



KATEDRA I ZAKŁAD HISTOLOGII I EMBRIOLOGII

mgr inż. Sylwia Ciesiółka

**Badanie ekspresji receptorów gonadotropin (LHR, FSHR),
aromatazy CYP19 oraz wybranych koneksyn w komórkach
izolowanych z warstwy ziarnistej pęcherzyków jajnika świni
w warunkach hodowli pierwotnej**

Rozprawa na stopień doktora nauk medycznych

Promotor: dr hab. n. med. Bartosz Kempisty

POZNAŃ 2020

Serdecznie dziękuję:

*Panu dr hab. Bartoszowi Kempistemu
za wyrozumiałość i pomoc w realizacji badań*

*Panu prof. Michałowi Nowickiemu oraz Panu Prof. Maciejowi Zabłowi
za stworzenie atmosfery sprzyjającej pracy i za życzliwość*

*Koleżankom i Kolegom
z Katedry i Zakładu Histologii i Embriologii
za nieustające wsparcie i pomoc*

Spis treści

Wykaz stosowanych skrótów	5
1. WSTĘP	8
1.1. Świnia domowa (łac. <i>Sus scrofa domestica</i> , Linnaeus 1758) jako zwierzę modelowe w badaniach biomedycznych	8
1.2. Morfologiczne aspekty folikulogenezy.....	8
1.3. Oś podwzgórze - przysadka - jajnik	11
1.3.1. Hormon luteinizujący (LH) i hormon folikulotropowy (FSH) – budowa i wpływ na funkcję jajnika.....	12
1.3.2. Hormonalna regulacja wydzielania LH i FSH	15
1.3.2.1. Rola pulsacyjnej sekrecji gonadoliberyny (GnRH)	15
1.3.2.2. Modulacja przez hormony steroidowe	16
1.3.2.3. Modulacja przez czynniki niesteroidowe (inhibiny/aktywiny/folistatynę).....	16
1.3.3. Receptory gonadotropin	18
1.3.3.1. Struktura i mechanizm aktywacji.....	18
1.3.3.2. Ekspresja receptorów gonadotropin w jajniku	19
1.4. Połączenia szczelinowe.....	21
1.4.1. Struktura i funkcja połączeń szczelinowych	21
1.4.2. Koneksyny – struktura genów i białek	23
1.4.3. Ekspresja i funkcja wybranych koneksyn w jajniku	25
1.5. Aromataza (CYP19).....	29
1.5.1. Struktura i funkcja aromatazy	29
1.5.2. Gen aromatazy.....	30
1.5.3. Ekspresja i rola aromatazy w jajniku	32
2. CEL PRACY	35
3. MATERIAŁ I METODY	36
3.1. Materiał	36
3.1.1. Zwierzęta i model badawczy	36
3.1.2. Odczynniki i zestawy do oznaczeń	36
3.2. Metody	38
3.2.1. Hodowla pierwotna komórek ziarnistych	38
3.2.2. Analiza proliferacji komórek w czasie rzeczywistym	39
3.2.3. Izolacja całkowitego RNA	39
3.2.4. Odwrotna transkrypcja.....	40
3.2.5. Reakcja łańcuchowa polimerazy w czasie rzeczywistym	42
3.2.6. Technika immunofluorescencyjna	44
3.2.7. Mikromacierze RNA	46
3.2.8. Analizy statystyczne	55

4. WYNIKI	56
4.1. Morfologia komórek ziarnistych w hodowli pierwotnej	56
4.2. Analiza proliferacji komórek ziarnistych w czasie rzeczywistym	56
4.3. Analiza ekspresji wybranych transkryptów w jajnikowych komórkach ziarnistych	60
4.4. Ilościowa analiza ekspresji mRNA <i>Lhr</i> , <i>Fshr</i> , <i>Cx43</i> i <i>Cx45</i>	60
4.5. Ilościowa analiza ekspresji mRNA <i>Cyp19</i> , <i>Cx36</i> , <i>Cx37</i> i <i>Cx40</i>	65
4.6. Jakościowa analiza ekspresji wybranych koneksyn na poziomie białka	65
4.7. Jakościowa analiza ekspresji <i>Lhr</i> , <i>Fshr</i> i <i>Cyp19</i> na poziomie białka	87
4.8. Profil ogólnej ekspresji genów podczas krótkoterminowej hodowli pierwotnej komórek ziarnistych jajnika świni	100
5. DYSKUSJA	105
5.1. Ograniczenia badań.....	121
6. WNIOSKI	123
7. STRESZCZENIE.....	124
8. ABSTRACT	128
9. PIŚMIENNICTWO	132
10. SPIS RYCIN I TABEL.....	151
10.1. Ryciny.....	151
10.2. Tabele	152

Wykaz stosowanych skrótów

ACTB	β -aktyna (ang. <i>β-actin</i>)
ArKO	mysz z nokautem genu dla aromatazy (ang. <i>aromatase knockout mouse</i>)
ATG	kodon oznaczający miejsce startu translacji
ATP	adenozynotrifosforan (ang. <i>adenosine-5'-triphosphate</i>)
BMP-15	białko morfogenetyczne kości 15 (ang. <i>bone morphogenetic protein 15</i>)
BPA	bisfenol A (ang. <i>bisphenol A</i>)
BSA	albumina surowicy bydłęcej (ang. <i>bovine serum albumine</i>)
cAMP	cykliczny adenzynomonofosforan (ang. <i>cyclic adenosine-3',5'-monophosphate</i>)
CBX	karbenoksolon (ang. <i>carbenoxolone</i>)
CCs	komórki wieńca promienistego (ang. <i>cumulus cells</i>)
CG	gonadotropina kosmówkowa (ang. <i>chorionic gonadotropin</i>)
CGA	podjednostka α hormonów glikoproteinowych (ang. <i>chorionic gonadotropin subunit alpha</i>)
cGMP	cykliczny guanozynomonofosforan (ang. <i>cyclic guanosine-3',5'-monophosphate</i>)
CI	indeks komórkowy (ang. <i>cell index</i>)
COC	kompleks oocyt-wieniec promienisty (ang. <i>cumulus-oocyte complex</i>)
Cx	koneksyna (ang. <i>connexin</i>)
CYP19	aromataza cytochromu P450 (ang. <i>cytochrome P450 aromatase</i>)
DAG	diacyloglicerol (ang. <i>diacylglycerol</i>)
DAPI	4',6-diamidyno-2-fenyloindol (ang. <i>4',6-diamidino-2-phenylindole</i>)
DIC	kontrast interferencyjno-różnicowy (ang. <i>differential interference contrast</i>)
DMEM	pożywka Eagle'a zmodyfikowana przez Dulbecco (ang. <i>Dulbecco's modified Eagle's medium</i>)
DPBS	zbuforowany roztwór soli fizjologicznej (ang. <i>Dulbecco's phosphate-buffered saline</i>)
E2	17 β -estradiol (ang. <i>17β-estradiol</i>)
ERα	receptor estrogenowy α (ang. <i>estrogen receptor alpha</i>)
FAD	dinukleotyd flawinoadeninowy (ang. <i>flavin adenine dinucleotide</i>)
FMN	mononukleotyd flawinowy (ang. <i>flavin mononucleotide</i>)

FBS	płodowa surowica bydlęca (ang. <i>fetal bovine serum</i>)
FORKO	mysz z nokautem genu dla receptora FSH (ang. <i>FSH receptor knockout mouse</i>)
FSH	hormon folikulotropowy (ang. <i>follicle-stimulating hormone</i>)
FSHβ	podjednostka β hormonu folikulotropowego (ang. <i>follicle-stimulating hormone subunit beta</i>)
FSHR	receptor hormonu folikulotropowego (ang. <i>follicle-stimulating hormone receptor</i>)
GCs	komórki ziarniste (ang. <i>granulosa cells</i>)
GDF-9	różnicujący czynnik wzrostu 9 (ang. <i>growth differentiation factor 9</i>)
GDP	guanozynodifosforan (ang. <i>guanosine-5'-diphosphate</i>)
GJ	połączenie szczelinowe (ang. <i>gap junction</i>)
GJC	komunikacja międzykomórkowa z udziałem połączeń szczelinowych (ang. <i>gap junctional communication</i>)
GnRH	hormon uwalniający gonadotropiny (ang. <i>gonadotropin-releasing hormone</i>)
GPCR	receptory sprzężone z białkami G (ang. <i>G-protein coupled receptor</i>)
GTP	guanozynotrifosforan (ang. <i>guanosine-5'-triphosphate</i>)
GV	pęcherzyk zarodkowy (ang. <i>germinal vesicle</i>)
GVBD	zanik pęcherzyka zarodkowego (ang. <i>germinal vesicle breakdown</i>)
hCG	ludzka gonadotropina kosmówkowa (ang. <i>human chorionic gonadotropin</i>)
HPO	oś podwzgórze-przysadka-jajnik (ang. <i>hypothalamic - pituitary - ovarian axis</i>)
HPRT1	fosforybozylotransferaza hipoksantynowa 1 (ang. <i>hypoxanthine phosphoribosyltransferase 1</i>)
IP₃	trifosforan inozytolu (ang. <i>inositol 1,4,5 - triphosphate</i>)
LH	hormon luteinizujący (ang. <i>luteinizing hormone</i>)
LHβ	podjednostka β hormonu luteinizującego (ang. <i>luteinizing hormone subunit beta</i>)
LHR	receptor hormonu luteinizującego (ang. <i>luteinizing hormone receptor</i>)
LRRs	powtórzenia bogate w leucynę (ang. <i>leucine-rich repeats</i>)
LuRKO	mysz z nokautem genu dla receptora LH (ang. <i>LH receptor knockout mouse</i>)
MFP488	fosforan metylofluoresceiny 488
MPF	czynnik fazy M/ czynnik wywołujący dojrzewanie (ang. <i>M-phase/maturation promoting factor</i>)
MGCs	przyścienne komórki ziarniste (ang. <i>mural granulosa cells</i>)
NAD⁺	dinukleotydnikotynamidoadeninowy, postać utleniona

NADP+	fosforan dinukleotydu nikotynamidoadeninowego, postać utleniona
NADPH	fosforan dinukleotydu nikotynamidoadeninowego, postać zredukowana
NEBD	rozpad otoczki jądrowej oocytu (ang. <i>nuclear envelope breakdown</i>)
P4	progesteron (ang. <i>progesterone</i>)
PBS	sól fizjologiczna buforowana fosforanami (ang. <i>phosphate buffered saline</i>)
POR	oksydoreduktaza cytochromu P450 (ang. <i>cytochrome P450 oxidoreductase</i>)
qPCR	reakcja łańcuchowa polimerazy w czasie rzeczywistym (ang. <i>quantitative polymerase chain reaction</i> lub <i>real-time PCR</i>)
RPLP1	białko rybosomalne LP1 (ang. <i>ribosomal protein lateral stalk subunit P1</i>)
RTCA	analizator komórek w czasie rzeczywistym (ang. <i>real-time cell analyzer</i>)
RT	odwrotna transkrypcja (ang. <i>reverse transcription</i>)
RT-PCR	reakcja łańcuchowa polimerazy z odwrotną transkrypcją (ang. <i>reverse transcription polymerase chain reaction</i>)
siRNA	mały interferujący RNA (ang. <i>small interfering RNA</i>)
TGF-β	transformujący czynnik wzrostu β (ang. <i>transforming growth factor β</i>)
TGFBR3	receptor typu III transformującego czynnika wzrostu β (ang. <i>transforming growth factor beta receptor 3</i>)
UTR	rejon niepodlegający translacji (ang. <i>untranslated region</i>)

W tekście rozprawy symbole genów pisano kursywą, przy czym symbole genów człowieka zapisywano wielkimi literami, natomiast geny zwierząt małymi literami, ale z pierwszą wielką literą. Symbole białek pisano antykwą (czcionką prostą), przy czym białko ludzkie - wielkimi literami, a białko zwierzęce - z pierwszą wielką literą.

1. WSTĘP

1.1. Świnia domowa (łac. *Sus scrofa domestica*, Linnaeus 1758) jako zwierzę modelowe w badaniach biomedycznych

Historia wykorzystania świń w badaniach biomedycznych sięga starożytności, jednak znaczenie tego gatunku dla wspomnianych badań wzrosło szczególnie w ciągu ostatnich kilku dekad. Charakterystyka anatomiczna i fizjologiczna świni czyni z niej wartościowy model zwierzęcy chorób człowieka, a także model ogólnej fizjologii ssaków. Przewaga świni w badaniach biomedycznych polega między innymi na tym, że ogólne stwierdzenia wyprowadzane z badań na gryzoniach nie w pełni przekładają się na inne gatunki ssaków, a tym bardziej na człowieka. Model myszy różni się od człowieka wieloma krytycznymi parametrami, takimi jak długość życia, wielkość, organizacja genomu, fizjologia i metabolizm, dlatego też zwierzęta gospodarskie - w tym świnia - okazują się być bardziej przydatne od typowych zwierząt laboratoryjnych. Siedemnastu zdobywców Nagrody Nobla wykorzystywało zwierzęta gospodarskie, takie jak bydło, świnię, owce, kozy czy konie, jako zwierzęta modelowe w prowadzonych przez siebie badaniach (Roberts i wsp., 2009). Świnie stanowią wartościowy model do badania endokrynologii rozrodu, a szczególnie do zrozumienia fizjologii jajnika. Wykorzystuje się je do badania morfologii tego narządu, różnicowania tkanek i działania poszczególnych typów komórek (Sun i Nagai, 2003). Komórki z nieprzydatnych komercyjnie narządów odrzucanych po uboju, takie jak oocyty, komórki nabłonka jajowodu, komórki wieńca promienistego czy komórki ziarniste, z powodzeniem mogą być wykorzystywane w hodowli pierwotnej, służąc jako model do badania fizjologii układu rozrodczego ssaków (Wu i wsp., 2001; Areekijserree i Vejaratpimol, 2006; Areekijserree i Chuen-Im, 2012).

1.2. Morfologiczne aspekty folikulogenezy

Folikulogeneza to długotrwały proces rozwoju pęcherzyka jajnikowego, od momentu opuszczenia przez niego puli pęcherzyków spoczynkowych i rozpoczęcia wzrostu, aż do owulacji lub atrezji. Rosnące pęcherzyki podlegają złożonemu procesowi rozwoju, który przede wszystkim obejmuje proliferację i różnicowanie się komórek somatycznych pęcherzyka. W tym samym czasie oocyt przechodzi zmiany niezbędne do późniejszego wznowienia mejozy po przedowulacyjnym piku gonadotropin. Folikulogeneza jajnikowa u ssaków rozpoczyna się wraz z utworzeniem pęcherzyków pierwotnych, co ma miejsce

jeszcze w czasie życia płodowego (np. u człowieka, świni) lub w okresie neonatalnym (np. u gryzoni).

Pęcherzyk pierwotny (ang. *primordial follicle*) zbudowany jest z centralnie położonego oocytu I rzędu otoczonego pojedynczą warstwą spłaszczonych komórek ziarnistych (GCs, ang. *granulosa cells*). Od zrębu jajnika oddziela go cienka błona podstawna (Hummitzsch i wsp., 2013). Cykl komórkowy oocytów na tym etapie rozwoju pęcherzyka zatrzymany jest w stadium profazy I. Pęcherzyki pierwotne nie są aktywne hormonalnie i nie posiadają receptorów gonadotropin (Oktay i wsp., 1997; Rice i wsp., 2007). Między komórkami ziarnistymi pęcherzyków pierwotnych, a także między komórkami ziarnistymi a oocytem brak jest wyspecjalizowanych połączeń. Jakikolwiek substancje niezbędne oocytowi dostarczane są przez endocytozę lub na drodze dyfuzji, dzięki ścisłemu kontaktowi pomiędzy komórkami ziarnistymi a oocytem (Lucci i wsp., 2001; Yu i wsp., 2010).

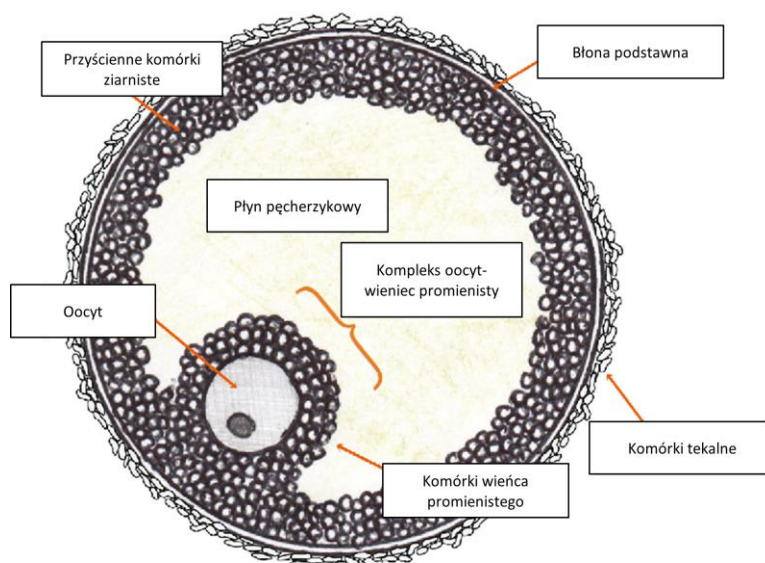
Pęcherzyki pierwotne stanowią tzw. rezerwę jajnikową, czyli pulę pęcherzyków spoczynkowych, z której będą się wywodzić wszystkie pęcherzyki wzrastające. Gdy niektóre ze spłaszczonych komórek ziarnistych otaczających oocyt zaczynają przybierać kształt sześcienny, pęcherzyk określa się mianem "pęcherzyka przejściowego". Pęcherzyki takie nadal zaliczane są do puli spoczynkowej. Proces powstawania pęcherzyków pierwotnych oraz ich aktywacja pozostają wciąż najslabiej poznanymi etapami folikulogenezy.

Przekształceniu pęcherzyków pierwotnych w pierwszorzędowe (ang. *primary follicles*) towarzyszy zmiana morfologii komórek ziarnistych ze spłaszczonych w sześcienne oraz zwiększenie średnicy oocytu (Braw-Tal i Yossefi, 1997). Powiększony oocyt wytwarza wokół siebie glikoproteinową otoczkę zwaną osłonką przejrzystą (łac. *zona pellucida*), która oddziela go od komórek ziarnistych (Braw-Tal i Yossefi, 1997). Pęcherzyki pierwszorzędowe są pierwszymi zaliczanymi do puli pęcherzyków wzrastających.

Pęcherzyk drugorzędowy (ang. *secondary follicle*) składa się z co najmniej dwóch warstw komórek ziarnistych, powstałych w wyniku ich proliferacji, oraz z kontynuującego swój wzrost oocytu. Na zewnątrz pęcherzyków drugorzędowych zaczynają się pojawiać pochodzące ze zrębu jajnika komórki osłonki (tzw. komórki tekalne, ang. *theca cells*). Pęcherzyki drugorzędowe, ze względu na obecność zarówno receptorów hormonu folikulotropowego (FSHR, ang. *follicle-stimulating hormone receptor*) w komórkach ziarnistych, jak i receptorów hormonu luteinizującego (LHR, ang. *luteinizing hormone*

receptor) w komórkach osłonki, są wrażliwe na gonadotropiny i zaczynają syntetyzować steroidowe hormony płciowe (Yamoto i wsp., 1992; Zhang i wsp., 2001; Yung i wsp., 2014).

Oocyt w pęcherzyku trzeciorzędowym (ang. *tertiary [antral] follicle*) otoczony jest wieloma warstwami komórek ziarnistych, między którymi pojawiają się przestrzenie zawierające płyn pęcherzykowy, stopniowo zlewające się w jedną jamę (łac. *antrum*). W osłonce pęcherzyka wyróżnić można warstwę wewnętrzną (łac. *theca interna*) oraz zewnętrzną (łac. *theca externa*). Pęcherzyk trzeciorzędowy szybko powiększa swe rozmiary i różnicuje się pod wpływem gonadotropin, tworząc w efekcie dojrzały pęcherzyk Graafa (ryc. 1).



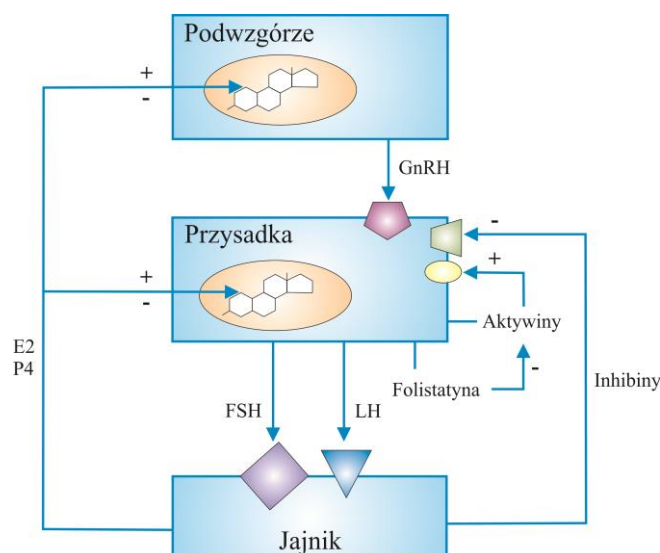
Ryc. 1. Schemat budowy pęcherzyka Graafa [zmodyfikowano wg Hennet i Combelles, 2012].

W pęcherzyku przedowulacyjnym (ang. *preovulatory [Graafian] follicle*) płyn pęcherzykowy zwiększa swoją objętość do tego stopnia, że otoczony komórkami ziarnistymi oocyt zepchnięty zostaje na biegun pęcherzyka. Wraz z powstaniem jamy pęcherzyka komórki ziarniste rozdzielają się na dwie subpopulacje, różniące się od siebie nie tylko umiejscowieniem w pęcherzyku, ale również ekspresją genów i funkcją. Przyściennne komórki ziarniste (MGCs, ang. *mural granulosa cells*) wyściełają ścianę pęcherzyka i odpowiadają głównie za steroidogenezę, natomiast komórki wienca promienistego (CCs, ang. *cumulus*

cells) ściśle otaczają oocyt, tworząc wraz z nim tzw. kompleks oocyt-wieniec promienisty (COC, ang. *cumulus-oocyte complex*), a dzięki pozostawaniu w bezpośrednim kontakcie z oocytem regulują jego wzrost, rozwój i dojrzewanie (Eppig i wsp., 1998; Li i wsp., 2000; Diaz i wsp., 2007; Harris i wsp., 2011). Różnica między MGCs a CCs polega również na tym, że tylko komórki wieńca promienistego, w odpowiedzi na przedowulacyjny pik LH, podlegają tzw. procesowi ekspansji (rozproszenia), dzięki któremu oocyt może zostać uwolniony z pęcherzyka Graafa podczas owulacji (Salustri i wsp., 1989; Kimura i wsp., 2002; Nagyova i wsp., 2017).

1.3. Oś podwzgórze - przysadka - jajnik

Rozmnażanie ssaków jest kontrolowane za pomocą interakcji między podwzgórzem, przysadką i gonadami. Składowe te tworzą u osobników żeńskich oś podwzgórze-przysadka-jajnik (HPO axis, ang. *hypothalamic-pituitary-ovarian axis*), która działa na zasadzie regulacji hormonalnej oraz pętli sprzężeń zwrotnych. Neurony okolicy przedwzrostkowej podwzgórza syntetyzują i wydzielają hormon uwalniający gonadotropiny, zwany także gonadoliberyną (GnRH, ang. *gonadotropin-releasing hormone*), będący nadrzędnym neuroregulatorem osi HPO. GnRH wraz z krwią krążenia wrotnego przysadki trafia do jej przedniego płata, gdzie po związaniu ze swoistymi receptorami na gonadotrofach stymuluje syntezę i uwalnianie hormonów gonadotropowych - hormonu luteinizującego (LH, ang. *luteinizing hormone*) i, w mniejszym zakresie, hormonu folikulotropowego (FSH, ang. *follicle-stimulating hormone*). Hormony steroidowe jajnika, takie jak estrogeny i progesteron, wraz z hormonami peptydowymi – aktywinami, inhibinami i folistatyną – modułują poziomy LH i FSH poprzez sprzężenia zwrotne wywierane zarówno na poziomie przysadki, jak i podwzgórza. LH i FSH z kolei regulują najważniejsze aspekty rozmnażania zachodzące w jajnikach, takie jak steroidogeneza, gametogeneza i owulacja. Schematyczne działanie osi podwzgórze - przysadka - jajnik przedstawiono na rycinie 2.



Ryc. 2. Ogólny schemat dodatnich i ujemnych pętli sprzężeń zwrotnych wywieranych przez poszczególne składowe osi podwzgórze-przysadka-jajnik [zmodyfikowano wg Bulun, 2011 W: Williams Textbook of Endocrinology]. GnRH – gonadoliberyna, FSH – hormon folikulotropowy, LH – hormon luteinizujący, E2 – 17-beta estradiol, P4 – progesteron, „+” – działanie stymulujące, „-” – działanie hamujące.

1.3.1. Hormon luteinizujący (LH) i hormon folikulotropowy (FSH) – budowa i wpływ na funkcję jajnika

LH i FSH to produkowane przez komórki przedniego płata przysadki mózgowej hormony glikoproteinowe o masie cząsteczkowej ok. 30 kDa. Każda z gonadotropin jest heterodimerem zbudowanym z dwóch podjednostek - α i β - powiązanych ze sobą wiązaniami niekowalencyjnymi (Pierce i Parsons, 1981). Podjednostka α (CGA, ang. *chorionic gonadotropin subunit alpha*) ma identyczną strukturę polipeptydową zarówno w przypadku FSH jak i LH, natomiast sekwencja aminokwasowa podjednostki β każdego z tych hormonów jest różna i decyduje ona o swoistości biologicznej heterodimerów $\alpha\beta$. U człowieka, dojrzała podjednostka α jest zbudowana z 92 reszt aminokwasowych; kodujący ją gen składa się z czterech egzonów i jest zlokalizowany na chromosomie 6 (6q12.21) (Fiddes i Goodman, 1981). Podjednostki β ludzkiego FSH (FSH β , ang. *follicle-stimulating hormone subunit beta*) i LH (LH β , ang. *luteinizing hormone subunit beta*) składają się, odpowiednio, ze 111 i 121 reszt aminokwasowych. Gen *LH β* leży na chromosomie 19 (19q13.32), natomiast gen *FSH β* na chromosomie 11 (11p13) (Talmadge i wsp., 1984; Watkins i wsp., 1987).

FSH jest głównym czynnikiem stymulującym folikulogenezę i oogenezę, a także regulatorem funkcji endokrynnej gonad. Hormon ten jest niezbędny dla prawidłowego funkcjonowania jajników, polegającego na wytwarzaniu dojrzałych oocytów i syntezie hormonów steroidowych u wszystkich gatunków ssaków. W przypadku niedoboru FSH, wywołanego spontanicznymi lub ukierunkowanymi mutacjami genetycznymi, wzrost pęcherzyków zostaje zatrzymany, a u samic stwierdza się niepłodność (Kumar i wsp., 1997; Layman i wsp., 1997; Burns i wsp., 2001).

Chociaż gonadotropiny zdają się nie mieć wpływu na inicjację wzrostu pęcherzyków jajnikowych, mają jednak wpływ na wczesne stadia ich rozwoju. FSH nie jest niezbędny dla przekształcenia się pęcherzyków pierwotnych w pęcherzyki pierwszorzędowe, ponieważ pęcherzyki pierwotne nie wykazują ekspresji receptorów dla FSH (Oktay i wsp., 1997; Rice i wsp., 2007). Wykazano jednak, że nawet pęcherzyki pierwszo- i drugorzędowe, których rozwój może się odbywać bez udziału gonadotropin, są na nie wrażliwe, a zatem hormony te mogą działać optymalizująco na rozwój pęcherzyków preantralnych (McGee i wsp., 1997; Hardy i wsp., 2017). FSH stymuluje rozwój pęcherzyków od stadium antralnego do przedowulacyjnego, w szczególności zaś promuje proliferację i różnicowanie się komórek ziarnistych. W wyniku tego różnicowania się komórki ziarniste nabywają zdolność do produkcji dużych ilości 17β -estradiolu (dzięki ekspresji aromatazy) oraz zdolność do odpowiedzi na sygnał LH (dzięki ekspresji receptora LH), co jest niezbędne do owulacji oraz powstania i utrzymania funkcji ciała żółtego. Zarówno zwiększenie ekspresji aromatazy przez komórki ziarniste, jak i pojawienie się w nich ekspresji LHR są procesami indukowanymi przez FSH (Piquette i wsp., 1991; Silva i Price, 2000).

LH działa synergistycznie z FSH w bardziej zaawansowanych stadiach rozwoju pęcherzyków. Stopniowe zwiększanie się krążących poziomów LH jest konieczne dla wzrostu i rozwoju małych pęcherzyków antralnych do stadium przedowulacyjnego (Richards i Bogovich, 1982; Hattori i wsp., 2018). Szczytowe stężenie tego hormonu we krwi w ostatnich dniach fazy pęcherzykowej cyklu miesięczkowego prowadzi do owulacji, luteinizacji i powstania ciała żółtego. LH podtrzymuje również produkcję progesteronu w ciałku żółtym, działając na złuteinizowane komórki ziarniste (Richards i wsp., 1998; Edson i wsp., 2009).

Obie gonadotropiny są niezbędne do produkcji hormonów steroidowych przez jajnik. Zgodnie z klasyczną koncepcją "dwóch komórek – dwóch gonadotropin", komórki

wewnętrznej warstwy osłonki pęcherzyków jajnikowych produkują androgeny, które w wyniku aromatyzacji w warstwie ziarnistej ulegają przemianie do estrogenów. Komórki osłonki wewnętrznej są stymulowane przez LH, a komórki warstwy ziarnistej przez FSH (Fevold, 1941). Model ten znalazł potwierdzenie na podstawie immunohistochemicznej lokalizacji enzymów biorących udział w syntezie androgenów (P450_{scc}, 3 β HSD oraz P450_{c17}) w komórkach wewnętrznej warstwy osłonki rozwijających się pęcherzyków oraz enzymu P450_{arom} (aromatazy) w komórkach ziarnistych rosnących pęcherzyków (Suzuki i wsp., 1993). Schemat steroidogenezy jajnikowej u świni jest zgodny z koncepcją "dwóch komórek - dwóch gonadotropin", tzn. androgeny produkowane przez komórki tekalne są następnie aromatyzowane do estrogenów przez komórki ziarniste. Jednak w przeciwieństwie do innych gatunków, komórki tekalne u świni wykazują również ekspresję aromatazy i mogą syntetyzować estrogeny prawdopodobnie w ilościach porównywalnych do tych syntetyzowanych przez komórki ziarniste (Foxcroft i Hunter, 1985; Shores i Hunter, 1999).

Znaczenie gonadotropin w jajniku wykazano na myszach z nokautami genów *Lhr*, *Fshr* i *Fsh β* . Myszy z niedoborem Fsh (*Fsh β* (-/-)) były nieplodne z powodu zatrzymania rozwoju pęcherzyków przed osiągnięciem stadium antralnego. W pęcherzykach tych komórki ziarniste wykazywały zwiększony poziom mRNA *Fshr*, przy jednoczesnym obniżeniu poziomów mRNA genu aromatazy (*Cyp19*) i genów podjednostek inhibin/aktywin (*Inhba* i *Inhbb*). Ekspresja mRNA *Lhr* w komórkach ziarnistych była pięciokrotnie niższa niż u myszy typu dzikiego (Burns i wsp., 2001). U samic myszy z nokautem genu *Fshr* (*Fshr* (-/-)) (FORKO, ang. *FSH receptor knockout*) macica była atroficzna i zwierzęta te były nieplodne na skutek zatrzymania folikulogenezy przed stadium antralnym (Dierich i wsp., 1998). Największe obserwowane u tych osobników pęcherzyki miały nie więcej niż cztery warstwy komórek ziarnistych. Rozwój pęcherzyków jajnikowych u myszy z nokautem genu *Lhr* (*Lhr* (-/-)) (LuRKO, ang. *lutropin receptor knockout*) nie wykraczał poza stadium wczesnego pęcherzyka antralnego i myszy takie były nieplodne z powodu niskiej produkcji estrogenów oraz braku owulacji (Lei i wsp., 2001; Zhang i wsp., 2001). Co więcej, wysokie dawki FSH nie były zdolne do indukcji końcowego rozwoju pęcherzyków i owulacji przy braku LHR, dowodząc że ekspresja LHR jest niezbędna nie tylko dla owulacji, ale również dla dojrzewania pęcherzyków przed owulacją (Pakarainen i wsp., 2005).

1.3.2. Hormonalna regulacja wydzielania LH i FSH

Synteza i wydzielanie gonadotropin znajdują się pod pozytywną kontrolą podwzgórzowego GnRH, natomiast produkowane w jajniku hormony steroidowe (estradiol i progesteron) oraz peptydowe (głównie inhibiny) również wpływają na syntezę i wydzielanie gonadotropin, oddziałując poprzez ujemne i dodatnie pętle sprzężeń zwrotnych albo bezpośrednio na przysadkę, albo pośrednio poprzez podwzgórze (głównie przez modulowanie wydzielania GnRH). Wydzielanie FSH i LH modyfikują również wytwarzane przez przysadkę aktywiny i folistatyna.

1.3.2.1. Rola pulsacyjnej sekrecji gonadoliberyny (GnRH)

Do prawidłowego przebiegu syntezy i wydzielania gonadotropin przez przysadkę mózgową niezbędne jest uwalnianie GnRH z podwzgórza w sposób pulsacyjny. Wydzielanie GnRH w sposób ciągły prowadzi do zahamowania uwalniania LH i FSH oraz supresji transkrypcji genów podjednostek α i β obu gonadotropin przez przednią część przysadki, a w rezultacie do hypoaktywności gonad (Belchetz i wsp., 1978; Haisenleder i wsp., 1991). Częstotliwość i amplituda pulsacyjnego wydzielania GnRH zmienia schemat wydzielania LH i FSH w ten sposób, iż niższa częstotliwość skutkuje uwalnianiem FSH, natomiast zwiększona sprzyja wydzielaniu LH (Wildt i wsp., 1981; Savoy-Moore i Swartz, 1987). Również sama transkrypcja podjednostek β gonadotropin zależy od częstotliwości pulsów GnRH. Liczne badania wykazały, że obniżona częstotliwość (co około 2 - 4 godz.) pulsów GnRH faworyzuje ekspresję genu *FSH β* , podczas gdy zwiększona częstotliwość (co około 30 min.) promuje ekspresję genu *LH β* (Haisenleder i wsp., 1991; Kaiser i wsp., 1997; Burger i wsp., 2008; Haisenleder i wsp., 2008). Wydaje się również, że *LH β* wykazuje większą wrażliwość na częstotliwość i amplitudę pulsów GnRH niż *FSH β* (Burger i wsp., 2008). Chociaż poziomy mRNA wspólnej podjednostki α (*CGA*) obu gonadotropin również reagują na pulsację GnRH, jej zmieniająca się częstotliwość jest mniej istotna dla ogólnej produkcji LH i FSH, ponieważ *CGA* jest wytwarzana w nadmiarze w stosunku do *LH β* i *FSH β* zarówno przy szybkiej, jak i wolnej frekwencji pulsów GnRH (Weiss i wsp., 1990; Bédécarrats i Kaiser, 2003; Ferris i Shupnik, 2006). To, w jaki sposób gonadotrofy rozróżniają częstotliwości pulsów GnRH, i w następstwie tego w różny sposób regulują ekspresję *LH β* i *FSH β* , nadal pozostaje kwestią do wyjaśnienia.

1.3.2.2. Modulacja przez hormony steroidowe

Hormony steroidowe jajnika, estrogen i progesteron, regulują ekspresję genów gonadotropin, jak również ich wydzielanie, poprzez ujemne i dodatnie pętle sprzężeń zwrotnych działających na podwzgórze i przysadkę. Przez większą część cyklu jajnikowego układ rozrodczy działa w klasycznym trybie ujemnego sprzężenia zwrotnego, tj. estradiol i progesteron hamują wydzielanie GnRH. U samic szczurów poddanych ovariectomii, usunięcie hamującego wpływu produkowanego w jajniku estradiolu skutkowało podwyższonymi poziomami LH i FSH (Shupnik i wsp., 1988). Na poziomie podwzgórza, sprzężenie zwrotne estradiolu (i progesteronu) jest wywierane głównie poprzez modulację amplitudy pulsacyjnego wydzielania GnRH. Estradiol zwiększa częstotliwość pulsów GnRH, natomiast podwyższone poziomy progesteronu mogą obniżać pulsację GnRH, prowadząc do zwiększonej syntezy i wydzielania FSH, co obserwowano w późnej fazie lutealnej cyklu (Haisenleder i wsp., 1991; Goodman, 1996). Oddziaływanie hormonów steroidowych na syntezę i wydzielanie hormonów gonadotropowych odbywa się również na poziomie przysadki, co wykazano w doświadczeniach na myszach z nokautem genu receptora estrogenowego α ($ER\alpha$ (-/-)) w komórkach gonadotrofowych przysadki. Myszy takie cechowały się niepłodnością, podwyższonymi stężeniami LH w surowicy i zwiększoną ekspresją genu podjednostki $LH\beta$, w wyniku braku ujemnego sprzężenia zwrotnego wywieranego przez estradiol na gonadotrofy przysadki (Gieske i wsp., 2008; Singh i wsp., 2009).

Cykl miesięczkowy jest również zależny od zachodzącego w jego połowie, indukowanego utrzymującymi się wysokimi poziomami estradiolu, dodatniego sprzężenia zwrotnego powodującego zwiększenie wydzielania LH (i w mniejszym stopniu FSH) przed owulacją. Pik LH zapoczątkowuje w komórkach ziarnistych ekspresję genów, których produkty białkowe inicjują luteinizację, dając oocytowi sygnał do rozpoczęcia dojrzewania meiotycznego, oraz prowadzą do pęknięcia ściany pęcherzyka i owulacji (Russell i Robker, 2007). Ścieżki sygnałowe, które odróżniają dodatnie i ujemne sprzężenie zwrotne estrogenów nie zostały jak dotąd w pełni poznane.

1.3.2.3. Modulacja przez czynniki niesteroidowe (inhibiny/aktywiny/folistatynę)

Ważną rolę w regulacji wydzielania hormonów gonadotropowych przez przysadkę mózgową odgrywają również inhibiny, aktywiny i folistatyna, choć wpływ ten w znacznie

większym stopniu dotyczy FSH niż LH (Knight, 1996). Inhibiny i aktywiny są czynnościowo antagonistycznymi członkami nadrodziny transformującego czynnika wzrostu β (TGF- β , ang. *transforming growth factor β*). Peptydy te po raz pierwszy wyizolowano z płynu pęcherzykowego jajników krów i świń, i scharakteryzowano w oparciu o ich zdolność do modulowania syntezy i wydzielania FSH przez komórki przysadki *in vitro* (Robertson i wsp., 1985; Vale i wsp., 1986).

Inhibiny hamują syntezę i wydzielanie FSH, zarówno poprzez zmniejszanie ekspresji FSH (Ling i wsp., 1985; Muttukrishna i wsp., 2002), jak również przez obniżanie ekspresji receptorów GnRH (Wang i wsp., 1989; Han i wsp., 2013). Konkurują one również o wiązanie z receptorami aktywin na gonadotrofach, powodując hamowanie ich działania (Martens i wsp., 1997; Zhu i wsp., 2012). Powinowactwo inhibin do receptorów aktywin zwiększa dodatkowo będący ko-receptorem betaglikan (receptor typu III transformującego czynnika wzrostu β , TGFBR3), czyniąc z inhibin bardzo silnych antagonistów aktywin (Lewis i wsp., 2000; Wiater i wsp., 2009).

Produkowane w komórkach gonadotrofowych przysadki aktywiny łączą się w sposób autokrynowy/parakrynowy ze swoistymi receptorami na powierzchni tych komórek. Aktywacja receptorów prowadzi do zwiększonej biosyntezy podjednostek β FSH poprzez zwiększanie transkrypcji i stabilności mRNA genu *FSH β* (Caroll i wsp., 1991; Weiss i wsp., 1995) oraz do nasilenia tworzenia receptora GnRH w wyniku aktywacji transkrypcji genu *GnRHR* (Fernández-Vázquez i wsp., 1996; Norwitz i wsp., 2002). Pojawiają się również doniesienia świadczące o tym, że w pewnych warunkach aktywiny mogą również regulować powstawanie LH, poprzez modyfikowanie ekspresji podjednostek LH β (Yamada i wsp., 2004; Coss i wsp., 2005).

O ile głównym (choć nie jedynym) źródłem inhibin są komórki ziarniste jajnika, o tyle aktywiny są także produkowane w innych narządach, takich jak mózg, nadnercza, przysadka, macica, śledziona czy łożysko (Meunier i wsp., 1988). Dzięki tak szerokiemu profilowi ekspresji, aktywiny wywierają swe działanie na drodze mechanizmów auto- i parakrynowych, natomiast inhibiny działają głównie w sposób endokrynowy.

Folistatyna to peptyd ulegający ekspresji między innymi w jajnikach i przysadce (Nakamura i wsp., 1990; Popovics i wsp., 2011). Wiąże ona z wysokim powinowactwem aktywiny, blokując tym samym ich łączenie się z receptorami aktywin oraz dalszą aktywację

ścieżek przekazywania sygnału (Thompson i wsp., 2005). Folistatyna może również przyspieszać internalizację i degradację aktywin (Cash i wsp., 2009). Ostatecznym rezultatem działania folistatyny jest więc zmniejszenie biodostępności aktywin, a tym samym utrata ich dodatniego wpływu na syntezę i uwalnianie FSH.

1.3.3. Receptory gonadotropin

1.3.3.1. Struktura i mechanizm aktywacji

LH i FSH wywierają zróżnicowane funkcje biologiczne poprzez aktywację swoistych receptorów błonowych. W związku z tym, że receptor LH ma zdolność do wiązania z wysokim powinowactwem zarówno hormonu luteinizującego, jak i gonadotropiny kosmówkowej (CG, ang. *chorionic gonadotropin*), określa się go również mianem receptora LH/CG. Hormon folikulotropowy jest natomiast jedynym ligandem receptora FSH.

Oba receptory są strukturalnie ze sobą powiązаныmi członkami nadrodziny receptorów sprzężonych z białkami G (GPCR, ang. *G-protein coupled receptor*). Zbudowane są one z zewnątrzkomórkowej domeny na końcu N łańcucha polipeptydowego, domeny transbłonowej składającej się z siedmiu helis α połączonych ze sobą trzema pętlami zewnątrzkomórkowymi oraz trzema pętlami wewnątrzkomórkowymi, która zakotwicza receptor w błonie komórkowej, oraz krótkiej domeny cytoplazmatycznej na końcu C, odpowiedzialnej za wiązanie białka G i transdukcję sygnału. Cechą charakterystyczną grupy receptorów hormonów glikoproteinowych, do której należą zarówno LHR, jak i FSHR, jest duża domena zewnątrzkomórkowa zawierająca powtórzenia bogate w leucynę (LRRs, ang. *leucine-rich repeats*), które pośredniczą w wiązaniu liganda z wysokim powinowactwem i swoistością (Braun i wsp., 1991; Smits i wsp., 2003).

Po związaniu liganda przez domenę zewnątrzkomórkową, receptor podlega zmianie konformacji. Prowadzi to do wymiany GDP-GTP w pokrewnym białku G, co skutkuje oddysocjowaniem inhibujących podjednostek $\beta\gamma$ od podjednostki α i prowadzi do aktywacji cyklazy adenylanowej. Powoduje to wzrost wewnątrzkomórkowych poziomów cAMP oraz aktywację kinaz białkowych A i licznych szlaków sygnałowych, czego zwieńczeniem jest zwiększona steroidogeneza oraz stymulacja innych funkcji komórki (Menon i wsp., 2010). Przy wyższych stężeniach, LH lub hCG mogą również aktywować fosfolipazę C, powodując powstawanie trifosforanu inozytolu (IP₃) oraz diacyloglicerolu (DAG) jako wtórnych przekaźników (Davis i wsp., 1987; Gudermann i wsp., 1992).

U człowieka, geny *FSHR* i *LHR* są zlokalizowane na chromosomie 2 (2p21), w odległości 200 kb od siebie (Rousseau-Merck i wsp., 1990; Rousseau-Merck i wsp., 1993). Składają się one, odpowiednio, z 10 i 11 egzonów, przy czym pierwszych 9 lub 10 egzonów koduje domenę zewnątrzkomórkową, a domena transbłonowa i część cytoplazmatyczna są kodowane przez ostatnie, najdłuższe egzony (Heckert i wsp., 1992). U świni, zarówno gen *Lhr*, jak i *Fshr* wykazują kolokalizację w rejonie q2.2-q2.3 chromosomu 3 (Yerle i wsp., 1992; Remy i wsp., 1995).

1.3.3.2. Ekspresja receptorów gonadotropin w jajniku

Ekspresja receptorów FSH, zarówno na poziomie mRNA, jak i białka, cechuje wyłącznie komórki ziarniste jajnika, a jej poziomy są ściśle związane ze stopniem zróżnicowania komórek ziarnistych i dojrzałością pęcherzyka (Camp i wsp., 1991). mRNA *Fshr* po raz pierwszy obserwowano w jajnikach płodowych szczura, około dnia 20.5 rozwoju embrionalnego. Transkrypty te odpowiadały tylko zewnątrzkomórkowej domenie receptora Fsh, a ekspresję pełnej długości mRNA obserwowano kilka dni później (Rannikki i wsp., 1995). Oktay i wsp. (1997) wykazali, że ekspresja genu *FSHR* u człowieka najwcześniej pojawia się w pęcherzykach pierwszorzędowych, a więc pierwszych zaliczanych do puli pęcherzyków rosnących. Ekspresję *FSHR* stwierdzano w komórkach ziarnistych pęcherzyków jajnikowych począwszy od stadium pęcherzyków drugorzędowych (Yamoto i wsp., 1992). Podobnie u innych gatunków ssaków, ekspresję transkryptów *Fshr* obserwowano począwszy od stadium pęcherzyków pierwszorzędowych, natomiast ekspresja receptora Fsh pojawiała się w małych pęcherzykach preantralnych z dwoma lub więcej warstwami komórek ziarnistych (tj. w pęcherzykach drugorzędowych) (Tisdall i wsp., 1995; Lan i wsp., 2014). Poziomy ekspresji mRNA genu *Fshr* były najwyższe w małych pęcherzykach antralnych, a w miarę powiększania się rozmiarów pęcherzyków spadały (LaBarbera, 1994; Abdennabi i wsp., 1999; Marelli i wsp., 2014).

Pierwszego bezpośredniego dowodu na to, że komórki ziarniste jajnika wykazują ekspresję *FSHR*, a miejsca wiązania LH występują w komórkach tekalnych jajnika dostarczyły autoradiograficzne badania Zeleznik i wsp. (1974). Wykazały one również, że podawanie szczurom *in vivo* hormonu folikulotropowego prowadzi do zwiększonego wiązania znakowanego radioaktywnym jodem hCG przez komórki ziarniste, dostarczając tym samym pierwszego bezpośredniego dowodu na indukcję przez FSH receptorów LH w komórkach ziarnistych.

Receptory LH ulegają ekspresji w komórkach osłonki (theca interna), komórkach ziarnistych pęcherzyków jajnikowych oraz w ciałku żółtym, a schemat tej ekspresji zmienia się w zależności od fazy cyklu jajnikowego (LaPolt i wsp., 1990; Segaloff i wsp., 1990). W jajnikach myszy i szczura, ekspresję mRNA genu *Lhr* obserwowano po raz pierwszy w komórkach tekalnych wczesnych pęcherzyków antralnych (Bukovsky i wsp., 1993; Zhang i wsp., 2001), natomiast pęcherzyki preantralne (pierwotne, pierwszo- i drugorzędowe) nie wykazywały ekspresji mRNA genu *Lhr* (Camp i wsp., 1991; Bukovsky i wsp., 1993). W miarę wzrostu pęcherzyków jajnikowych, ekspresję receptorów LH w odpowiedzi na FSH, estradiol i czynniki parakrynowe obserwowano także w komórkach ziarnistych późnych pęcherzyków antralnych szczura, świni i człowieka, a poziomy tej ekspresji były najwyższe w dużych pęcherzykach przedowulacyjnych (Zeleznik i wsp., 1974; Segaloff i wsp., 1990; Peng i wsp., 1991; Yamoto i wsp. 1992; Liu i wsp., 1998; Yung i wsp., 2014). W odpowiedzi na przedowulacyjny wyrzut LH, poziomy ekspresji mRNA genu *LHR* w różnicujących się do komórek luteinowych komórkach ziarnistych ulegały przejściowemu obniżeniu (LaPolt i wsp., 1990; Segaloff i wsp., 1990; Jeppesen i wsp., 2012; Ophir i wsp., 2014), po czym wracały do stanu poprzedniego, osiągając maksymalny poziom w połowie fazy lutealnej cyklu jajnikowego (Nishimori i wsp., 1995; Smith i wsp., 1996). Wraz z zanikiem ciała żółtego, poziomy ekspresji receptora LH ponownie spadały (Lu i wsp., 1993; Nishimori i wsp., 1995).

Badania immunocytochemiczne i hybrydyzacja *in situ* u szczurów wykazały, że komórki ziarniste mogą mieć znacząco różne poziomy ekspresji LH/CGR, w zależności od ich umiejscowienia w ścianie pęcherzyka. Wyższe poziomy LH/CGR stwierdzano w przyściennych komórkach ziarnistych umiejscowionych bliżej błony podstawnej, w porównaniu z tymi od strony jamy pęcherzyka (Peng i wsp., 1991; Eppig i wsp., 1997). Powyższy schemat ekspresji dotyczy MGCs, natomiast w komórkach wieńca promienistego ekspresji LHR nie stwierdzano lub też jej poziomy były znacznie niższe niż w ściennych komórkach ziarnistych (Eppig i wsp., 1997; Jeppesen i wsp., 2012). Takie zachodzące za pośrednictwem oocytu hamowanie ekspresji LHR może stanowić mechanizm chroniący CCs przed przedwczesną luteinizacją oraz zapewniać właściwe mikrośrodowisko dla skutecznego rozwoju i dojrzewania oocytu (Procházka i wsp., 2009).

