZ RM, HUNEAU D, DUCIBELLA T. Egg activation events are regulated by the duration of a sustained $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{cyt}}$ signal in the mouse. *Dev Biol* 2005; **282**: 39–54.
- [54] PARRINGTON J. Does a soluble sperm factor trigger calcium release in the egg at fertilization? *J Androl* 2001; **22**: 1–11.
- [55] PATEL S, JOSEPH SK, THOMAS AP. Molecular properties of inositol 1,4,5-trisphosphate receptors. *Cell Calcium* 1999; **25**: 247–264.
- [56] PATTERSON RL, BOEHNING D, SNYDER SH. Inositol 1,4,5-trisphosphate receptors as signal integrators. *Annu Rev Biochem* 2004; **73**: 437–465.
- [57] RAUH NR, SCHMIDT A, BORMANN J, NIGG EA, MAYER TU. Calcium triggers exit from meiosis II by targeting the APC/C inhibitor XErp1 for degradation. *Nature* 2005; **437**: 1048–1052.
- [58] REBECCHI MJ, PENTYALA SN. Structure, function, and control of phosphoinositide-specific phospholipase C. *Physiol Rev* 2000; **80**: 1291–1335.
- [59] REYNAUD K, FONTBONNE A, MARSELOO N, VIARIS DE LESEGNO C, SAINT-DIZIER M, CHASTANT-MAILLARD S. *In vivo* canine oocyte maturation, fertilization and early embryogenesis: a review. *Theriogenology* 2006; **66**: 1685–1693.
- [60] SAUNDERS CM, LARMAN MG, PARRINGTON J, COX LJ, ROYSE J, BLAYNEY LM, SWANN K, LAI FA. PLC zeta: a sperm-specific trigger of Ca^{2+} oscillations in eggs and embryo development. *Development* 2002; **129**: 3533–3544.
- [61] SCHMIDT A, DUNCAN PI, RAUH NR, SAUER G, FRY AM, NIGG EA, MAYER TU. *Xenopus* polo-like kinase Plx1 regulates XErp1, a novel inhibitor of APC/C activity. *Genes Dev* 2005; **19**: 502–513.
- [62] SCHULTZ RM, KOPF GS. Molecular basis of mammalian egg activation. *Curr Top Dev Biol* 1995; **30**: 21–62.

- [63] SHOJI S, YOSHIDA N, AMANAI M, OHGISHI M, FUKUI T, FUJIMOTO S, NAKANO Y, KAJIKAWA E, PERRY AC. Mammalian Emi2 mediates cytostatic arrest and transduces the signal for meiotic exit via Cdc20. *Embo J* 2006; **25**: 834–845.
- [64] SWANN K, OZIL JP. Dynamics of the calcium signal that triggers mammalian egg activation. *Int Rev Cytol* 1994; **152**: 183–222.
- [65] SWANN K, PARRINGTON J, JONES KT. Potential role of a sperm-derived phospholipase C in triggering the egg-activating Ca^{2+} signal at fertilization. *Reproduction* 2001; **122**: 839–846.
- [66] SWANN K, SAUNDERS CM, ROGERS NT, LAI FA. PLC ζ (zeta): a sperm protein that triggers Ca^{2+} oscillations and egg activation in mammals. *Semin Cell Dev Biol* 2006; **17**: 264–273.
- [67] TOTH S, HUNEAU D, BANREZES B, OZIL JP. Egg activation is the result of calcium signal summation in the mouse. *Reproduction* 2006; **131**: 27–34.
- [68] TUNG JJ, HANSEN DV, BAN KH, LOKTEV AV, SUMMERS MK, ADLER JR, 3rd, JACKSON PK. A role for the anaphase-promoting complex inhibitor Emi2/XErp1, a homolog of early mitotic inhibitor 1, in cytostatic factor arrest of *Xenopus* eggs. *Proc Natl Acad Sci USA* 2005; **102**: 4318–4323.
- [69] WEBSTER JM, TIWARI S, WEISSMAN AM, WOJCIKIEWICZ RJ. Inositol 1,4,5-trisphosphate receptor ubiquitination is mediated by mammalian Ubc7, a component of the endoplasmic reticulum-associated degradation pathway, and is inhibited by chelation of intracellular Zn^{2+} . *J Biol Chem* 2003; **278**: 38238–38246.
- [70] WIRTH KG, WUTZ G, KUDO NR, DESDOUETS C, ZETTERBERG A, TAGHYBEEGLU S, SEZNEC J, DUCOS GM, RICCI R, FIRNBERG N, PETERS JM, NASMYTH K. Separase: a universal trigger for sister chromatid disjunction but not chromosome cycle progression. *J Cell Biol* 2006; **172**: 847–860.
- [71] WOJCIKIEWICZ RJ, XU Q, WEBSTER JM, ALZAYADY K, GAO C. Ubiquitination and proteasomal degradation of endogenous and exogenous inositol 1,4,5-trisphosphate receptors in alpha T3-1 anterior pituitary cells. *J Biol Chem* 2003; **278**: 940–947.
- [72] WORTZMAN-SHOW GB, KUROKAWA M, FISSORE RA, EVANS JP. Calcium and sperm components in the establishment of the membrane block to polyspermy: studies of ICSI and activation with sperm factor. *Mol Hum Reprod* 2007; **13**: 557–565.
- [73] WU Q, GUO Y, YAMADA A, PERRY JA, WANG MZ, ARAKI M, FREEL CD, TUNG JJ, TANG W, MARGOLIS SS, JACKSON PK, YAMANO H, ASANO M, KORNBLUTH S. A role for Cdc2- and PP2A-mediated regulation of Emi2 in the maintenance of CSF arrest. *Curr Biol* 2007; **17**: 213–224.
- [74] XU Z, WILLIAMS CJ, KOPF GS, SCHULTZ RM. Maturation-associated increase in IP_3 receptor type 1: role in conferring increased IP_3 sensitivity and Ca^{2+} oscillatory behavior in mouse eggs. *Dev Biol* 2003; **254**: 163–171.
- [75] YANAGIMACHI R. Mammalian fertilization. W: Knobil E, Neill J [red], The Physiology of Reproduction, 2nd ed. New York: Raven Press; 1994: 189–317.
- [76] YODA A, ODA S, SHIKANO T, KOUCHI Z, AWAJI T, SHIRAKAWA H, KINOSHITA K, MIYAZAKI S. 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.

Redaktor prowadzący – Janusz Kubrakiewicz

Otrzymano: 10.09. 2007 r.

Przyjęto: 26.11. 2007 r.

Zakład Embriologii, Instytut Zoologii, Wydział Biologii, UW

ul. Miecznikowa 1, 02-096 Warszawa

e-mail: aaajduk@biol.uw.edu.pl