1.4. Połączenia szczelinowe

Połączenia szczelinowe (GJ, ang. *gap junction*), zwane również połączeniami jonowo-metabolicznymi lub połączeniami typu neksus, są powszechne w organizmach wielokomórkowych i odgrywają ważną rolę w regulacji i koordynacji metabolizmu oraz czynności komórek podczas wzrostu i różnicowania się narządów i tkanek. Rola komunikacji międzykomórkowej z udziałem połączeń szczelinowych (GJC, ang. *gap junctional communication*) została dowiedziona w różnych procesach rozwojowych, takich jak morfogeneza, różnicowanie i wzrost komórek. Przypisuje się jej również udział w przekazywaniu sygnałów w komórce, funkcji wydzielniczej oraz sygnalizacji parakrynowej (Serre-Beinier i wsp., 2002; Gittens i wsp., 2005). Połączenia szczelinowe występują u kręgowców między komórkami niemal wszystkich tkanek z wyjątkiem erytrocytów, w pełni zróżnicowanych komórek mięśni szkieletowych oraz plemników (Rackauskas i wsp., 2010). W celu bezpośredniej międzykomórkowej komunikacji, komórki roślinne połączone są ze sobą w podobny sposób, lecz z użyciem struktur zwanych plazmodesmami (Kumar i Gilula, 1996; Mese i wsp., 2007).

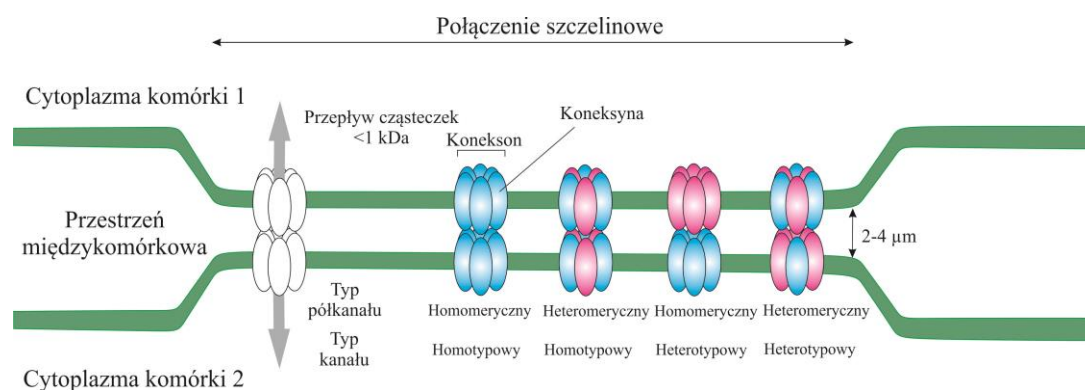
1.4.1. Struktura i funkcja połączeń szczelinowych

Połączenia szczelinowe stanowią skupiska kanałów przecinających błony komórkowe sąsiadujących ze sobą komórek, umożliwiających bezpośredni kontakt między ich cytoplazmą. Każde takie skupisko zawierać może dziesiątki lub tysiące pojedynczych kanałów i mieć od poniżej stu nanometrów do kilku mikrometrów średnicy (McNutt i Weinstein, 1970; Forge i wsp., 2003). Połączenia szczelinowe po raz pierwszy zostały zaobserwowane w obrazie z mikroskopu elektronowego przez Revel i Karnovsky (1967), którzy badając mięsień sercowy i wątrobę myszy znaleźli miejsca, gdzie dwie błony przylegających do siebie komórek oddzielone były jednolitą wąską szczeliną.

Dzięki połączeniom szczelinowym komórki mogą wymieniać między sobą małe cząsteczki o masie nieprzekraczającej 1 kDa, takie jak jony nieorganiczne (K^+ i Ca^{2+}), nukleotydy, aminokwasy, wtórne przekaźniki (cAMP, cGMP i IP_3) oraz małe metabolity (glukoza, mniejsze sacharydy) (Bevans i Harris, 1999; Goldberg i wsp., 1999; Niessen i wsp., 2000). Poza wymianą substancji (koordynacja metabolizmu), połączenia typu neksus uczestniczą również w rozprzestrzenianiu impulsów elektrycznych w mięśniu sercowym, mięśniach gładkich i między komórkami nerwowymi (Barr i wsp., 1965; Bennett i Zukin, 2004). Valiunas i wsp. (2005) wykazali, że połączenia jonowo-metaboliczne umożliwiają

również transfer siRNA (ang. *small interfering RNA*) między przylegającymi komórkami, chociaż niejasnym pozostaje, czy siRNA jest również przekazywany z komórki do komórki *in vivo*.

Każdy kanał połączenia szczelinowego składa się z dwóch półkanałów zwanych koneksonami, z których każdy należy do jednej z partycypujących komórek. Konekson zbudowany jest z sześciu podjednostek koneksynowych otaczających centralnie położony por. Większość komórek wykazuje ekspresję więcej niż jednego typu koneksyn (Cx, ang. *connexin*), co umożliwia powstawanie koneksonów heteromerycznych (zbudowanych z dwóch lub więcej typów koneksyn) oraz koneksonów homomerycznych (utworzonych przez jeden rodzaj koneksyn). Co więcej, kanały tworzone przez koneksyny mogą być homotypowe - zbudowane z identycznych koneksonów, lub heterotypowe - gdy dwa tworzące je koneksyny są różne (ryc. 3).



Ryc. 3. Schemat budowy połączenia szczelinowego oraz typy półkanałów i kanałów koneksynowych [zmodyfikowano wg Shimizu i Stopfer, 2013].

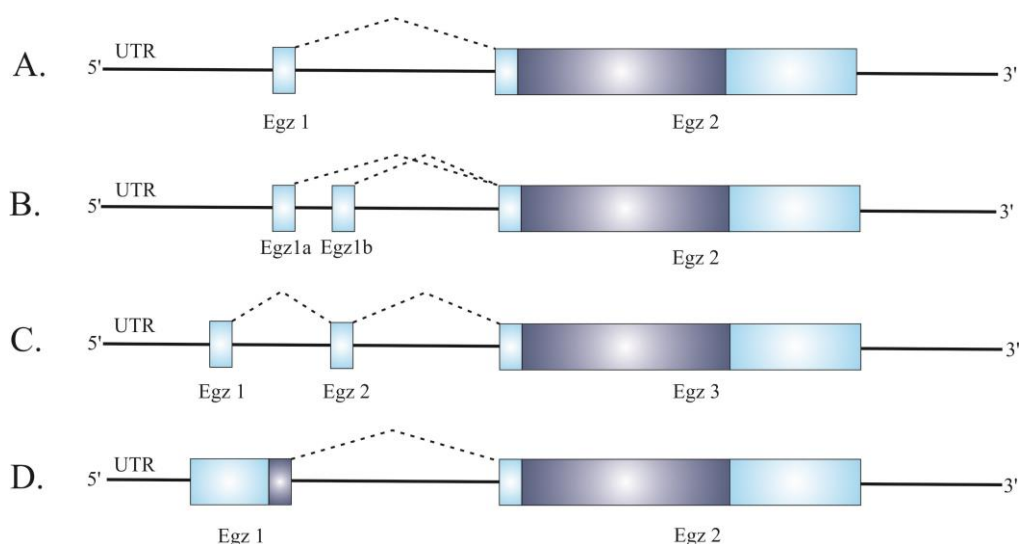
Kombinacja koneksyn obecnych w poszczególnych półkanałach koneksynowych decyduje nie tylko o typie połączenia szczelinowego, ale przede wszystkim wpływa na jego właściwości biofizyczne, takie jak przewodność, przepuszczalność czy bramkowanie (Elenes i wsp., 2001; Martinez i wsp., 2002). Biorąc pod uwagę fakt, że większość komórek wykazuje ekspresję dwóch lub więcej białek koneksynowych, funkcjonalna różnorodność kanałów połączeń szczelinowych w różnych komórkach i tkankach jest ogromna. W błonie komórkowej występują również półkanały koneksynowe, które nie tworzą par i pozostają

wolne, co pozwala im pełnić inne, niż typowe dla kanałów połączeń szczelinowych, funkcje biologiczne. Wolne półkanały biorą udział w szeregu procesów komórkowych, takich jak uwalnianie ATP, NAD⁺, prostaglandyn i glutaminianu (Stout i wsp., 2002; Ye i wsp., 2003; Cherian i wsp., 2005; Zhao i wsp., 2005), międzykomórkowe rozprzestrzenianie się fali jonów wapniowych (Stout i wsp., 2002), regulacja objętości komórki (Quist i wsp., 2000) oraz transdukcja sygnałów decydujących o przeżyciu komórki (Plotkin i wsp., 2002).

1.4.2. Koneksyny – struktura genów i białek

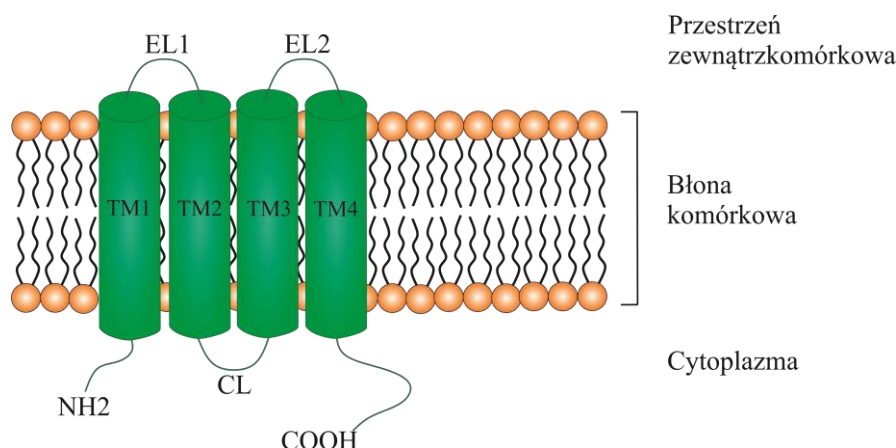
Koneksyny należą do dużej rodziny integralnych białek błonowych o masie cząsteczkowej 23-62 kDa, a każda z nich jest produktem odrębnego genu. Dotychczas zidentyfikowano 21 genów koneksyn u człowieka oraz 20 genów koneksyn u myszy, przy czym dziewiętnaście z nich można na podstawie sekwencji pogrupować w pary ortologiczne (Söhl i Willecke, 2003). W przypadku białek koneksynowych stosuje się obecnie dwa systemy nomenklaturowe: pierwszy z nich rozróżnia koneksyny na podstawie ich masy cząsteczkowej, i tak np. przewidywana masa cząsteczkowa najpowszechniejszej koneksyny wątroby wynosi 32 kDa, w związku z czym nosi ona nazwę koneksyny 32 (Cx32). Według drugiego systemu nomenklaturowego koneksyn, białka te dzieli się na podklasy (α , β , γ , δ lub ϵ) w zależności od podobieństwa strukturalnego genów (ich homologii i sekwencji) oraz długości domen cytoplazmatycznych. Nazwa własna składa się wówczas z przedrostka GJ (ang. *gap junction*), litery A, B, C, D lub E odpowiadającej podklasie oraz numeru informującego o kolejności odkrycia danej koneksyny. Zgodnie z tym systemem koneksyna 32 nosi nazwę GJB1, tzn. że jest to pierwsze sklonowane białko z podklasy koneksyn β (Söhl i Willecke, 2003; Söhl i Willecke, 2004).

Większość koneksyn ma podobną, stosunkowo prostą strukturę genu. Składa się on z dwóch egzonów przedzielonych różnej długości intronem. Pierwszy egzon zawiera tylko rejon 5' niepodlegający translacji (5'-UTR, ang. *5'-untranslated region*), podczas gdy drugi egzon zawiera całą sekwencję kodującą oraz rejon 3'-UTR (ang. *3'-untranslated region*). Opisano trzy rodzaje wyjątków od tej ogólnej struktury, a mianowicie: alternatywne składanie (ang. *splicing*) rejonu 5'-UTR (Cx32), występowanie w genie trzech egzonów (Cx45) oraz przerwanie sekwencji kodującej intronem (Cx36) (Neuhaus i wsp., 1996; Belluardo i wsp., 1999; Baldrige i wsp., 2001; Jacob i Beyer, 2001; Söhl i wsp., 2001; Söhl i Willecke, 2004) (ryc. 4).



Ryc. 4. Struktura genów koneksyn. A. Ogólna struktura genów koneksyn. Dwa egzony przedzielone różnej długości intronem, z których pierwszy zawiera tylko rejon 5' niepodlegający translacji, a drugi egzon zawiera całą sekwencję kodującą oraz rejon 3'-UTR. B. Alternatywne składanie (ang. *splicing*) rejonu 5'-UTR (Cx32). C. Występowanie w genie trzech egzonów (Cx45) D. Przerwanie sekwencji kodującej intronem (Cx36) [zmodyfikowano wg Bosco i wsp., 2011]. UTR – rejon niepodlegający translacji, Egz – egzon, kolor ciemnoniebieski – sekwencja kodująca.

Pod względem biochemicznym koneksyny stanowią heterogenną grupę białek o wspólnym schemacie budowy. Każda koneksyna składa się z czterech hydrofobowych domen transbłonowych (TM, ang. *transmembrane domain*), dwóch pętli zewnątrzkomórkowych (EL, ang. *extracellular loop*), jednej pętli wewnątrzkomórkowej (CL, ang. *cytoplasmic loop*) oraz znajdującego się w cytoplazmie końca karboksylowego (COOH, ang. *C-terminus*) i aminowego (NH₂, ang. *N-terminus*) (ryc. 5).



Ryc. 5. Schemat budowy cząsteczki koneksyny z widocznymi pętlami zewnątrzkomórkowymi (EL), pętlami wewnątrzkomórkowymi (CL), domenami transbłonowymi (TM) oraz końcem aminowym (NH₂) i końcem karboksylowym (COOH) [zmodyfikowano wg Nielsen i wsp., 2012].

Domeny transbłonowe i pętle zewnątrzkomórkowe wykazują największą konserwatywność sekwencji, natomiast najbardziej zmienne, zarówno pod względem długości jak i sekwencji, są pętla cytoplazmatyczna oraz cytoplazmatyczny koniec karboksylowy. Domeny transbłonowe tworzą ścianę/por kanału i decydują o rozmiarze oraz ładunku cząsteczek mogących przejść przez konekson (Goodenough i Paul, 2003); domena N-końcowa stanowi część poru kanału i kontroluje bramkowanie indukowane napięciem (Bargiello wsp., 2012); natomiast domena C-końcowa moduluje otwieranie się kanału poprzez zmiany swojego statusu fosforylacji (Herve i wsp., 2012). Ponadto domena C-końcowa wchodzi w interakcje z wewnątrzkomórkowymi białkami strukturalnymi i katalitycznymi, dzięki czemu reguluje subkomórkową lokalizację nowosyntetyzowanych białek koneksynowych i stopień ich degradacji (Herve i wsp., 2012).

1.4.3. Ekspresja i funkcja wybranych koneksyn w jajniku

Ekspresja koneksyn w jajniku

Wśród koneksyn ulegających ekspresji w jajnikach różnych gatunków ssaków wymienić można takie białka jak Cx26, Cx30.3, Cx32, Cx36, Cx37, Cx40, Cx43, Cx45 oraz Cx57. Ekspresję Cx26 stwierdzono w oocytach, komórkach ziarnistych i komórkach tekalnych kilku gatunków zwierząt, wydaje się również, że odgrywa ona ważną rolę podczas

powstawania i zaniku ciała żółtego (Itahana i wsp., 1996; Johnson i wsp., 1999; Borowczyk i wsp., 2006; Berisha i wsp., 2009). Zarodki myszy z nokautem genu *Cx26* ginęły w 11 dniu po zapłodnieniu, prawdopodobnie z powodu dysfunkcji łożyska (Gabriel i wsp., 1998). Zastosowanie techniki hybrydyzacji *in situ* pozwoliło na wykrycie *Cx30.3* w komórkach ziarnistych, osłonkowych i komórkach wieńca promienistego pęcherzyków jajnikowych świni (Itahana i wsp., 1996). Ekspresję tej koneksyny wykazano również w komórkach wieńca promienistego u człowieka (Wang i wsp., 2009). *Cx32* ulega ekspresji w komórkach osłonki pęcherzyków jajnikowych świni (Itahana i wsp., 1996) oraz w komórkach ziarnistych pęcherzyków atrezyjnych bydła (Johnson i wsp., 1999). Uważa się jednak, że *Cx32* nie odgrywa istotnej roli w procesie folikulogenezy i oogenezy, gdyż samice myszy z nokautem genu *Cx32* były żywe oraz płodne (Nelles i wsp., 1996). Ekspresję *Cx43* i *Cx45* stwierdzono pomiędzy komórkami warstwy ziarnistej pęcherzyków jajnikowych, podczas gdy *Cx37* jest obecna w połączeniach szczelinowych powstających między oocytem a otaczającymi go komórkami wieńca promienistego (CCs) (Okuma i wsp., 1996; Veitch i wsp., 2004; Richard i Baltz, 2014). Stosunkowo niewiele wiadomo na temat ekspresji *Cx57* i *Cx36* w tkankach jajnika. Manthey i wsp. (1999) wykazali niski poziom mRNA *Cx57* w jajnikach myszy, a obecność mRNA *Cx36* potwierdzono w jajnikowych komórkach ziarnistych świni (Kempisty i wsp., 2014; Ciesiółka i wsp., 2017). Ekspresję *Cx40* wykazano w komórkach wieńca promienistego *in vitro*, zarówno za pomocą techniki RT-PCR, jak i barwienia immunofluorescencyjnego (Wang i wsp., 2009). Obecność mRNA *Cx40* stwierdzono również w komórkach ziarnistych pęcherzyków jajnikowych świni (Kempisty i wsp., 2014).

Rola koneksyn w jajniku

Połączenia szczelinowe w pozbawionej unaczynienia warstwie ziarnistej pęcherzyków jajnikowych są dobrze rozwinięte i odgrywają ważną rolę w dwukierunkowym przekazywaniu sygnałów oraz transporcie cząsteczek między samymi komórkami ziarnistymi, a także między komórkami ziarnistymi a oocytem (Eppig 1991; Eppig i wsp., 1996). Spośród kilku koneksyn ulegających ekspresji w pęcherzykach jajnikowych, najważniejszą rolę w procesie folikulogenezy i oogenezy odgrywają *Cx37* i *Cx43* (Veitch i wsp., 2004). Koneksyny te są również najlepiej jak dotąd poznanymi koneksynami jajnika, ponieważ ich ekspresję w tym narządzie stwierdza się u wielu gatunków ssaków. Rolę *Cx37* i *Cx43* w procesie folikulogenezy i oogenezy jajnikowej poznano dzięki badaniom na myszach pozbawionych genów kodujących te białka oraz wynikającym z tego defektem w rozwoju oocytów i komórek ziarnistych. Brak *Cx43* wpływał na folikulogenezę poprzez zahamowanie

wzrostu pęcherzyków na wczesnych etapach ich rozwoju (Juneja i wsp., 1999). Również rozwój oocytów u myszy z nokautem genu *Cx43* (*Gja1* (-/-)) przebiegał nieprawidłowo i komórki rozrodcze nie osiągały dojrzałości meiotycznej (Ackert i wsp., 2001). Nokaut genu *Cx37* wywierał wpływ na późniejsze stadia folikulogenezy, niż ma to miejsce w przypadku nokautu genu *Cx43*. Homozygotyczne samice były bezpłodne, ponieważ pęcherzyki jajnikowe nie osiągały stadium pęcherzyków Graafa, a ich rozwój zatrzymywał się na etapie wczesnych pęcherzyków antralnych (Simon i wsp., 1997). Co więcej, większość oocytów u myszy z brakiem *Cx37* nie kończyła swego wzrostu, ani nie osiągała pełnej kompetencji meiotycznej (Simon i wsp., 1997; Carabatsos i wsp., 2000).

Rolę połączeń szczelinowych w procesie apoptozy wykazano w różnych liniach komórkowych i narządach, przy czym zwłaszcza *Cx43* okazała się odwrotnie korelować z apoptozą, działając jako czynnik decydujący o przeżyciu komórki. Chang i wsp. (2005) wykazali, że u samic myszy z ostrą hiperglikemią i cukrzycą zwiększona liczba atrezyjnych pęcherzyków jajnikowych z oznakami apoptozy wiązała się z obniżoną jajnikową ekspresją *Cx43*. W zgodzie z tym pozostaje obserwacja, że liczba oocytów w jajnikach samic z nokautem genu *Cx43* (*Gja1* (-/-)) była zredukowana z powodu nasilonej apoptozy pierwotnych komórek płciowych (Juneja i wsp., 1999; Francis i Lo, 2006). Obniżoną ekspresję *Cx43* w atrezyjnych pęcherzykach jajnikowych obserwowano również u bydła i świń (Johnson i wsp., 1999; Cheng i wsp., 2005), natomiast podwyższoną częstość apoptozy związaną z niską ekspresją *Cx43* opisano w komórkach ziarnistych ptaków (Krysko i wsp., 2004). W przeciwieństwie do obniżonej ekspresji *Cx43* w pęcherzykach atrezyjnych, ekspresja *Cx32* jest podwyższona w pęcherzykach atrezyjnych bydła (Johnson i wsp., 1999), co może sugerować, że połączenia szczelinowe utworzone przez *Cx32* pośredniczą w rozchodzeniu się "sygnału śmierci komórki", podczas gdy ekspresja *Cx43* jest wymagana dla przeżycia komórek ziarnistych. Ngezahayo i wsp. (2005) wykazali, że przedłużona inkubacja komórek ziarnistych z linii GFSHR-17 z blokerem połączeń szczelinowych (heptanolem lub kwasem glicyretynowym) nieodwracalnie niszczyła połączenia szczelinowe między tymi komórkami i wywoływała w nich cechy apoptozy, takie jak kondensacja chromatyny czy degradacja DNA.

Znajdujące się wewnątrz pęcherzyków jajnikowych oocyty są utrzymywane w profazie I podziału meiotycznego dzięki inaktywacji czynnika MPF (ang. *M-phase/maturation promoting factor*), niezbędnego komórkom eukariotycznym do przejścia fazy G1/S oraz G2/M cyklu komórkowego. Sygnałem utrzymującym niską aktywność kinazy

CDK1, będącej podjednostką katalityczną MPF, są stosunkowo wysokie stężenia cząsteczek takich jak cAMP i cGMP, przekazywanych do oocytu za pośrednictwem połączeń szczelinowych (Dekel, 1988; Norris i wsp., 2009; Vaccari i wsp., 2009). Przerwanie GJC w obrębie pęcherzyka jajnikowego, będące następstwem przedowulacyjnego piku LH, zakłóca dostarczanie cAMP/cGMP z komórek somatycznych do oocytu, w skutek czego następuje spadek stężenia tych hamujących nukleotydów w oocycie, odblokowanie czynnika MPF i wznowienie mejozy (Dekel, 1988; Norris i wsp., 2008; Norris i wsp., 2009). Dowodu na to, że zanikanie połączeń między oocytem a komórkami ziarnistymi jest warunkiem wstępnym wznowienia mejozy przez oocyt dostarczyły eksperymenty z wykorzystaniem karbenoksolonu (CBX, ang. *carbenoxolone*), farmakologicznego blokera połączeń szczelinowych (Sela-Abramovich i wsp., 2006). Dodanie CBX do pożywki, w której hodowano oocyty utrzymywane wewnątrz pęcherzyków jajnikowych (ang. *follicle-enclosed oocytes*) powodowało spadek poziomu cAMP w oocytach oraz wznowienie mejozy (Sela-Abramovich i wsp., 2006).

Komórki luteinowe i paraluteinowe ciała żółtego komunikują się ze sobą za pośrednictwem połączeń szczelinowych powstałych przy udziale Cx43 (Mayerhofer i Garfield, 1995; Khan-Dawood i wsp., 1996; Borowczyk i wsp., 2007; Berisha i wsp., 2009). Grazul-Bilska i wsp. (1996) wykazali, że LH i cAMP zwiększały zarówno ilość połączeń szczelinowych między komórkami luteinowymi i paraluteinowymi u bydła, jak i produkcję progesteronu przez te komórki, co sugeruje, że koordynacja funkcji ciała żółtego może zachodzić przy udziale połączeń szczelinowych. Potwierdzeniem związku między komunikacją międzykomórkową z udziałem połączeń szczelinowych (GJC) a syntezą hormonów steroidowych był fakt, iż eksperymentalne zahamowanie ekspresji Cx43 lub farmakologiczne rozerwanie tworzonych przez nią połączeń obniżało, natomiast farmakologiczne zwiększenie liczby połączeń między komórkami ciała żółtego podwyższało wydzielanie progesteronu przez komórki ciała żółtego (Khan-Dawood i wsp., 1998; Grazul-Bilska i wsp., 2001). Ke i wsp. (2005) dostarczyli bezpośredniego dowodu na związek pomiędzy GJC a wydzielaniem progesteronu przez komórki ziarniste szczura. Wykazali oni, że traktowanie komórek ziarnistych blokerem połączeń szczelinowych o nazwie lindane, powodowało redukcję poziomów dwóch kluczowych białek szlaku steroidogenezy - P450 sc c i StAR, oraz hamowało produkcję progesteronu (Ke i wsp., 2005). Obserwacja ta pozwoliła na postawienie hipotezy, że połączenia szczelinowe wpływają na steroidogenezę prawdopodobnie poprzez zwiększanie dostępności enzymów tego szlaku.

1.5. Aromataza (CYP19)

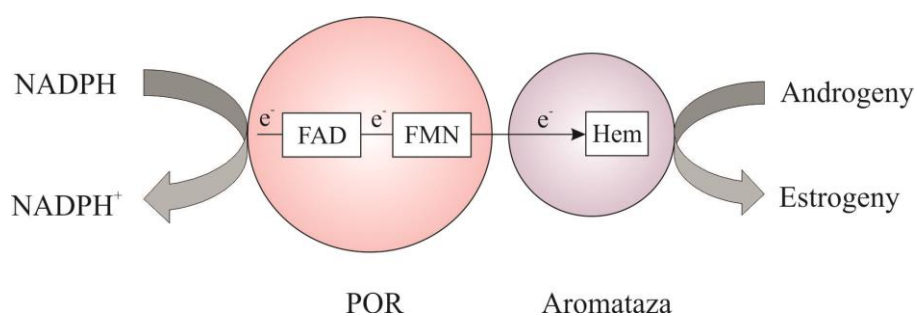
Aromataza (synonimy: P450arom, CYP19) należy do cytochromu P450, dużej nadrodziny enzymów o aktywności monooksygenazy, zaangażowanych w wiele ważnych funkcji fizjologicznych, takich jak biosynteza hormonów steroidowych i kwasów żółciowych, czy biotransformacja ksenobiotyków. Enzymy te należą do białek hemowych, szeroko rozpowszechnionych w organizmach żywych, począwszy od bakterii i grzybów, aż po rośliny i zwierzęta. Swą nazwę zawdzięczają zdolności pochłaniania światła przy długości fali około 450 nm w obecności tlenku węgla (Nelson i wsp., 1996). Bakteryjne enzymy z nadrodziny cytochromu P450 występują w cytozolu, natomiast u ssaków są one białkami zakotwiczonymi w błonie, zlokalizowanymi albo w błonach mitochondriów albo w błonach retikulum endoplazmatycznego (białka mikrosomalne). W genomie człowieka zidentyfikowano dotychczas 57 genów kodujących enzymy cytochromu P450, sklasyfikowanych w 18 rodzinach i 42 podrodzinach, z czego siedem koduje enzymy związane z mitochondriami, a pozostałych 50 koduje enzymy związane z błonami retikulum endoplazmatycznego. Enzymy zaklasyfikowane do jednej rodziny (oznaczonej numerem arabskim, np. CYP19) wykazują homologię sekwencji aminokwasowej > 40%, natomiast członkowie podrodziny (oznaczonej literą, np. CYP19A) – homologię rzędu 55% i większą (Nelson i wsp., 1996; Nebert i wsp., 2013).

1.5.1. Struktura i funkcja aromatazy

Najlepiej jak dotąd scharakteryzowaną i poznaną pod względem struktury i funkcji aromatazą jest aromataza człowieka. Jest to glikoproteina o masie cząsteczkowej 58 kDa i 503 resztach aminokwasowych (Sethumadhavan i wsp., 1991; Simpson i wsp., 1994), zakotwiczona w błonie retikulum endoplazmatycznego dzięki znajdującej się na jej końcu N hydrofobowej sekwencji zwanej sygnałową sekwencją kotwiczącą (Sakaguchi i wsp., 1987; Ghosh i wsp., 2010). Trzeciorzędową strukturę tego białka tworzy 12 helis α oraz 10 nici β ułożonych w jedną główną i trzy mniejsze β - harmonijki (Ghosh i wsp., 2010).

Aromataza jest kluczowym enzymem biosyntezy estrogenów. Katalizuje ona konwersję androgenów do estrogenów: testosteronu do 17β -estradiolu, androstendionu do estronu oraz 16α -hydroksyt testosteronu do $17\beta,16\alpha$ -estriolu (Thompson i wsp., 1974; Simpson i wsp., 1994). Do swej funkcjonalnej aktywności aromataza wymaga obecności oksydoreduktazy cytochromu P450 (POR, ang. *cytochrome P450 oxidoreductase*), będącej flawoproteiną NADPH-zależną. Rola POR polega na transporcie elektronów z NADPH

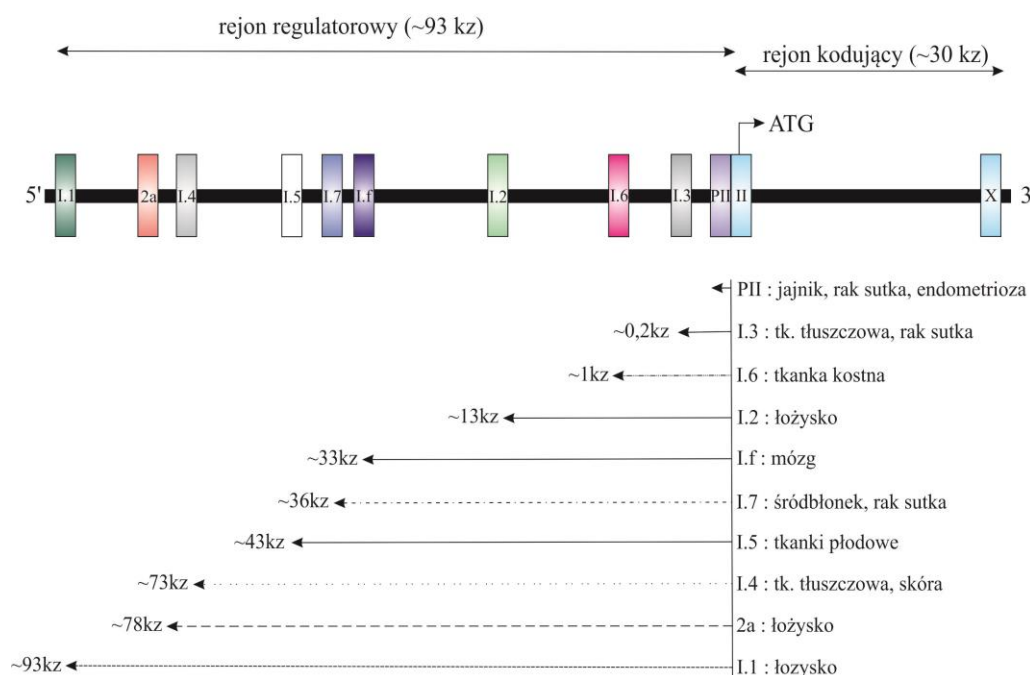
(poprzez FAD, dinukleotyd flawinoadeninowy, oraz FMN, mononukleotyd flawinowy) na żelazo hemowe aromatazy, co skutkuje aromatyzacją androgenowego substratu (ryc. 6) (Conley i Hinshelwood, 2001; Miller, 2005). Sugeruje się, że uważana do tej pory za białko monomeryczne aromataza człowieka funkcjonuje *in vivo* jako dimer, a jej dimeryzacja prowadzi do zwiększenia aktywności i zmniejszonego uwalniania produktów pośrednich (Praporski i wsp, 2009; Martin i wsp., 2015).



Ryc. 6. Schemat przepływu elektronów w kompleksie POR-aromataza [zmodyfikowano wg Hong i wsp., 2009]. NADPH – zredukowana forma fosforanu dinukleotydu nikotynoamidoadeninowego, FAD – dinukleotyd flawinoadeninowy, FMN – mononukleotyd flawinowy.

1.5.2. Gen aromatazy

Aromataza człowieka jest kodowana przez pojedynczą kopię genu *CYP19* zlokalizowanego na długim ramieniu chromosomu 15 (15q21.2) (Chen i wsp., 1988; Toda i wsp., 1990; Simpson i wsp., 1994). Jak wykazali Sebastian i Bulun (2001), gen ten obejmuje obszar o długości około 123 kb i jest największym genem w rodzinie cytochromu P450. Ulega on transkrypcji od telomeru do centromeru, a sekwencja kodująca białko obejmuje 30 tysięcy par zasad na końcu 3' i zawiera 9 egzonów (II-X) (Shozu i wsp., 2003). Pełniąc funkcję regulatorową sekwencja niekodująca obejmuje obszar o długości 93 tysięcy par zasad i zawiera nie ulegające translacji alternatywne egzony pierwsze wraz z odpowiadającymi sekwencjami promotorowymi (ryc. 7).

Gen *CYP19* człowieka (~123 kz)

Ryc. 7. Schematyczna budowa genu *CYP19* człowieka. Przedstawiono lokalizację wszystkich tkankowo-specyficznych promotorów oraz ich położenie względem egzonu II [zmodyfikowano wg Cui i wsp., 2013]. ATG – miejsce startu translacji, kz – kilobazasada.

U większości kręgowców ekspresja genu aromatazy znajduje się pod kontrolą promotorów specyficznych dla gonad i dla mózgu. Jednak u człowieka istnieje co najmniej osiem dodatkowych promotorów, które najprawdopodobniej wykształciły się w toku ewolucji. Miejsce startu translacji znajduje się w egzonie II i rozpoczyna się kodonem ATG. Na obszarze 1 kb od tego miejsca znajduje się najbardziej proksymalny promotor PII, odpowiedzialny za ekspresję aromatazy w gonadach, a także w raku sutka i endometriozie oraz dwa inne promotory: I.3 (swoisty dla tkanki tłuszczowej i raka sutka) i I.6 (swoisty dla tkanki kostnej). Promotor I.2 (swoisty dla łożyska) leży w odległości około 13 kz od miejsca ATG w egzonie II. Powyżej niego znajdują się promotory specyficzne dla: mózgu (I.f), śródbłonna naczyń/raka sutka (I.7), tkanek płodowych (I.5), skóry/tkanki tłuszczowej (I.4) oraz łożyska (2a i I.1). Demura i wsp. (2008) zidentyfikowali i scharakteryzowali kolejny

promotor (I.8) zlokalizowany w odległości około 2 kb od promotora I.4 oraz 75 kb od konstytutywnego miejsca splicingowego w egzonie II. Promotory te pozwalają na regulację ekspresji genu *CYP19* w sposób tkankowo specyficzny, co jest możliwe dzięki obecności w każdej z tych tkanek odrębnych zestawów hormonów, cytokin i ścieżek sygnałowych, na które poszczególne promotory są wrażliwe (Mahendroo i wsp., 1993; Mendelson i Kamat, 2007). Pomimo użycia alternatywnych promotorów, wszystkie nie ulegające translacji egzony pierwsze są składane w tym samym miejscu, bezpośrednio powyżej (38 pb) miejsca startu translacji w rejonie kodującym (Mahendroo i wsp., 1993; Bulun i wsp., 2004). Otwarta ramka odczytu (egzony II-X) jest więc identyczna w przypadku mRNA aromatazy transkrybowanego z różnych promotorów, co prowadzi do translacji białka mającego zawsze identyczną budowę i wielkość.

W odróżnieniu od genomu człowieka, w genomie świniowatych występują trzy geny *Cyp19*, wszystkie funkcjonalne i kodujące trzy różne izoenzymy P450arom: jeden specyficzny dla gonad, drugi dla łożyska i trzeci dla blastocysty (Corbin i wsp., 1995; Choi i wsp., 1996; Conley i wsp., 1996; Graddy i wsp., 2000). Corbin i wsp. (2009) wykazali, że izoenzym specyficzny dla gonad ulega również ekspresji w podwzgórzcu, właściwszym zatem wydaje się określenie go jako izoenzymu gonadalno/podwzgórzowego. Izoenzym łożyskowy przypomina aromatazę człowieka, zarówno pod względem długości (503 aminokwasy), jak i ogólnego podobieństwa. Izoenzym jajnikowy jest krótszy od łożyskowego o 2 aminokwasy, ale łączy go z nim podobnie wysoka homologia sekwencji (Corbin i wsp., 1995). Corbin i wsp. (1999) wykazali, że w porównaniu z izoenzymem ulegającym ekspresji w gonadach, aromataza łożyskowa metabolizuje testosteron z dużo większą wydajnością, a katalizowana przez nią reakcja aromatyzacji przebiega szybciej i w mniejszym stopniu zależy od wsparcia POR (Corbin i wsp., 2001).

1.5.3. Ekspresja i rola aromatazy w jajniku

Ekspresja genu aromatazy

U większości gatunków płciowo dojrzałych samic, ekspresja aromatazy w jajnikach ogranicza się do komórek ziarnistych dużych pęcherzyków antralnych, pęcherzyków przedowulacyjnych oraz komórek luteinowych ciała żółtego. Niezróżnicowane komórki ziarniste pęcherzyków preantralnych nie wykazują ekspresji aromatazy (Słomczyńska i Tabarowski, 2001; Turner i wsp., 2002; Sakurada i wsp., 2006). Wzrostowi i dojrzewaniu

pęcherzyków preantralnych aż do stadium przedowulacyjnego towarzyszy indukcja ekspresji aromatazy w komórkach ziarnistych, który to proces jest uznawany za marker ich różnicowania się (Rodgers i wsp., 1999; Christenson i wsp., 2013; Hatzirodos i wsp., 2015).

Wysoki poziom ekspresji aromatazy w komórkach ziarnistych pęcherzyków przedowulacyjnych ulega gwałtownemu obniżeniu spowodowanemu wyrzutem LH, jaki ma miejsce w czasie owulacji *in vivo* lub po dodaniu go do hodowli *in vitro* (Hickey i wsp., 1988; Fitzpatrick i wsp., 1997; Lee i wsp., 2013). Komórki luteinowe ciała żółtego, będące zróżnicowanymi komórkami ziarnistymi, odzyskują ekspresję aromatazy w czasie fazy lutealnej u niektórych gatunków zwierząt, w tym u naczelnych i gryzoni (Turner i wsp., 2002). U świni nie stwierdzono ekspresji P450arom w ciałkach żółtych pochodzących z połowy fazy lutealnej, natomiast ciała żółte z wczesnej fazy lutealnej oraz ciała żółte zanikające wykazywały słabą ekspresję aromatazy (Słomczyńska i Tabarowski, 2001).

Badania wykazały, że u świni P450arom ulega ekspresji nie tylko w komórkach ziarnistych pęcherzyków przedowulacyjnych, lecz również w wewnętrznej warstwie osłonki pęcherzyka (Lautincik i wsp., 1994; Shores i Hunter, 1999). Komórki osłonki mogą zatem syntetyzować estrogeny niezależnie od komórek ziarnistych, istnieją jednak rozbieżności co do poziomów tej syntezy - jedni badacze uważają, że są one znacznie niższe (Magoffin, 2005), a inni że porównywalne z tymi obserwowanymi w warstwie ziarnistej (Foxcroft i Hunter, 1985; Tsang i wsp., 1985).

Poziomy ekspresji aromatazy w obrębie pęcherzyka antralnego są niejednolite, tzn. najwyższy poziom ekspresji obserwuje się w przyściennych (muralnych) komórkach ziarnistych na obrzeżach pęcherzyka, a brak ekspresji - w komórkach ziarnistych od strony jamy pęcherzyka (tzw. antralnych komórkach ziarnistych) i w komórkach wieńca promienistego (Turner i wsp., 2002). Intensywność immunobarwienia w pęcherzykach okołowulacyjnych była większa niż w mniej dojrzałych pęcherzykach antralnych (Turner i wsp., 2002). Ekspresja aromatazy w komórkach wieńca promienistego jest tłumiona wytwarzanymi przez oocyt czynnikami, takimi jak BMP-15 i GDF-9 (Vitt i wsp., 2000; Otsuka i wsp., 2001; Spicer i wsp., 2006). Ten hamujący wpływ oocytu potwierdzają badania na myszach z nokautem genu *Gdf-9* (*Gdf-9* (-/-)), u których stwierdza się przedwczesną ekspresję aromatazy w pęcherzykach preantralnych (Elvin i wsp., 1999).

Głównym regulatorem ekspresji aromatazy w komórkach ziarnistych jajnika u człowieka, szczura i bydła jest FSH (Steinkampf i wsp., 1987; Fitzpatrick i Richards, 1991;

Silva i Price, 2000). Indukowany przez FSH wzrost wewnątrzkomórkowych poziomów cAMP prowadzi do aktywacji zależnej od cAMP kinazy białkowej A (PKA, ang. *protein kinase A*) oraz do aktywacji promotora PII aromatazy (Vanselow i wsp., 2001; Bulun i wsp., 2003; Pannetier i wsp., 2006). W badaniach *in vitro* ludzkich komórek ziarnistych otrzymanych z dojrzałych pęcherzyków jajnikowych, FSH zwiększał aktywność, jak również syntezę aromatazy cytochromu P450 w sposób zależny od czasu, podczas gdy przy braku FSH, zarówno aktywność, jak i synteza P450arom spadały wraz z upływem czasu trwania hodowli (Steinkampf i wsp., 1987; Yong i wsp., 1994).

Rola aromatazy

Aby dokładniej zbadać rolę aromatazy i wpływ syntetyzowanych przez nią estrogenów na funkcjonowanie jajników wygenerowano genetycznie zmodyfikowane myszy z nokautem genu dla aromatazy (ArKO, ang. *aromatase gene knockout*) (Fisher i wsp., 1998; Toda i wsp., 2001). Jajniki myszy ArKO zawierały liczne pęcherzyki z nierównomierną warstwą komórek ziarnistych i oznakami tworzenia się jamy pęcherzyka, lecz ich rozwój zatrzymywał się w stadium przed owulacją, a ciała żółte nie powstawały (Fisher i wsp., 1998; Britt i wsp., 2000). Surowicze poziomy testosteronu, LH i FSH u samic myszy ArKO były istotnie podwyższone w porównaniu z myszami dzikiego typu, natomiast poziomy 17 β -estradiolu były poniżej granicy wykrywalności (Britt i wsp., 2000; Toda i wsp., 2001; Liew i wsp., 2010). Chociaż jajniki myszy ArKO zawierały pęcherzyki we wszystkich stadiach rozwoju, to wraz z upływem wieku zwierzęcia pojawiały się w nich takie nieprawidłowości jak wypełnianie się jamy pęcherzyka krwią, a komórki ziarniste wykazywały podwyższone poziomy ekspresji genów *p53* i *Bax* o działaniu proapoptotycznym (Britt i wsp., 2000; Toda i wsp., 2001). Ze względu na nieprawidłowy przebieg folikulogenezy i brak owulacji, myszy ArKO były nieplodne (Britt i wsp., 2000; Britt i wsp., 2001). Toda i wsp. (2012) wykazali, że przy zastosowaniu odpowiednio wysokich dawek 17 β -estradiolu oraz gonadotropin fenotyp ten był odwracalny, niemniej jednak ilość oocytów uwalnianych z jajników myszy ArKO była statystycznie istotnie mniejsza niż u myszy typu dzikiego.

2. CEL PRACY

W świetle przytoczonych we wstępie danych literaturowych, celowym wydaje się jak najlepsze scharakteryzowanie komórek ziarnistych w warunkach hodowli pierwotnej *in vitro*, poprzez zbadanie parametrów świadczących o ich reaktywności na czynniki zewnętrzne (takich jak ekspresja receptorów gonadotropin), wyznaczników ich funkcjonalności (takich jak ekspresja aromatazy), czy też określenie ich współdziałania ze sobą (wyrażonego ekspresją koneksyn).

W związku z powyższym, za główny cel niniejszej pracy przyjęto:

1. Zbadanie właściwości fizjologicznych komórek ziarnistych wyrażonych ekspresją genów i białek regulujących procesy wzrostu i proliferacji tych komórek podczas krótkoterminowej hodowli pierwotnej.

Cel ten zrealizowano w oparciu o niżej wymienione cele szczegółowe:

1. Badanie ekspresji receptorów gonadotropin, aromatazy oraz wybranych koneksyn w komórkach ziarnistych podczas krótkoterminowej hodowli pierwotnej.
2. Określenie potencjału proliferacyjnego komórek ziarnistych w czasie rzeczywistym na modelu hodowli pierwotnej.
3. Poszukiwanie nowych markerów molekularnych zaangażowanych w regulację procesu proliferacji i wzrostu komórek podczas krótkoterminowej hodowli pierwotnej.

3. MATERIAŁ I METODY

3.1. Materiał

3.1.1. Zwierzęta i model badawczy

Doświadczenia przeprowadzono na dojrzałych płciowo samicach świni domowej o średnim wieku 120 dni i o masie ciała ok. 98 kg. Jajniki (každorazowo n=40) pobierano natychmiast po uboju, umieszczano w 0,9% roztworze soli fizjologicznej w temperaturze 38°C i w ciągu 30 minut transportowano do Katedry i Zakładu Histologii i Embriologii Uniwersytetu Medycznego im. Karola Marcinkowskiego w Poznaniu. Komórki utrzymywano w hodowli *in vitro* przez okres siedmiu dni. Poziom ekspresji genów oraz białek badano w odstępach 24 godzinnych. Za grupę kontrolną obrano pierwszą dobę hodowli komórek. Analizy mikromacierzy ekspresyjnych wykonano w następujących przedziałach czasowych: 24 godz., 48 godz., 96 godz. i 144 godz.

3.1.2. Odczynniki i zestawy do oznaczeń

Hodowla komórek

- DMEM (Sigma-Aldrich, nr kat. D6546)
- FBS (Sigma-Aldrich, nr kat. F7524)
- roztwór antybiotyków/antymykotyku (Sigma-Aldrich, nr kat. A5955)
- roztwór L-glutaminy 200 mM (Sigma-Aldrich, nr kat. G7513)
- roztwór trypsyny/EDTA 0,25% (Sigma-Aldrich, nr kat. T4049)
- DPBS (Sigma-Aldrich, nr kat. D8537)
- roztwór błękitu trypanu 0,4% (Sigma-Aldrich, nr kat. T8154)

Izolacja RNA

- TRI Reagent[®] (Sigma-Aldrich, nr kat. T9424)
- chloroform (Sigma-Aldrich, nr kat. C2432)
- izopropanol (Sigma-Aldrich, nr kat. 59304)
- etanol 75% cz.d.a. (Chempur, nr kat. 113964202)
- woda wolna od nukleaz (Ambion, nr kat. AM9937)

Odwrotna transkrypcja

- zestaw odczynników do odwrotnej transkrypcji RT² First Strand Kit (Qiagen, nr kat. 330401)
- woda wolna od nukleaz (Ambion, nr kat. AM9937)

Reakcja łańcuchowa polimerazy w czasie rzeczywistym

- zestaw odczynników do reakcji qPCR RT² SYBR[®] Green ROX[™] qPCR Mastermix (Qiagen, nr kat. 330523)
- woda wolna od nukleaz (Ambion, nr kat. AM9937)

Immunofluorescencja

- przeciwciała pierwszorzędowe wg specyfikacji zamieszczonej w tabeli 5
- przeciwciała drugorzędowe wg specyfikacji zamieszczonej w tabeli 6
- PBS (Sigma-Aldrich, nr kat. P4417)
- BSA 30% (Sigma-Aldrich, nr kat. A9576)
- aceton cz.d.a. (POCH SA, nr kat. 102480111)
- metanol cz.d.a. (POCH SA, nr kat. 621990110)
- DAPI (Fluoroshield[™] with DAPI, Sigma-Aldrich, nr kat. F6057)

Mikromacierze RNA

- Ambion[®] WT Expression Kit (Ambion, nr kat. 4411973)
- GeneChip[®] WT Terminal Labeling Kit and Controls Kit (Affymetrix, nr kat. 901525)
- GeneChip[®] Poly-A RNA Control Kit (Affymetrix, nr kat. 900433)
- GeneChip[®] Hybridization Control Kit (Affymetrix, nr kat. 900454)
- GeneAtlas[®] Hybridization, Wash, and Stain Kit for WT Array Strips (Affymetrix, nr kat. 901667)
- etanol 100% (Sigma-Aldrich, nr kat. 51976)
- izopropanol 100% (Sigma-Aldrich, nr kat. 59304)

3.2. Metody

3.2.1. Hodowla pierwotna komórek ziarnistych

Pęcherzyki jajnikowe, z których pobierano komórki ziarniste przeznaczone do hodowli selekcyonowano na podstawie rozmiaru (średnica > 6 mm), kształtu (sferyczny), wyglądu płynu pęcherzykowego (klarowny) i unaczynienia (dobrze unaczynione). Płyn pęcherzykowy zawierający przyściennie (muralne) komórki ziarniste aspirowano przy użyciu strzykawki o objętości 5 ml oraz igły 20-G, a następnie zbierano do wspólnej puli. Zebrane komórki zawieszano w medium hodowlanym i przesączano przez nylonowe sitko (40 μm ; Corning, USA; nr kat. 431750) w celu usunięcia kompleksów oocyt-wieniec promienisty, większych agregatów komórek oraz pozostałości tkanek. Komórki odwirowywano (200 x g, 10 min. w 18°C), a supernatant odrzucano. Ponownie zawieszano komórki w znanej objętości medium hodowlanego, barwiono 0,4% roztworem błękitu trypanu w celu określenia ich żywotności oraz zliczano przy użyciu komory Bürkera. Komórki wysiewano w ilości 2-4x10⁶ komórek/butelkę 25 cm² (Thermo Scientific Nunc, USA; nr kat. 156367) (badanie morfologii komórek oraz ekspresji genów), 5-10x10⁴ komórek/płytkę MatTek (MatTek Corporation, USA; nr kat. P35GC-1.5-14-C) (badanie ekspresji białek) oraz 5x10⁴ komórek/dołek płytki E-Plate 16 (ACEA Biosciences Inc., USA; nr kat. 05469830001) (badanie proliferacji).

Komórki hodowano w standardowej pożywce DMEM (ang. *Dulbecco's Modified Eagle Medium*) z dodatkiem 200 mM L-glutaminy i 10% płodowej surowicy bydlęcej oraz roztworu antybiotyków/antymykotyku (penicylina 10000 U/ml, streptomycyna 10 mg/ml i amfoterycyna B 25 $\mu\text{g/ml}$). Optymalne warunki hodowlane, tj. temperaturę 38°C, 100% wilgotności i 5% CO₂ utrzymywano przy pomocy inkubatora CO₂ Forma™ Series II Water Jacket Incubator (Thermo Scientific, USA). Medium hodowlane zmieniano co 2 dni. Po upływie określonych przedziałów czasowych hodowli (24 godz., 48 godz., 72 godz., 96 godz., 120 godz., 144 godz. i 168 godz.), komórki przemywano zbuforowanym fosforanami roztworem soli fizjologicznej bez jonów Ca²⁺ i Mg²⁺ (DPBS, ang. *Dulbecco's Phosphate-Buffered Saline*) i odtrawiano od podłoża przy użyciu 0,25% roztworu trypsyny/EDTA. Zebrane komórki zawieszano w 1 ml odczynnika TRI Reagent® (Sigma-Aldrich, USA) i zamrażano w -80°C jako materiał do dalszych badań.

3.2.2. Analiza proliferacji komórek w czasie rzeczywistym

Do oceny proliferacji komórek zastosowano analizator komórek w czasie rzeczywistym (RTCA, ang. *real-time cell analyser*) (xCELLigence® RTCA DP Instrument, ACEA Biosciences Inc., USA). Urządzenie to składa się z jednostki sterującej (RTCA Control Unit, nr kat. 05454417001) oraz analizatora (RTCA DP Analyzer, nr kat. 05469759001) z trzema zintegrowanymi stacjami umożliwiającymi kontrolowanie i monitorowanie, w sposób równoległy lub niezależny od siebie, 16-dołkowych płytek E-Plate 16. Analizator umieszczony w standardowym inkubatorze hodowlanym z dostępem CO₂ jest zasilany i kontrolowany za pomocą jednostki sterującej (laptopa) znajdującej się poza inkubatorem. Działanie systemu opiera się na pomiarze impedancji elektrycznej między mikroelektrodami pokrywającymi około 80% powierzchni dna każdego dołka. Parametr ten zwiększa się tym bardziej, im więcej komórek przyklejonych jest do mikroelektrod. Jest on również zależny od kształtu i wielkości komórek. Wartości impedancji są przeliczane przez oprogramowanie (RTCA Software 1.2, Roche Diagnostics GmbH, Niemcy) na tzw. indeks komórkowy (CI, ang. *Cell Index*). Indeks komórkowy jest równy zeru przy braku lub nie przyleganiu komórek do elektrod, natomiast jego wartość rośnie w miarę jak komórki zaczynają stykać się z elektrodami.

Do każdego dołka płytki E-Plate 16 dodawano po 100 µl suplementowanego medium hodowlanego DMEM. Płytkę umieszczano w analizatorze i dokonywano odczytu impedancji tła; dane z odczytu służyły jako referencyjna impedancja do obliczania wartości indeksu komórkowego. Następnie wyjmowano płytkę, do każdego dołka dodawano po 100 µl zawiesiny komórek (5×10^4 komórek/dołek) i inkubowano w temperaturze pokojowej przez 30 minut (w komorze laminarnej). Ponownie umieszczano płytkę w analizatorze w celu ciągłego zapisu impedancji przez cały okres trwania eksperymentu (168 godzin). Wartości indeksu komórkowego (CI) mierzono poprzez zapis impedancji co 15 minut.

3.2.3. Izolacja całkowitego RNA

Izolację całkowitego RNA przeprowadzano zgodnie z procedurą dostarczoną przez producenta odczynnika TRI Reagent® (Sigma-Aldrich), według zmodyfikowanej metody Chomczyńskiego i Sacchi (Chomczynski i Sacchi, 1987). Komórki homogenizowano w 1 ml odczynnika TRI Reagent®, a następnie inkubowano przez 5 minut w temperaturze pokojowej, w celu całkowitego rozbicia kompleksów nukleoproteinowych. Do prób dodawano po 200 µl chloroformu, energicznie wytrząsano przez 15 sekund, po czym

inkubowano w temperaturze pokojowej przez 15 minut. Następnie próby wirowano przy 12 000 x g przez 15 minut w temperaturze 4°C. W wyniku wirowania próby ulegały rozdzielaniu na trzy fazy: (1) górną, bezbarwną fazę wodną zawierającą RNA, (2) fazę pośrednią (interfazę) zawierającą DNA oraz (3) dolną, czerwoną fazę fenolowo-chloroformową zawierającą białka. Fazę wodną (ok. 300 µl) przenoszono do nowych probówek i wytrącano z niej RNA poprzez dodanie 500 µl izopropanolu. Następnie próby inkubowano przez 10 minut w temperaturze pokojowej, wirowano przy 12 000 x g przez 10 minut w temperaturze 4°C, po czym usuwano supernatant i dodawano 1 ml 75% lodowatego etanolu. Mieszaninę energicznie worteksowano przez 10 sekund, a następnie wirowano przy 7 500 x g przez 5 minut w temperaturze 4°C. Po usunięciu alkoholu etylowego osad RNA osuszano i rozpuszczano w 20 µl wody wolnej od nukleaz (Nuclease-Free Water, Ambion Inc., USA). Stężenie uzyskanego RNA mierzono z zastosowaniem spektrofotometru NanoDrop ND-1000 (NanoDrop Technologies, USA), używając każdorazowo do analizy 1,5 µl próby badanej. Aparat kalibrowano zastosowanym rozpuszczalnikiem. Uzyskany wynik odczytywano stosując program komputerowy ND-1000 v3.5.2 (Coleman Technologies Inc., USA). Po zakończeniu izolacji całkowitego RNA część materiału pobierano w celu analizy ekspresji genów metodą reakcji łańcuchowej polimerazy w czasie rzeczywistym (qPCR), natomiast resztę zamrażono w temperaturze -80°C w celu późniejszej analizy ekspresji genów za pomocą mikromacierzy ekspresyjnych.

3.2.4. Odwrotna transkrypcja

Wyizolowany całkowity RNA poddawano reakcji odwrotnej transkrypcji (RT, ang. *reverse transcription*) z udziałem enzymu odwrotnej transkryptazy (polimerazy DNA zależnej od RNA), polegającej na syntezie komplementarnego DNA (cDNA) na bazie RNA. Reakcje przeprowadzano z użyciem termocyklera Veriti® 96-Well Thermal Cycler (Applied Biosystems®, USA). Wykorzystywano gotowy zestaw odczynników RT² First Strand Kit (Qiagen, Niemcy), który obejmuje również procedurę eliminacji z próbek RNA zanieczyszczającego je genomowego DNA. W tym celu, dla każdej próbki RNA przygotowywano w sterylnej probówce mieszaninę reakcyjną (Genomic DNA Elimination Mixture) według składu przedstawionego w tabeli 1.

Tab. 1. Skład mieszaniny reakcyjnej do eliminacji genomowego DNA.

Całkowity RNA	500 ng
Bufor GE (5X gDNA Elimination Buffer)	2,0 μ l
H₂O	do końcowej objętości 10,0 μ l

Próby inkubowano w 42°C przez 5 minut, a następnie natychmiast schładzano na lodzie przez co najmniej 1 minutę. Tak przygotowany RNA wykorzystywano jako matrycę do syntezy cDNA w procesie odwrotnej transkrypcji. Wykaz odczynników wchodzących w skład mieszaniny reakcyjnej do odwrotnej transkrypcji przedstawia tabela 2.

Tab. 2. Skład mieszaniny reakcyjnej do odwrotnej transkrypcji.

Składnik	1 reakcja	2 reakcje	4 reakcje
BC3 (5X RT Buffer 3)	4 μ l	8 μ l	16 μ l
P2 (Primer and External Control Mix)	1 μ l	2 μ l	4 μ l
RE3 (RT Enzyme Mix 3)	2 μ l	4 μ l	8 μ l
RNase free H₂O	3 μ l	6 μ l	12 μ l
Końcowa objętość	10 μ l	20 μ l	40 μ l

W celu przeprowadzenia reakcji syntezy pierwszej nici cDNA do każdego 10 μ l mieszaniny eliminującej genomowy DNA dodawano po 10 μ l mieszaniny do odwrotnej transkrypcji. Inkubowano w 42°C przez dokładnie 15 minut, po czym natychmiast przerywano reakcję przez podgrzanie w 95°C przez 5 minut. Dodawano 91 μ l H₂O wolnej od nukleaz do każdego 20 μ l składowych reakcji syntezy cDNA i dobrze mieszano. Zakończoną

reakcję syntezy pierwszej nici cDNA umieszczano na lodzie lub w temp. -20°C w celu dłuższego przechowywania. Uzyskany cDNA służył jako matryca do reakcji qPCR.

3.2.5. Reakcja łańcuchowa polimerazy w czasie rzeczywistym

Reakcję łańcuchową polimerazy w czasie rzeczywistym (qPCR, ang. *quantitative PCR* lub *real-time PCR*) przeprowadzano za pomocą urządzenia 7900 HT Fast Real-Time PCR System (Applied Biosystems®, USA). W metodzie tej jako detektor wykorzystano barwnik SYBR Green, który interkalując z dwuniciowym DNA emituje fluorescencję.

Projektowanie starterów do reakcji qPCR w programie Primer3Plus (<http://www.bioinformatics.nl/primer3plus>) rozpoczynano od wyszukania w danej sekwencji mRNA punktów wycięcia intronów. Startery zaprojektowano w taki sposób, żeby amplifikowane fragmenty sekwencji nukleotydowych obejmowały punkty wycięć odpowiednio długich intronów. Zapobiega to amplifikacji genomowego DNA w przypadku ewentualnego zanieczyszczenia próbki cDNA. Przy użyciu programu Primer3Plus wytypowano optymalne pod względem termodynamicznym sekwencje starterów. Syntezę starterów przeprowadziła Pracownia Sekwencjonowania DNA i Syntezy Oligonukleotydów Instytutu Biochemii i Biofizyki Polskiej Akademii Nauk w Warszawie. Sekwencje użytych starterów przedstawiono w tabeli 3.

Mieszanina reakcyjna o objętości 25 μl zawierała 2 μl matrycy cDNA, 1 μl startera przedniego (stężenie końcowe 7,5 μM), 1 μl startera tylnego (stężenie końcowe 7,5 μM), 8,5 μl wody wolnej od nukleaz oraz 12,5 μl RT² SYBR® Green ROX™ qPCR Mastermix (w skład którego wchodziła polimeraza DNA, bufor PCR, dNTP oraz barwnik fluorescencyjny SYBR Green).

Reakcje qPCR przeprowadzano z użyciem polimerazy *Taq* DNA typu hot-start, wymagającej 10-minutowej aktywacji w temperaturze 95°C . Polimeraza ta w temperaturze poniżej 75°C jest nieaktywna, co zapobiega powstawaniu nieswoistych produktów podczas składania reakcji. Właściwa reakcja PCR składała się z 35 cykli obejmujących: denaturację w temperaturze 95°C przez 15 sekund, przyłączanie starterów w temperaturze 58°C przez 30 sekund oraz wydłużanie w temperaturze 72°C przez 30 sekund. W celu określenia specyficzności reakcji przeprowadzano analizę krzywej topnienia otrzymanych produktów reakcji z dokładnością do $0,1^{\circ}\text{C/s}$.

Tab. 3. Sekwencje starterów wykorzystanych do reakcji qPCR. Przedstawiono sekwencje starterów sensownych (S), antysensownych (A), numer akcesyjny i długość produktu.

cDNA	Numer dostępu do GenBank	Starter	Sekwencja startera (5' – 3')	Długość produktu PCR (pz)
LHR	NM_214449.1	S A	TTGCCATGTTGCCTCTTGTG TGATGAAGGCCACCACATTG	132
FSHR	NM_214386.3	S A	TCCCAGCCTGGAAAAGTTTG GGATGAAGGTCAGAGATTTGCC	105
CYP19	NM_214430.1	S A	ATTCCATCACCAAGCACCTG ATGGCCTTTTCATCCAACGG	142
Cx36	XM_021098274.1	S A	ATCTTCCGGATCCTCATTGTGG TGCACACAAACATGGTCTGC	73
Cx37	NM_001244224	S A	ACAGATGGCCAAGATCTCAGTG GGCACACAAACACATAGAGACG	110
Cx40	XM_001928300.5	S A	AATTCCTGGAGGAGGTGCAC CACCAGCATGCGGAATATGAAG	83
Cx43	NM_001244212.1	S A	AGTACCAAACAGCAGCAGAC TTGCCCGGACACTACTCTTTC	134
Cx45	NM_001097519.1	S A	ATCTGGCTCACTGTACTGATCG ACAACTTGCTCTGCTCGTC	89

Uzyskane wyniki normalizowano względem 3 genów referencyjnych (ang. *housekeeping genes*), czyli genów o stałej ekspresji we wszystkich analizowanych próbach, bez względu na warunki doświadczalne, przedstawionych w tabeli 4.

Tab. 4. Sekwencje starterów dla genów referencyjnych wykorzystanych do reakcji qPCR. Przedstawiono sekwencje starterów sensownych (S), antysensownych (A), numer akcesyjny i długość produktu.

cDNA	Numer dostępu do GenBank	Starter	Sekwencja startera (5' – 3')	Długość produktu PCR (pz)
HPRT1	XM_021079504.1	S A	TGCCTGCAAACCAAGAGAAG GGTCATAACCTGGTTCGTCATC	110
ACTB	XM_003124280.5	S A	TGACCCAGATCATGTTCGAGAC AGTCCATCACGATGCCAGTG	108
RPLP1	NM_001129964.2	S A	TGCATCTATTCTGCCCTCATCC AGAGCCTTTGCAAACAAGCC	128

3.2.6. Technika immunofluorescencyjna

Technikę immunofluorescencyjną zastosowano dla wykrycia ekspresji białka Lhr, Fshr, Cyp19, Cx36, Cx37, Cx40, Cx43 i Cx45 w komórkach izolowanych z warstwy ziarnistej pęcherzyków jajnikowych. Hodowla prowadzona była na płytkach MatTek w standardowych warunkach w temperaturze 38°C i przy stężeniu 5% CO₂, w medium DMEM z dodatkiem 10% FBS, L-glutaminy 200 mM oraz roztworu antybiotyków/antymykotyku. Reakcję immunofluorescencyjną z wykorzystaniem przeciwciał pierwszo- i drugorzędowych przedstawionych w tabeli 5 i tabeli 6 przeprowadzano według następujących etapów:

1. Usunięcie medium i trzykrotne przepłukanie komórek w PBS
2. Utrwalenie komórek w mieszaninie aceton/metanol (1:1, v/v) – 10 min./temp. -20°C
3. Trzykrotne przepłukanie w PBS
4. Inkubacja w 3% BSA – 30 min./temp. pokojowa
5. Inkubacja ze swoistym przeciwciałem – 1 godz./temp. pokojowa
6. Płukanie w PBS – 3x5 min.
7. Inkubacja z drugim przeciwciałem znakowanym fluorochromem – 1 godz./temp. pokojowa/ciemność
8. Płukanie w PBS – 3x5 min.
9. Zamknięcie preparatów za pomocą balsamu zawierającego DAPI i szkiełek nakrywkowych

Przeprowadzono również kontrole negatywne, zastępując specyficzne przeciwciała z etapu 5 czystym PBS-em. Dokumentację fotograficzną wyników fluorescencji przeprowadzono z użyciem mikroskopu Olympus Fluoview FV10i (Olympus Corporation, Japonia) i oprogramowania Imagis 7.2 Software (BitPlane, Szwajcaria). Była to ocena wyłącznie jakościowa w celu określenia wzoru ekspresji i lokalizacji danego białka w komórce (lokalizacja błonowa, cytoplazmatyczna, i/lub jądrowa).

Tab. 5. Charakterystyka przeciwciał pierwszorzędowych użytych do badania immunofluorescencji.

Przeciwciało	Wykrywany antygen	Typ przeciwciała/ rozcieńczenie/producent	Numer katalogowy
LHR (K-15)	receptor LH	poliklonalne kozie/1:250/ Santa Cruz Biotechnology, Inc.	sc-26341
anti-FSH receptor antibody	receptor FSH	poliklonalne królicze /1:60/ Abcam	ab103874
anti-aromatase antibody	aromataza	poliklonalne królicze/1:200/ Abcam	ab18995
connexin 36 (H-9)	koneksyna 36	monoklonalne mysie/1:250/ Santa Cruz Biotechnology, Inc.	sc-398063
connexin 37 (N-14)	koneksyna 37	poliklonalne kozie/1:50/ Santa Cruz Biotechnology, Inc.	sc-27711
anti-connexin 40/GJA5 antibody	koneksyna 40	poliklonalne królicze/1:200/Abcam	ab38580
connexin 43 (F-7)	koneksyna 43	monoklonalne mysie/1:50/ Santa Cruz Biotechnology, Inc.	sc-271837
connexin 45 (N-19)	koneksyna 45	poliklonalne kozie/1:50/ Santa Cruz Biotechnology, Inc.	sc-7680

Tab. 6. Charakterystyka przeciwciał drugorzędowych użytych do badania immunofluorescencji.

Typ przeciwciała	Numer katalogowy	Rozcieńczenie/producent
MFP488 goat anti-rabbit IgG (H+L)	MFP-A1034	1:500/MoBiTec
MFP488 donkey anti-goat IgG (H+L)	MFP-A1055	1:500/MoBiTec
MFP488 goat anti-mouse IgG (H+L)	MFP-A1029	1:500/MoBiTec

3.2.7. Mikromacierze RNA

Analizę ekspresji genów za pomocą mikromacierzy RNA przeprowadzono przy użyciu systemu firmy Affymetrix - GeneAtlas™ Personal Microarray System (Affymetrix, Santa Clara, USA). Przebadano blisko 24 tys. transkryptów świni, wykorzystując mikromacierze RNA typu GeneChip® Porcine Gene 1.1ST Arrays (Affymetrix® Porcine Gene 1.1 ST Array Strips), postępując zgodnie ze szczegółową procedurą dostarczoną przez producenta.

Transkrypcja cRNA

Przygotowanie cRNA Wash Solution

Do butelki oznaczonej jako cRNA Wash Solution Concentrate dodano 100% etanol w objętości opisanej na butelce. W dalszych opisach procedury roztwór ten określa się jako cRNA Wash Solution.

Przygotowanie kontrolnych poli(A) RNA

W celu przygotowania rozcieńczeń poli(A) RNA dla 100 ng całkowitego RNA:

1. Dodano 2 µl Poly-A Control Stock do 38 µl buforu rozcieńczającego (Poly-A Control Dil Buffer) w celu uzyskania pierwszego rozcieńczenia (1:20). Wymieszano i zwirowano.
2. Dodano 2 µl pierwszego rozcieńczenia do 98 µl buforu rozcieńczającego w celu uzyskania drugiego rozcieńczenia (1:50). Wymieszano i zwirowano.
3. Dodano 2 µl drugiego rozcieńczenia do 98 µl buforu rozcieńczającego w celu uzyskania trzeciego rozcieńczenia (1:50). Wymieszano i zwirowano.
4. Dodano 2 µl trzeciego rozcieńczenia do 18 µl buforu rozcieńczającego w celu uzyskania czwartego rozcieńczenia (1:10). Wymieszano i zwirowano.
5. Dodano 2 µl czwartego rozcieńczenia do 100 ng całkowitego RNA o stężeniu 33,3 ng/ µl.
6. Dodano wodę wolną od nukleaz by uzyskać całkowitą objętość 5 µl.

Odwrotna transkrypcja (synteza pierwszej nici cDNA)

Rozpoczęto od przygotowania mieszaniny reakcyjnej zawierającej bufor i enzymy do syntezy pierwszej nici cDNA (5 µl First-Strand Master Mix/1 próbę). Do każdych 5 µl First-Strand Master Mix dodawano 5 µl mieszaniny całkowitego RNA i kontrolnych poli(A) RNA (Total RNA/poly-A Control Mixture). Inkubowano w termocyklerze Veriti® 96-Well Thermal Cycler (Applied Biosystems®, USA) przez 60 minut w temp. 25°C, 60 minut w temp. 42°C i 2

minuty w temp. 4°C. Krótko zwirowano, umieszczono na lodzie i przystąpiono do syntezy drugiej nici cDNA.

Synteza drugiej nici cDNA

Rozpoczęto od przygotowania mieszaniny reakcyjnej zawierającej bufor i enzymy do syntezy drugiej nici cDNA (50 µl Second-Strand Master Mix/1 próbę). Dobrze wymieszano i zwirowano. Do każdej próby zawierającej 10 µl jednoniciowego cDNA dodano 50 µl Second-Strand Master Mix. Inkubowano przez 60 minut w temp. 16°C, 10 minut w temp. 65°C i 4 minuty w temp. 2°C. Zwirowano, umieszczono na lodzie i natychmiast przystąpiono do kolejnego etapu.

Transkrypcja *in vitro*

Reakcję rozpoczęto od przygotowania mieszaniny zawierającej bufor i enzymy do przeprowadzenia transkrypcji *in vitro* (IVT Master Mix). Do każdej próby zawierającej 60 µl dwuniciowego cDNA (uzyskanego w poprzednich etapach procedury) dodano po 30 µl IVT Master Mix. Inkubowano w termocyklerze przez 16 godzin w temp. 40°C, a następnie podtrzymywano temperaturę 4°C. cRNA umieszczono na krótko w lodzie lub zamrażano.

Oczyszczanie cRNA

Otrzymany w wyniku transkrypcji *in vitro* jednoniciowy cRNA poddano procesowi oczyszczania z wykorzystaniem odczynników wchodzących w skład zestawu dostarczonego przez producenta (Nucleic Acid Purification Reagents). Najpierw przygotowano mieszaninę składającą się z buforu i złoża magnetycznego wiążącego kwasy nukleinowe (cRNA Binding Mix). Do każdej próby dodano 60 µl tej mieszaniny, dobrze wymieszano i przeniesiono na płytkę o dołkach w kształcie litery U. Następnie do każdej próby dodano 60 µl 100% izopropanolu i dobrze wymieszano. Delikatnie wytrząsano przez 2 do 5 minut, pozwalając cRNA znajdującemu się w próbach na związanie się ze złożem magnetycznym. Płytkę umieszczono na statywie magnetycznym. Po około 5 minutach płyn stał się przejrzysty, a kulki złoża magnetycznego utworzyły agregat w miejscu przylegania do magnesów statywu. Supernatant delikatnie zebrano, a płytkę zdjęto ze statywu magnetycznego. Kolejnym krokiem było przemycie RNA Binding Beads. Do każdej próby dodano 100 µl roztworu myjącego (Nucleic Acid Wash Solution) i wytrząsano przez 1 minutę. Płytkę przeniesiono na statyw magnetyczny na czas 5 minut. Ostrożnie zebrano i odrzucono supernatant. Zdjęto płytkę ze statywu magnetycznego, powtórnie przemyto RNA Binding Beads 100 µl roztworu

myjącego i osuszono kulki poprzez energiczne wytrząsanie płytki przez 1 minutę. Następnie wypłukano cRNA ze złoża magnetycznego. W tym celu do każdej próby dodano 40 μ l wcześniej podgrzanego roztworu płuczącego (Elution Solution) i inkubowano najpierw przez 2 minuty bez wytrząsania, a następnie przez 3 minuty intensywnie wytrząsając. Płytkę przeniesiono na statyw magnetyczny na czas 5 minut. Supernatant zawierający wypłukany cRNA przeniesiono do nowej probówki wolnej od nukleaz. Po zakończeniu oczyszczania określono stężenie cRNA mierząc spektrofotometrycznie jego absorbancję przy długości fali 260 nm.

Synteza cDNA

Synteza cDNA, cykl drugi

W procedurze tej syntetyzowano nić kodującą cDNA poprzez odwrotną transkrypcję uzyskanego wcześniej cRNA. W tym celu przygotowano 10 μ g cRNA w objętości 22 μ l i połączono z 2 μ l mieszaniny starterów z zestawu (Random Primers, Ambion WT Expression Kit). Inkubowano w termocyklerze przez 5 minut w temp. 70°C, 5 minut w temp. 25°C i 2 minuty w temp. 4°C. Po inkubacji krótko zwirowano. Następnie do każdej próby dodano 16 μ l mieszaniny reakcyjnej zawierającej bufor oraz enzymy drugiego cyklu odwrotnej transkrypcji (2-nd Cycle Master Mix). Inkubowano przez 10 minut w temp. 25°C, 90 minut w temp. 42°C, 10 minut w temp. 70°C, a następnie 2 minuty w temp. 4°C. Natychmiast po inkubacji próby zwirowano, umieszczono na lodzie i przystąpiono do kolejnego etapu procedury.

Hydroliza z zastosowaniem RNazy H

W procedurze tej RNaza H degradowuje matrycę cRNA, pozostawiając jednoniciowe cDNA. Do każdej próby dodano po 2 μ l RNazy H i inkubowano w następujących warunkach: 45 minut w temp. 37°C, 5 minut w temp. 95°C i 2 minuty w temp. 4°C. Po inkubacji próby zwirowano, umieszczono na lodzie i natychmiast przystąpiono do kolejnego etapu.

Oczyszczanie cDNA z drugiego cyklu

Etap ten przygotowuje cDNA do fragmentacji i znakowania. Najpierw do każdej próby dodano 18 μ l wody wolnej od nukleaz w celu uzyskania końcowej objętości 60 μ l, a następnie 60 μ l buforu cDNA Binding Mix. Próby przeniesiono na płytkę o dołkach w kształcie litery U. Dodano 120 μ l 100% etanolu do każdej próbki, wymieszano i delikatnie

wytrząsano przez 2 minuty. W czasie tej inkubacji cDNA wiąże się ze złożem magnetycznym (Nucleic Acid Binding Beads). Płytkę umieszczono w statywie magnetycznym. Po około 5 minutach, gdy płyn stał się klarowny, usunięto supernatant bez naruszania kulek magnetycznych, a płytkę zdjęto ze statywu. Kolejnym krokiem było dwukrotne przemycie cDNA za pomocą roztworu myjącego (Nucleic Acid Wash Solution). Do każdej próby dodano 100 μ l roztworu myjącego (Nucleic Acid Wash Solution) i wytrząsano przez 1 minutę. Płytkę przeniesiono na statyw magnetyczny. Po około 5 minutach płyn stał się przejrzysty, a kulki złoża magnetycznego utworzyły agregat w miejscu przylegania do magnesów statywu. Ostrożnie zebrano i odrzucono supernatant, a płytkę zdjęto ze statywu magnetycznego. Krok powtórzono w celu ponownego przemycia cDNA kolejnymi 100 μ l roztworu myjącego. Płytkę przeniesiono na 1 minutę na wytrząsarke, by odparować resztki etanolu z kulek złoża magnetycznego. Następnie wymyto oczyszczony cDNA ze złoża magnetycznego. W tym celu do każdej próby dodano 30 μ l wcześniej podgrzanego roztworu płuczającego (Elution Solution) i inkubowano najpierw przez 2 minuty bez wytrząsania, a następnie przez 3 minuty intensywnie wytrząsając. Płytkę przeniesiono na statyw magnetyczny na okres 5 minut. Supernatant zawierający wymyty cDNA przeniesiono do nowej probówki wolnej od nukleaz. Po zakończeniu oczyszczania próbek określono stężenie cDNA mierząc spektrofotometrycznie jego absorbancję przy długości fali 260 nm.

Fragmentacja cDNA

Kolejnym krokiem była fragmentacja cDNA. W tym celu do 5,5 μ g jednoniciowego cDNA dodano taką objętość wody wolnej od RNaz, by uzyskać końcową objętość 31,2 μ l na macierz (cDNA Fragmentation Mixture). Przygotowano też mieszaninę reakcyjną do fragmentacji (Fragmentation Master Mix) i w ilości 16,8 μ l dodano do 31,2 μ l buforu zawierającego cDNA. Delikatnie zwirowano i inkubowano w temp. 37°C przez 60 minut, w temp. 93°C przez 2 minuty i w temp. 4°C przez co najmniej 2 minuty. Odwirowano, a następnie przeniesiono po 45 μ l każdej próby do nowych probówek.

Znakowanie pofragmentowanego cDNA

Przygotowano mieszaninę odczynników do znakowania (Labeling Reaction Master Mix) i dodano w odpowiednich proporcjach do każdej próby (15 μ l buforu do znakowania i 45 μ l pofragmentowanej próby). Zwirowano i inkubowano w temp. 37°C przez 60 minut, w temp. 70°C przez 10 minut i w temp. 4°C przez co najmniej 2 minuty. Tak przygotowany materiał wykorzystano w procesie hybrydyzacji.

Hybrydyzacja

Przygotowano bufor do hybrydyzacji (WT Hybridization Master Mix) zgodnie z wytycznymi producenta zamieszczonymi w tabeli 7. Dodano po 49 μl buforu do każdej probówki użytej na 1 próbę, a następnie dodawano 41 μl pofragmentowanego i znakowanego DNA (badanego) oraz 60 μl buforu 2,5X WT Hyb Add 6 do końcowej objętości 150 μl . Wymieszano i zwirowano. Probówki z badanym materiałem poddano denaturacji w termocyklerze w 99°C przez 5 minut, a następnie w 45°C przez 5 minut. Po denaturacji, w celu usunięcia jakichkolwiek nierozpuszczalnych składników z mieszaniny, próby odwirowano przez 1 minutę w 5000 RPM w temperaturze pokojowej. Macierze do hybrydyzacji przygotowano poprzez zanurzenie ich w 120 μl mieszaniny hybrydyzacyjnej, uważając przy tym, by usunąć wszelkie pęcherzyki powietrza. Tak przygotowane macierze umieszczono w stacji do hybrydyzacji w temperaturze 48°C i rozpoczęto proces hybrydyzacji, który trwał 20 godzin. Czas trwania oraz temperaturę, w jakiej przebiegał proces hybrydyzacji, kontrolowano za pomocą programu GeneAtlas® Software Setup firmy Affymetrix. Po zakończeniu procesu hybrydyzacji przystąpiono do płukania bloków z macierzami.

Tab. 7. Składniki buforu do hybrydyzacji.

Kolejność dodawania	Składnik	Ilość na jedną macierz	Ilość na 4 macierze (z 10% nadwyżką)
1	5X WT Hyb Add 1	30 μl	132 μl
2	Oligonukleotydy kontrolne B2 (3 nM)	1,5 μl	6,6 μl
3	20X kontrole hybrydyzacji (<i>bioB</i> , <i>bioC</i> , <i>bioD</i> , <i>cre</i>)	7,5 μl	33 μl
4	15X WT Add 4	10 μl	44 μl
Całkowita objętość		49 μl	215,6 μl

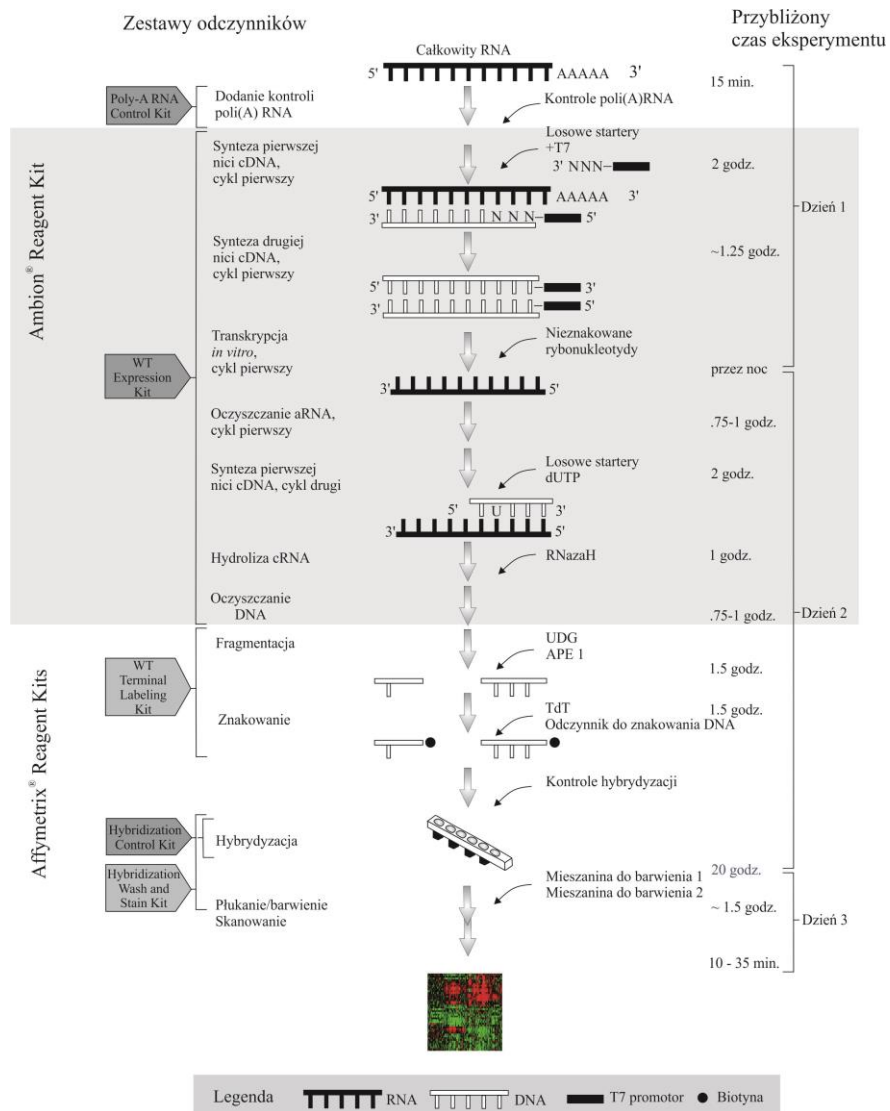
Płukanie macierzy i odczyt wyników

Ostatnim etapem procedury było płukanie macierzy w celu usunięcia buforu do hybrydyzacji oraz niezwiązanego cDNA. Etap ten przeprowadzono z zastosowaniem stacji płukania GeneAtlas® Fluidics Station 450. Przygotowane bufory do płukania podano w określonych ilościach do odpowiednich dołków na płytce do przemywania, zgodnie ze schematem umieszczonym w instrukcji obsługi GeneAtlas® System User's Guide. Płytki do przemywania umieszczono w stacji do płukania i rozpoczęto procedurę. Czas i tempo przemywania kontrolowano za pomocą odpowiedniego oprogramowania (GeneAtlas® Instrument Control Software). Po zakończeniu płukania mikromacierze umieszczano w stacji obrazowania (GeneAtlas® Imaging Station) i rozpoczynano skanowanie za pomocą programu komputerowego GeneAtlas® Viewer, w wyniku czego powstało wiele plików wynikowych z rozszerzeniem .DAT. Na każdą macierz została nałożona siatka w celu określenia dokładnego położenia wszystkich punktów, po czym pliki .DAT przekonwertowano do plików .CEL. Wstępna analiza uzyskanych obrazów została przeprowadzona w programie Partek Express, Affymetrix Edition, stanowiącym część oprogramowania operacyjnego systemu Affymetrix GeneAtlas®. Za jego pomocą przeprowadzono kontrolę jakości hybrydyzacji i znakowania oraz kontrolę jakości użytego RNA.

Całą procedurę doświadczenia mikromacierzowego przedstawiono na rycinie 8.

Analiza danych uzyskanych metodą mikromacierzy RNA

Otrzymane uprzednio pliki .CEL, zawierające tzw. „surowe dane” intensywności świecenia każdego bloku mikromacierzy, zostały zaimportowane do oprogramowania TAC (ang. *Transcriptome Analysis Console*) (Affymetrix, Santa Clara, USA; wersja 4.0.1.36) w celu bioinformatycznej analizy mikromacierzy. Do wstępnego przetworzenia danych zastosowano algorytm RMA (ang. *Robust Multiarray Average*) obejmujący trzy kroki: korekcję tła, normalizację oraz wyznaczenie wartości miar ekspresji. Po zakończeniu normalizacji uzyskane wyniki scalano z plikiem opisowym, w którym znajdowały się nazwy oraz charakterystyki funkcji genów.

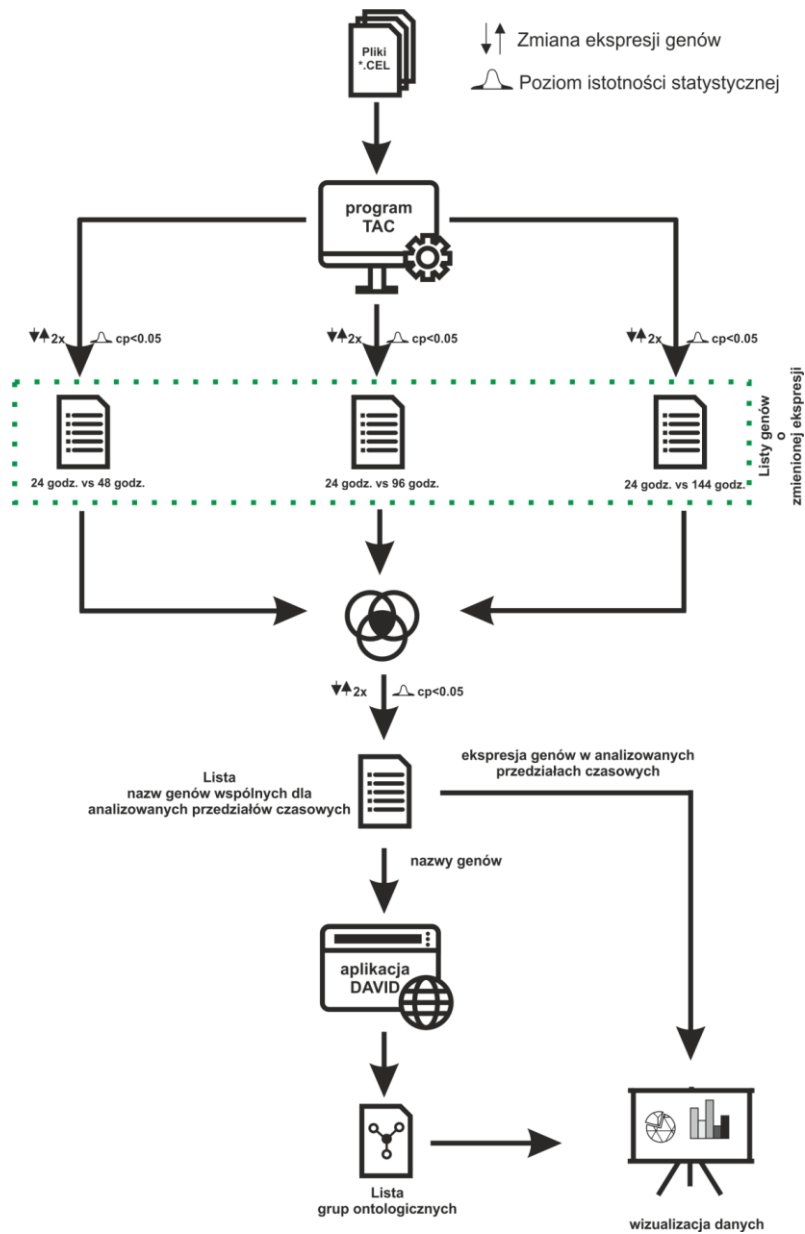


Ryc. 8. Schemat przedstawiający przebieg doświadczenia mikromacierzowego [zmodyfikowano wg materiałów Affymetrix].

W wyniku analizy różnicowej ekspresji genów (ang. *differential expression analysis*) uzyskano trzy tabele zawierające listy genów różnicujących (DEG, ang. *Differentially Expressed Genes*) dla następujących porównań pomiędzy analizowanymi grupami: 48 godz. vs. 24 godz., 96 godz. vs. 24 godz. oraz 144 godz. vs. 24 godzina. W następnym kroku listy przefiltrowano przy wykorzystaniu kryteriów dla skorygowanej wartości $p < 0,05$ (ang. *adjusted p-value*) oraz zmiany ekspresji genów (wzrost/spadek) na poziomie >2 . Tak otrzymane zbiory genów uwspólniono do jednej listy zawierającej wyłącznie te geny, które znajdowały się na wszystkich trzech listach.

Wspólną listę genów zaimportowano do oprogramowania bazy danych DAVID (ang. *Database for Annotation, Visualization and Integrated Discovery*) (www.david.ncifcrf.gov) w celu przeprowadzenia analizy pod kątem współwystępowania w grupach ontologicznych z bazy ontologii genów (GO, ang. *Gene Ontology database*). Uzyskane w ten sposób klastry grup ontologicznych przeanalizowano, a następnie wybrane grupy ontologiczne zapisano w pliku .xlsx, który zaimportowano do środowiska RStudio (wersja 1.1.453) języka R (wersja 3.5.0) w celu wizualizacji wyników. Praca w środowisku RStudio umożliwiła zarówno wizualizację danych, jak również wszystkie analizy danych tabelarycznych, w tym łączenie tabel oraz ich filtrowanie. Wszystkie kroki analizy w środowisku języka R przeprowadzono z wykorzystaniem następujących pakietów: dplyr – filtrowanie oraz łączenie danych, stringr – analiza wyrażeń regularnych, GPlot/ggplot2 – wizualizacja danych.

Przebieg bioinformatycznej analizy danych uzyskanych metodą mikromacierzy RNA przedstawiono na rycinie 9.



Ryc. 9. Schemat bioinformatycznej analizy wyników eksperymentu mikromacierzowego.

3.2.8. Analizy statystyczne

qPCR

Do przeprowadzenia analizy statystycznej wyników uzyskanych metodą qPCR wykorzystano program Microsoft Excel, za pomocą którego obliczono wartości średnie, odchylenie standardowe oraz błąd standardowy średniej. Następnie za pomocą dodatku Real Statistics do programu Microsoft Excel, wykorzystującego test Kruskala-Wallisa z zastosowanym po nim testem *post-hoc* Nemenyi, obliczono poziomy istotności, przyjmując różnice między grupami za statystycznie istotne na poziomie:

* dla $p < 0,05$

** dla $p < 0,01$

*** dla $p < 0,001$

Mikromacierze RNA

Istotność statystyczną uzyskanych w eksperymencie mikromacierzowym danych sprawdzono przy pomocy analizy wariancji ANOVA. Uzyskane wartości p zostały skorygowane procedurą FDR (ang. *false discovery rate*) dla wielokrotnych porównań. Za geny o statystycznie istotnie zmienionej ekspresji uznano geny, których poziom ekspresji zmienił się co najmniej dwukrotnie (wzrost/spadek), przy uzyskanej wartości $p < 0,05$.

Immunofluorescencja

Analizę statystyczną wyników pochodzących z eksperymentów immunofluorescencji przeprowadzono z zastosowaniem testu Kruskala-Wallisa na poziomie istotności $\alpha < 0,05$. W celu sprawdzenia, która para przedziałów czasowych stanowiła o istotności testu Kruskala-Wallisa wykorzystano test Wilcoxona z poprawką na wielokrotne testowanie metodą Holma-Bonferroniego. Różnice między grupami przyjęto za statystycznie istotne na poziomie:

* dla $p < 0,05$

** dla $p < 0,01$

*** dla $p < 0,001$

4. WYNIKI

4.1. Morfologia komórek ziarnistych w hodowli pierwotnej

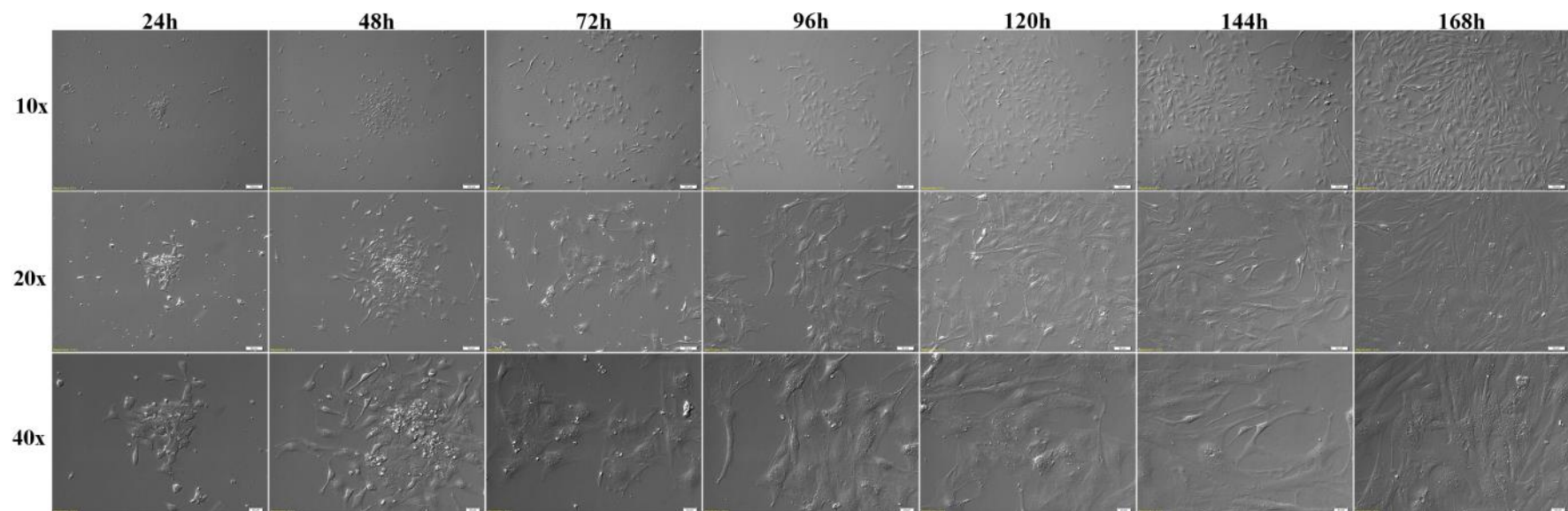
Obserwację cech morfologicznych komórek ziarnistych w hodowli pierwotnej prowadzono przy użyciu mikroskopu badawczego Olympus IX81 w układzie odwróconym (Olympus Corporation, Japonia).

Komórki ziarniste hodowano *in vitro* przez 168 godzin (hodowla krótkoterminowa), a przebieg zmian w ich morfologii monitorowano co 24 godziny (7 przedziałów czasowych). Kształt komórek ziarnistych w początkowym etapie hodowli był nieregularnie wieloboczny (gwiazdzisty), a w miarę upływu czasu hodowli przybierały one kształt wrzecionowaty (ang. *spindle-shaped cells*) i/lub podobny do fibroblastów (ang. *fibroblast-like cells*). Komórki ziarniste przylegały do podłoża w ciągu pierwszych 24 godzin hodowli. W drugim dniu trwania hodowli komórki zaczynały tworzyć różnej wielkości kolonie, a następnie stopniowo pokrywały dno naczynia hodowlanego jedną warstwą (ang. *monolayer*). W 6 - 7 dniu hodowla osiągała konfluencję (ryc. 10).

4.2. Analiza proliferacji komórek ziarnistych w czasie rzeczywistym

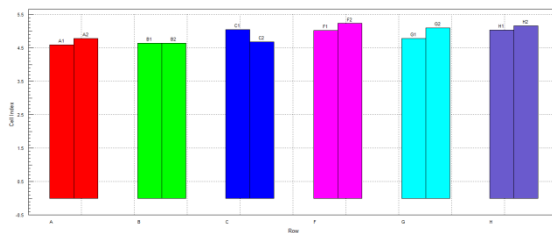
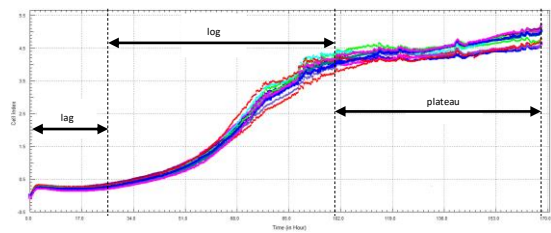
Proliferację komórek ziarnistych w czasie rzeczywistym mierzono za pomocą systemu RTCA przez 168 godzin hodowli *in vitro*. Faza przystosowacza (tzw. faza lag, ang. *lag phase*), w czasie której następowała adhezja komórek do podłoża i ich rozplaszczanie się na dnie naczynia hodowlanego, obejmowała pierwsze 24 godz. hodowli. Po tym okresie komórki wchodziły w logarytmiczną fazę wzrostu (tzw. fazę log, ang. *log phase*), która trwała do około 100 godziny hodowli. Po fazie logarytmicznego wzrostu liczby komórek następowała faza stacjonarna (tzw. faza plateau, ang. *stationary phase*). Indeks komórkowy (CI, ang. *cell index*) osiągnął najwyższą wartość około 100 godz. hodowli (ryc. 11).

Ryc. 10. Morfologia komórek ziarnistych w poszczególnych przedziałach czasowych hodowli pierwotnej. Obserwacje prowadzono pod mikroskopem odwróconym, w kontraście interferencyjno-różnicowym Nomarskiego (DIC, ang. *differential interference contrast*) (powiększenie 10x, 20x i 40x).

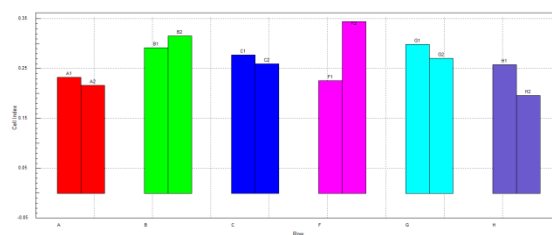
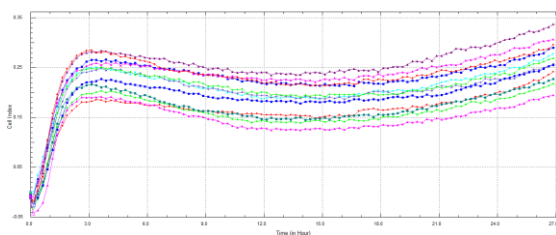


Ryc. 11. Wykres przedstawiający proliferację komórek ziarnistych jajnika świni hodowanych przez 168 godzin, wyrażoną wartością indeksu komórkowego (CI, ang. *cell index*) (A). W każdym przedziale czasowym eksperymentu ((B) 0 - 24 godz.), ((C) 24 - 48 godz.), ((D) 48 - 72 godz.), ((E) 72 - 96 godz.), ((F) 96 - 120 godz.), ((G) 120 - 144 godz.) i ((H) 144 - 168 godz.) pomiaru impedancji dokonywano co 15 minut. Wykresy kolumnowe przedstawiają ilościowe różnice w proliferacji komórek w czasie rzeczywistym między poszczególnymi powtórzeniami.

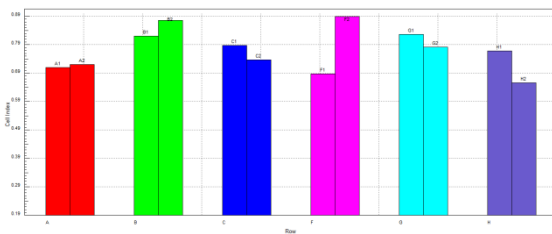
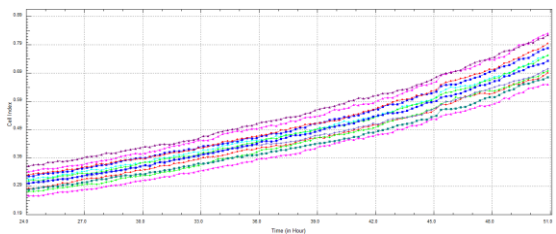
A.



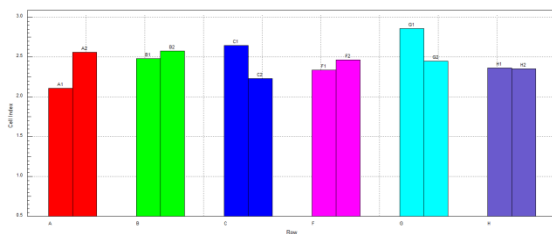
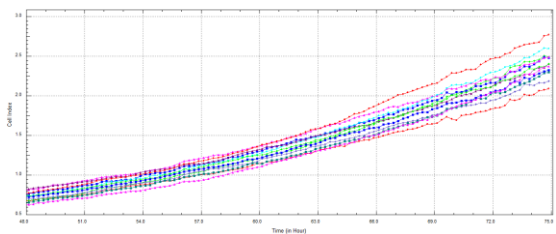
B.



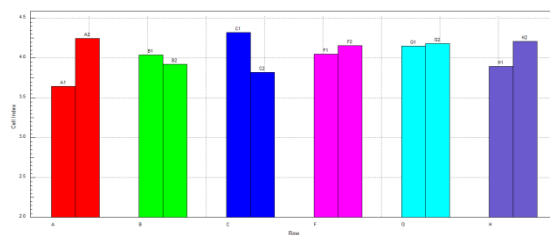
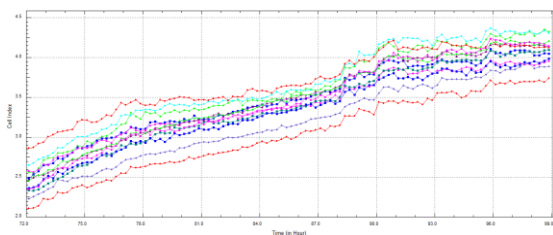
C.



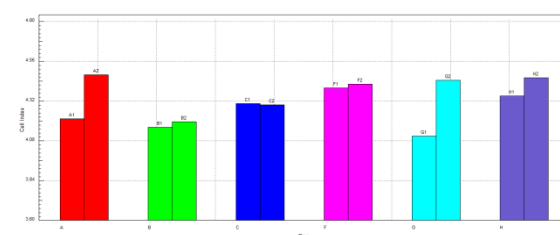
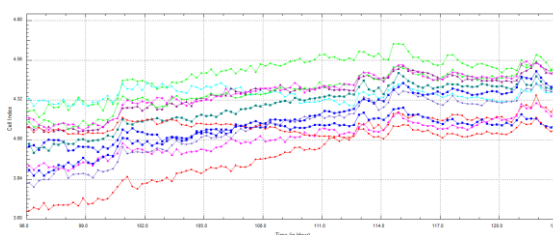
D.



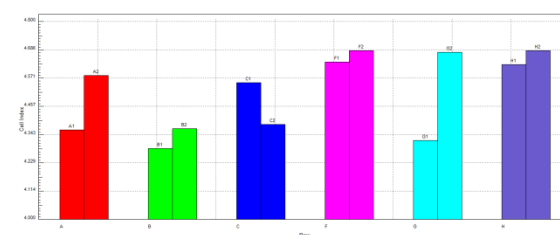
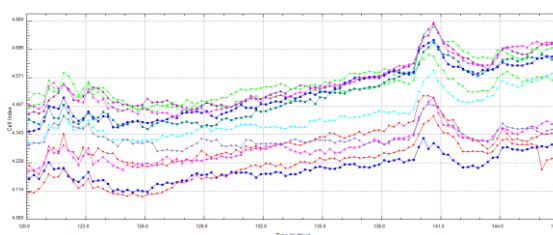
E.



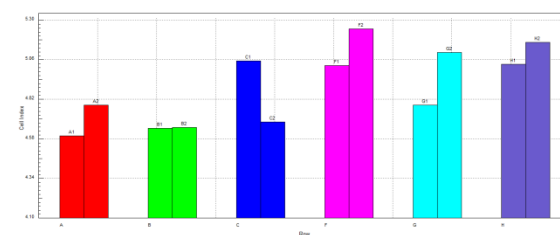
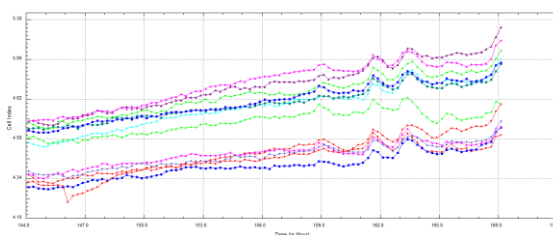
F.



G.

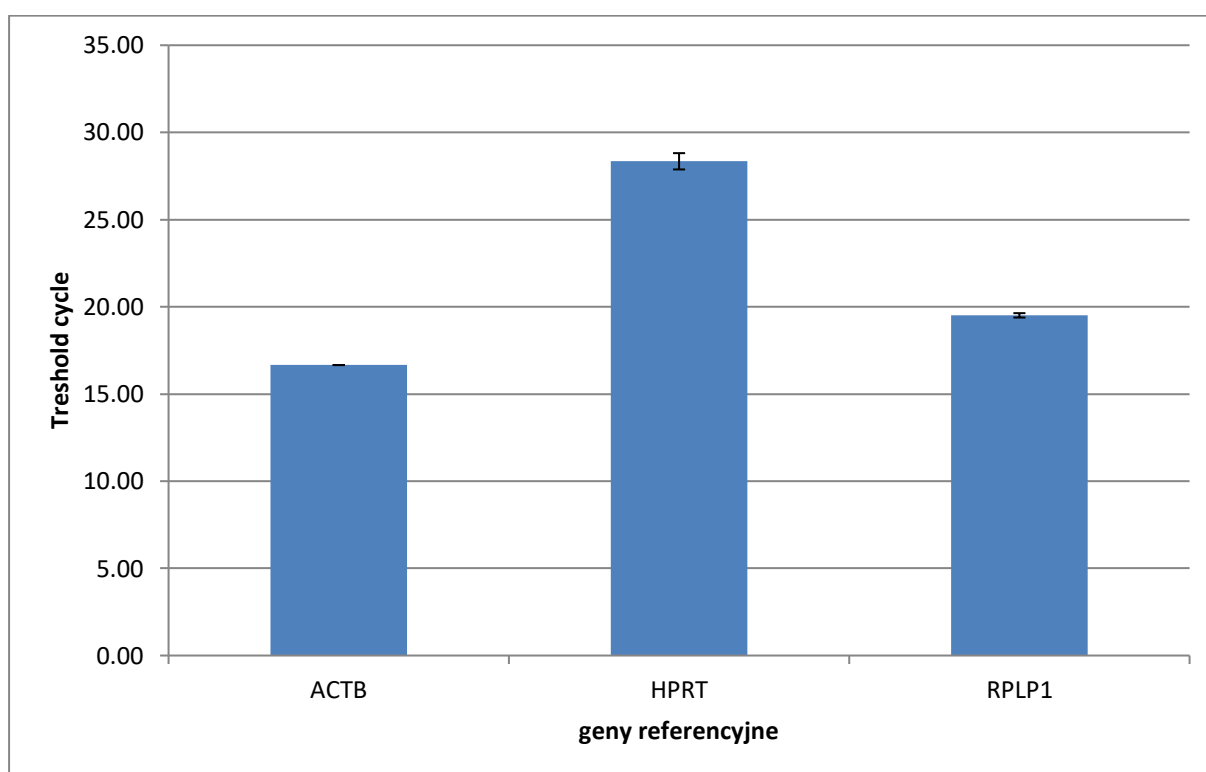


H.



4.3. Analiza ekspresji wybranych transkryptów w jajnikowych komórkach ziarnistych

Ekspresję genów (*Lhr*, *Fshr*, *Cyp19*, *Cx36*, *Cx37*, *Cx40*, *Cx43* i *Cx45*) na poziomie mRNA w komórkach ziarnistych badano za pomocą metody qPCR. Ekspresja wybranych genów analizowana była podczas krótkoterminowej hodowli *in vitro* (168 godz.) w następujących przedziałach czasowych: 24, 48, 72, 96, 120, 144 i 168 godz. Wyniki poziomów ekspresji standaryzowano względem trzech genów z grupy housekeeping: ACTB, HPRT i RPLP1 (ryc. 12).

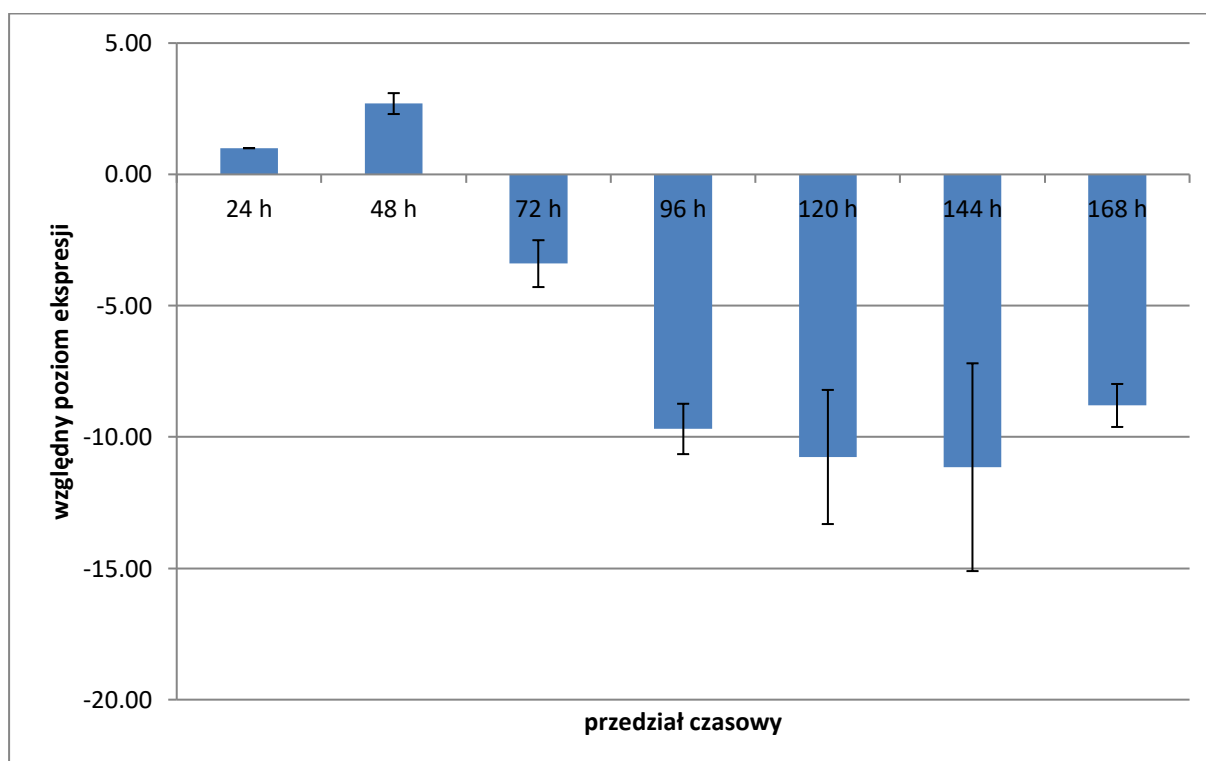


Ryc. 12. Analiza uśrednionych poziomów ekspresji trzech genów z grupy housekeeping wykorzystanych w analizie qPCR jako geny referencyjne (ACTB - β -aktyna, HPRT - fosforybozylotransferaza hypoksantyny, RPLP1 – białko rybosomalne LP1). Poziomy ekspresji ACTB, HPRT oraz RPLP1 zostały przedstawione jako średnia ze wszystkich przedziałów czasowych \pm SEM.

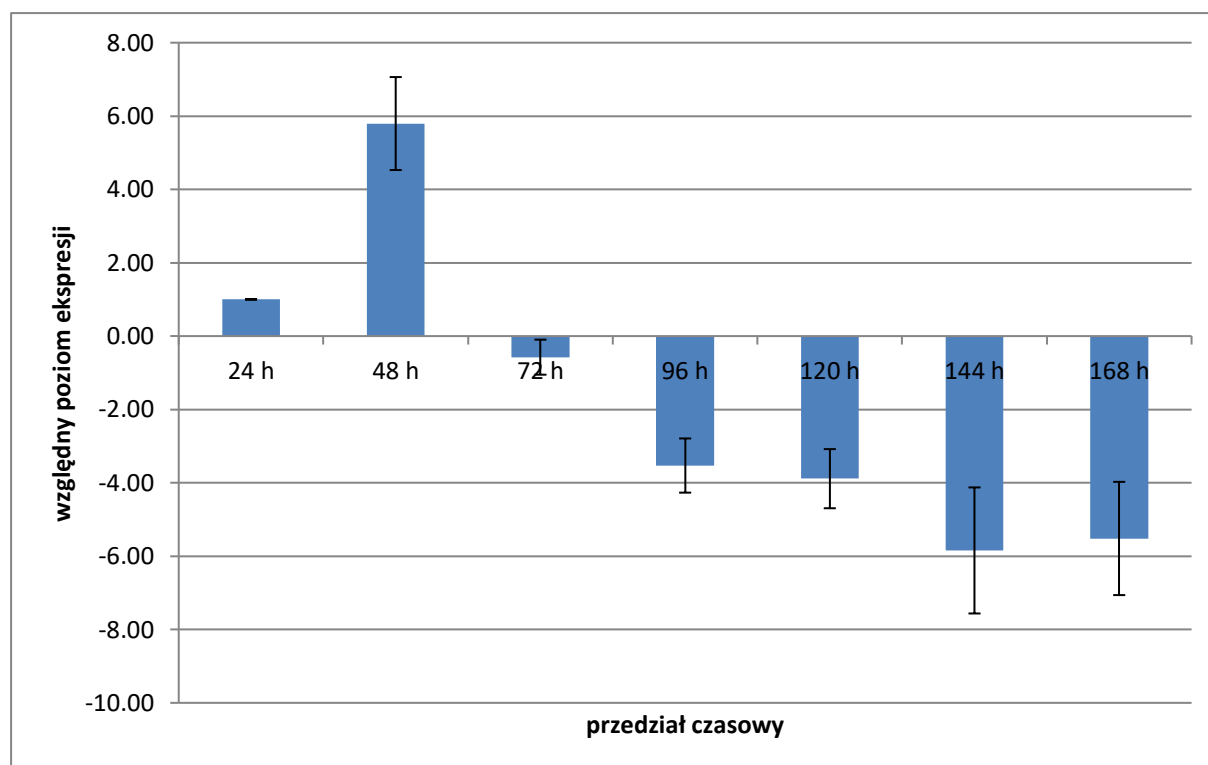
4.4. Ilościowa analiza ekspresji mRNA *Lhr*, *Fshr*, *Cx43* i *Cx45*

Za pomocą metody PCR w czasie rzeczywistym (qPCR) wykazano ekspresję w komórkach ziarnistych następujących transkryptów: *Lhr*, *Fshr*, *Cx43* i *Cx45*. Poziom

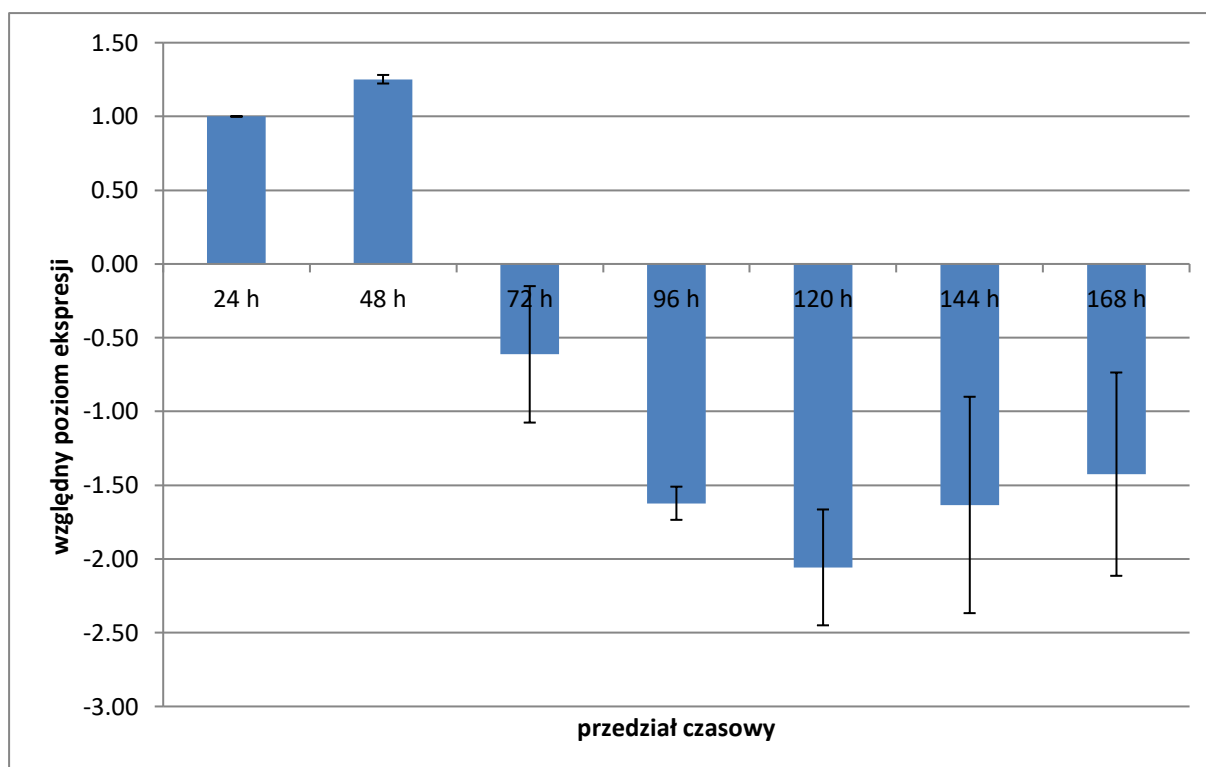
mRNA *Lhr* był najwyższy w 48 godz. hodowli; w kolejnych przedziałach czasowych hodowli (72, 96, 120, 144 i 168 godz.) ekspresja genu *Lhr* wykazywała tendencję spadkową (ryc. 13). Podobny wzór ekspresji obserwowano w przypadku genu *Fshr*, którego ekspresja była najwyższa w 48 godz. hodowli (ryc. 14). Poziomy ekspresji *Lhr* i *Fshr* nie osiągnęły istotności statystycznej na żadnym z analizowanych przedziałów czasowych hodowli ($p > 0,05$) (ryc. 13; ryc. 14). Najwyższy poziom ekspresji genu *Cx43* wykazano w 48 godzinie hodowli, a w kolejnych przedziałach czasowych hodowli następował spadek ekspresji *Cx43*. (ryc. 15). Poziomy transkryptu *Cx45* wykazywał wzrost ekspresji wyłącznie w 24 godz. hodowli w porównaniu z pozostałymi przedziałami czasowymi (ryc. 16). Poziomy ekspresji obu analizowanych koneksyn (*Cx43* i *Cx45*) nie uzyskały istotności statystycznej na żadnym z analizowanych przedziałów czasowych hodowli ($p > 0,05$) (ryc. 15; ryc. 16).



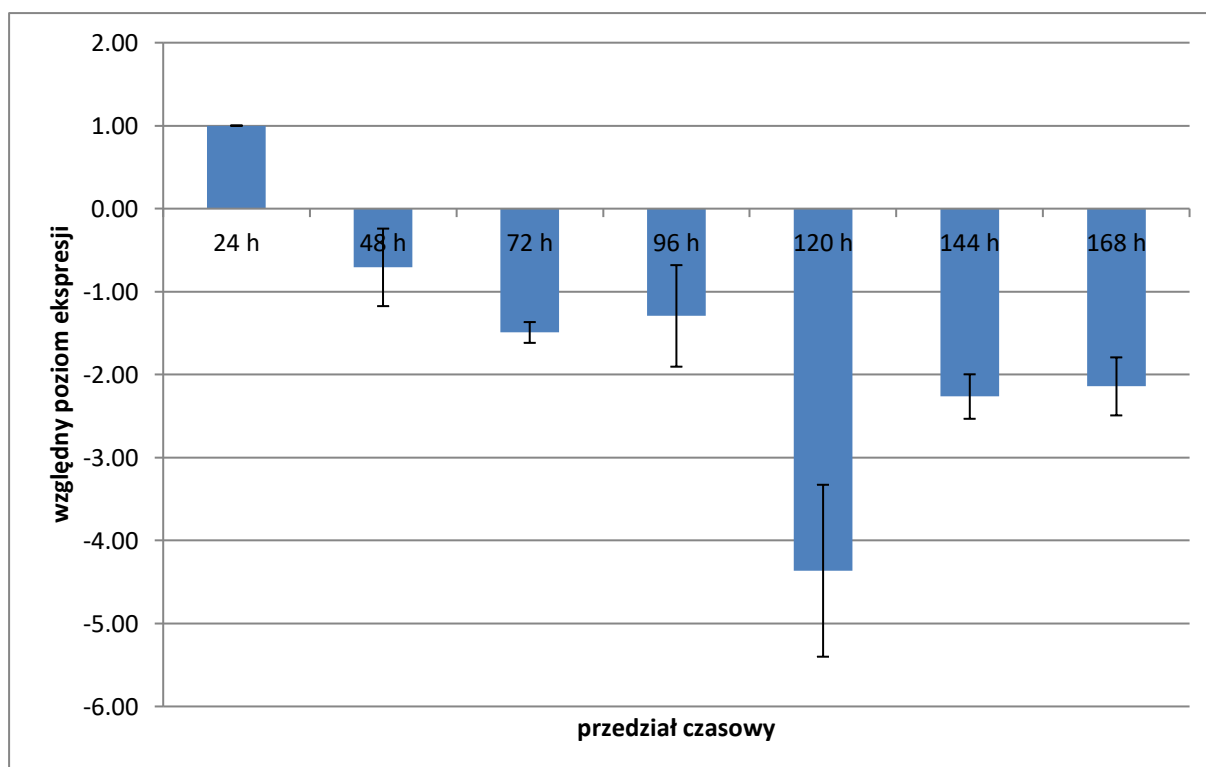
Ryc. 13. Analiza ekspresji genu *Lhr* w komórkach ziarnistych w poszczególnych przedziałach czasowych krótkoterminowej hodowli *in vitro*. Kolumny przedstawiają ekspresję genu na poziomie mRNA względem genów referencyjnych. Średniej ekspresji w komórkach w 24 godz. hodowli przypisano wartość 1, a w pozostałych przedziałach czasowych adekwatnie znormalizowano. Dane przedstawiają wartości średnie \pm SEM; $p > 0,05$, brak istotności statystycznej.



Ryc. 14. Analiza ekspresji genu *Fshr* w komórkach ziarnistych w poszczególnych przedziałach czasowych krótkoterminowej hodowli *in vitro*. Kolumny przedstawiają ekspresję genu na poziomie mRNA względem genów referencyjnych. Średniej ekspresji w komórkach w 24 godz. hodowli przypisano wartość 1, a w pozostałych przedziałach czasowych adekwatnie znormalizowano. Dane przedstawiają wartości średnie \pm SEM; $p > 0,05$, brak istotności statystycznej.



Ryc. 15. Analiza ekspresji genu *Cx43* w komórkach ziarnistych w poszczególnych przedziałach czasowych krótkoterminowej hodowli *in vitro*. Kolumny przedstawiają ekspresję genu na poziomie mRNA względem genów referencyjnych. Średniej ekspresji w komórkach w 24 godz. hodowli przypisano wartość 1, a w pozostałych przedziałach czasowych adekwatnie znormalizowano. Dane przedstawiają wartości średnie \pm SEM; $p > 0,05$, brak istotności statystycznej.



Ryc. 16. Analiza ekspresji genu *Cx45* w komórkach ziarnistych w poszczególnych przedziałach czasowych krótkoterminowej hodowli *in vitro*. Kolumny przedstawiają ekspresję genu na poziomie mRNA względem genów referencyjnych. Średniej ekspresji w komórkach w 24 godz. hodowli przypisano wartość 1, a w pozostałych przedziałach czasowych adekwatnie znormalizowano. Dane przedstawiają wartości średnie \pm SEM; $p > 0,05$, brak istotności statystycznej.

4.5. Ilościowa analiza ekspresji mRNA *Cyp19*, *Cx36*, *Cx37* i *Cx40*

Posługując się techniką qPCR, w żadnym z analizowanych przedziałów czasowych hodowli pierwotnej komórek ziarnistych nie wykazano ekspresji następujących transkryptów: *Cyp19*, *Cx36*, *Cx37* i *Cx40*.

4.6. Jakościowa analiza ekspresji wybranych koneksyn na poziomie białka

Najwyższy poziom ekspresji *Cx36* w komórkach ziarnistych obserwowano w 24 i 48 godzinie hodowli *in vitro*; w kolejnych pięciu przedziałach czasowych hodowli obserwowano spadek ekspresji *Cx36* ($p < 0,001$) (ryc. 17). Ekspresja *Cx37* w komórkach ziarnistych utrzymywała się na porównywalnie niskim poziomie przez cały okres hodowli *in vitro*, a różnice między poziomami ekspresji *Cx37* w 24 godz. hodowli i w pozostałych przedziałach czasowych nie osiągnęły istotności statystycznej (ryc. 18). Poziom ekspresji *Cx40* był najwyższy w 24 godz. hodowli komórek ziarnistych *in vitro*. W kolejnych przedziałach czasowych wykazano statystycznie istotny spadek ekspresji tego białka (dla następujących przedziałów czasowych 48 godz., 72 godz., 96 godz., 120 godz., 144 godz., 168 godz., odpowiednio $p < 0,01$, $p < 0,001$, $p < 0,001$, $p < 0,001$, $p < 0,001$, $p < 0,001$) (ryc. 19).

Najwyższy poziom ekspresji *Cx43* obserwowano w 24 godz. hodowli *in vitro*. W kolejnych przedziałach czasowych hodowli ekspresja *Cx43* spadała, osiągając poziom istotności statystycznej $p < 0,01$ w 72 i 144 godz. hodowli oraz $p < 0,001$ w 96, 120 i 168 godz. hodowli (ryc. 20). Ekspresja *Cx45* była najwyższa w 24 godz. hodowli *in vitro*. Spadek ekspresji *Cx45* w przedziałach czasowych 72-168 godz. osiągnął istotność statystyczną na poziomie $p < 0,001$. Nie odnotowano istotności statystycznej między różnicą w ekspresji *Cx45* w 24 i 48 godzinie hodowli (ryc. 21).

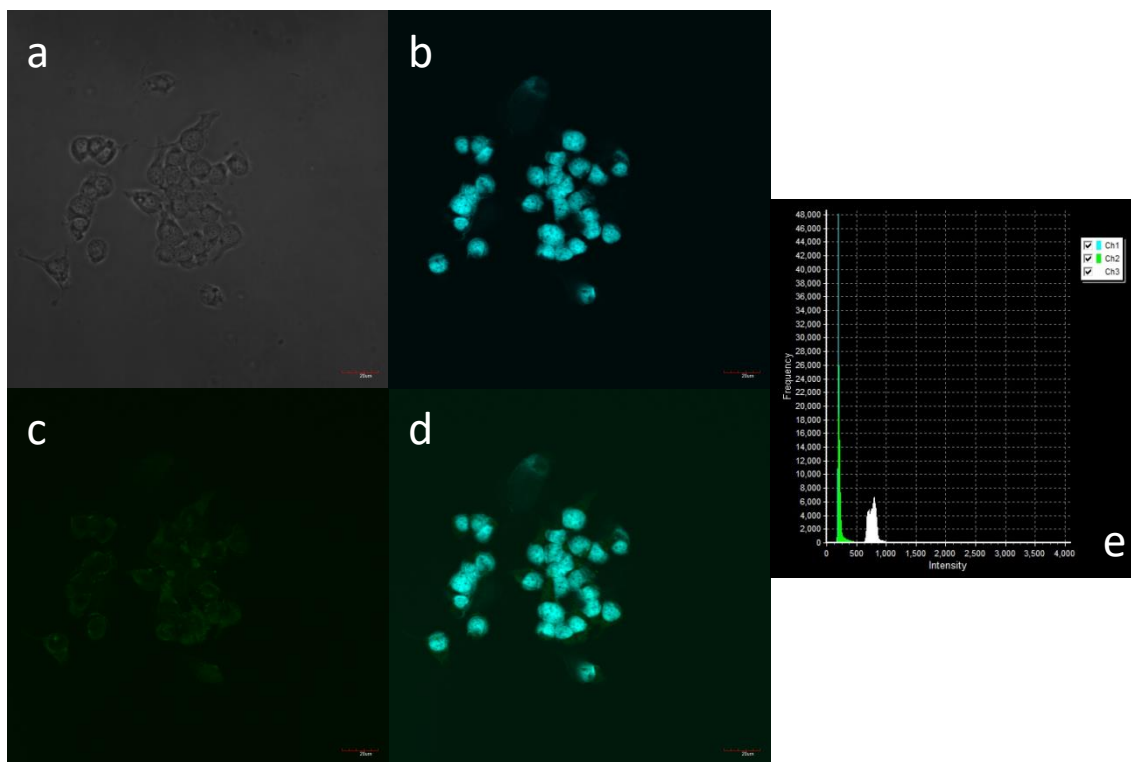
We wszystkich analizowanych przedziałach czasowych hodowli badane białka (*Cx36*, *Cx37*, *Cx40*, *Cx43* i *Cx45*) wykazywały lokalizację jądrową, cytoplazmatyczną oraz błonową (tab. 8).

Tab. 8. Komórkowa lokalizacja białka Cx36, Cx37, Cx40, Cx43 i Cx45.

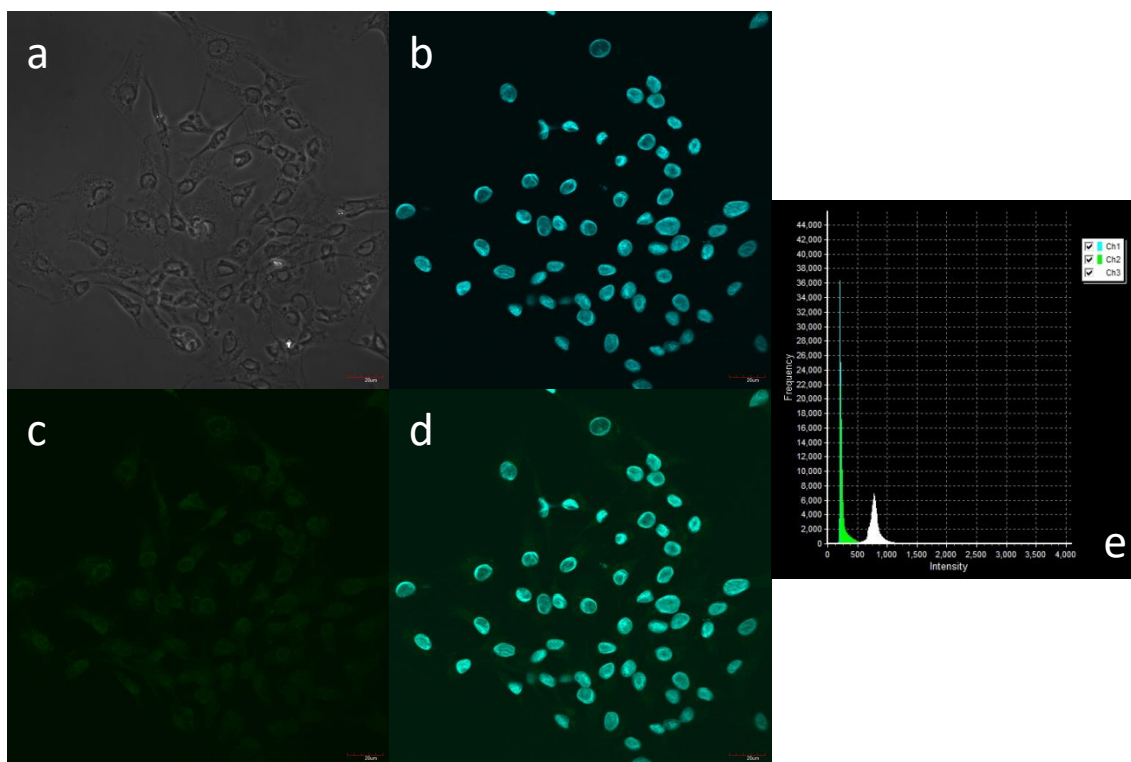
Lokalizacja Białko	Błonowa	Cytoplazmatyczna	Jądrowa
Cx36	+	+	-
Cx37	+	+	-
Cx40	+	+	+
Cx43	+	+	-
Cx45	+	+	-

Ryc. 17. Ekspresja i lokalizacja komórkowa białka Cx36 w komórkach ziarnistych podczas 7-dniowej hodowli pierwotnej. W celu przeprowadzenia procedury barwienia immunofluorescencyjnego komórki ziarniste utrwalano po 24 godz. (A), 48 godz. (B), 72 godz. (C), 96 godz. (D), 120 godz. (E), 144 godz. (F) i 168 godz. (G) hodowli. **a.** kontrast Nomarskiego, **b.** jądra komórkowe wybarwione DAPI, **c.** komórki wybarwione przeciwciałem, **d.** nałożenie obrazów b i c, **e.** histogram przedstawiający dwa kanały fluorescencji: kanał 1 - DAPI, kanał 2 - FITC oraz kontrast fazowy. Podziałka odpowiada 20 μm . (H) Intensywność fluorescencji emitowanej przez barwione przeciwciałem anty-Cx36 komórki ziarniste w poszczególnych przedziałach czasowych krótkoterminowej hodowli pierwotnej. W każdym przedziale czasowym liczba ocenianych komórek (n) wynosiła 10. Wartości statystyczne przedstawiają porównania względem pierwszej grupy (24 godz.). Pozioma kreska wyznacza medianę. *** - $p < 0,001$.

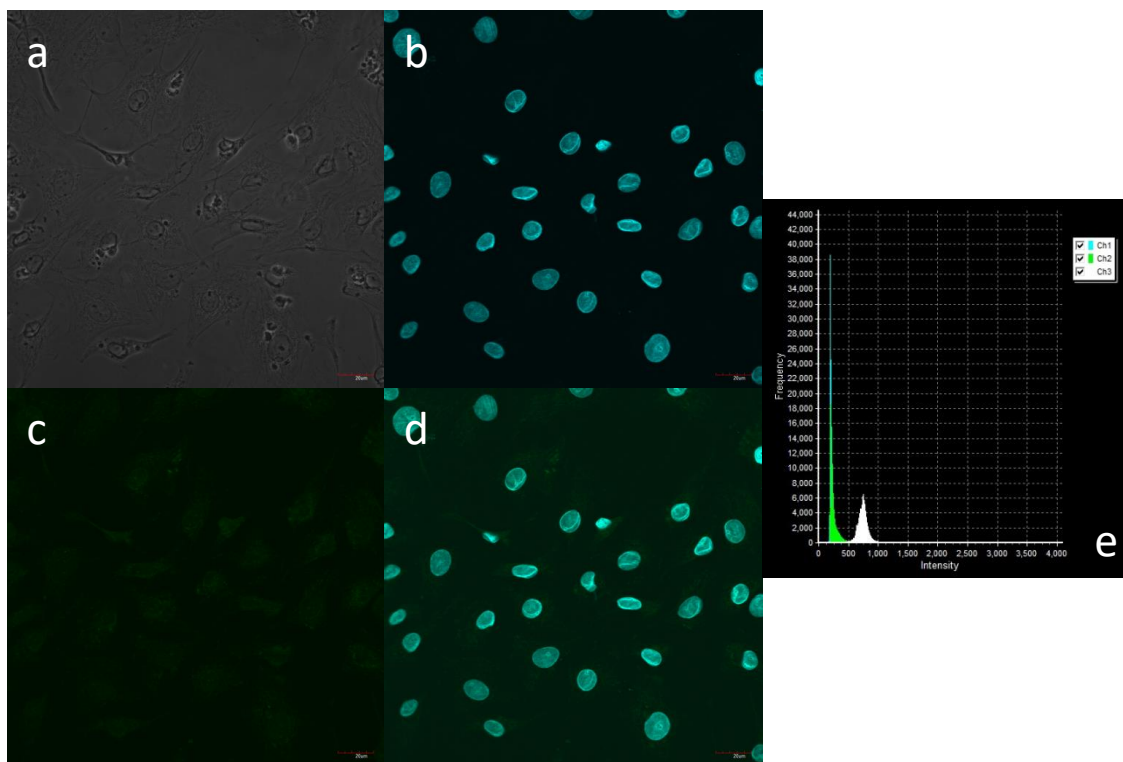
A.



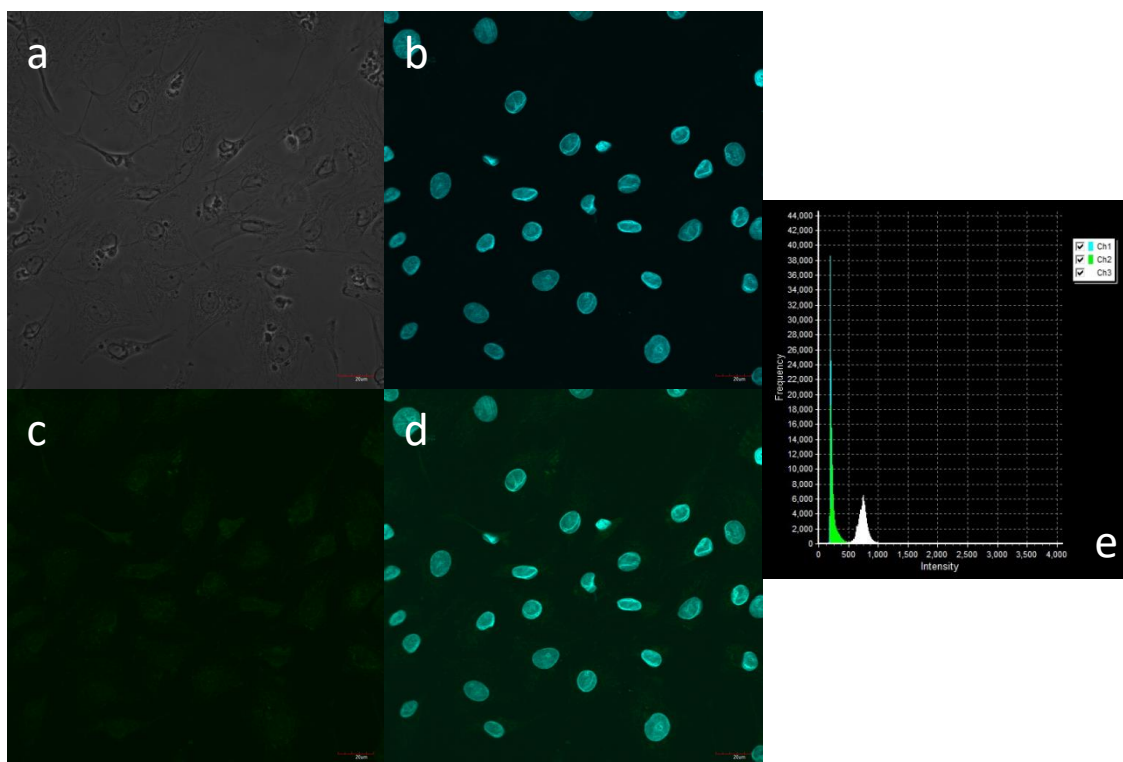
B.



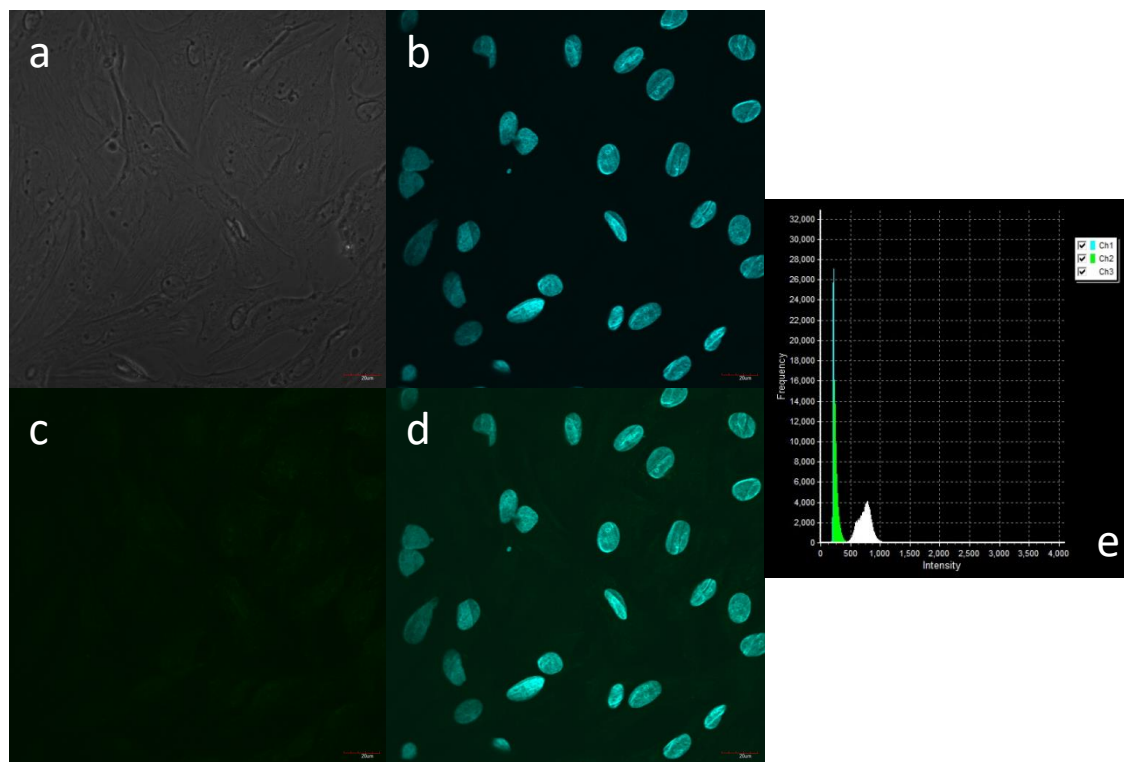
c.



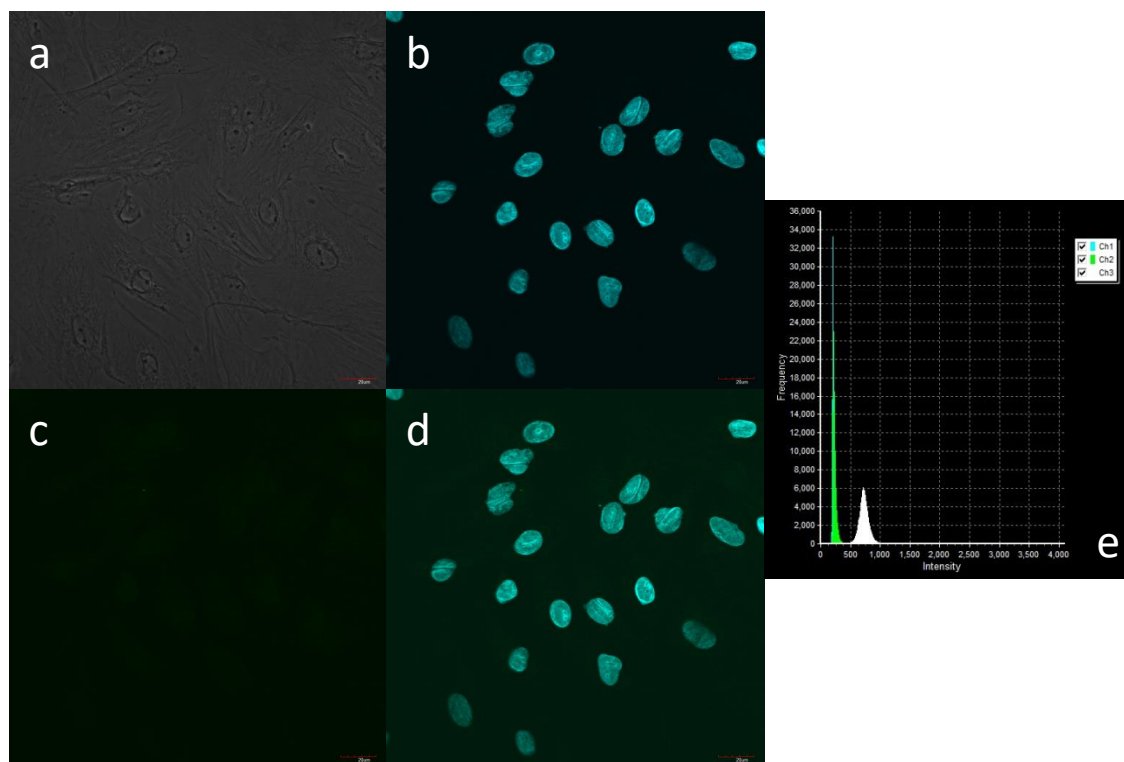
D.



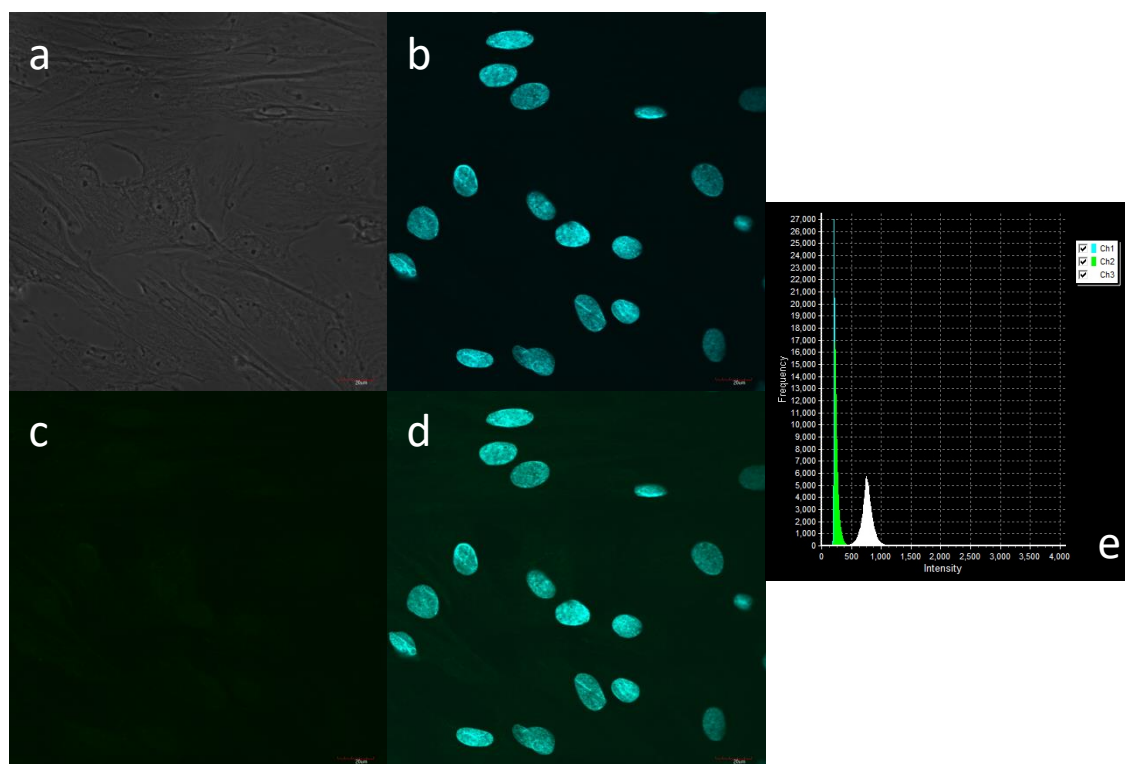
E.



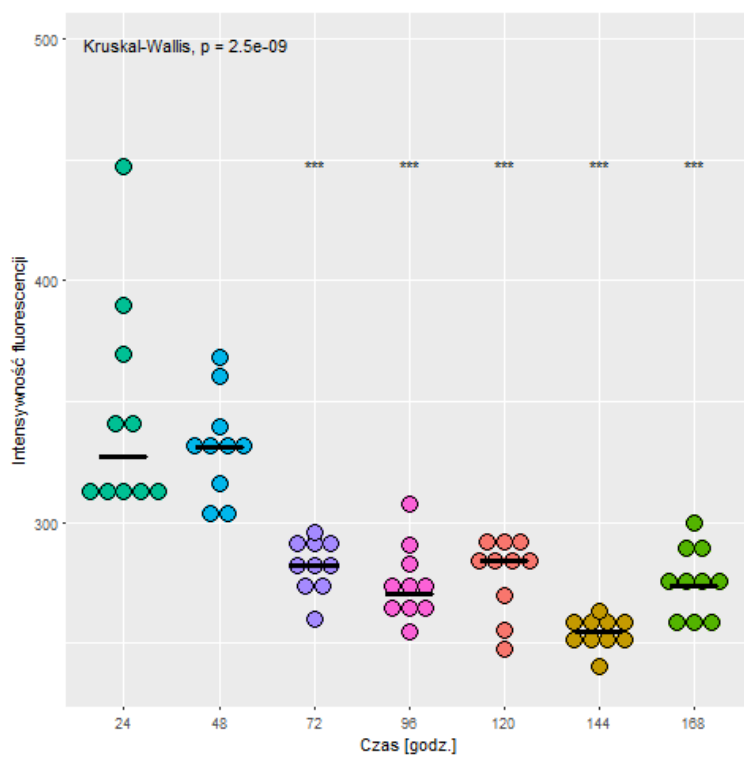
F.



G.

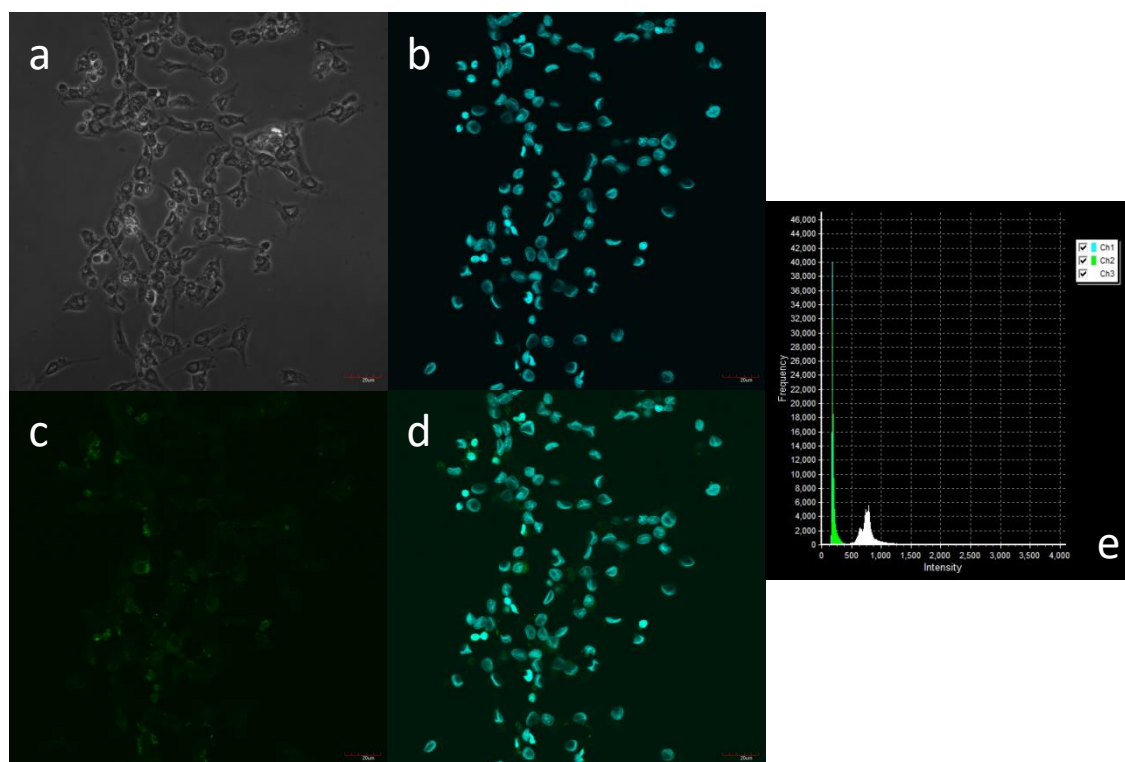


H.

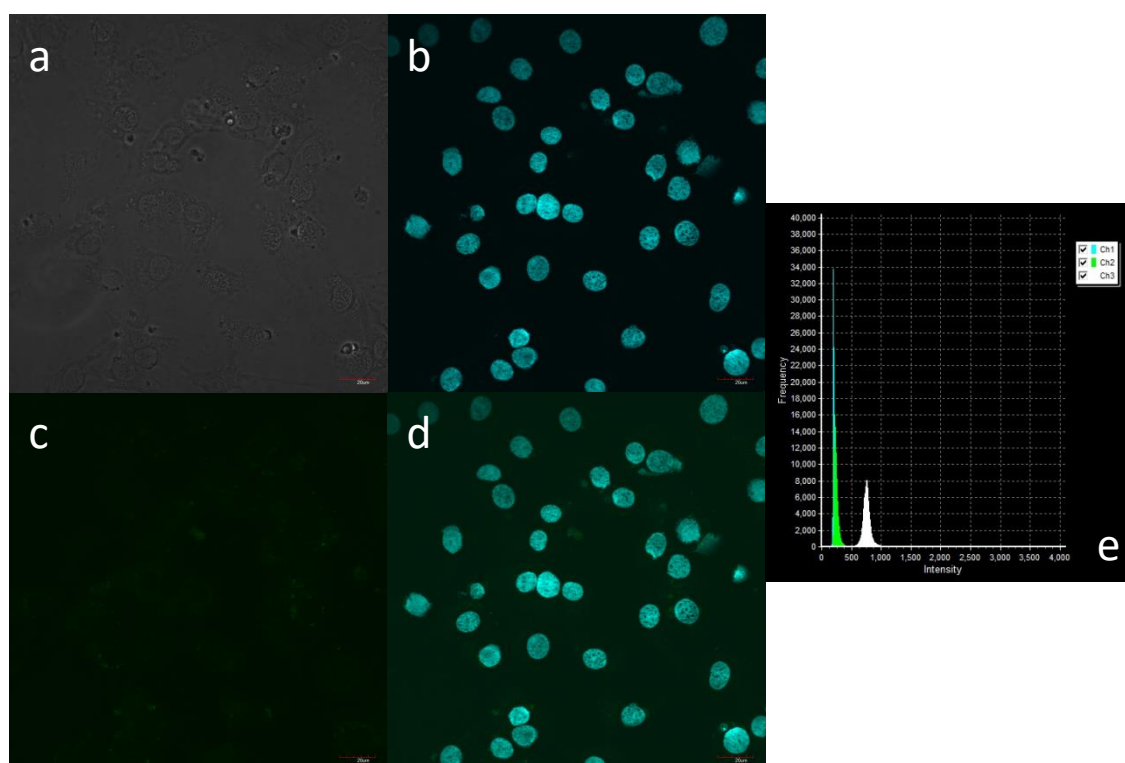


Ryc. 18. Ekspresja i lokalizacja komórkowa białka Cx37 w komórkach ziarnistych podczas 7-dniowej hodowli pierwotnej. W celu przeprowadzenia procedury barwienia immunofluorescencyjnego komórki ziarniste utrwalano po 24 godz. (A), 48 godz. (B), 72 godz. (C), 96 godz. (D), 120 godz. (E), 144 godz. (F) i 168 godz. (G) hodowli. **a.** kontrast Nomarskiego, **b.** jądra komórkowe wybarwione DAPI, **c.** komórki wybarwione przeciwciałem, **d.** nałożenie obrazów b i c, **e.** histogram przedstawiający dwa kanały fluorescencji: kanał 1 - DAPI, kanał 2 - FITC oraz kontrast fazowy. Podziałka odpowiada 20 μm . (H) Intensywność fluorescencji emitowanej przez barwione przeciwciałem anti-Cx37 komórki ziarniste w poszczególnych przedziałach czasowych krótkoterminowej hodowli pierwotnej. W każdym przedziale czasowym liczba ocenianych komórek (n) wynosiła 10. Wartości statystyczne przedstawiają porównania względem pierwszej grupy (24 godz.). Pozioma kreska wyznacza medianę.

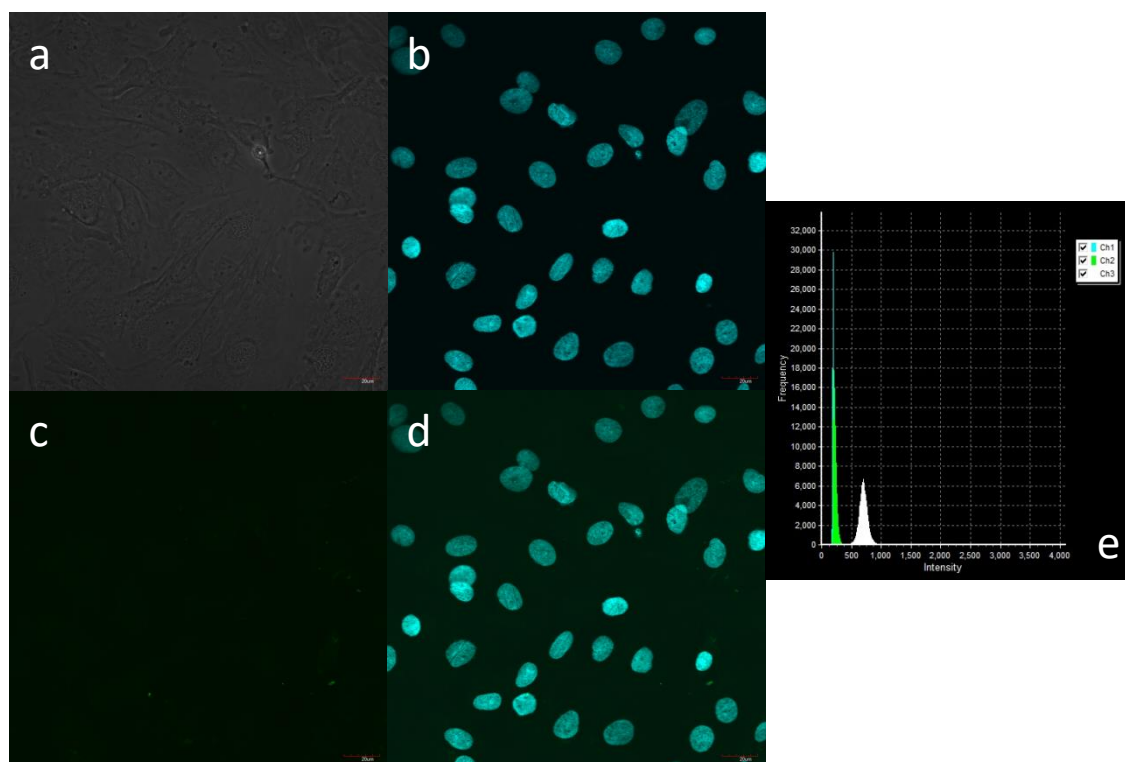
A.



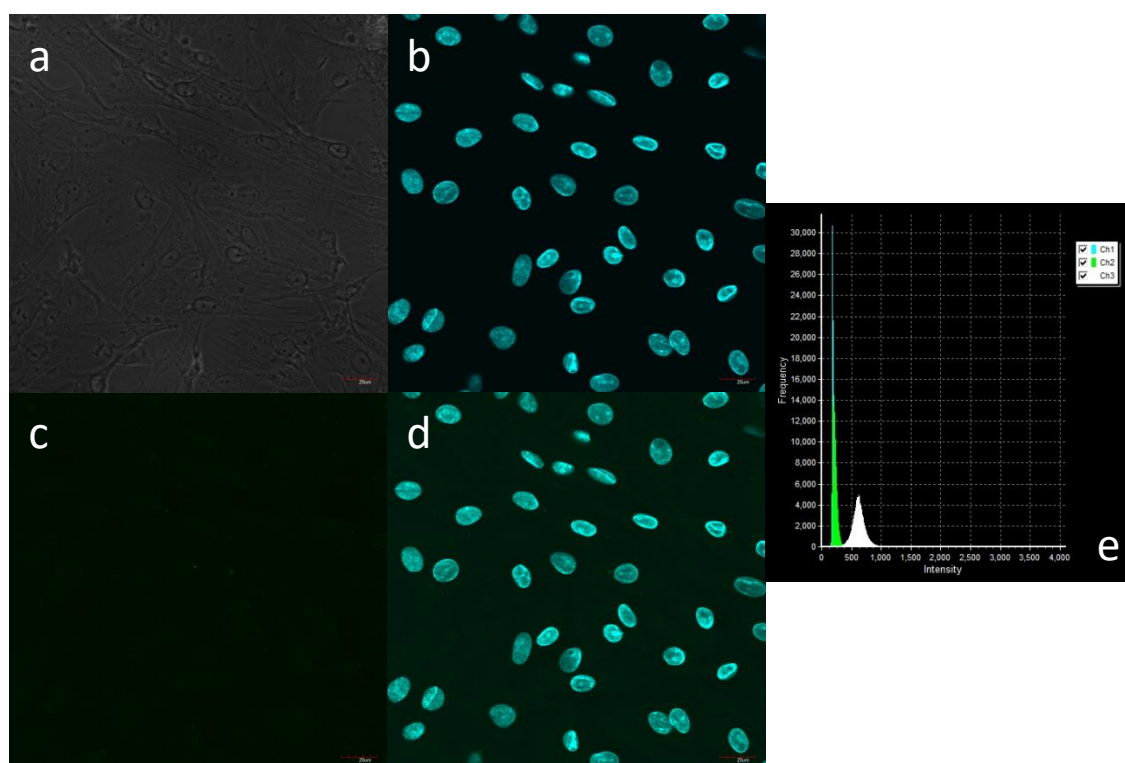
B.



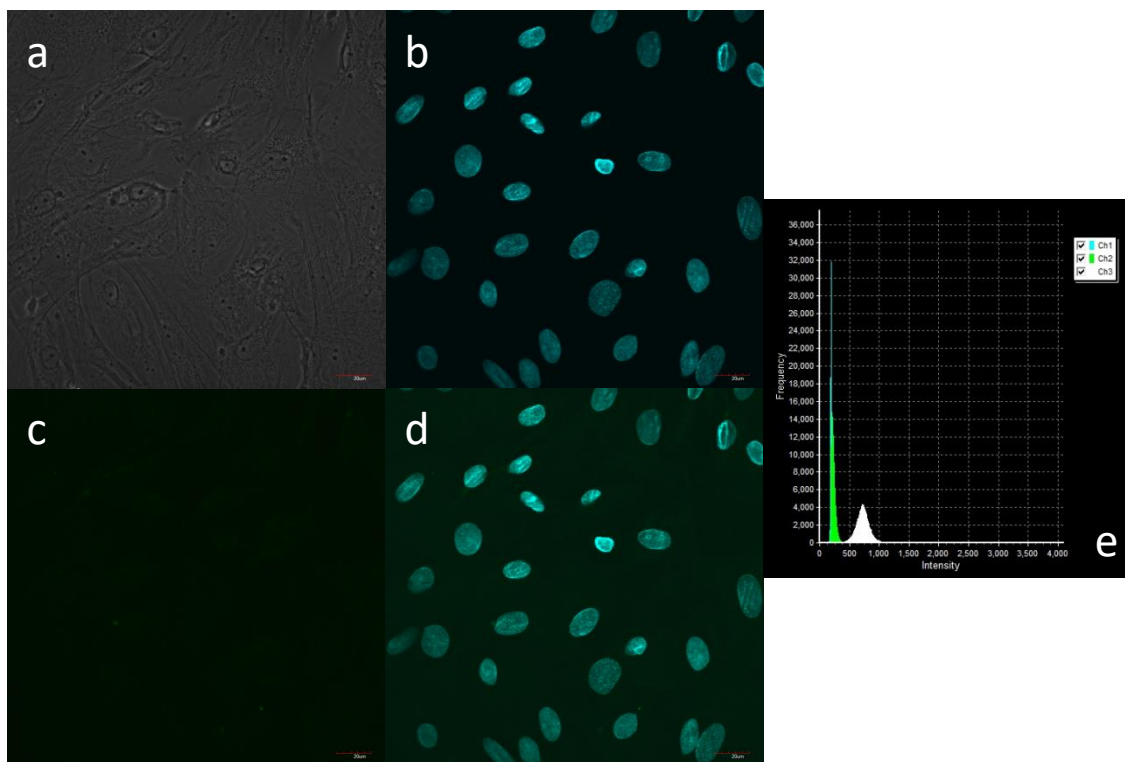
c.



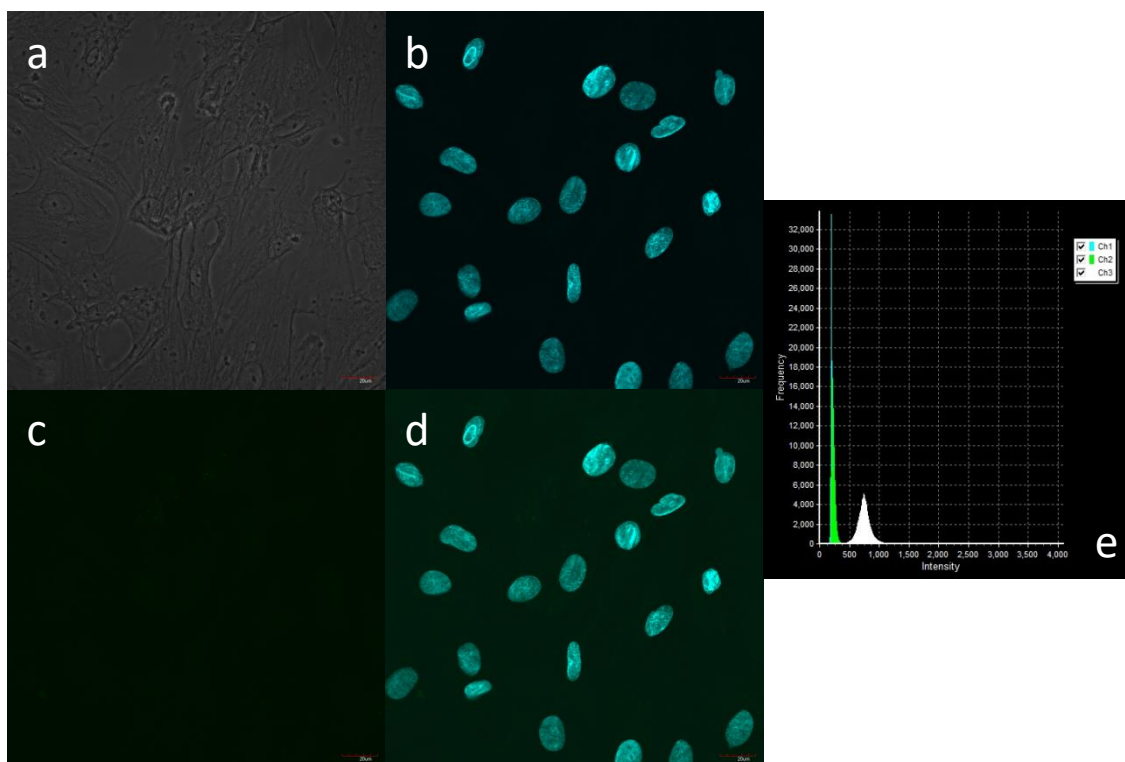
D.



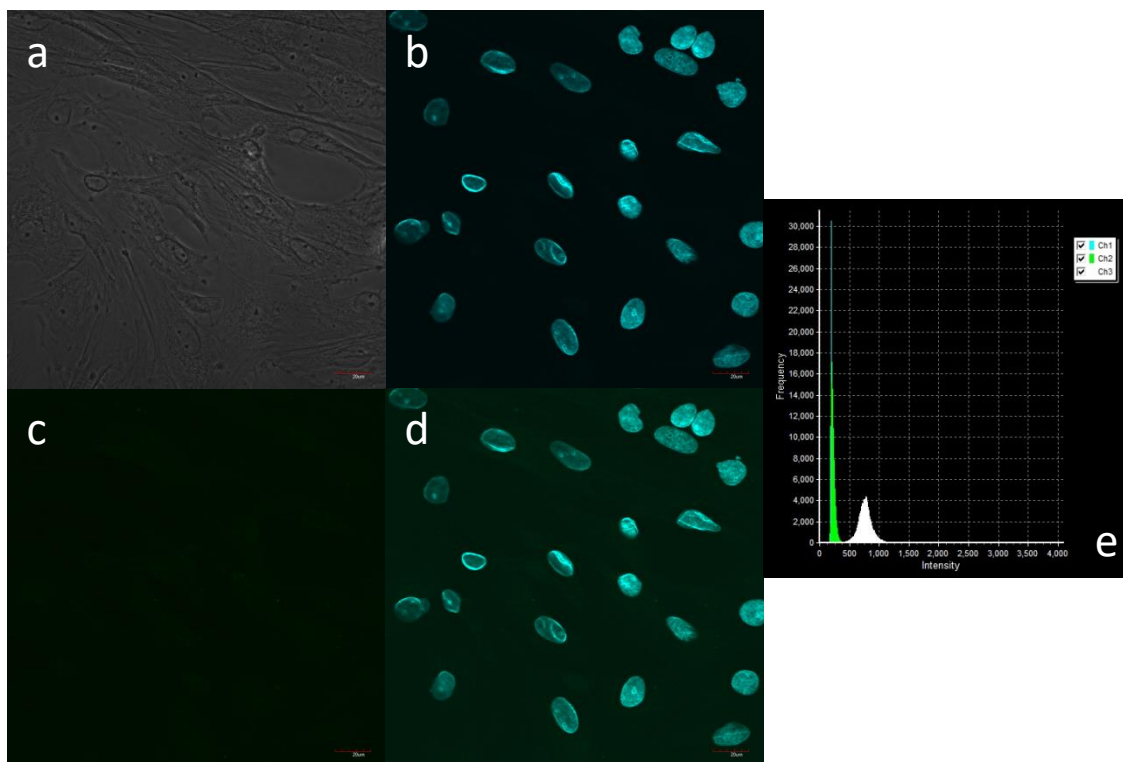
E.



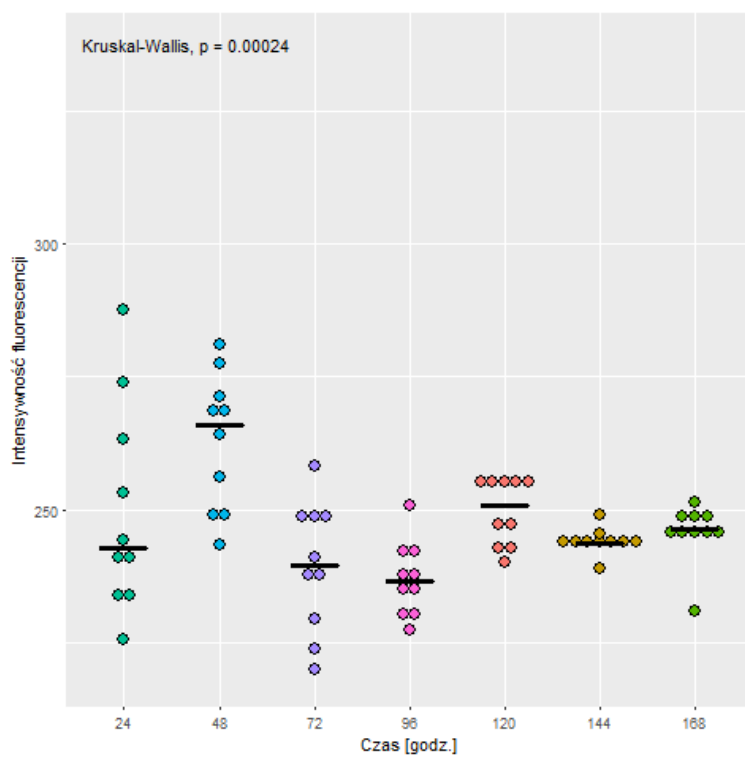
F.



G.

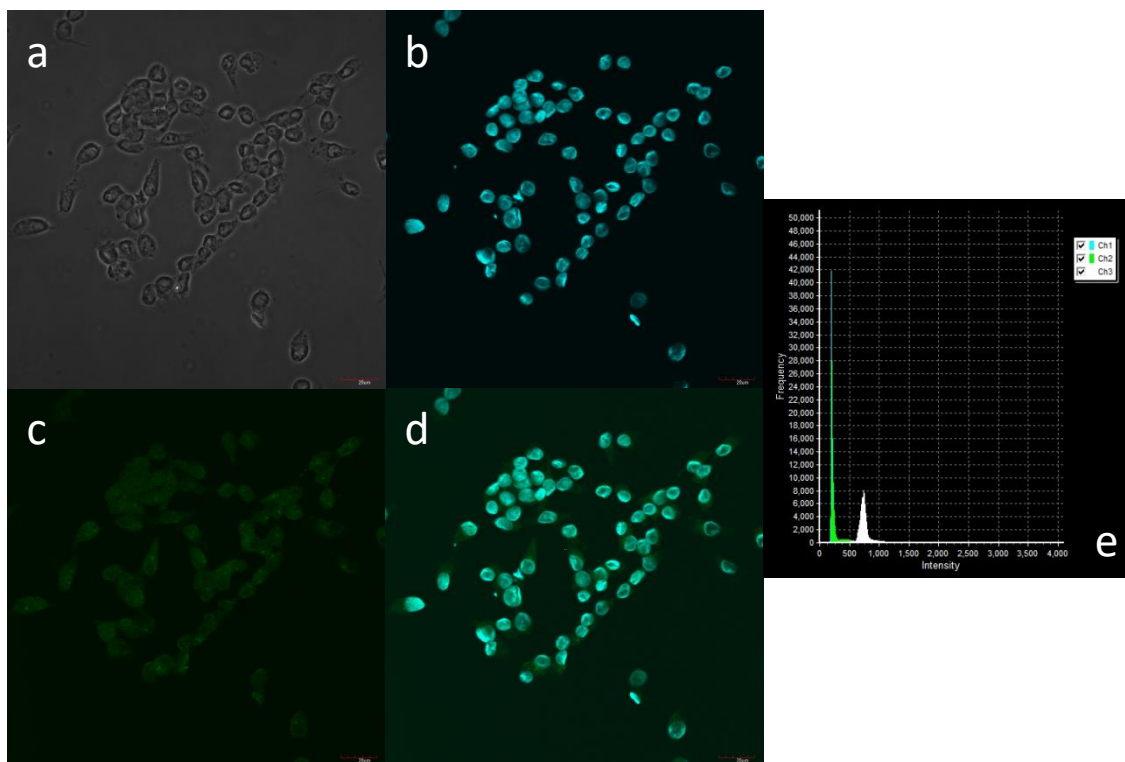


H.

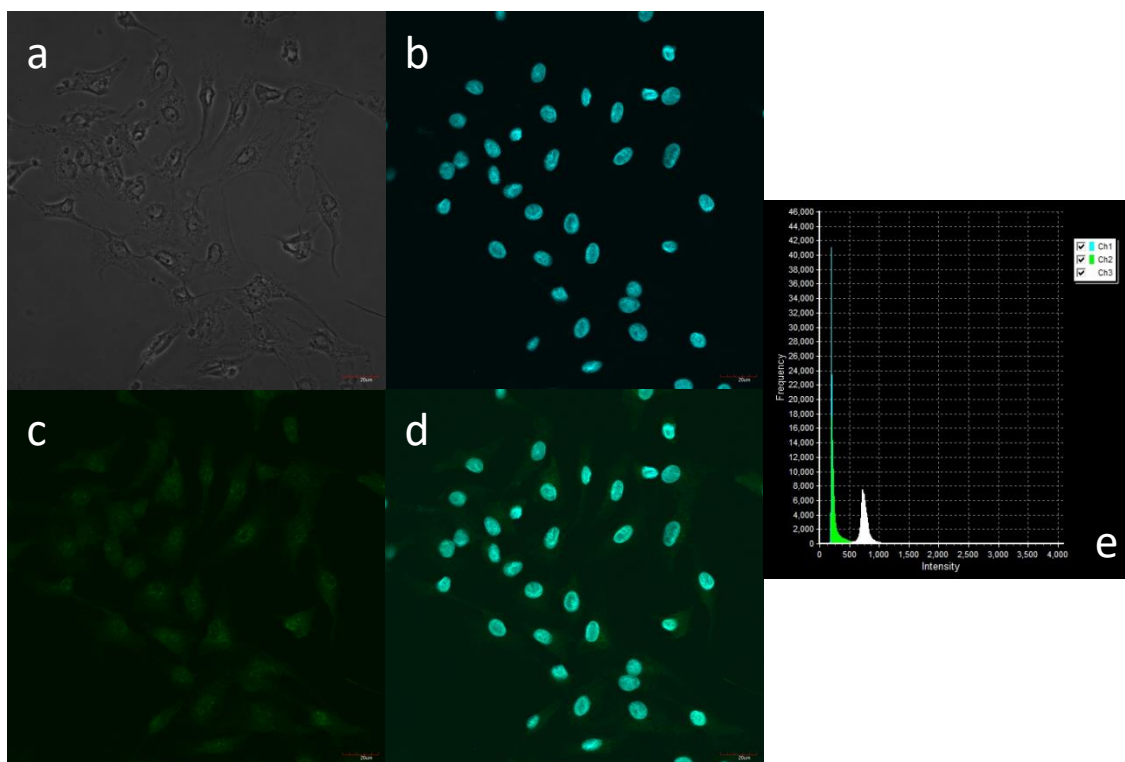


Ryc. 19. Ekspresja i lokalizacja komórkowa białka Cx40 w komórkach ziarnistych podczas 7-dniowej hodowli pierwotnej. W celu przeprowadzenia procedury barwienia immunofluorescencyjnego komórki ziarniste utrwalano po 24 godz. (A), 48 godz. (B), 72 godz. (C), 96 godz. (D), 120 godz. (E), 144 godz. (F) i 168 godz. (G) hodowli. **a.** kontrast Nomarskiego, **b.** jądra komórkowe wybarwione DAPI, **c.** komórki wybarwione przeciwciałem, **d.** nałożenie obrazów b i c, **e.** histogram przedstawiający dwa kanały fluorescencji: kanał 1 - DAPI, kanał 2 - FITC oraz kontrast fazowy. Podziałka odpowiada 20 μm . (H) Intensywność fluorescencji emitowanej przez barwione przeciwciałem anti-Cx40 komórki ziarniste w poszczególnych przedziałach czasowych krótkoterminowej hodowli pierwotnej. W każdym przedziale czasowym liczba ocenianych komórek (n) wynosiła 10. Wartości statystyczne przedstawiają porównania względem pierwszej grupy (24 godz.). Pozioma kreska wyznacza medianę. *** - $p < 0,001$; ** - $p < 0,01$.

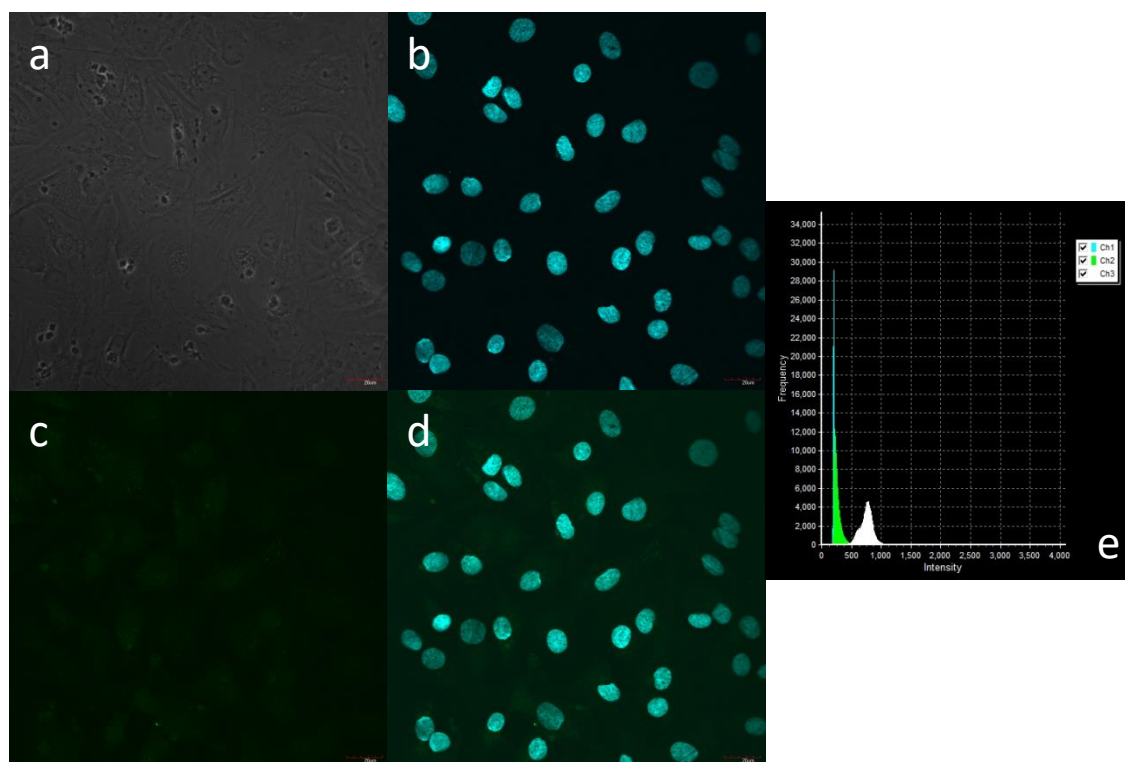
A.



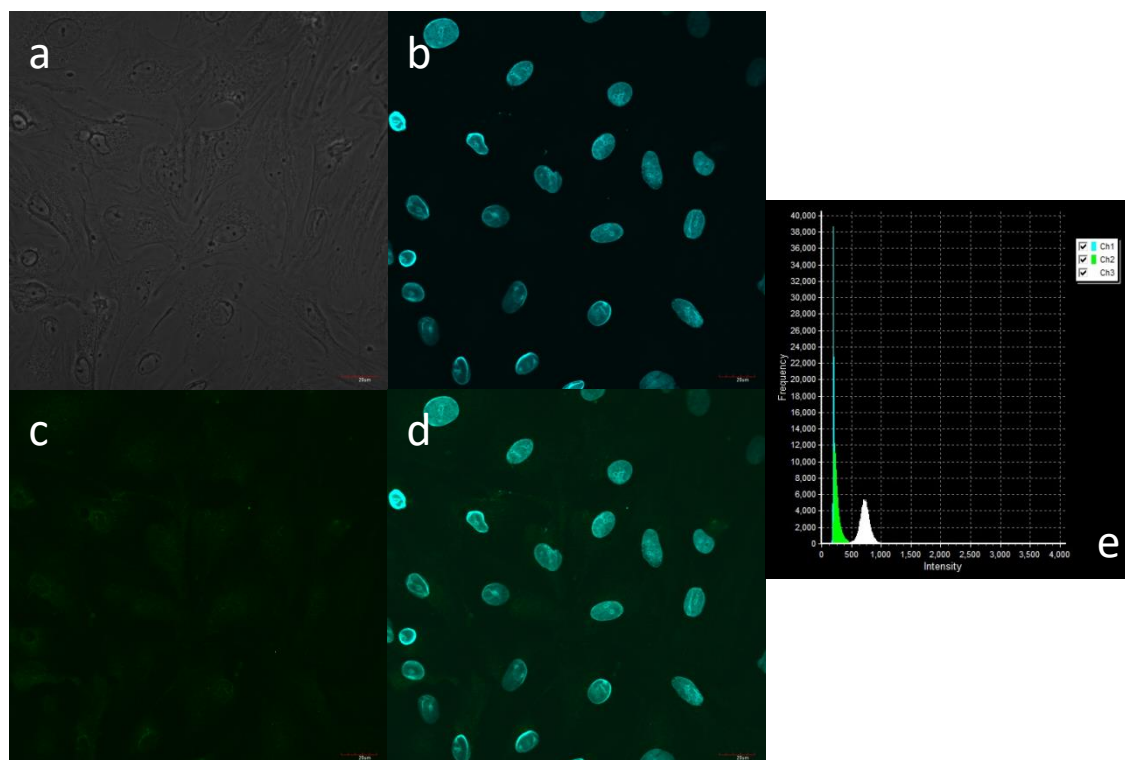
B.



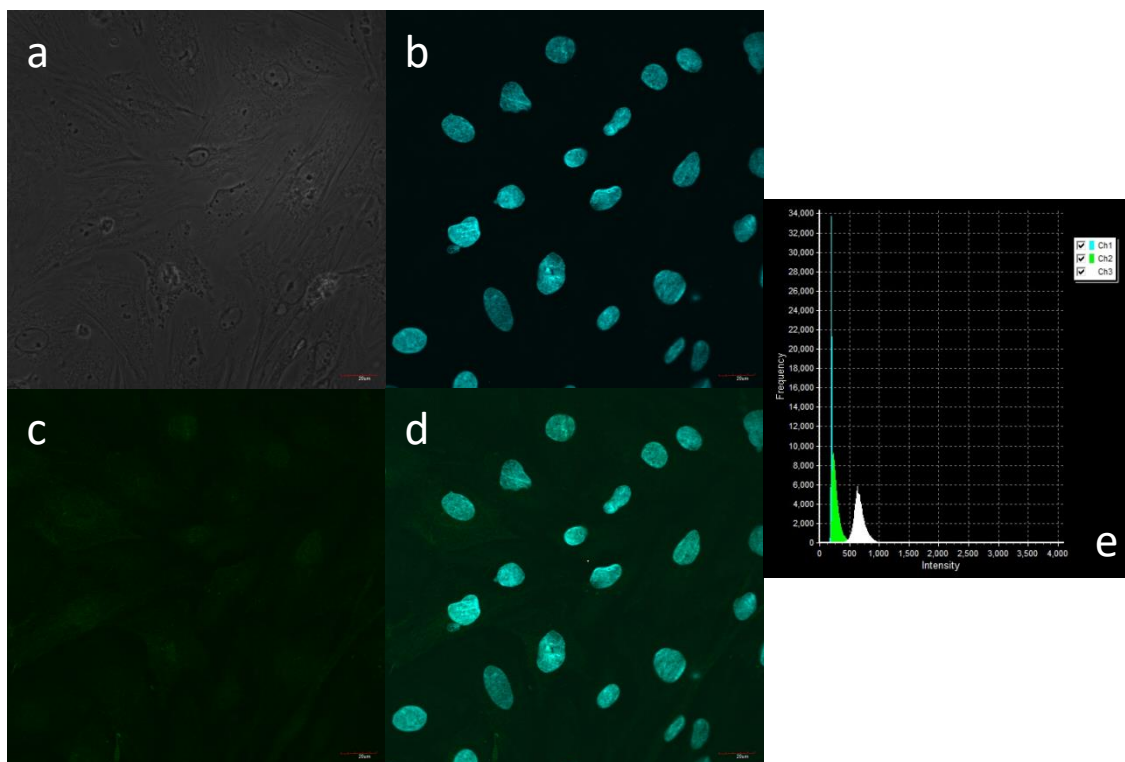
c.



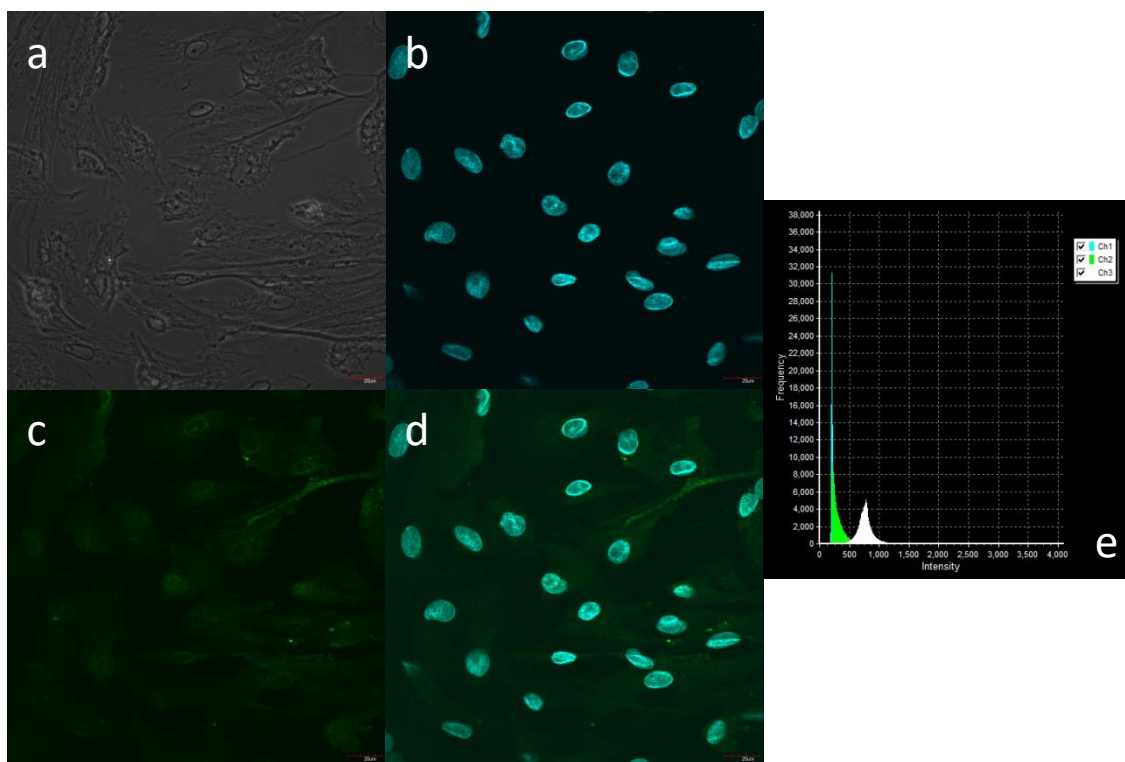
D.



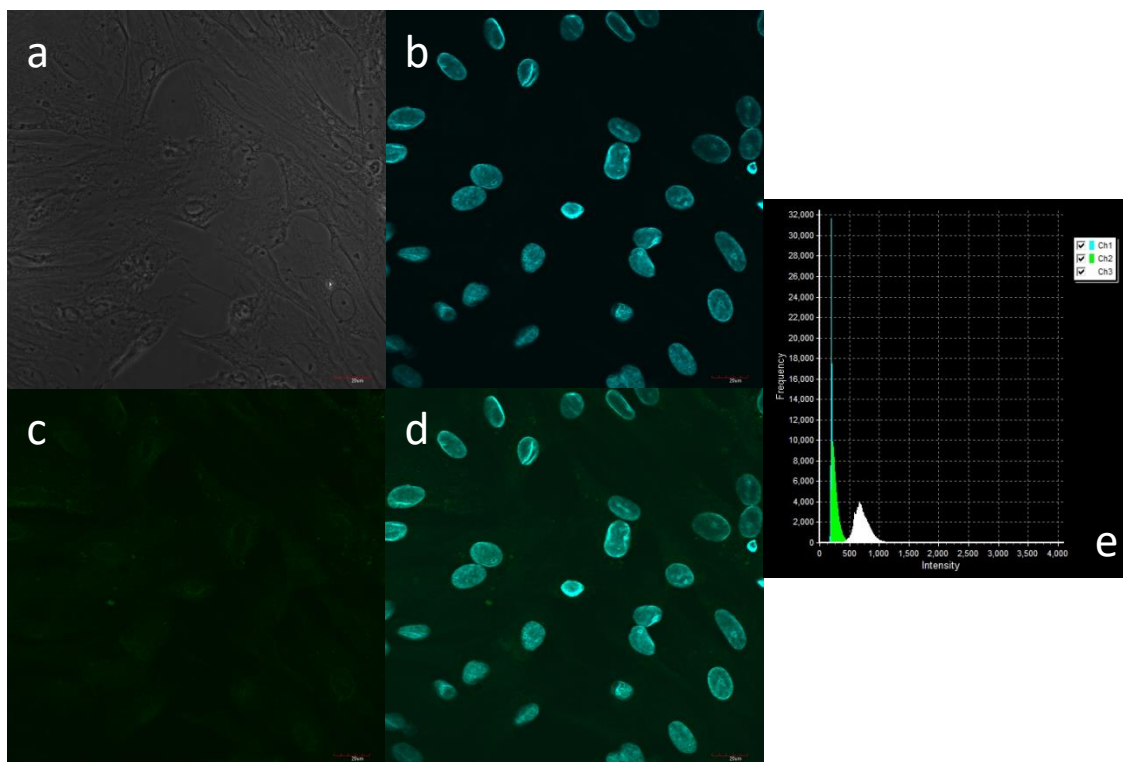
E.



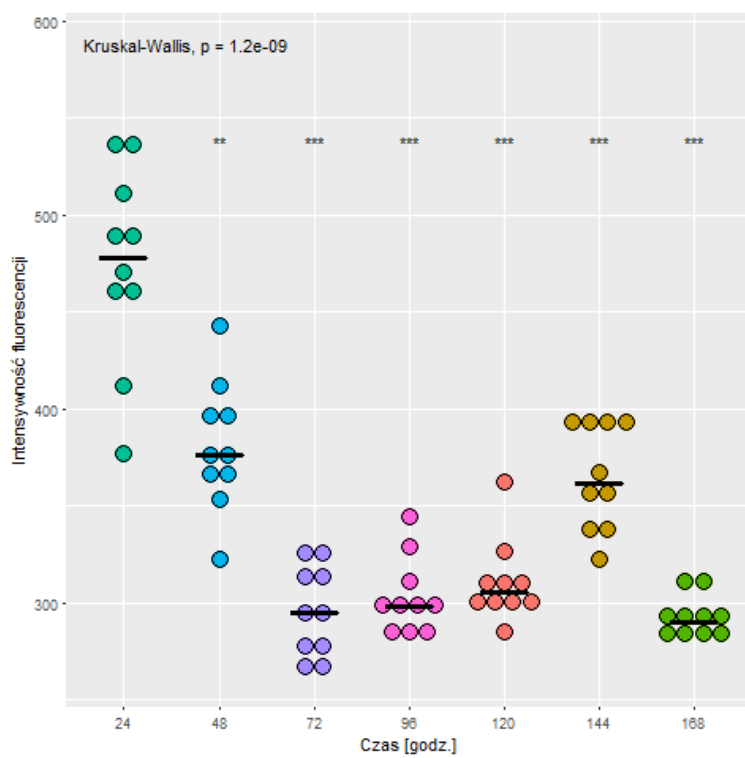
F.



G.

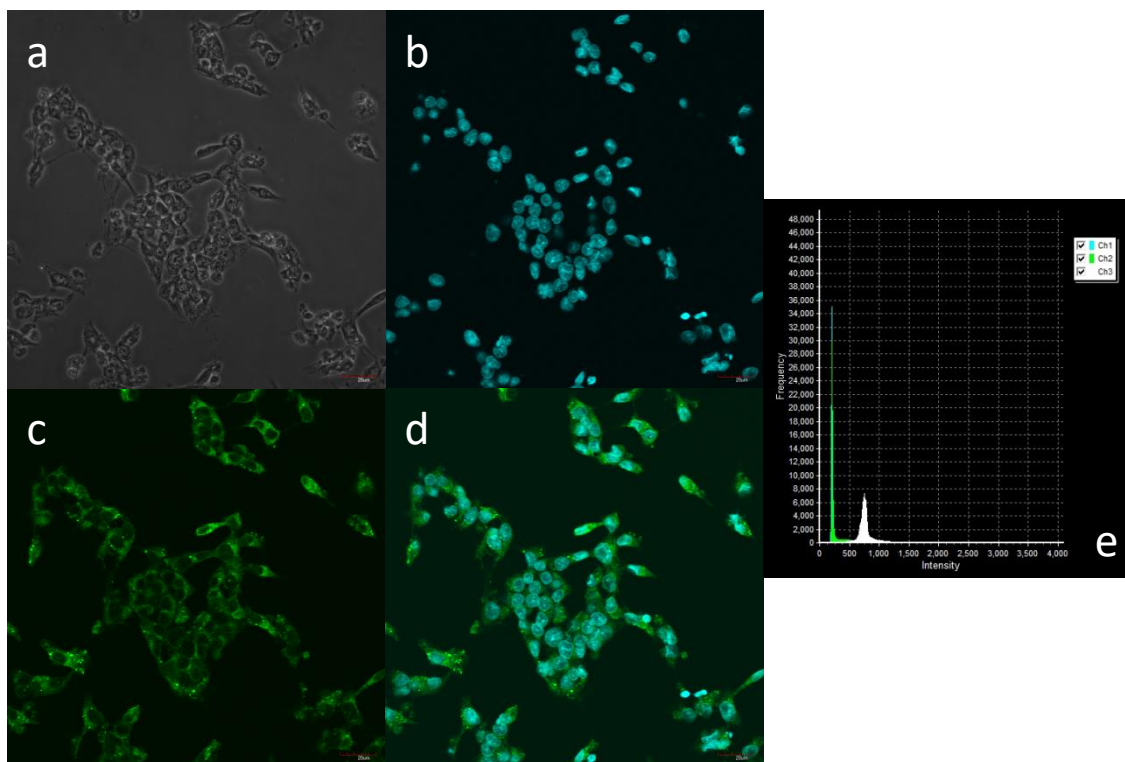


H.

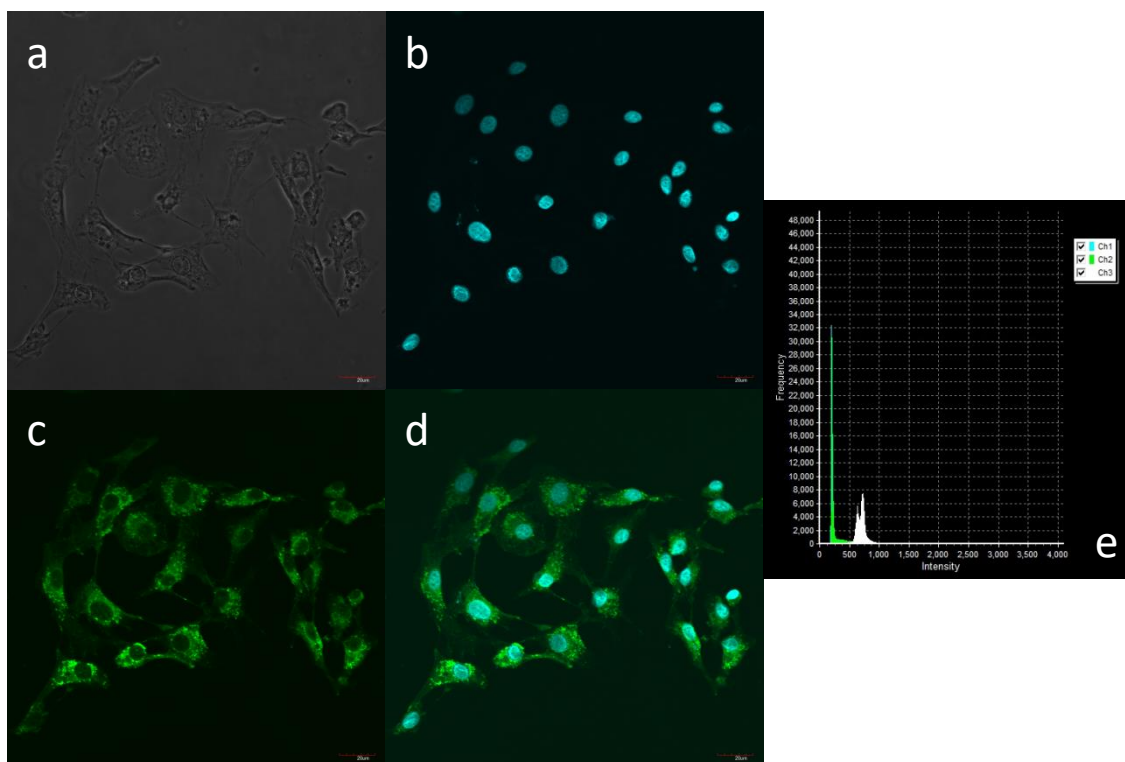


Ryc. 20. Ekspresja i lokalizacja komórkowa białka Cx43 w komórkach ziarnistych podczas 7-dniowej hodowli pierwotnej. W celu przeprowadzenia procedury barwienia immunofluorescencyjnego komórki ziarniste utrwalano po 24 godz. (A), 48 godz. (B), 72 godz. (C), 96 godz. (D), 120 godz. (E), 144 godz. (F) i 168 godz. (G) hodowli. **a.** kontrast Nomarskiego, **b.** jądra komórkowe wybarwione DAPI, **c.** komórki wybarwione przeciwciałem, **d.** nałożenie obrazów b i c, **e.** histogram przedstawiający dwa kanały fluorescencji: kanał 1 - DAPI, kanał 2 - FITC oraz kontrast fazowy. Podziałka odpowiada 20 μm . (H) Intensywność fluorescencji emitowanej przez barwione przeciwciałem anty-Cx43 komórki ziarniste w poszczególnych przedziałach czasowych krótkoterminowej hodowli pierwotnej. W każdym przedziale czasowym liczba ocenianych komórek (n) wynosiła 10. Wartości statystyczne przedstawiają porównania względem pierwszej grupy (24 godz.). Pozioma kreska wyznacza medianę. *** - $p < 0,001$; ** - $p < 0,01$.

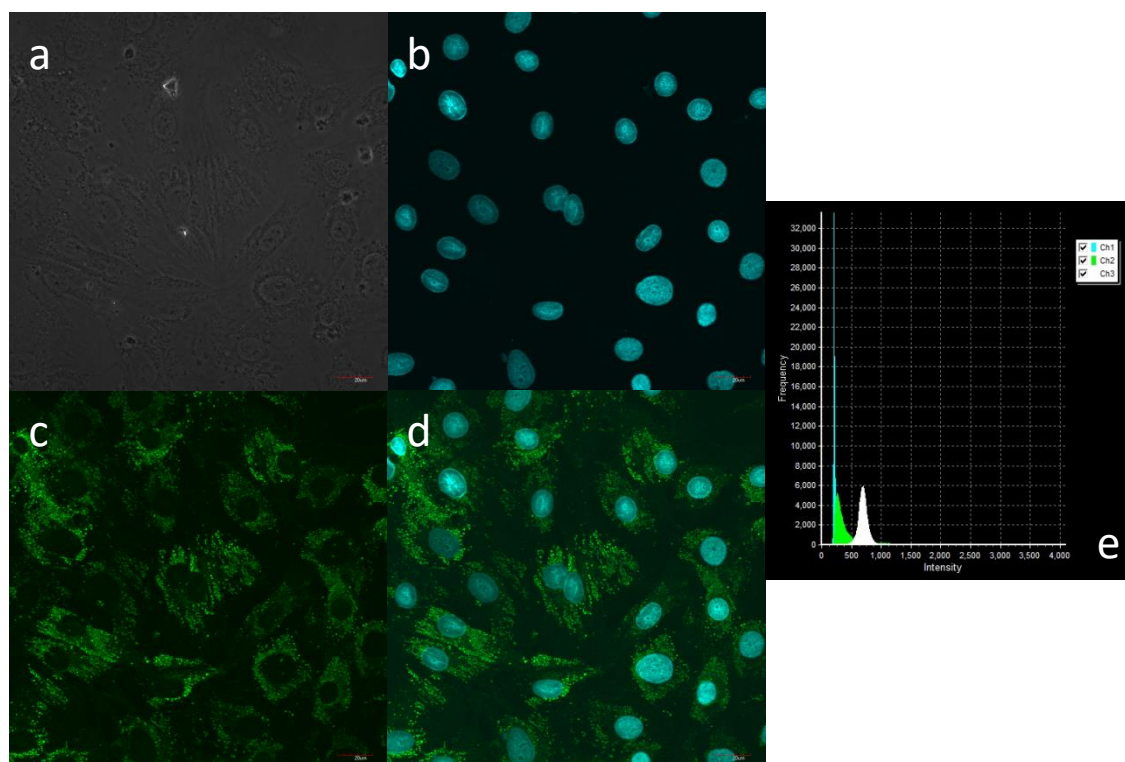
A.



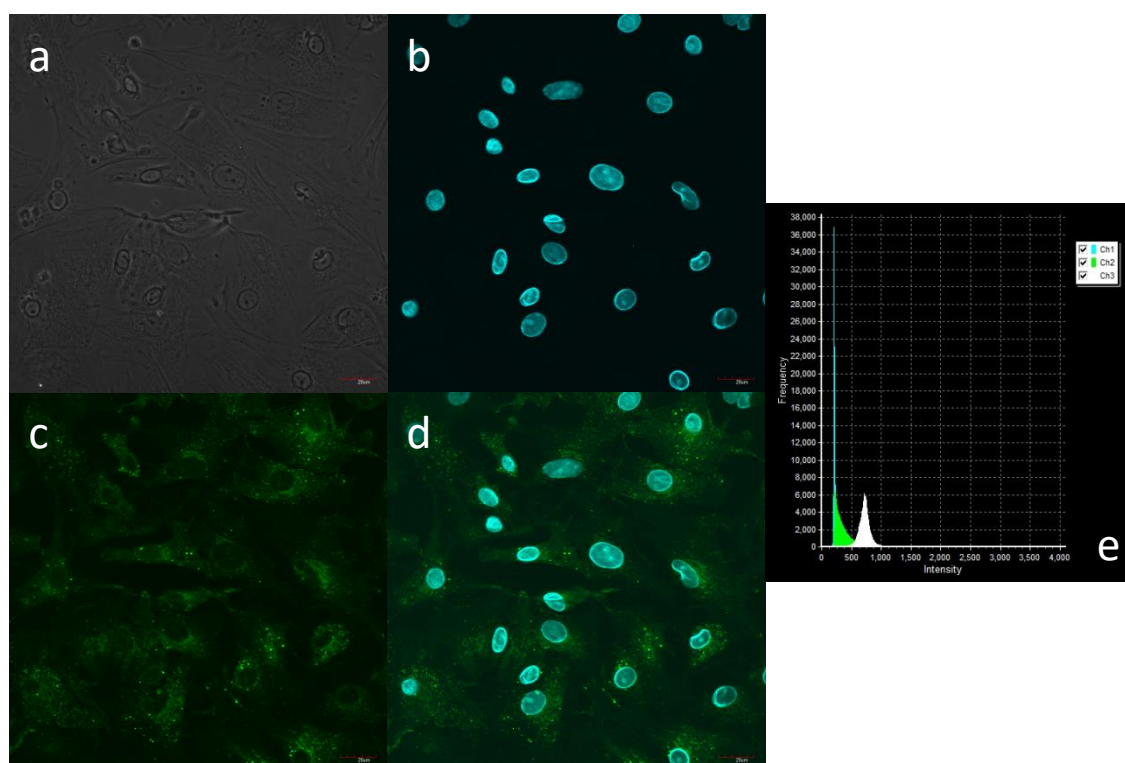
B.



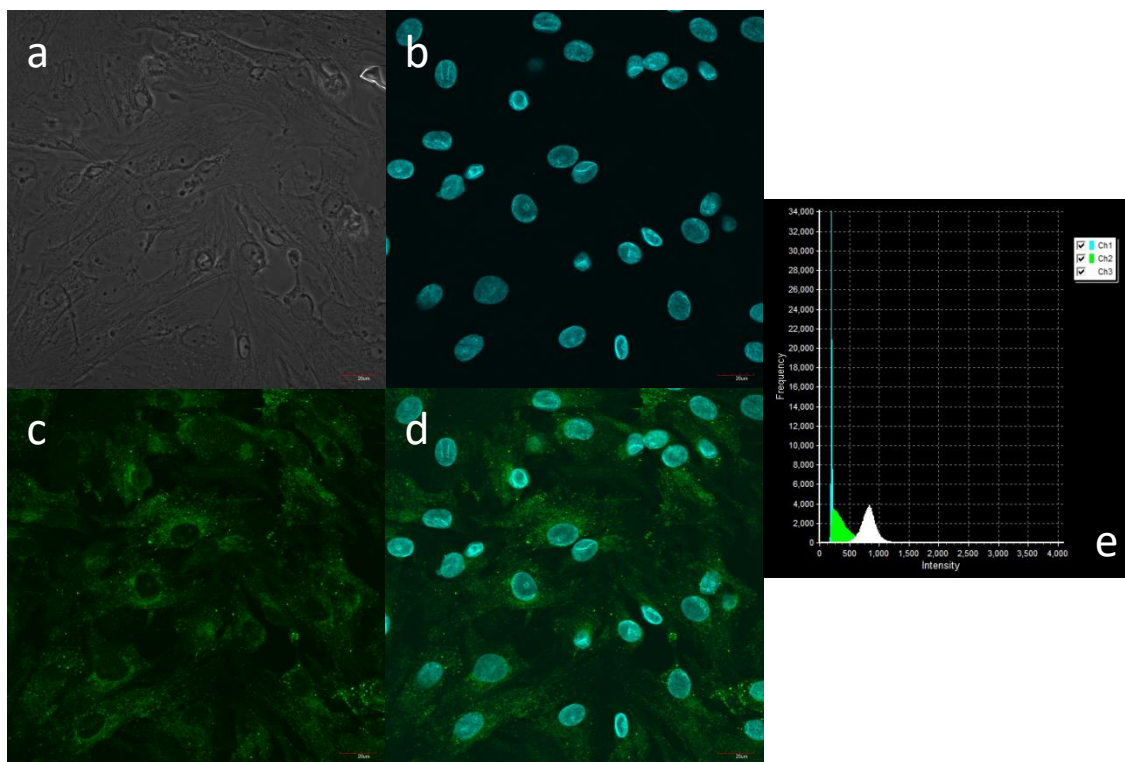
c.



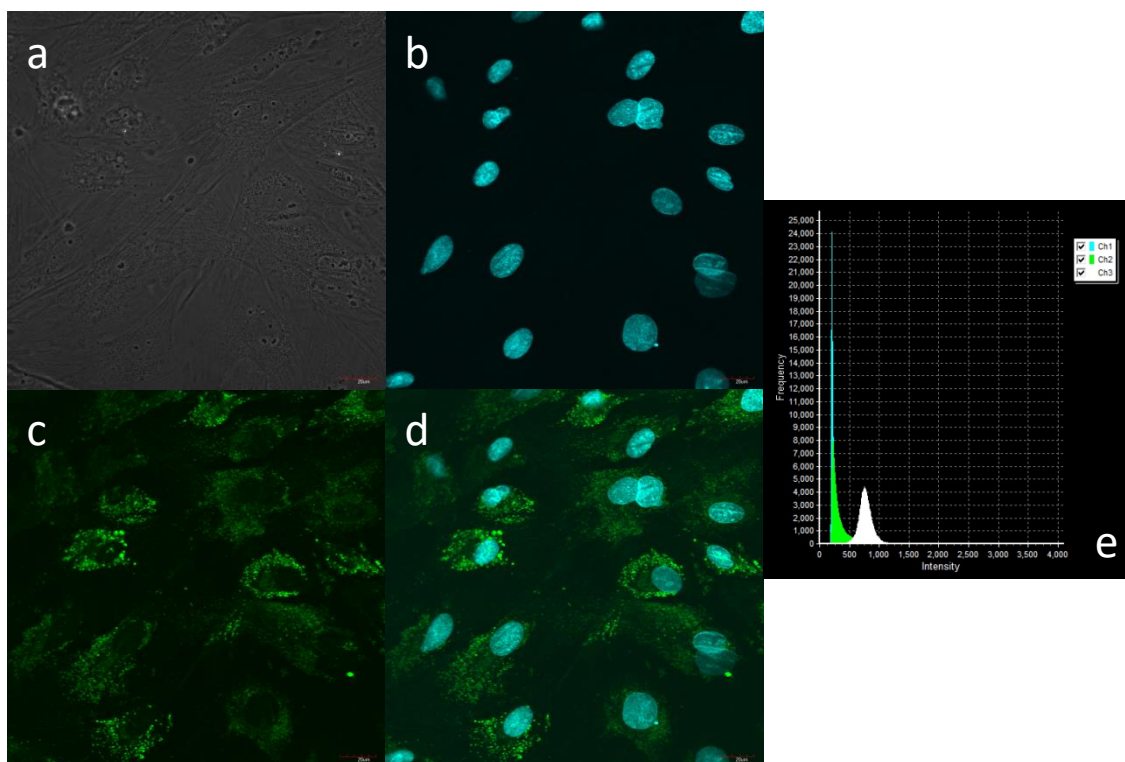
D.



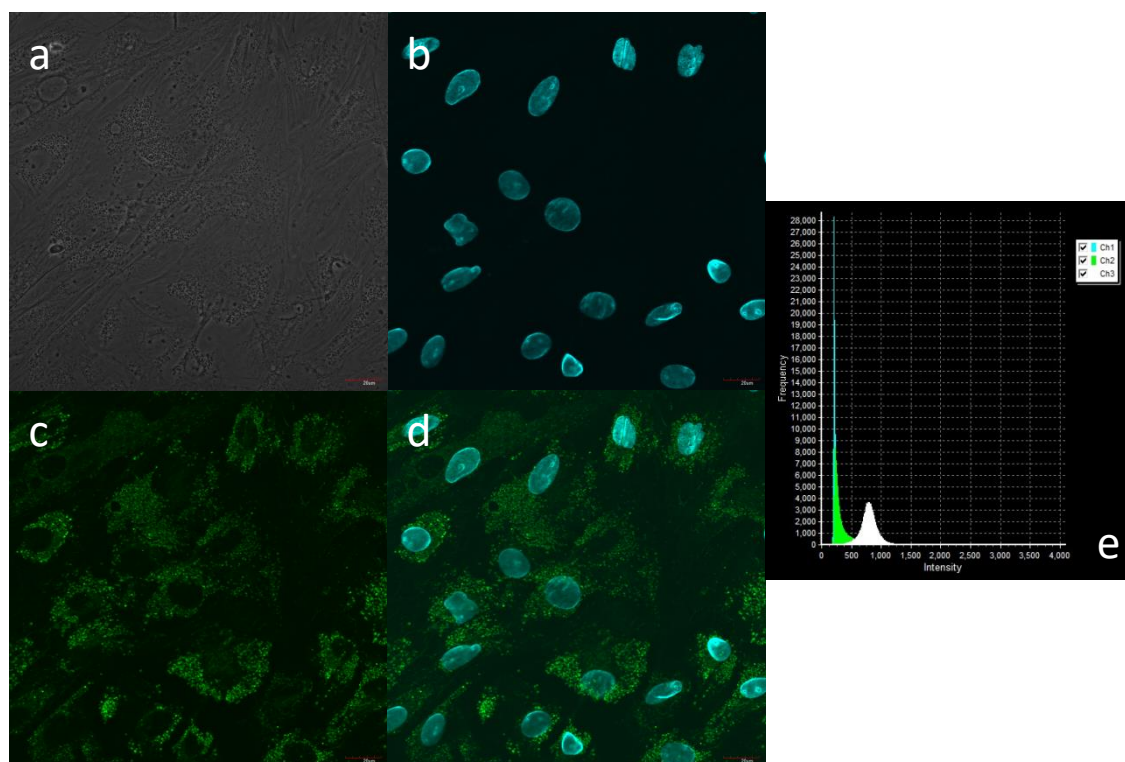
E.



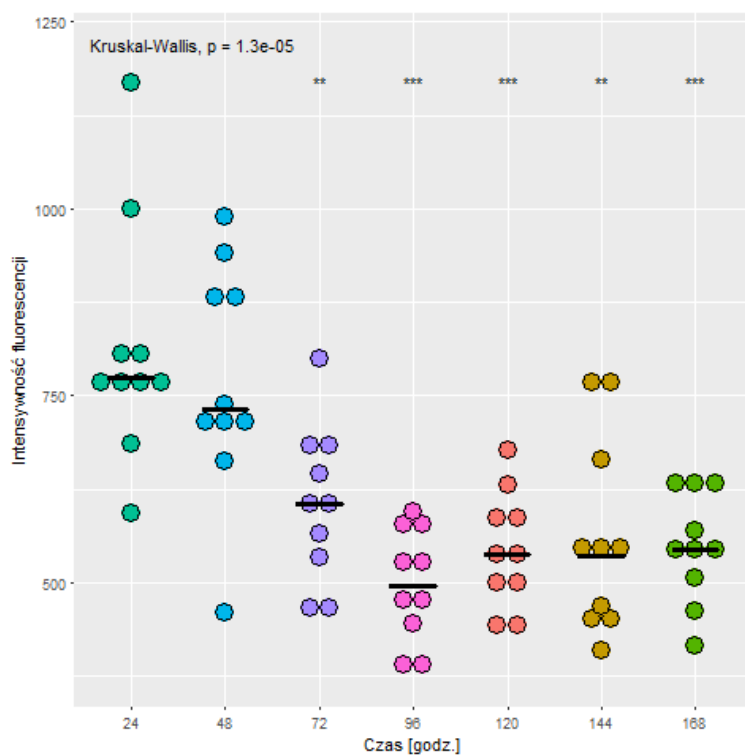
F.



G.

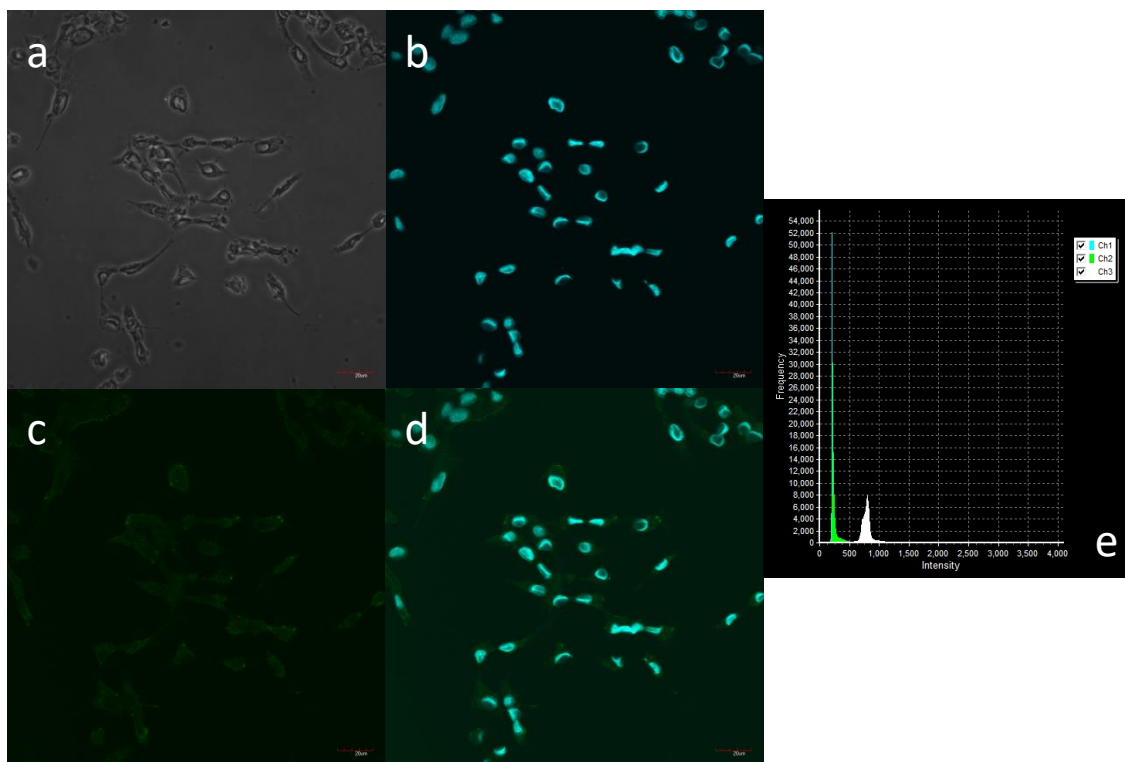


H.

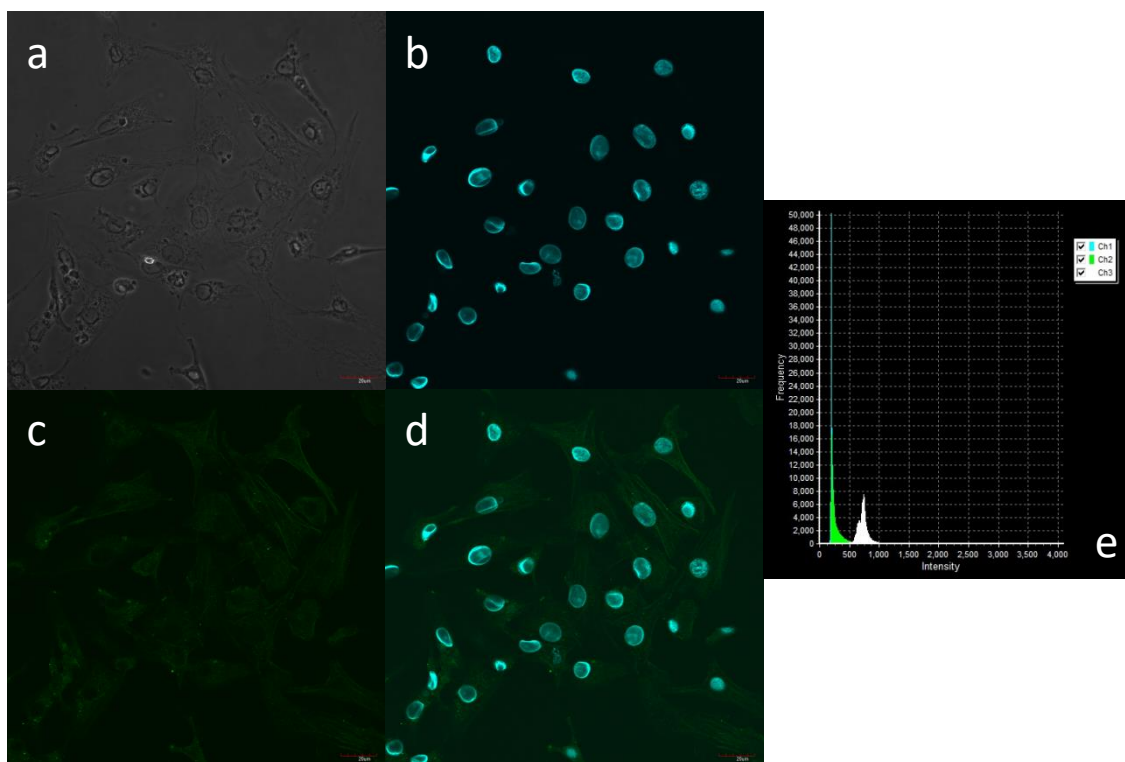


Ryc. 21. Ekspresja i lokalizacja komórkowa białka Cx45 w komórkach ziarnistych podczas 7-dniowej hodowli pierwotnej. W celu przeprowadzenia procedury barwienia immunofluorescencyjnego komórki ziarniste utrwalano po 24 godz. (A), 48 godz. (B), 72 godz. (C), 96 godz. (D), 120 godz. (E), 144 godz. (F) i 168 godz. (G) hodowli. **a.** kontrast Nomarskiego, **b.** jądra komórkowe wybarwione DAPI, **c.** komórki wybarwione przeciwciałem, **d.** nałożenie obrazów b i c, **e.** histogram przedstawiający dwa kanały fluorescencji: kanał 1 - DAPI, kanał 2 - FITC oraz kontrast fazowy. Podziałka odpowiada 20 μm . (H) Intensywność fluorescencji emitowanej przez barwione przeciwciałem anty-Cx45 komórki ziarniste w poszczególnych przedziałach czasowych krótkoterminowej hodowli pierwotnej. W każdym przedziale czasowym liczba ocenianych komórek (n) wynosiła 10. Wartości statystyczne przedstawiają porównania względem pierwszej grupy (24 godz.). Pozioma kreska wyznacza medianę. *** - $p < 0,001$.

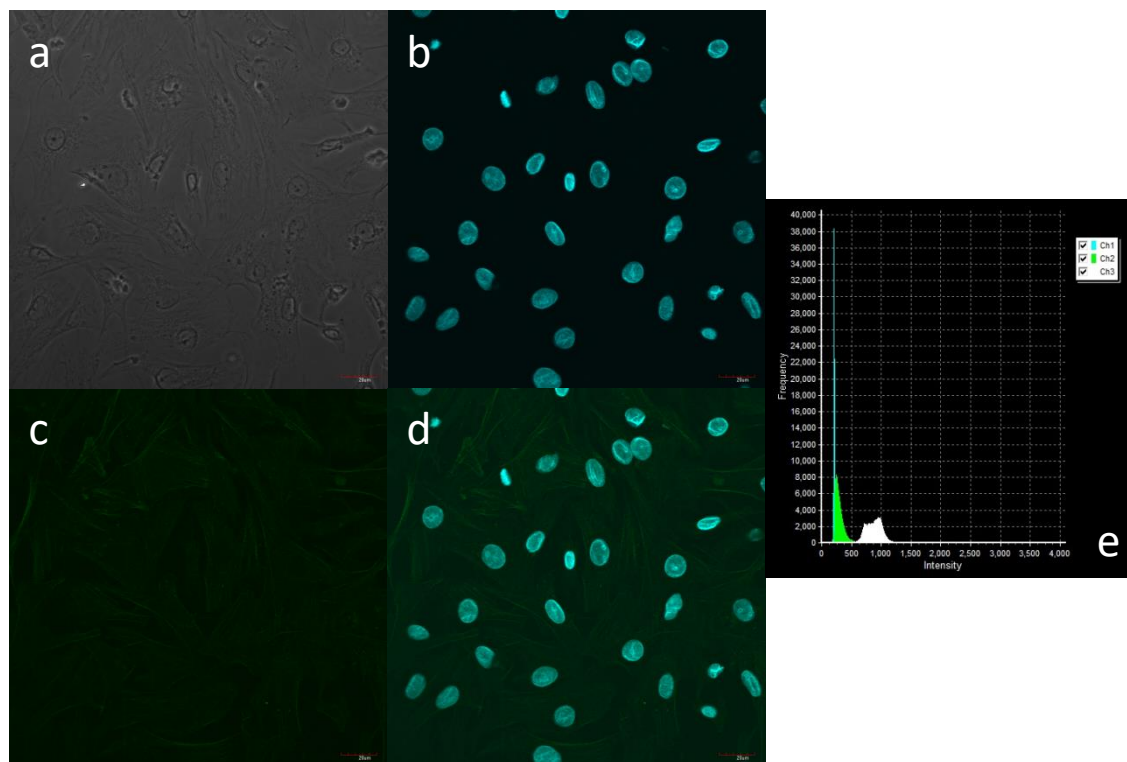
A.



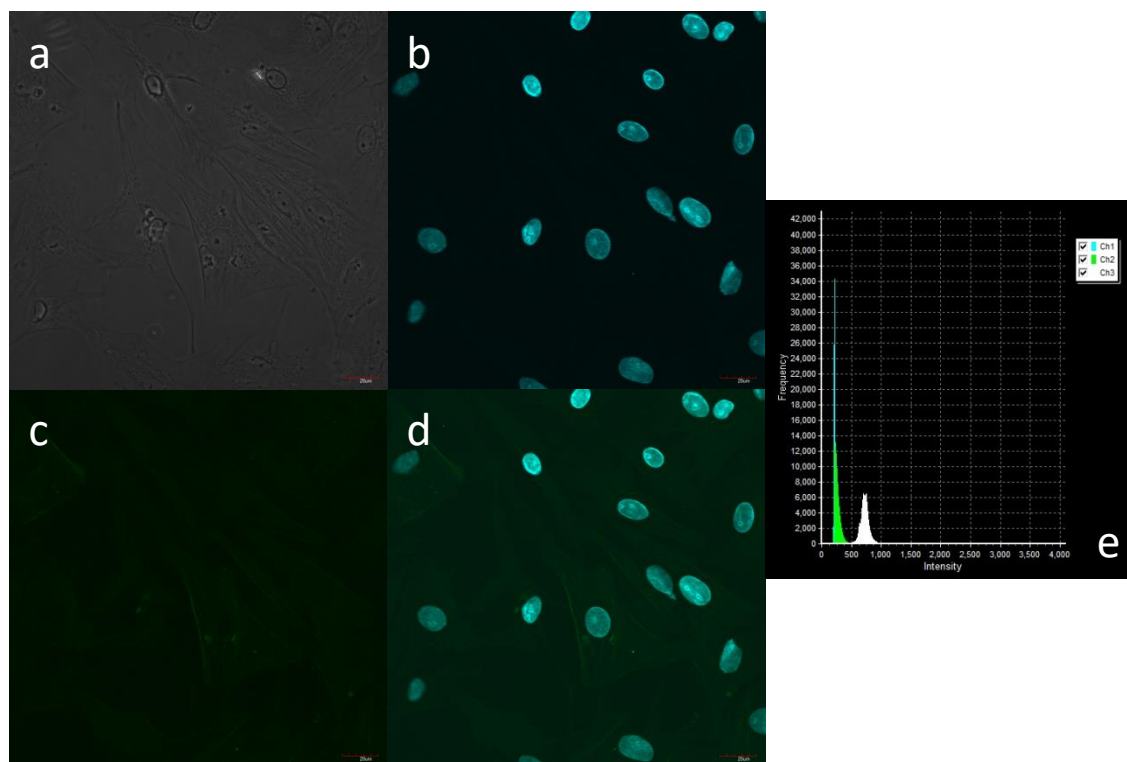
B.



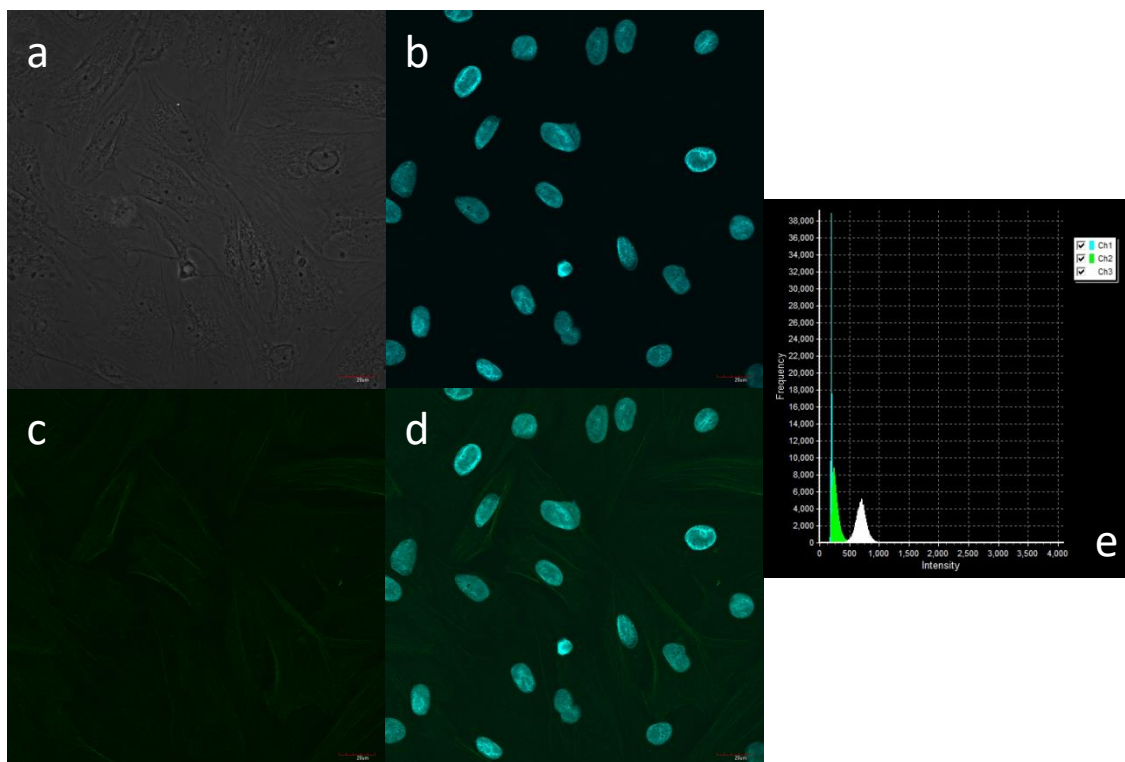
c.



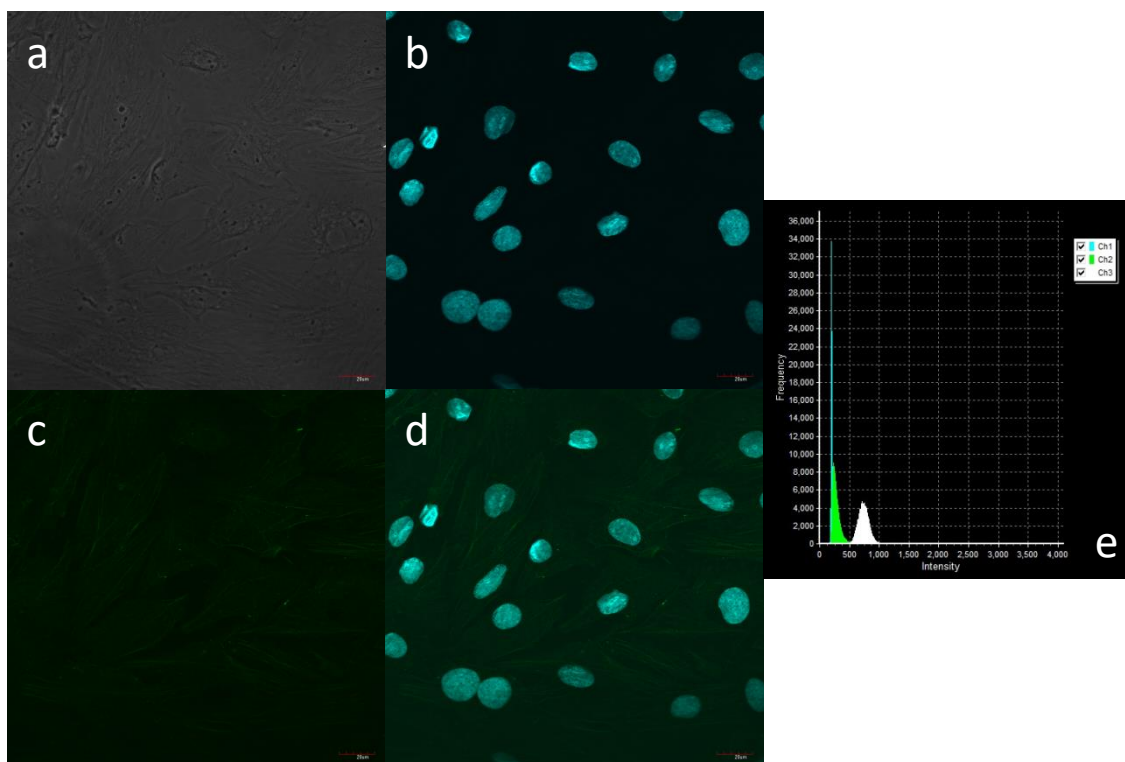
D.



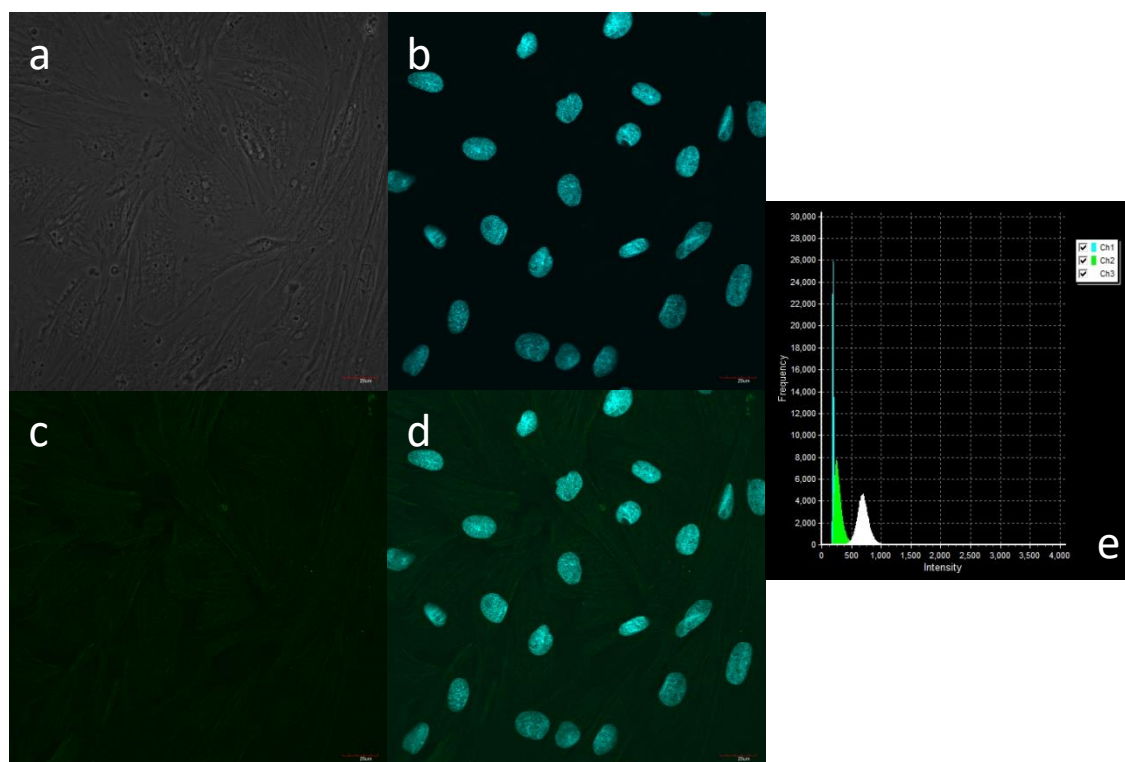
E.



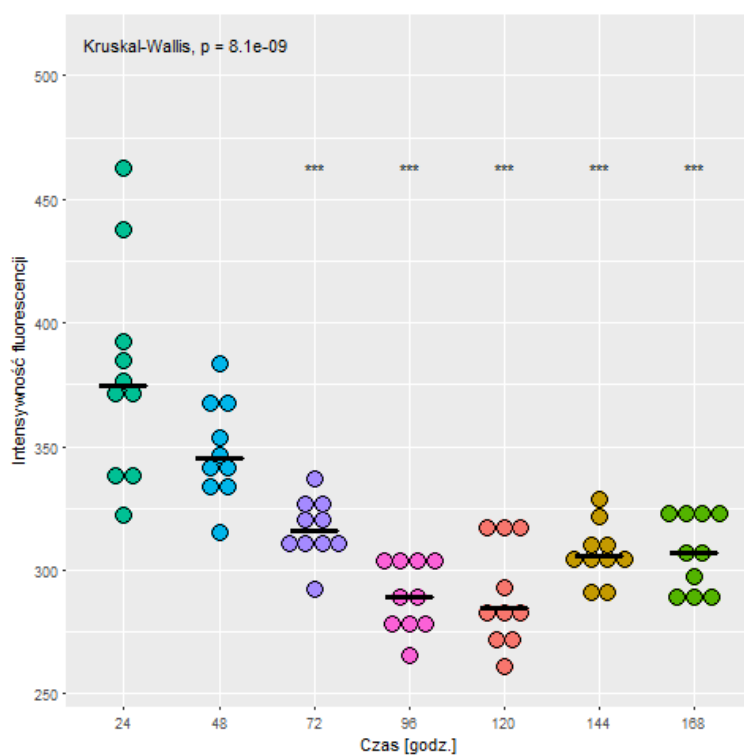
F.



G.



H.



4.7. Jakościowa analiza ekspresji Lhr, Fshr i Cyp19 na poziomie białka

Ekspresja Lhr osiągnęła najwyższy poziom w 48 godzinie hodowli *in vitro* ($p < 0,05$). W kolejnych pięciu przedziałach czasowych hodowli obserwowano spadek ekspresji Lhr, jednak tylko w 120 godzinie osiągnął on istotność statystyczną ($p < 0,05$) (ryc. 22). Najwyższy poziom ekspresji Fshr wykazano w 24 godzinie hodowli *in vitro*. We wszystkich pozostałych przedziałach czasowych hodowli obserwowano spadek ekspresji Fshr ($p < 0,001$) (ryc. 23). Ekspresja Cyp19 była najwyższa w 24 i 48 godzinie hodowli *in vitro*. Począwszy od 72 godziny hodowli obserwowano statystycznie istotny spadek ekspresji Cyp19 ($p < 0,001$) (ryc. 24).

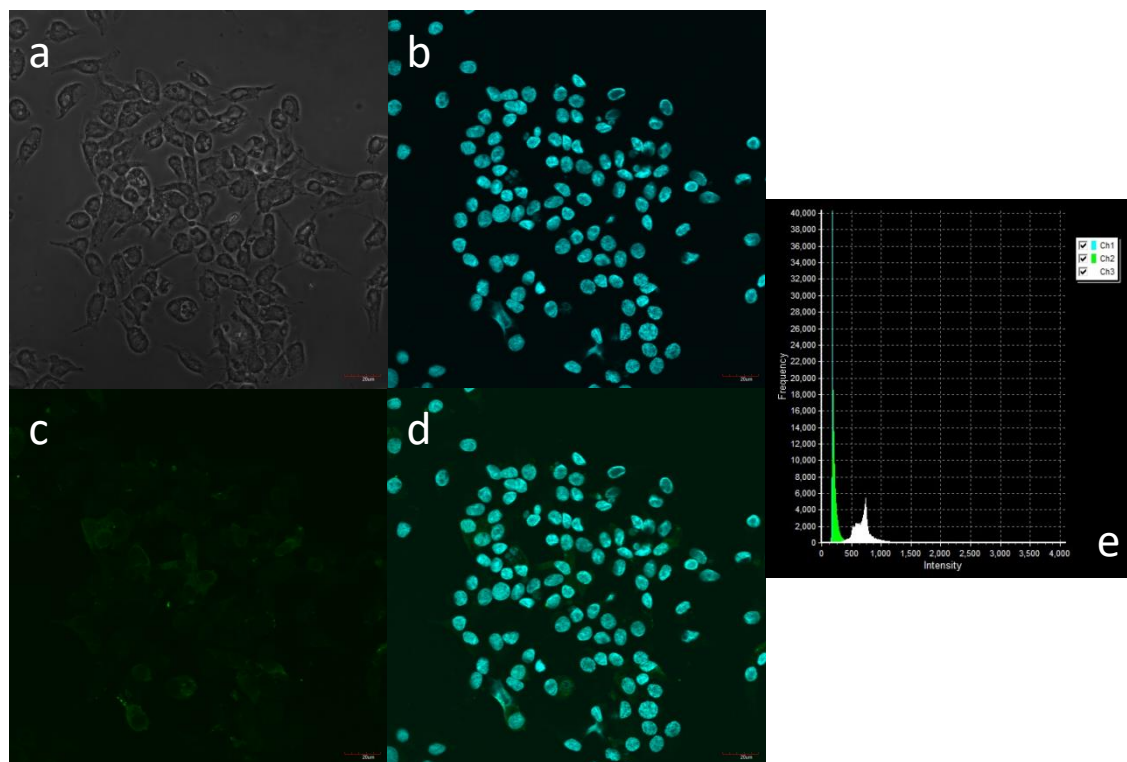
We wszystkich analizowanych przedziałach czasowych hodowli badane białka (Lhr, Fshr i Cyp19) wykazywały lokalizację błonową oraz cytoplazmatyczną (tab. 9).

Tab. 9. Komórkowa lokalizacja białka Lhr, Fshr i Cyp19.

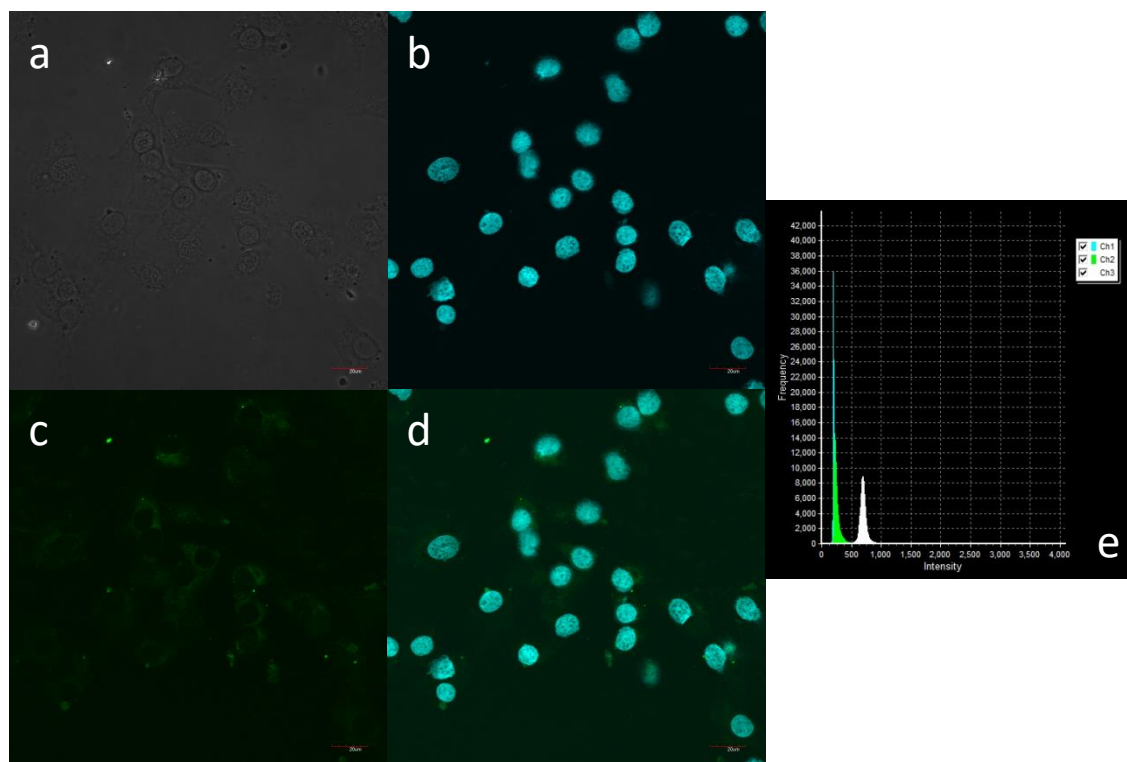
Lokalizacja Białko	Błonowa	Cytoplazmatyczna	Jądrowa
Lhr	+	+	-
Fshr	+	+	-
Cyp19	+	+	-

Ryc. 22. Ekspresja i lokalizacja komórkowa białka Lhr w komórkach ziarnistych podczas 7-dniowej hodowli pierwotnej. W celu przeprowadzenia procedury barwienia immunofluorescencyjnego komórki ziarniste utrwalano po 24 godz. (A), 48 godz. (B), 72 godz. (C), 96 godz. (D), 120 godz. (E), 144 godz. (F) i 168 godz. (G) hodowli. **a.** kontrast Nomarskiego, **b.** jądra komórkowe wybarwione DAPI, **c.** komórki wybarwione przeciwciałem, **d.** nałożenie obrazów b i c, **e.** histogram przedstawiający dwa kanały fluorescencji: kanał 1 - DAPI, kanał 2 - FITC oraz kontrast fazowy. Podziałka odpowiada 20 μm . (H) Intensywność fluorescencji emitowanej przez barwione przeciwciałem anty-Lhr komórki ziarniste w poszczególnych przedziałach czasowych krótkoterminowej hodowli pierwotnej. W każdym przedziale czasowym liczba ocenianych komórek (n) wynosiła 10. Wartości statystyczne przedstawiają porównania względem pierwszej grupy (24 godz.). Pozioma kreska wyznacza medianę. * - $p < 0,05$.

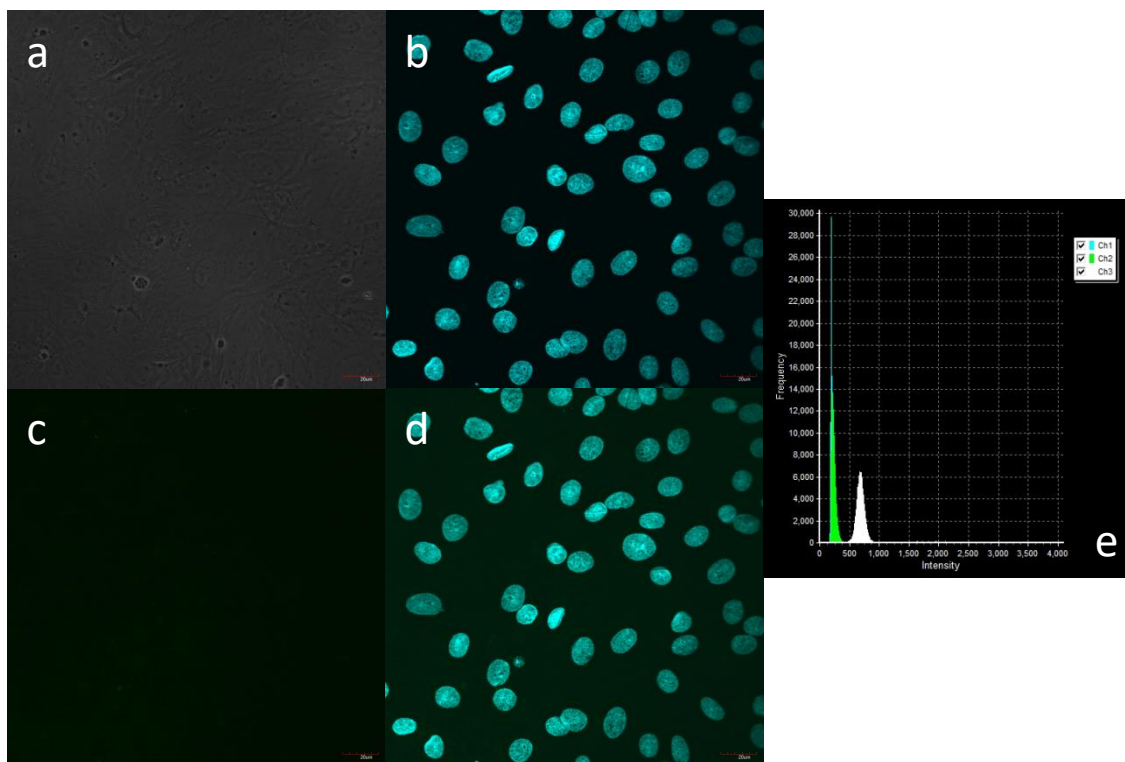
A.



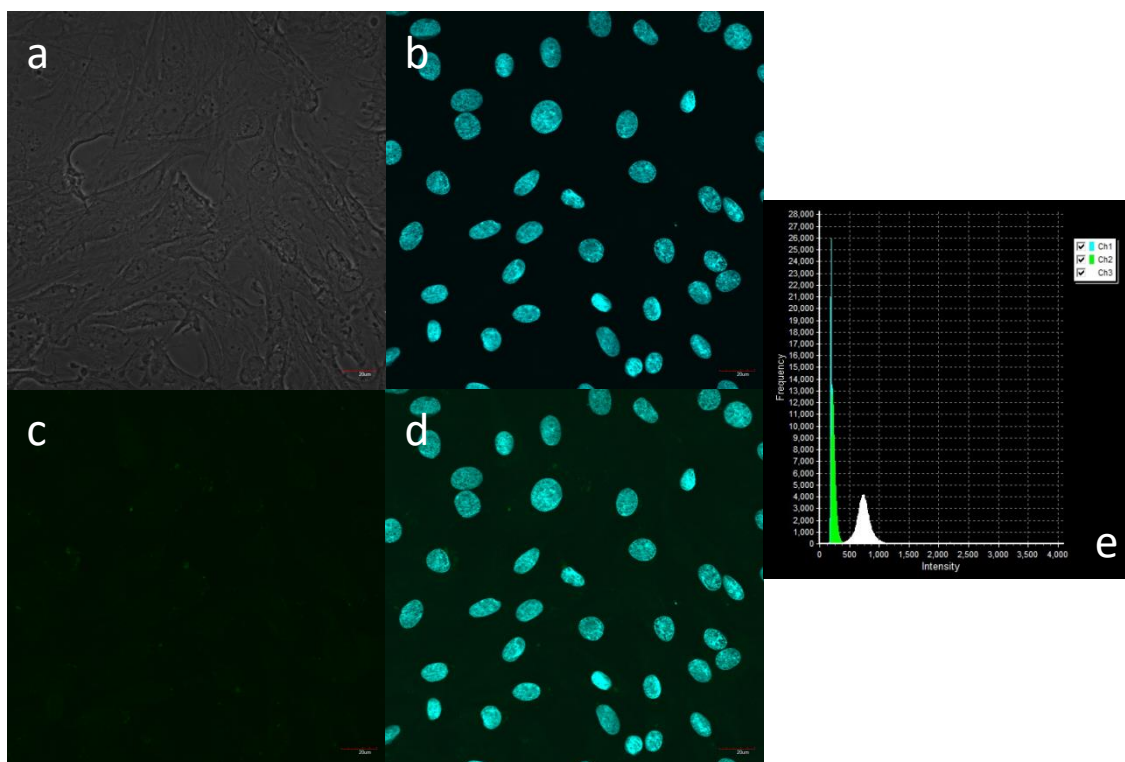
B.



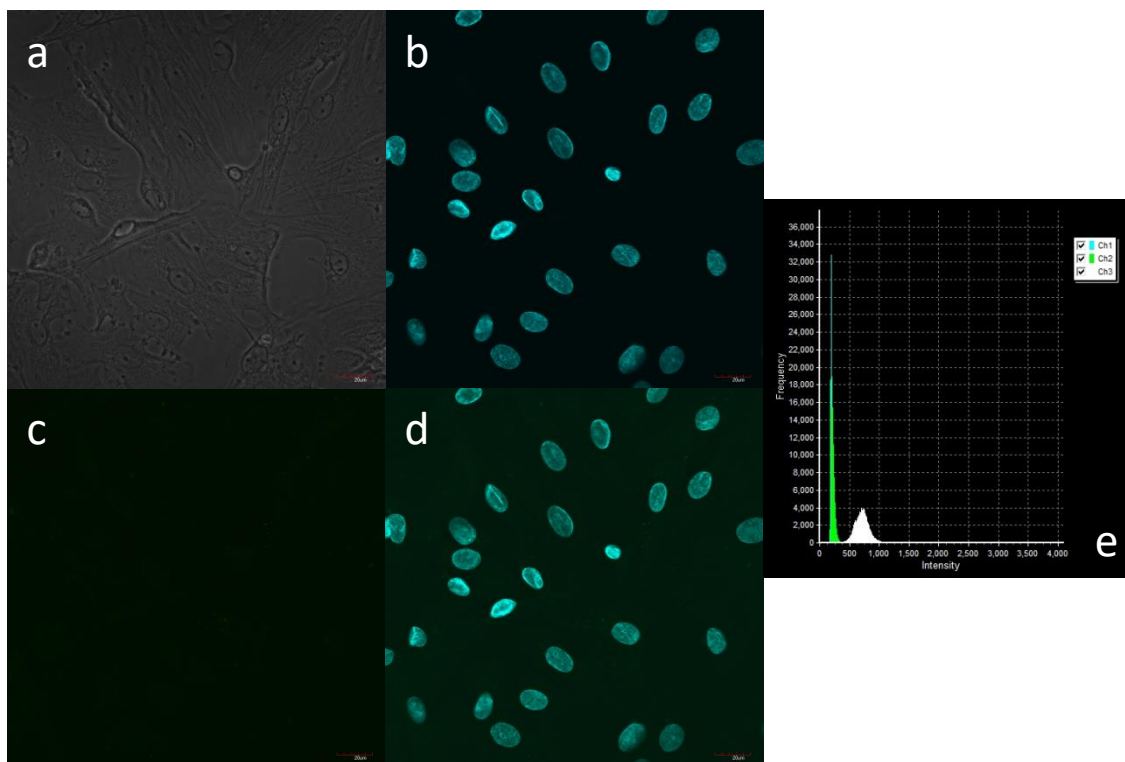
c.



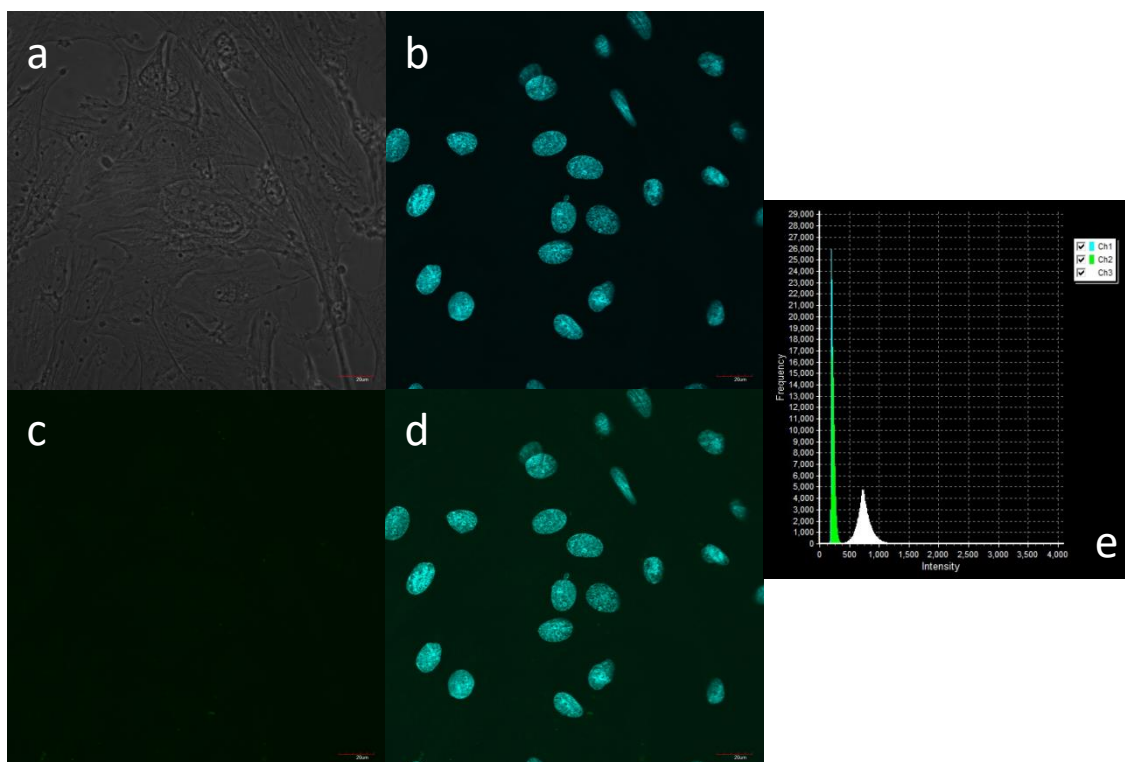
D.



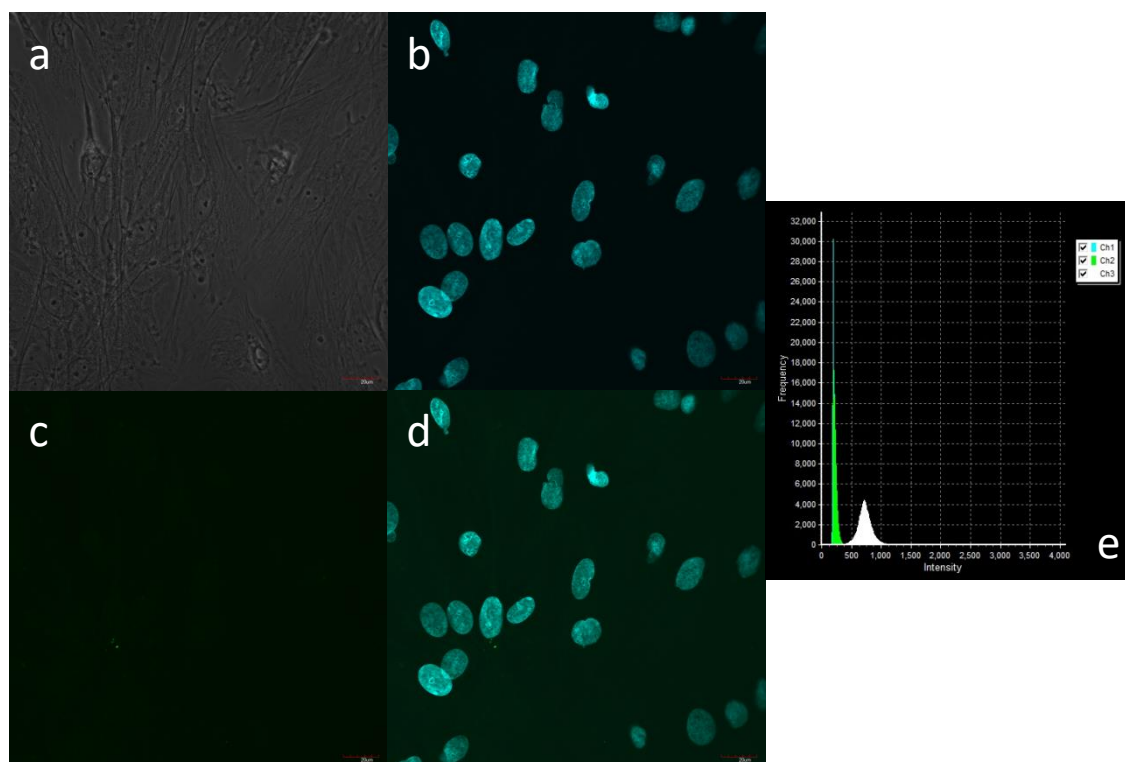
E.



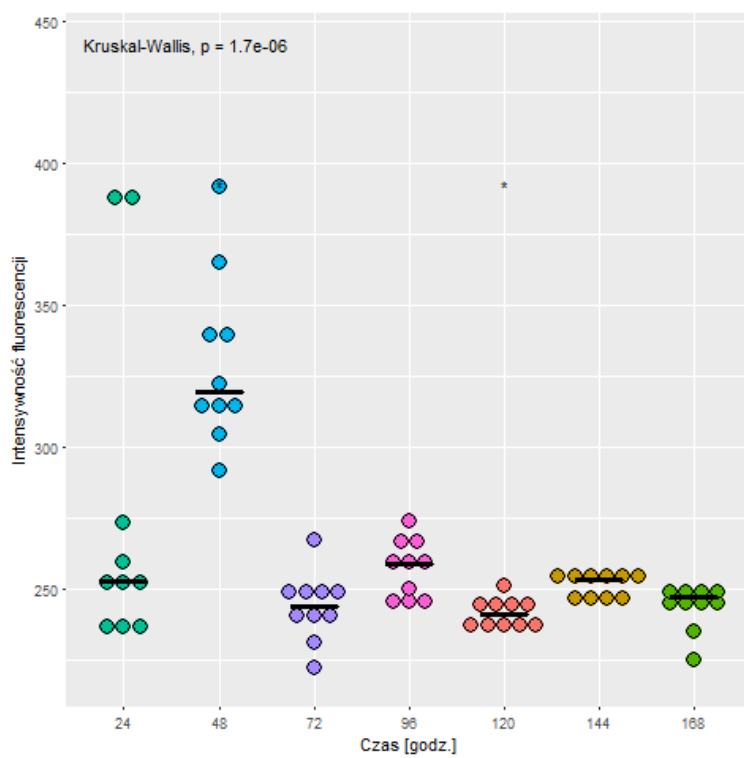
F.



G.

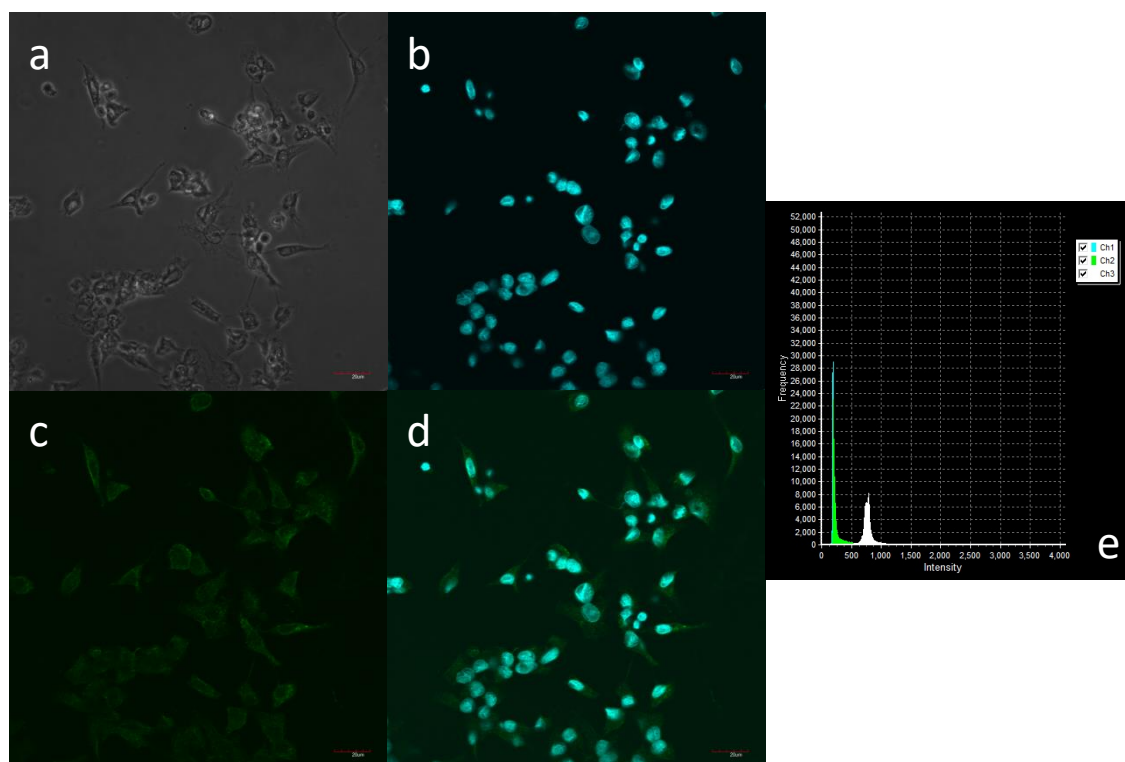


H.

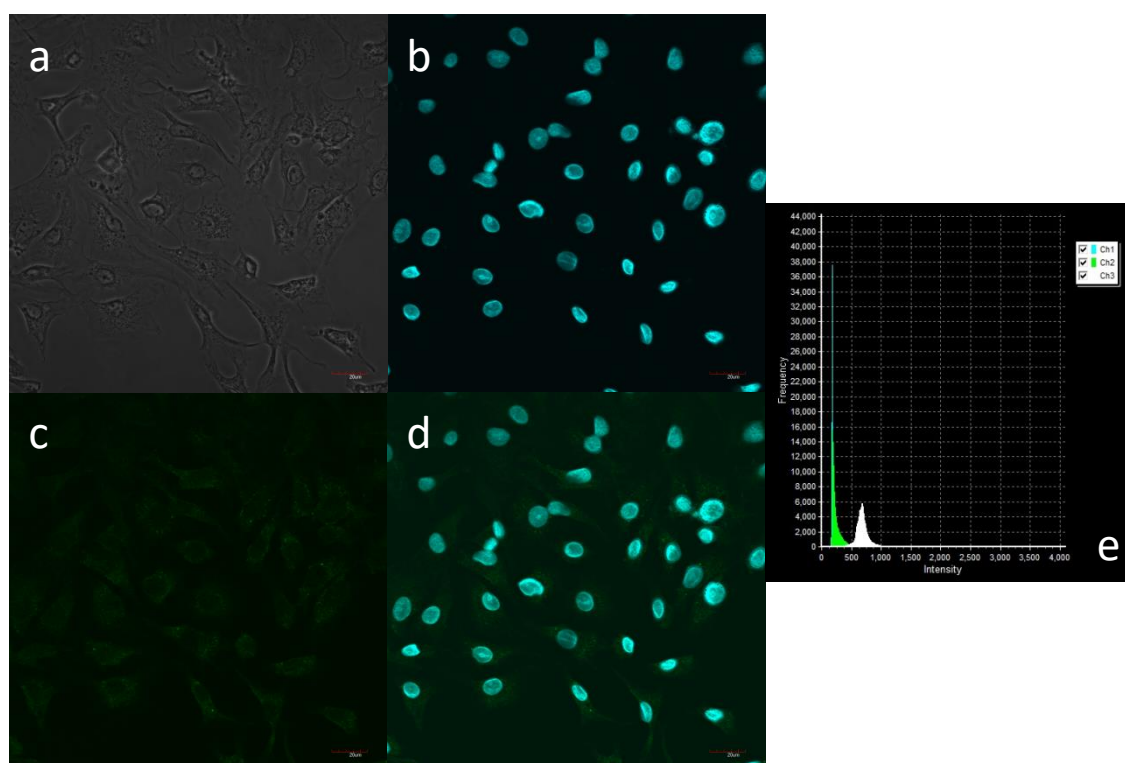


Ryc. 23. Ekspresja i lokalizacja komórkowa białka Fshr w komórkach ziarnistych podczas 7-dniowej hodowli pierwotnej. W celu przeprowadzenia procedury barwienia immunofluorescencyjnego komórki ziarniste utrwalano po 24 godz. (A), 48 godz. (B), 72 godz. (C), 96 godz. (D), 120 godz. (E), 144 godz. (F) i 168 godz. (G) hodowli. **a.** kontrast Nomarskiego, **b.** jądra komórkowe wybarwione DAPI, **c.** komórki wybarwione przeciwciałem, **d.** nałożenie obrazów b i c, **e.** histogram przedstawiający dwa kanały fluorescencji: kanał 1 - DAPI, kanał 2 - FITC oraz kontrast fazowy. Podziałka odpowiada 20 μm . (H) Intensywność fluorescencji emitowanej przez barwione przeciwciałem anti-Fshr komórki ziarniste w poszczególnych przedziałach czasowych krótkoterminowej hodowli pierwotnej. W każdym przedziale czasowym liczba ocenianych komórek (n) wynosiła 10. Wartości statystyczne przedstawiają porównania względem pierwszej grupy (24 godz.). Pozioma kreska wyznacza medianę. *** - $p < 0,001$.

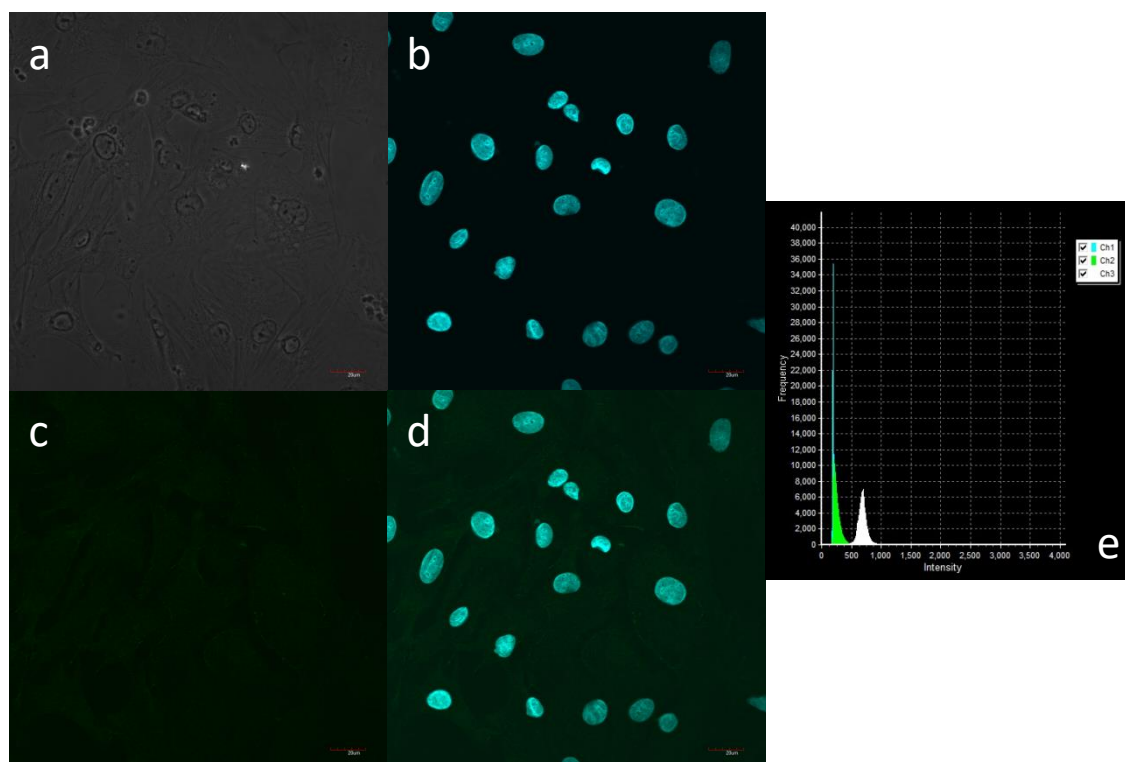
A.



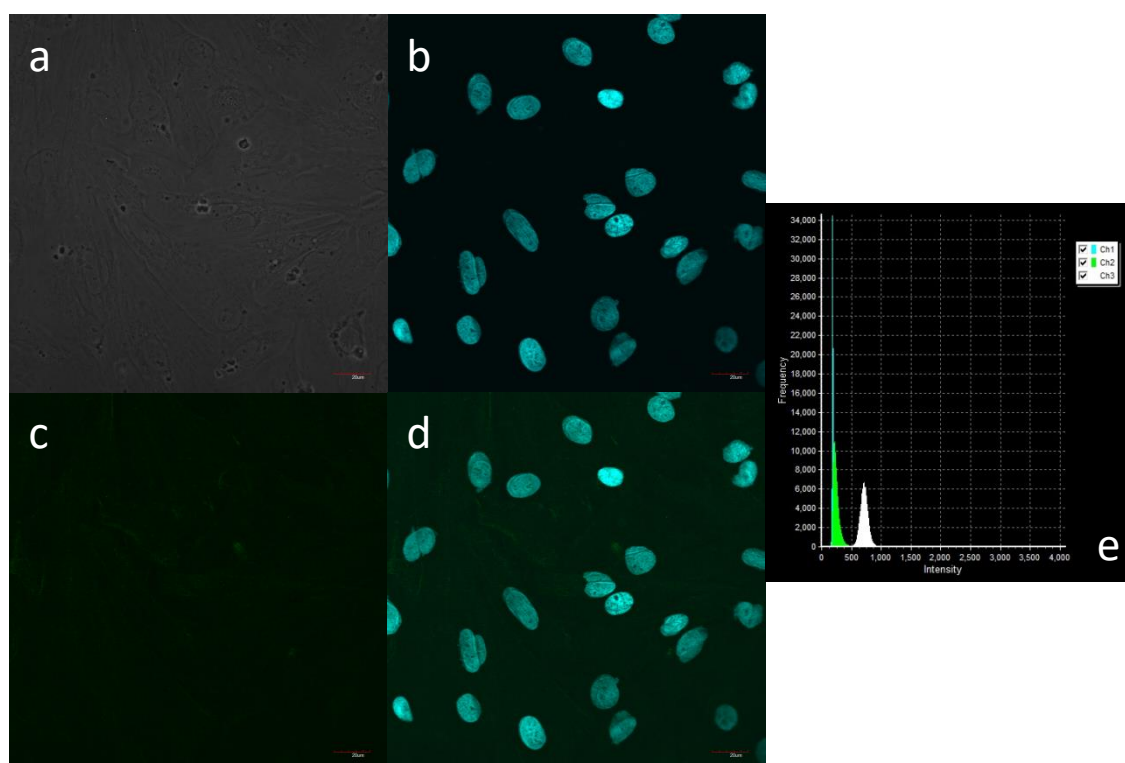
B.



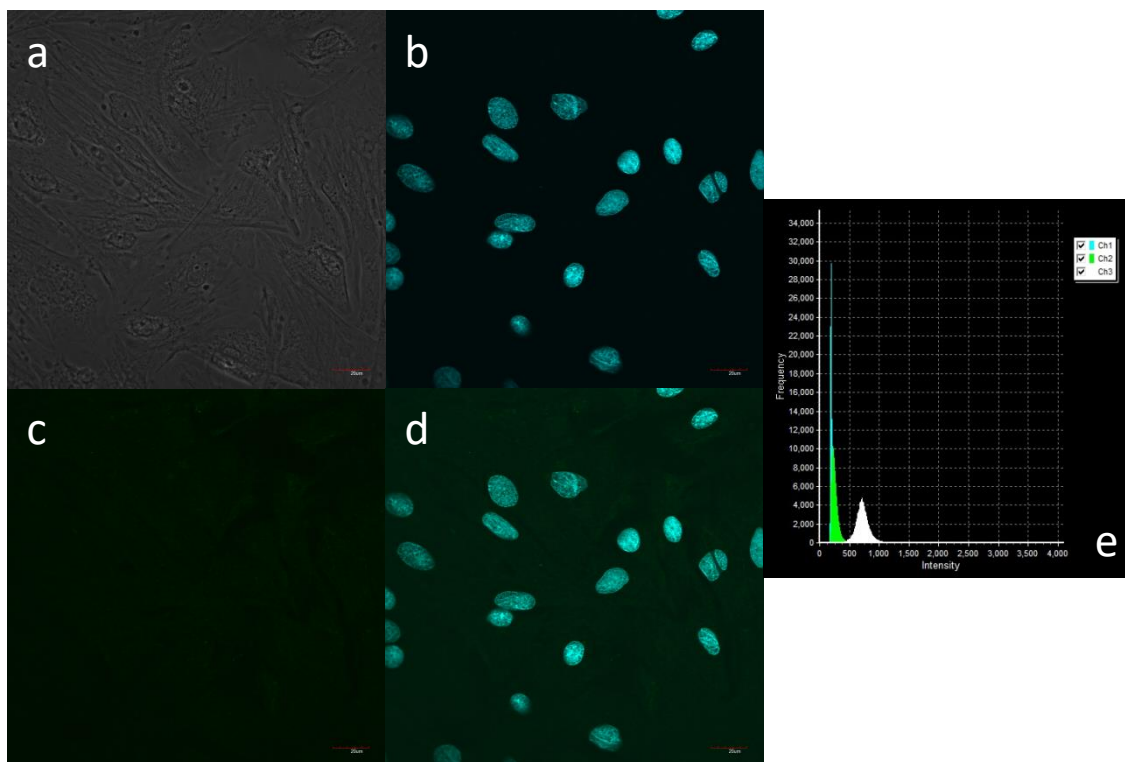
c.



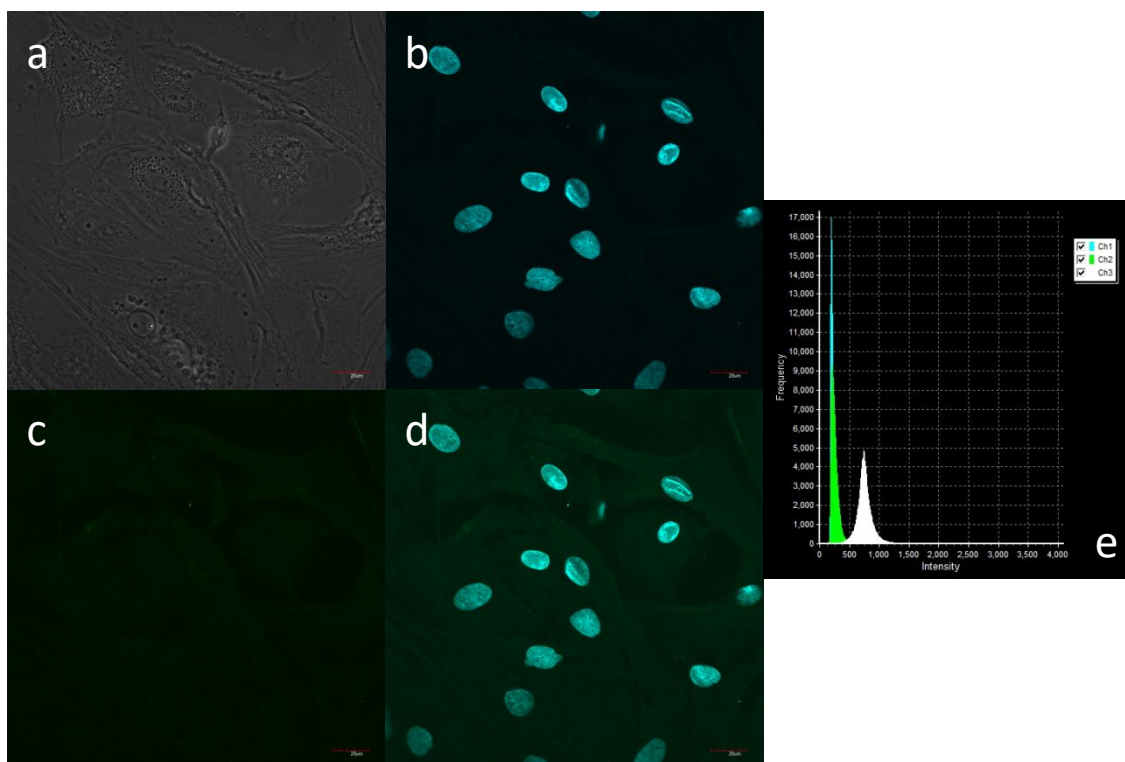
D.



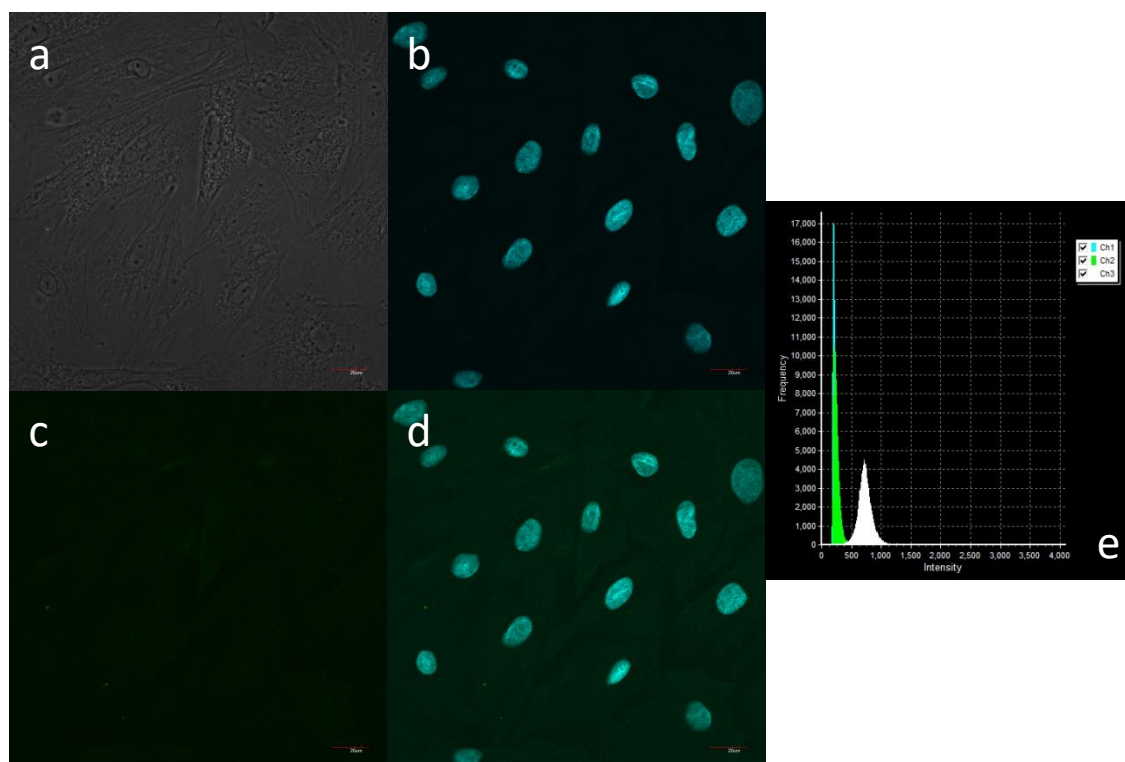
E.



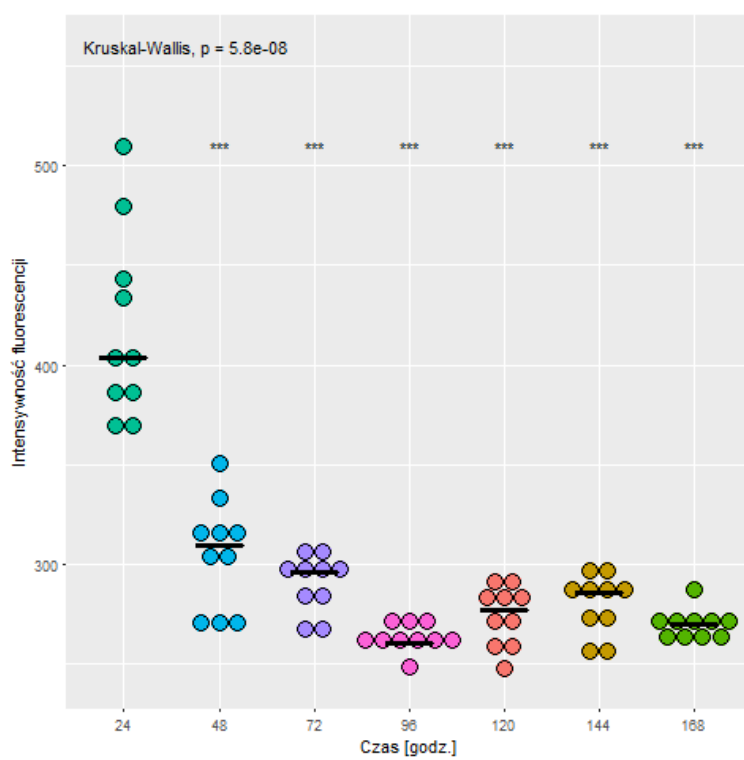
F.



G.

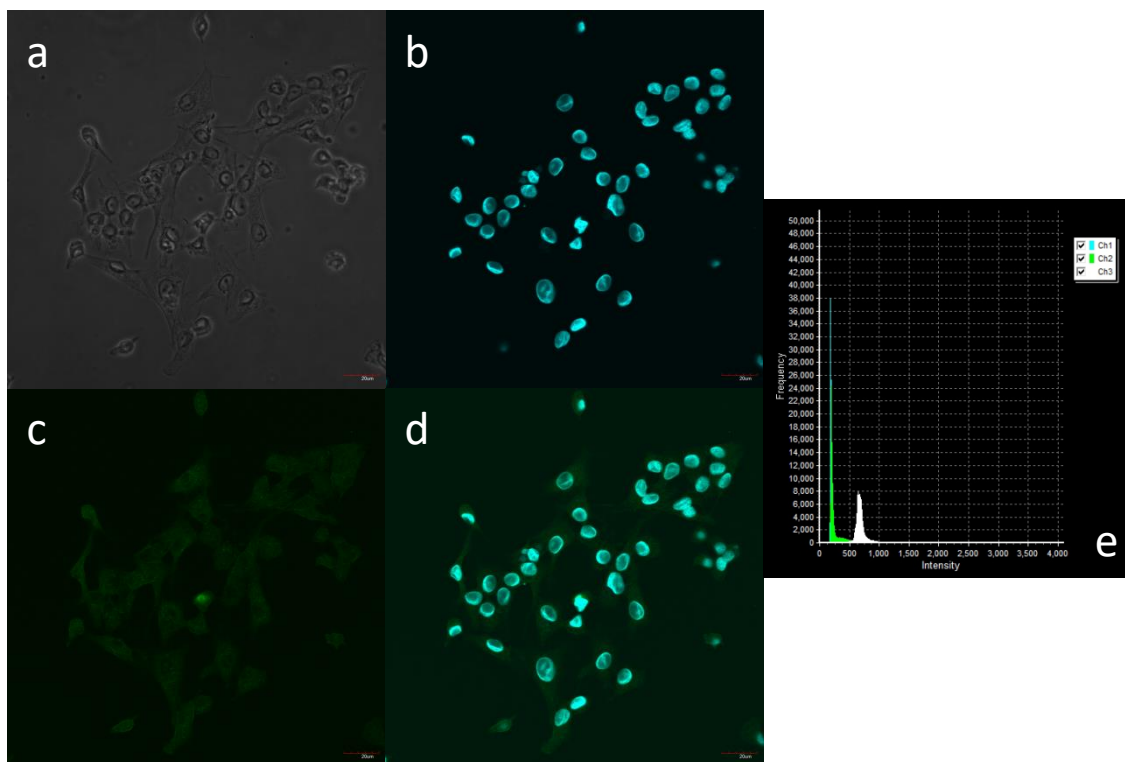


H.

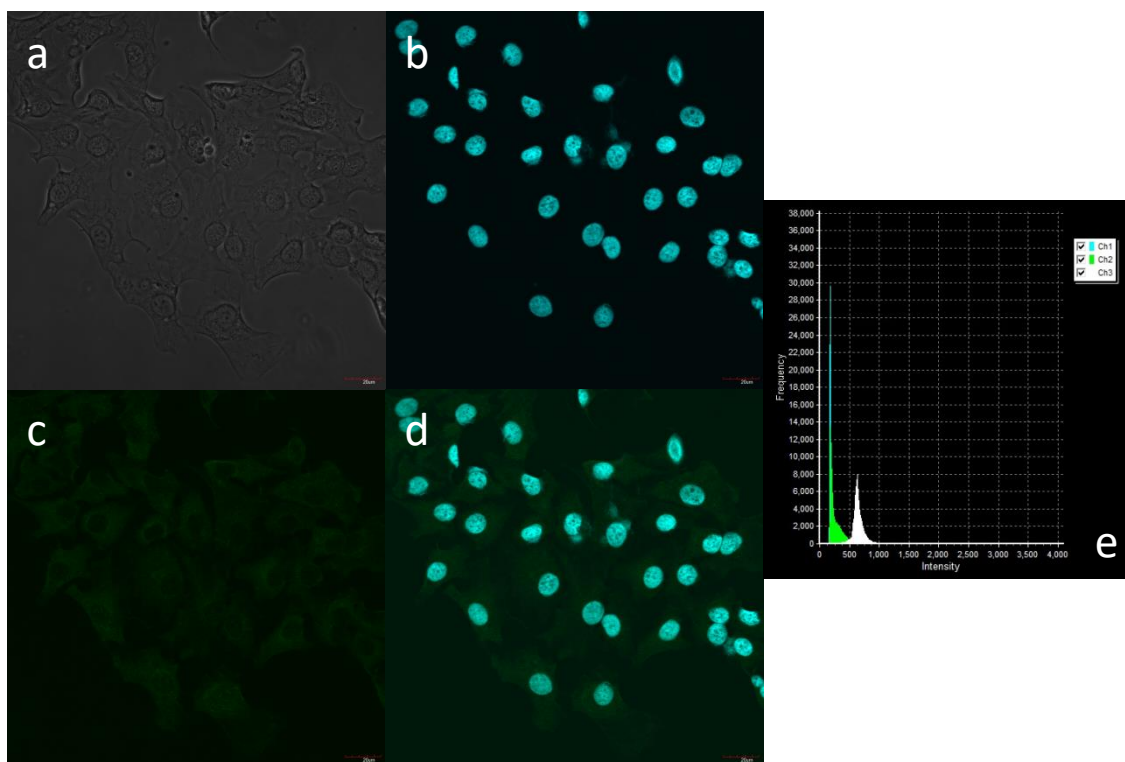


Ryc. 24. Ekspresja i lokalizacja komórkowa białka Cyp19 w komórkach ziarnistych podczas 7-dniowej hodowli pierwotnej. W celu przeprowadzenia procedury barwienia immunofluorescencyjnego komórki ziarniste utrwalano po 24 godz. (A), 48 godz. (B), 72 godz. (C), 96 godz. (D), 120 godz. (E), 144 godz. (F) i 168 godz. (G) hodowli. **a.** kontrast Nomarskiego, **b.** jądra komórkowe wybarwione DAPI, **c.** komórki wybarwione przeciwciałem, **d.** nałożenie obrazów b i c, **e.** histogram przedstawiający dwa kanały fluorescencji: kanał 1 - DAPI, kanał 2 - FITC oraz kontrast fazowy. Podziałka odpowiada 20 μm . (H) Intensywność fluorescencji emitowanej przez barwione przeciwciałem anty-Cyp19 komórki ziarniste w poszczególnych przedziałach czasowych krótkoterminowej hodowli pierwotnej. W każdym przedziale czasowym liczba ocenianych komórek (n) wynosiła 10. Wartości statystyczne przedstawiają porównania względem pierwszej grupy (24 godz.). Pozioma kreska wyznacza medianę. *** - $p < 0,001$.

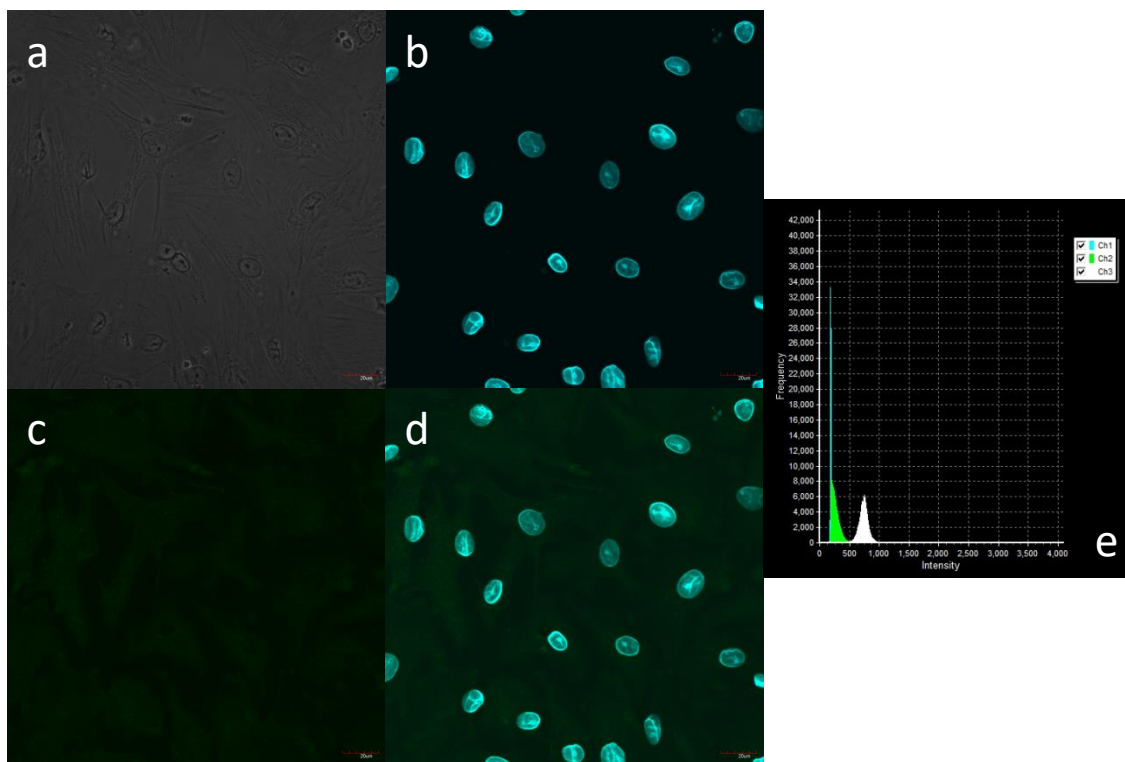
A.



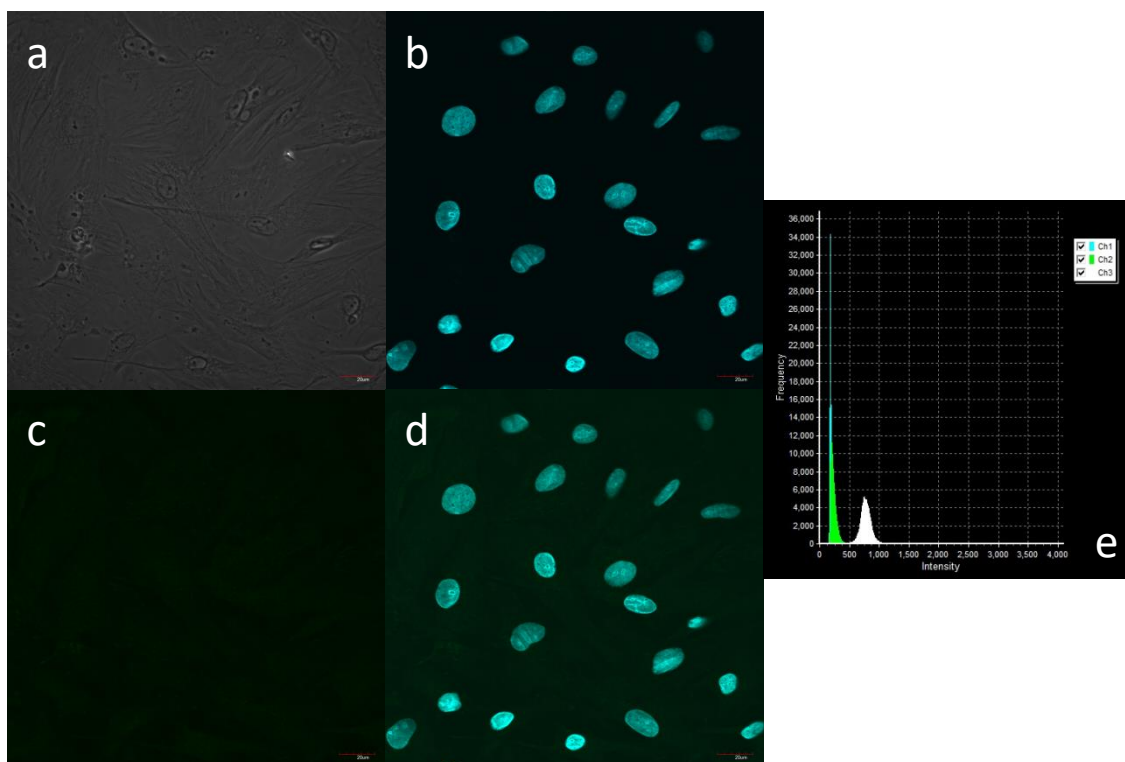
B.



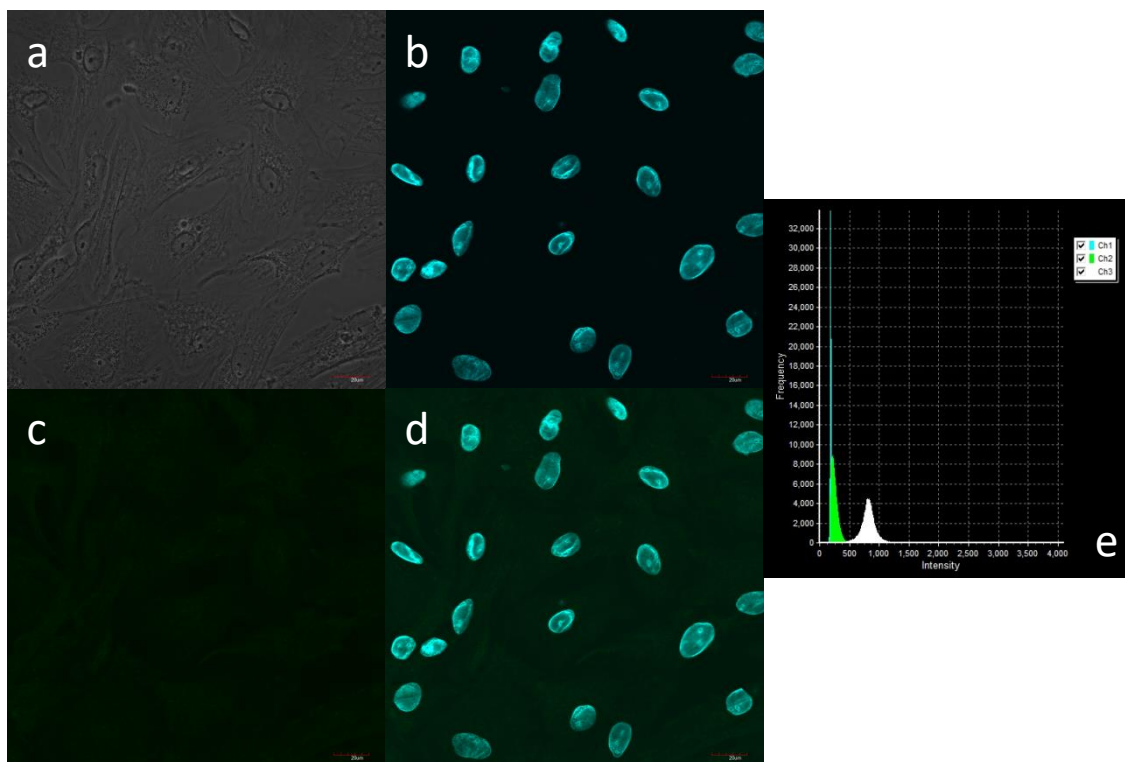
c.



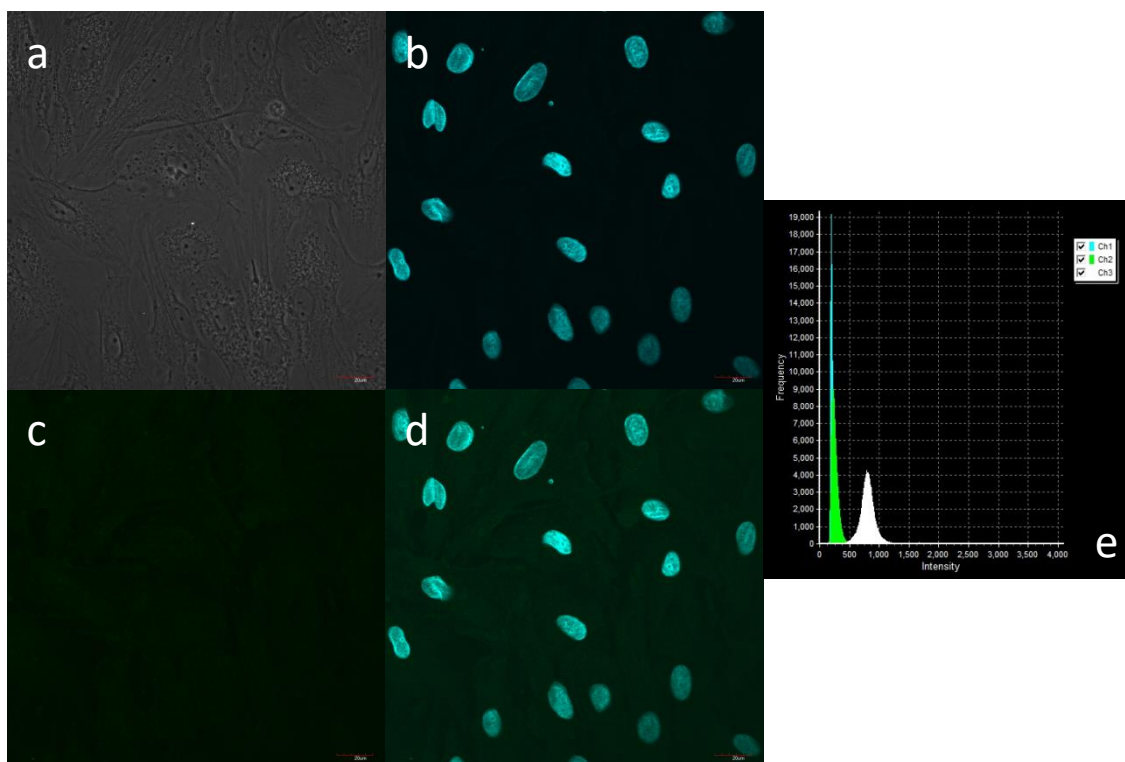
D.



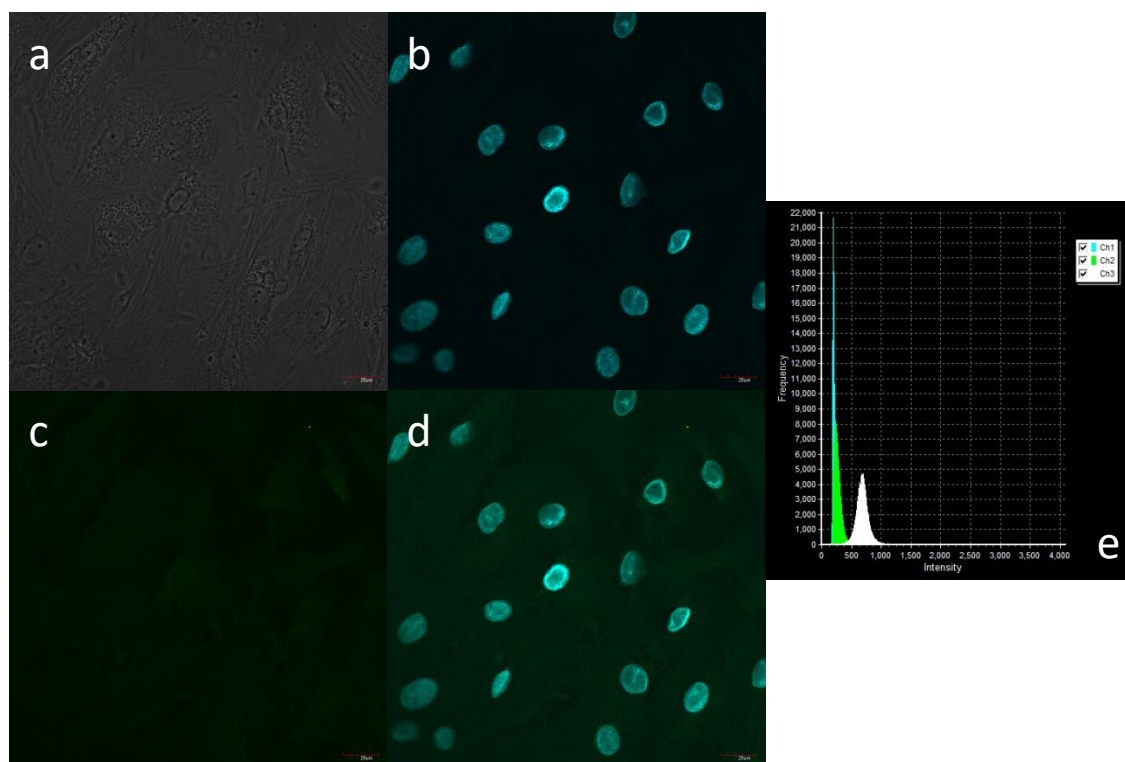
E.



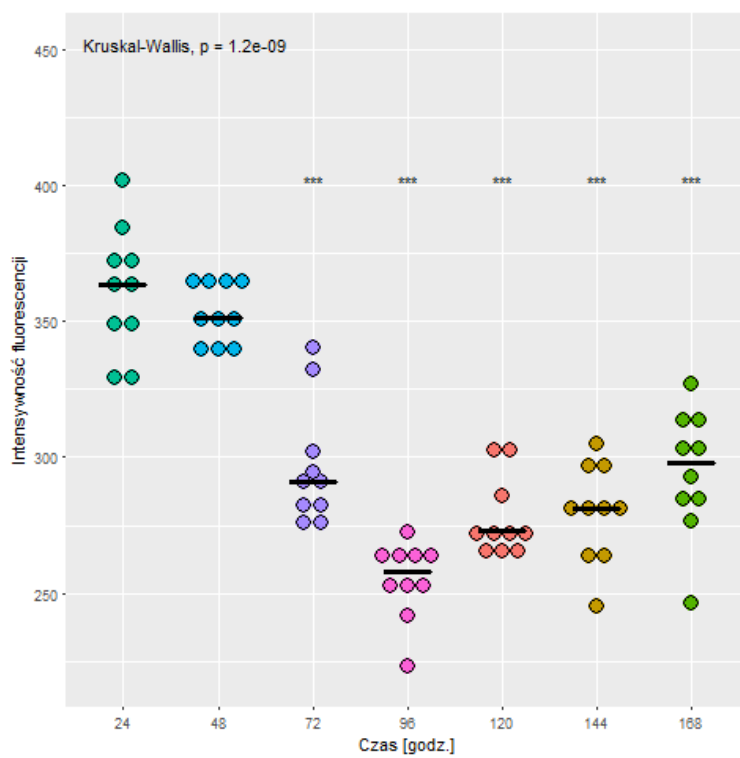
F.



G.

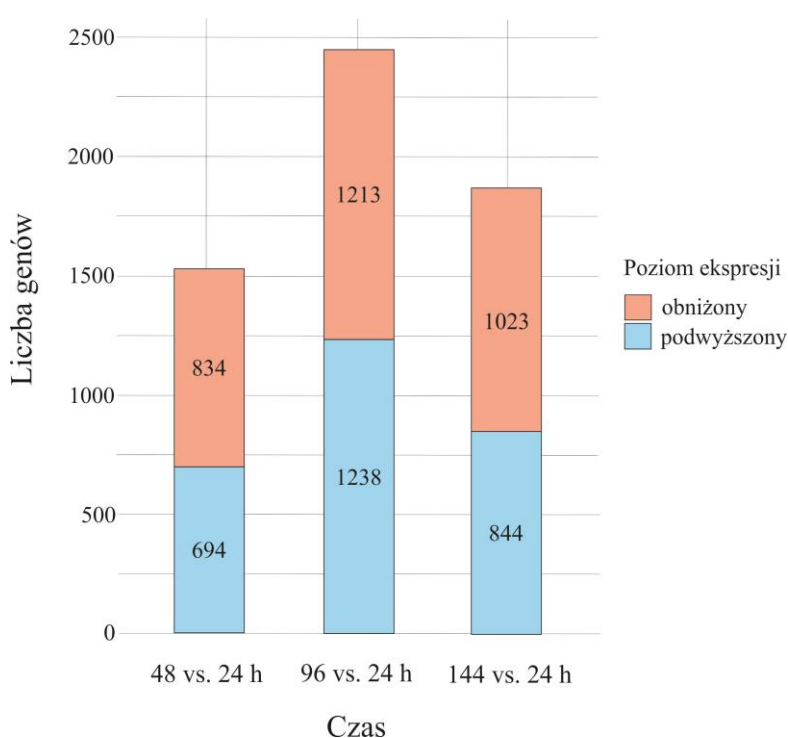


H.



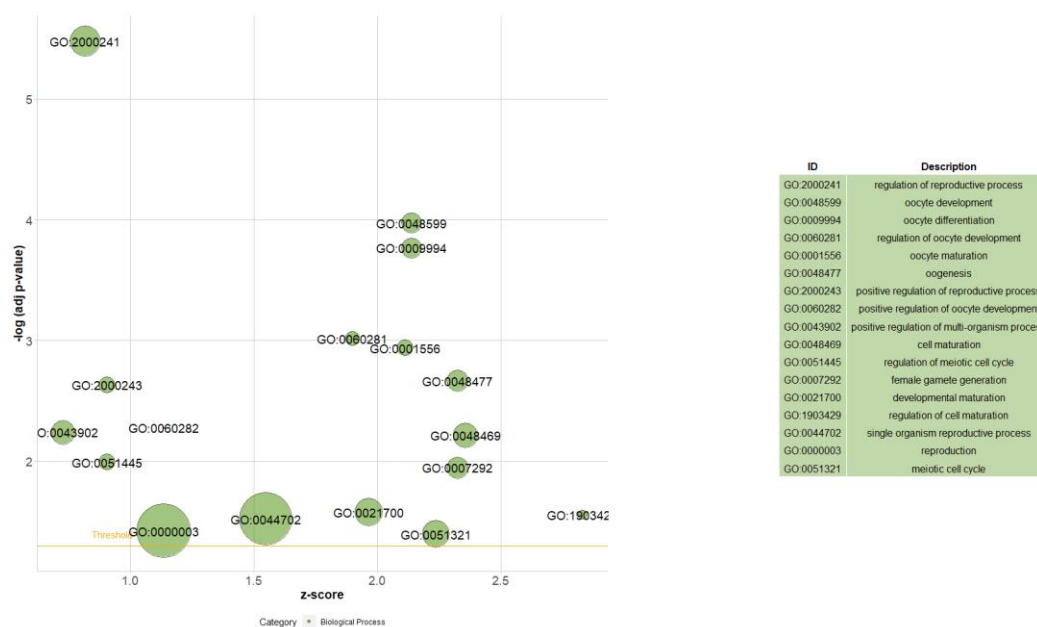
4.8. Profil ogólnej ekspresji genów podczas krótkoterminowej hodowli pierwotnej komórek ziarnistych jajnika świni

Analiza transkryptomu komórek ziarnistych z zastosowaniem techniki mikromacierzy RNA pozwoliła na prześledzenie zmian ogólnej ekspresji genów podczas krótkoterminowej hodowli pierwotnej. Za pomocą mikromacierzy ekspresyjnych przeanalizowano ekspresję ponad 24 tysięcy genów w trzech spośród siedmiu przedziałów czasowych hodowli pierwotnej (48 godz., 96 godz. i 144 godzina) oraz porównano ją z ekspresją genów w 24 godzinie hodowli, przy założeniu zmiany ekspresji >2 (wzrost/spadek) oraz wartości $p < 0,05$. W 48 godzinie hodowli *in vitro* odnotowano zmianę ekspresji 1528 genów, przy czym 694 geny charakteryzował wzrost ekspresji, natomiast spadek ekspresji dotyczył 834 genów. W 96 godzinie hodowli obniżeniu uległ poziom ekspresji 1213 genów, natomiast 1238 genów wykazało wzrost ekspresji. W trzecim z analizowanych przedziałów czasowych ekspresja 1023 genów uległa obniżeniu, a 844 geny wykazały wzrost ekspresji, co łącznie dało 1867 genów o zmienionych poziomach ekspresji w 144 godzinie hodowli (ryc. 25).



Ryc. 25. Liczba genów o zmienionych poziomach ekspresji w poszczególnych przedziałach czasowych hodowli pierwotnej (48 godz., 96 godz. i 144 godz.) w stosunku do 24 godz., przy założeniu zmiany ekspresji >2 (wzrost/spadek) oraz $p < 0,05$.

Dane pochodzące z mikromacierzy RNA przeanalizowano również pod kątem udziału genów w określonych procesach biologicznych, a tym samym ich współwystępowania w grupach ontologicznych (klasteryzacja). Grupowano tylko te geny, które zostały wyodrębnione ze względu na przyjęte wcześniej kryteria: zmiana poziomu ekspresji >2 (wzrost/spadek) w każdym z trzech wybranych przedziałów czasowych hodowli *in vitro* (48 godz., 96 godz., 144 godz.) w porównaniu z 24 godziną hodowli oraz wartość $p < 0,05$. W trakcie klasteryzacji wyrażeń ontologicznych zdecydowano się poddać dalszej analizie istotny statystycznie klaster 42 zawierający 34 grupy ontologiczne blisko związane z procesami rozrodczymi. Odrzucono te grupy ontologiczne, w których pokrycie genami było nieistotne statystycznie, co skutkowało zawężeniem pierwotnej liczby grup ontologicznych do siedemnastu. Na rycinie 26 przedstawiono wybrane grupy ontologiczne, wraz z ich przynależnością do danego typu ontologicznego.



Ryc. 26. Wykres przedstawiający 17 wybranych grup ontologicznych o istotnie statystycznie zmienionym wzbogaceniu, wchodzących w skład klastra 42. Na osi Y przedstawiono ujemny logarytm ze skorygowanej wartości p (ang. *adjusted p-value*), natomiast oś X pokazuje wartość Z (ang. *Z-score*). Wielkość każdego okręgu jest proporcjonalna do liczby genów w danej grupie ontologicznej o zmienionej ekspresji.

Spośród tych grup wytypowano 5 genów, których ekspresja: (1) powtarzała się w każdym z analizowanych przedziałów czasowych hodowli, oraz (2) w każdym z przedziałów czasowych geny te występowały w największej liczbie wytypowanych grup ontologicznych związanych z procesami reprodukcyjnymi. Nazwy tych genów oraz zmiany poziomów ich ekspresji przedstawia tabela 10.

Tab. 10. Charakterystyka genów wytypowanych w eksperymencie mikromacierzowym jako geny markerowe.

Symbol genu	Zmiana ekspresji 48 godz. vs. 24 godz.	Zmiana ekspresji 96 godz. vs. 24 godz.	Zmiana ekspresji 144 godz. vs. 24 godz.
CDC20	5,92	3,18	5,84
CDK1	3,9	6,51	4,15
MASTL	3,26	8,07	2,77
PDE3A	-6,47	-15,32	-32,97
PDE5A	-11,64	-13,93	-11,61

W celu zobrazowania zmiany ekspresji genów oraz pokrycia genami wybranych 17 grup ontologicznych zastosowano wykres typu mapy cieplnej (ang. *heat map*) dla każdego przedziału czasowego (ryc. 27).

Ryc. 27. Mapy cieplne obrazujące zmianę ekspresji genów w poszczególnych przedziałach czasowych hodowli: A. 48 godz. vs. 24 godz., B. 96 godz. vs. 24 godz., C. 144 godz. vs. 24 godz.

5. DYSKUSJA

Folikulogeneza jest złożonym procesem polegającym na proliferacji i różnicowaniu się komórek tworzących ścianę pęcherzyka jajnikowego. Składa się on z kilku etapów obejmujących przemiany biochemiczne, metaboliczne, morfologiczne i molekularne, które ściśle regulują poszczególne stadia wzrastania pęcherzyków. Przemiany biochemiczne i metaboliczne zachodzące w komórkach somatycznych pęcherzyków jajnikowych podlegają regulacji i oddziaływaniu ze strony hormonów gonadotropowych (LH, FSH) oraz steroidowych (P4, E2), a zatem wzrost i rozwój pęcherzyków zachodzi pod ścisłym wpływem osi podwzgórze-przysadka-jajnik. Cykl jajnikowy, na który składają się dwa kluczowe procesy - folikulogeneza oraz oogeneza - obejmuje z jednej strony ścisłą synchronizację hormonalną, dzięki której odbywa się wzrost i dojrzewanie pęcherzyków jajnikowych oraz oocytów, a z drugiej strony wzajemne interakcje pomiędzy wzrastającymi i różnicującymi się komórkami. Powszechnie wiadomo, że komórki utrzymywane w hodowli pierwotnej także różnicują się, co z kolei jest ściśle związane ze zmianami ich morfologii. W przypadku komórek ziarnistych izolowanych z płynu pęcherzykowego, w późniejszych etapach hodowli pierwotnej mogą one tworzyć populację komórek przypominających pod względem morfologicznym fibroblasty (określa się je wówczas jako *fibroblast-like cells*). Wiadomym jest także, co pokazały wyniki badań przedstawione w niniejszej rozprawie, że komórki ziarniste utrzymywane w warunkach hodowli pierwotnej podlegają procesowi luteinizacji i mogą tracić swoje endokrynne właściwości.

Celem podjętych badań była analiza ekspresji *Lhr*, *Fshr*, *Cyp19* oraz wybranych koneksyn (*Cx36*, *Cx37*, *Cx40*, *Cx43* i *Cx45*) w komórkach izolowanych z warstwy ziarnistej pęcherzyków jajnikowych świni, zarówno na poziomie mRNA, jak i białka. Wybór tych właśnie czynników podyktowany był ich istotną rolą w procesach folikulogenezy i oogenezy. Pęcherzyki jajnikowe stanowią podstawową jednostkę czynnościową jajnika, dzięki której w ciągu każdego cyklu jajnikowego powstaje gotowa do zapłodnienia komórka jajowa, a także syntetyzowane są hormony steroidowe i białkowe odpowiedzialne za regulację cyklu rozrodczego osobników żeńskich. Funkcja endokrynną gonad, obejmującą steroidogenezę, zachodzi głównie dzięki przyściennym komórkom ziarnistym. Komórki wieńca promienistego otaczające oocyt umożliwiają jego wzrost i nabycie kompetencji rozwojowej, poprzez złożone dwukierunkowe oddziaływania zachodzące między nimi a oocytem. Najważniejszymi czynnikami regulującymi zachodzące w jajnikach podstawowe zjawiska,

takie jak folikulogeneza, steroidogeneza czy owulacja, są hormony gonadotropowe (FSH i LH), a ich działanie jest możliwe dzięki swoistym receptorom. Rola LHR i FSHR w rozwoju pęcherzyków jajnikowych jest niepodważalna, przez co schemat ich ekspresji ma duże znaczenie badawcze oraz szerokie implikacje kliniczne. Pojawiają się nowe doniesienia dotyczące schematu ekspresji receptorów LH i FSH w jajnikach ssaków, jednak ciągle pozostają one niekompletne i wymagają dalszego uzupełnienia. Pod wpływem gonadotropin komórki ziarniste nabywają zdolności do syntezy znacznych ilości estradiolu, co jest możliwe dzięki zachodzącej w nich ekspresji aromatazy (CYP19). Oba te zjawiska są niezbędne dla prawidłowego wzrostu i rozwoju pęcherzyków jajnikowych oraz będącej ich zwińczeniem owulacji. W nieunaczynionej warstwie ziarnistej pęcherzyków jajnikowych ważna jest również regulacja i koordynacja metabolizmu oraz działania komórek ziarnistych, możliwa m. in. dzięki ekspresji koneksyn tworzących rozległą sieć połączeń szczelinowych. Połączenia te umożliwiają sprzężenie poszczególnych komórek ziarnistych w rodzaj rozbudowanego i zintegrowanego czynnościowo syncytium, a także dwukierunkową komunikację między komórkami ziarnistymi a oocytem, co jest warunkiem prawidłowego przebiegu folikulogenezy i oogenezy.

Ekspresja *Lhr*, *Fshr*, *Cyp19* i wybranych koneksyn w jajnikach różnych gatunków ssaków została już wcześniej wykazana (zarówno na poziomie białka, jak i mRNA) różnymi metodami badawczymi, jednak istnieje niewiele doniesień odnośnie profilu tej ekspresji oraz lokalizacji poszczególnych białek w jajnikach świni domowej. Ponadto, chociaż mechanizmy, które leżą u podstaw regulacji ekspresji *Lhr*, *Fshr* i *Cyp19* w komórkach ziarnistych ssaków są dobrze znane, wciąż niewiele wiadomo na temat ekspresji mRNA i odpowiadających im białek w odniesieniu do proliferacji i luteinizacji komórek ziarnistych *in vitro*. Podobnie w przypadku występowania poszczególnych koneksyn w jajniku, chociaż zostało już ono w pewnym zakresie opisane, brak jest danych dotyczących ekspresji genów i dystrybucji białek *Cx* podczas proliferacji komórek ziarnistych świni w czasie rzeczywistym. Przeprowadzone badania po raz pierwszy przedstawiły zależność pomiędzy proliferacją komórek ziarnistych w czasie rzeczywistym a procesem luteinizacji zachodzącym w hodowli komórek *in vitro*. Mimo że luteinizacja jest procesem powszechnie znanym, to większość danych literaturowych odnosi się do jej przebiegu *in vivo*, natomiast niewiele jest danych analizujących proces luteinizacji komórek ziarnistych jajnika zachodzący w warunkach hodowli pierwotnej *in vitro*.

Pierwszym podjętym w ramach niniejszej pracy zagadnieniem była ekspresja genu oraz lokalizacja białka Lhr w komórkach izolowanych z warstwy ziarnistej podczas ich krótkotrwałej hodowli pierwotnej *in vitro*. Receptor białkowy Lhr jest ściśle regulowany sekrecją hormonu luteinizującego (LH) z przedniego płata przysadki mózgowej. Hormon ten, zaliczany do gonadotropin, reguluje aktywność swojego receptora zlokalizowanego m.in. w komórkach ziarnistych. Wiadomym jest, że aktywność receptora LH jest kluczowa dla regulacji i aktywacji procesu luteinizacji komórek ziarnistych. Do tej pory jednak, niewiele było dostępnych danych literaturowych, odnoszących się do ekspresji mRNA i dystrybucji białka Lhr w krótkoterminowej hodowli pierwotnej komórek ziarnistych świni domowej. Ekspresję mRNA Lhr analizowano w odstępach 24 godzinnych przez okres 7 dni w hodowli pierwotnej. Identyfikacyjny model badawczy przyjęto w celu zbadania lokalizacji białka receptorowego.

Przeprowadzone badania wykazały najwyższy poziom mRNA *Lhr* w 48 godzinie hodowli *in vitro*, w porównaniu z pozostałymi przedziałami czasowymi hodowli. Podobnie w przypadku białka, ekspresja Lhr była najwyższa w 48 godzinie hodowli *in vitro*. Zbliżony schemat ekspresji receptora Lh w komórkach ziarnistych *in vitro*, z najwyższymi jej poziomami w początkowych etapach hodowli pierwotnej, a następnie spadkiem ekspresji Lhr w dalszych jej etapach obserwowali również Montaño i wsp. (2009). Między 12 a 24 godziną hodowli 45-50% komórek wykazywało ekspresję Lhr, a w 48 godzinie hodowli obserwowano statystycznie istotny wzrost ekspresji Lhr dający pozytywną immunoreakcję w 80-90% komórek, który utrzymywał się aż do 96 godziny hodowli. Taki schemat ekspresji Lhr podczas inkubacji komórek ziarnistych potwierdził, że zastosowany przez badaczy model *in vitro* czynnościowo i morfologicznie odzwierciedlał proces luteinizacji/różnicowania się komórek ziarnistych. Tym samym wyniki analiz ekspresji mRNA i białka Lhr w komórkach ziarnistych uzyskane w niniejszej rozprawie potwierdzają wcześniejsze doniesienia literaturowe mówiące o tym, że najwyższy poziom ekspresji Lhr odnotowuje się na początkowych etapach hodowli pierwotnej. Sugeruje się, że przyjęty model doświadczalny odzwierciedla indukcję oraz najwyższą aktywność procesu luteinizacji na początkowych etapach utrzymywania komórek w warunkach *in vitro*. W przedstawionym w niniejszej rozprawie eksperymencie, komórki ziarniste izolowane były z płynu pęcherzykowego dużych pęcherzyków jajnikowych o średnicy powyżej 6 mm. Pęcherzyki te określa się jako dojrzałe, i odpowiadają one przedowulacyjnym pęcherzykom Graafa. Wewnątrz pęcherzyków przedowulacyjnych znajdują się oocyty, przytwierdzone do ściany pęcherzyka za pomocą

komórek wzgórka jajonośnego. Stadium fizjologiczne tych komórek pozwala sądzić, iż znajdują się one na etapie poprzedzającym luteinizację pęcherzyków jajnikowych, a więc na etapie najwyższej aktywności receptora Lhr, która jest regulowana wzrastającym stężeniem hormonu luteinizującego. Komórki ziarniste izolowane z przedowulacyjnych pęcherzyków jajnikowych są następnie utrzymywane w krótkoterminowej hodowli pierwotnej *in vitro*. Przedstawione wyniki oraz przytoczone dane literaturowe wskazują jednoznacznie, iż komórki ziarniste w początkowych etapach hodowli pierwotnej podlegają procesowi luteinizacji, co odpowiada fizjologicznemu procesowi w stadium poowulacyjnym. Należy pamiętać, iż komórki ziarniste w hodowli pierwotnej podlegają wpływowi pełnowartościowego medium hodowlanego z surowicą zawierającą wiele czynników wzrostowych oraz hormonów. Sugeruje się zatem, iż krótkoterminowa hodowla pierwotna obejmuje proces luteinizacji komórek ziarnistych zachodzący w warunkach *in vitro*. Najnowsze dane literaturowe, oraz niepublikowane badania własne wykonane na ludzkich jajnikowych komórkach ziarnistych wskazują także, iż komórki te podlegają procesowi różnicowania się w warunkach *in vitro*. Uzyskane wyniki pozwalają przypuszczać, że komórki ziarniste posiadają cechy komórek macierzystych, mogących różnicować się w kierunku osteoblastów, chondroblastów oraz neuroblastów, podczas ich utrzymywania w warunkach hodowli pierwotnej *in vitro*.

Monga i wsp. (2011) badali zmiany ekspresji genów zachodzące w komórkach ziarnistych podczas 8-dniowej hodowli *in vitro*, związane z przejściem tych komórek z fenotypu syntetyzującego estradiol w fenotyp syntetyzujący progesteron. Zaobserwowali oni, iż w stanowiących grupę kontrolną komórkach ziarnistych niepoddanych działaniu FSH i/lub IGF1 ekspresja mRNA *Lhr* była najwyższa w 4 dniu hodowli *in vitro*, natomiast w 6 i 8 dniu hodowli następował statystycznie istotny spadek ekspresji *Lhr*. W badaniach przeprowadzonych przez Monga i wsp. (2011) maksimum oraz spadek tej ekspresji następowały później niż w przypadku wspomnianych wcześniej badań Montaño i wsp. (2009) oraz badań własnych autorki, co prawdopodobnie miało związek z faktem, iż hodowla komórek ziarnistych prowadzona przez Monga i wsp. (2011) była hodowlą bez użycia surowicy, będącej czynnikiem przyspieszającym luteinizację komórek ziarnistych *in vitro*. Tym samym uzyskane w niniejszej rozprawie wyniki badań potwierdzają przytoczone dane literaturowe świadczące, iż surowica (bogata w czynniki wzrostowe i hormony) jest czynnikiem indukującym proces luteinizacji komórek ziarnistych *in vitro*, regulowany aktywnością receptora Lh oraz stężeniem tej gonadotropiny. Badania Monga i wsp. (2011)

dowodły również, że komórki ziarniste utrzymywane w krótkoterminowej hodowli pierwotnej mogą zmieniać swój „hormonalny fenotyp”, co przejawia się zmianą sekrecji E2 w P4. Przytoczone dane literaturowe oraz badania własne autorki potwierdzają, iż komórki ziarniste w hodowli pierwotnej posiadają także dużą zdolność do różnicowania się, czego odzwierciedleniem są ich przemiany morfologiczne oraz istotne zmiany profilu sekrecji wybranych hormonów. Dlatego też sugeruje się, że zarówno proces luteinizacji, jak i profil sekrecji hormonów steroidowych (E2, P4) oraz zmiany morfologiczne komórek zachodzące na początkowych etapach hodowli, mogą być odzwierciedleniem różnicowania się komórek ziarnistych w hodowli pierwotnej *in vitro*.

Motola i wsp. (2008) analizowali okołoowulacyjną odpowiedź pęcherzyków jajnikowych, przyściennych komórek ziarnistych (MGCs) oraz kompleksów oocyt - wieniec promienisty (COCs) szczura na LH/hCG lub epiregulinę (ER), w zależności od tego, czy stymulacja zachodziła *in vivo* czy w warunkach hodowli pierwotnej. Stwierdzili oni stopniowy spadek ekspresji *Lhr* w miarę upływu czasu trwania hodowli, niezależnie od układu doświadczalnego (brak stymulacji/stymulacja LH/stymulacja ER). Po 3 godzinach stymulacji całych pęcherzyków jajnikowych za pomocą lutropiny i epireguliny poziom mRNA *Lhr* ulegał obniżeniu, podczas gdy w hodowli pierwotnej przyściennych komórek ziarnistych LH i ER nie wywierały żadnego wpływu na ekspresję mRNA *Lhr*. Poziom ekspresji *Lhr* w COCs był praktycznie niewykrywalny. Badacze doszli do wniosku, że różnice w ekspresji genów ujawnione między MGCs a COCs stymulowanymi wewnątrz całych pęcherzyków jajnikowych lub w hodowli pierwotnej podkreślają istotny wpływ interakcji między poszczególnymi typami komórek pęcherzykowych na ich aktywność. Przytoczone wyniki badań stanowią jedne z pierwszych doniesień opisujących wpływ ekspresji wybranych genów i kodowanych przez nie białek na regulację właściwości sekrecyjnych komórek ziarnistych wynikających z interakcji międzykomórkowych. Wiadomym jest, iż wzajemne oddziaływania pomiędzy oocytem a otaczającymi go komórkami wienca promienistego są warunkiem niezbędnym do uzyskania przez komórkę pełnej kompetencji rozwojowej (ang. *developmental competence*) przejawiającej się dojrzałością jądrową i cytoplazmatyczną. Jednakże dopiero badania przedstawione w niniejszej rozprawie, wykazujące ekspresję wybranych koneksyn w komórkach ziarnistych na poziomie molekularnym w modelu *in vitro*, stanowią dowód potwierdzający interakcje pomiędzy komórkami pęcherzykowymi jajnika świni, co przedstawiono w dalszej części dyskusji.

Schemat ekspresji LHR w ludzkich komórkach ziarnistych z pęcherzyków antralnych i przedowulacyjnych został przedstawiony w badaniach Maman i wsp. (2012). Stwierdzili oni korelację między ekspresją LHR a rozmiarem pęcherzyka, a mianowicie poziomy tej ekspresji były najniższe w małych pęcherzykach, wyższe w pęcherzykach średnich, a najwyższe poziomy ekspresji LHR stwierdzono w dużych pęcherzykach przedowulacyjnych. Natomiast Nogueira i wsp. (2007) wykorzystali model jajników bydłych do przeprowadzenia analizy ekspresji LHR w pęcherzykach jajnikowych o określonym rozmiarze i statusie steroidogenezy, a także w komórkach ziarnistych małych pęcherzyków (<6 mm średnicy) podlegających różnicowaniu *in vitro*. Wykazali oni, że poziom mRNA *Lhr* był niewykrywalny w GCs pęcherzyków o średnicy mniejszej niż 7 mm (pęcherzyków niedominujących), oraz że zwiększał się on wraz ze wzrostem średnicy pęcherzyków (>7 mm). Przytoczone wyniki badań Maman i wsp. (2012) oraz Nogueira i wsp. (2007) potwierdzają spostrzeżenia uzyskane w niniejszej pracy, mówiące o zależności między wielkością pęcherzyków jajnikowych a wzrostem i proliferacją komórek ziarnistych oraz o zależności tych procesów od luteinizacji komórek zachodzącej w warunkach *in vitro*. Folikulogeneza jest procesem polegającym na wzroście pęcherzyków jajnikowych, który obejmuje szereg przemian morfologicznych, biochemicznych oraz metabolicznych. Poszczególne etapy wzrostu pęcherzyków jajnikowych są ściśle regulowane poprzez aktywność hormonalną związaną z sekrecją hormonów osi podwzgórze-przysadka-jajnik. Pęcherzyki te kończą swój wzrost tworząc dojrzały pęcherzyk Graafa zawierający oocyt o pełnej kompetencji rozwojowej. Wcześniejsze wyniki badań autorki przeprowadzone na modelu pęcherzyków jajnikowych świni domowej pokazały, iż jedynie pęcherzyki Graafa, znajdujące się w stadium poprzedzającym owulację, zawierają w pełni dojrzałe oocyty, dlatego też sugeruje się ścisłą korelację pomiędzy wielkością pęcherzyków przedowulacyjnych a kompetencjami rozwojowymi znajdujących się w nich komórek jajowych. Badania wykonane przez autorkę polegały na izolacji komórek ziarnistych z największych pęcherzyków przedowulacyjnych (>6 mm), przyjęto zatem, iż oocyty znajdujące się wewnątrz tych pęcherzyków charakteryzują się największą kompetencją rozwojową. Ponadto stadium przedowulacyjne pęcherzyków, z których izolowane były komórki ziarniste sugeruje najwyższy poziom aktywności hormonów gonadotropowych oraz ich receptorów, który poprzedza indukcję luteinizacji pęcherzyków i owulację. Reasumując należy podkreślić, iż jedynie pęcherzyki o największej średnicy (u świni domowej >6 mm) podlegają procesowi luteinizacji oraz uwalniają w pełni kompetentną komórkę jajową podczas owulacji.

W badaniach Lindeberg i wsp. (2007) analizowano odpowiedź ludzkich niezluteinizowanych komórek ziarnistych na stymulację gonadotropinami w hodowli *in vitro*. Autorzy zaobserwowali statystycznie istotny wzrost poziomu ekspresji LHR w niezluteinizowanych komórkach ziarnistych stymulowanych FSH lub FSH w połączeniu z hCG, oraz brak wpływu samego hCG na ekspresję LHR w tych komórkach. Badania Lindeberg i wsp. (2007) pozwoliły na wyciągnięcie wniosku, że w hodowli *in vitro* niezluteinizowane komórki ziarniste zachowują się inaczej niż komórki zluteinizowane. Przytoczone wyniki badań potwierdzają spostrzeżenia autorki, iż proces luteinizacji komórek ziarnistych zachodzący w warunkach *in vitro* podlega ścisłej regulacji ze strony hormonów gonadotropowych, takich jak LH, FSH czy hCG. Opracowany przez Lindeberg i wsp. (2007) model *in vitro* odzwierciedla sekrecję tych hormonów oraz aktywność osi podwzgórze-przysadka-jajnik w warunkach *in vivo*. Ponadto przytoczony model eksperymentalny dokładnie odpowiada wynikom badań uzyskanych przez autorkę, które jednoznacznie wskazują, iż największy potencjał luteinizacyjny mają komórki ziarniste w początkowych etapach hodowli pierwotnej, będące w stadium największego wpływu ze strony hormonów i czynników wzrostowy zawartych w medium hodowlanym.

Podsumowując przytoczone wyniki badań innych autorów oraz obserwacje własne sugeruje się, że podwyższony poziom ekspresji Lhr po 48 godzinach hodowli *in vitro* może być związany z procesem luteinizacji komórek ziarnistych. Zmniejszająca się ekspresja Lhr w późniejszych etapach hodowli *in vitro* może odzwierciedlać spadek wrażliwości lub podatności komórek ziarnistych na aktywację szlaku zależnego od LH. Taki schemat ekspresji Lhr podczas hodowli komórek izolowanych z warstwy ziarnistej jajnika świni może więc być ważnym wskaźnikiem ich luteinizacji *in vitro*. Przytoczone dane literaturowe oraz badania własne autorki wskazują jednoznacznie, iż luteinizacja komórek ziarnistych na początkowych etapach hodowli pierwotnej jest wynikiem silnej stymulacji ze strony hormonów gonadotropowych, zachodzącej za pośrednictwem odpowiadających im specyficznych receptorów, oraz ważnych czynników wzrostowych obecnych w wchodzącej w skład medium hodowlanego surowicy. Należy jednak również podkreślić, że indukcja procesu luteinizacji w warunkach *in vitro* pozostaje w ścisłej korelacji z aktywnością proliferacyjną komórek ziarnistych, co najprawdopodobniej związane jest ze stadium dojrzałości pęcherzyków jajnikowych, z których izolowane są komórki przeznaczone do hodowli pierwotnej.

Dane literaturowe oraz wyniki badań własnych autorki jednoznacznie dowodzą kluczowej roli hormonu LH oraz jego receptora LHR w regulacji zarówno funkcji fizjologicznych komórek ziarnistych, takich jak właściwości sekrecyjne, oraz ich wpływu na indukcję i przebieg procesu luteinizacji *in vitro*. Podkreślono ponadto istotną rolę innych hormonów gonadotropowych, takich jak FSH czy hCG, oraz aktywności osi podwzgórze-przysadka-jajnik na przebieg luteinizacji komórek ziarnistych. Przedmiotem badań w ramach niniejszej rozprawy doktorskiej była także analiza ekspresji mRNA i lokalizacji białka FSHR w komórkach ziarnistych, dlatego też kolejne eksperymenty skupiały się na badaniu tychże na modelu krótkoterminowej hodowli pierwotnej jajnikowych komórek ziarnistych świni. Przeprowadzone badania wykazały, że poziom ekspresji mRNA *Fshr* był najwyższy w 48 godzinie hodowli *in vitro*, w porównaniu z pozostałymi przedziałami czasowymi hodowli. Ekspresja *Fshr* na poziomie białka była najwyższa w 24 godzinie hodowli. Obserwacja ta pozostaje w zgodzie z wynikami uzyskanymi przez Serikawa i wsp. (2006), którzy podjęli próbę podtrzymania funkcji komórek ziarnistych *in vivo* (wyrażonej ekspresją receptora Fsh) dokonując transdukcji genu *Fshr* do tych komórek za pomocą adenowirusa. W komórkach ziarnistych niepoddanych transdukcji, największą liczbę receptorów Fsh stwierdzano bezpośrednio po ich wyizolowaniu z pęcherzyków jajnikowych (4874 receptory Fsh/komórkę). Wraz z czasem trwania hodowli *in vitro* liczba Fshr w komórkach ziarnistych systematycznie spadała, osiągając ostatniego, siódmego dnia hodowli wartość 692 receptorów Fsh/komórkę. Odnosząc się do wyników badań przytoczonych wcześniej – ekspresji i lokalizacji receptora Lh - można wysunąć hipotezę, iż zarówno ekspresja receptora Lh, jak i Fsh, podlegają podobnym mechanizmom regulacyjnym. Podobny wzór ekspresji mRNA oraz białek Lh i Fsh podczas krótkotrwałej hodowli pierwotnej komórek ziarnistych w warunkach *in vitro* może wskazywać na zbliżony do fizjologicznego profil oddziaływań tych hormonów na komórki pęcherzykowe. Tym samym potwierdzono hipotezę o ścisłej regulacji procesu luteinizacji przez Lh i Fsh, dzięki wykazaniu aktywności ich receptorów w warunkach hodowli *in vitro*.

Kluczowe dla wyjaśnienia roli FSHR w folikulogenezie jajnikowej były badania Vasconcelos i wsp. (2013), którzy analizowali ekspresję *StAR*, enzymów szlaku steroidogenezy oraz *Fshr* w wycinkach ściany pęcherzyków antralnych (FWS, ang. *follicle wall sections*) bezpośrednio po ich pobraniu z pęcherzyków lub hodowanych przez 24 lub 48 godz. w medium suplementowanym surowicą (NDM, ang. *nondefined medium*) lub w medium bez surowicy (DM, ang. *defined medium*). Wykazali oni podwyższoną ekspresję

wszystkich wspomnianych genów w hodowli bez surowicy (DM), w porównaniu ze skrawkami świeżymi lub z hodowlą w pożywce z surowicą (NDM), przy czym w przypadku genu receptora Fsh wzrost ekspresji nie osiągnął istotności statystycznej. Wyniki badań Vasconcelos i wsp. (2013) sugerują, że pożywka bez surowicy pozwala zachować cechy morfologiczne komórek, wpływa na wzrost ekspresji genów enzymów szlaku steroidogenezy oraz podtrzymuje produkcję hormonów steroidowych w hodowli wycinków ściany pęcherzyków antralnych. Powyższe wyniki badań potwierdzają spostrzeżenia autorki, iż komórki ziarniste izolowane z płynu pęcherzykowego zachowują swoje „pierwotne” właściwości. W przypadku badań Vasconcelos i wsp. (2013), te „pierwotne właściwości” znajdowały odbicie we właściwościach morfologicznych komórek budujących ścianę pęcherzyków jajnikowych oraz w ekspresji *Fshr* i genów szlaku syntezy hormonów steroidowych. W badaniach autorki, właściwości komórek ziarnistych na początkowych etapach hodowli pierwotnej znajdowały odzwierciedlenie w wysokiej ekspresji receptora Fsh, co prawdopodobnie było efektem podwyższonego stężenia agonisty (Fsh). Ponadto sugeruje się, że początkowe stadia wzrostu i proliferacji komórek ziarnistych w warunkach hodowli pierwotnej *in vitro*, z uwagi na izolację tych komórek z pęcherzyków przedowulacyjnych, charakteryzują się wysokim statusem metabolicznym, który przekłada się na odpowiedź na sekrecję wybranych hormonów i aktywność ich receptorów.

Durlej i wsp. (2011) wykorzystali model folikulogenezy u świń analizując ekspresję mRNA *Fshr* oraz lokalizację tego białka w jajnikach nowonarodzonych świń, a także określili zmiany tej ekspresji zachodzące pod wpływem ekspozycji zwierząt na flutamid (niesteroidowy lek o działaniu antyandrogenowym) *in utero*. Podanie flutamidu obniżało ekspresję mRNA *Fshr*, przy czym spadek ten był większy, gdy ekspozycja na antyandrogen miała miejsce 20 dnia *post-coitum* (p.c.) w porównaniu z 80 dniem p.c. Badacze zasugerowali, że *Fshr* może brać udział w powstawaniu pęcherzyków jajnikowych świń już na etapie rozwoju prenatalnego. Ponadto regulacja ekspresji mRNA i białka *Fshr* w jajnikach nowonarodzonych świń po ekspozycji matek na flutamid potwierdza istotną rolę androgenów we wczesnych etapach folikulogenezy świń. Badania te stanowią jedne z pierwszych wyników odnoszących się do ekspresji *Fshr* u osobników nowonarodzonych. Tym samym potwierdzono, iż proces folikulogenezy jest ściśle regulowany nie tylko ze strony gonadotropin wydzielanych dzięki aktywności osi podwzgórze-przysadka-jajnik, ale także poprzez syntezę i aktywność hormonów steroidowych. Przytoczone wyniki wydają się potwierdzać słuszność badań przeprowadzonych przez autorkę, które obejmują także analizę

profilu ekspresji genu i dystrybucji białka Cyp19, jako jednego z najważniejszych enzymów szlaku przemian hormonów steroidowych.

Celem badań Cardenas i Pope (2002) była analiza ekspresji receptora Fsh w późnych pęcherzykach dojrzewających świni. Stwierdzili oni brak statystycznie istotnej różnicy w poziomach mRNA *Fshr* między największymi pęcherzykami jajnikowymi pochodzącymi z 13, 15 i 17 dnia cyklu rujowego. W pęcherzykach pobranych w 19 dniu cyklu rujowego, tj. w pęcherzykach przedowulacyjnych, poziom mRNA *Fshr* był istotnie niższy niż w dniach poprzednich, co sugeruje, że w ciągu ostatnich kilku dni przed owulacją pęcherzyki jajnika świni mogą rosnąć przy zmniejszonym wsparciu ze strony FSH. Wyniki badań Cardenas i Pope (2002) wskazują na podrzędną rolę FSH w procesie formowania pęcherzyków owulacyjnych. W toku badań własnych wykazano, iż kluczową rolę w formowaniu pęcherzyków Graafa odgrywa LH i jego receptor (Lhr), z uwagi najwyższy wzrost ekspresji Lhr w pęcherzykach jajnikowych o największej średnicy. Dotychczas sądzono, iż kluczowymi hormonami regulującymi wzrost pęcherzyków jajnikowych oraz proliferację i różnicowanie się komórek budujących ścianę pęcherzyków, w tym przede wszystkim komórek ziarnistych, są Lh i Fsh. Przytoczone wyniki badań wskazują, iż w porównaniu z Lh, Fsh nie odgrywa tak kluczowej roli w formowaniu pęcherzyków Graafa. Podsumowując można wysunąć hipotezę, że Fsh i aktywowany przez tę gonadotropinę specyficzny receptor (Fshr) reguluje początkowe stadia folikulogenezy, także podczas rozwoju płodowego. Natomiast hormon Lh i jego receptor Lhr jest odpowiedzialny za formowanie przedowulacyjnych pęcherzyków Graafa.

Przytoczone powyżej wyniki badań innych autorów wskazują jednoznacznie na ścisłą zależność pomiędzy sekrecją hormonów gonadotropowych i aktywnością ich receptorów a syntezą i wydzielaniem hormonów steroidowych. Powszechnie wiadomo, że proces steroidogenezy jajnikowej w istotny sposób wpływa na właściwości fizjologiczne, zdolność do proliferacji i różnicowania się komórek pęcherzykowych, w tym przede wszystkim komórek ziarnistych. Jednym z głównych enzymów przemian hormonów steroidowych w jajniku jest aromataza, celem badań przeprowadzonych w ramach niniejszej rozprawy była więc także analiza ekspresji genu i dystrybucji białka Cyp19 na modelu jajnikowych komórek ziarnistych świni utrzymywanych w krótkoterminowej hodowli pierwotnej *in vitro*. W wyniku przeprowadzonych badań wykazano podwyższony poziom białka Cyp19 w 24 godzinie hodowli *in vitro*, w porównaniu z pozostałymi przedziałami czasowymi. Nie wykazano ekspresji mRNA *Cyp19* w komórkach ziarnistych. Posługując się podobnym modelem

krótkoterminowej hodowli pierwotnej, Monga i wsp. (2011) wykazali, że podczas trwającej 8 dni hodowli komórek ziarnistych ekspresja genu *Cyp19* ulegała statystycznie istotnemu obniżeniu w kolejnych dniach hodowli, począwszy od dnia 4-go. Wyniki badań własnych potwierdzają spostrzeżenia Monga i wsp. (2011), w których najwyższy poziom ekspresji *Cyp19* obserwowano w początkowych stadiach krótkoterminowej hodowli pierwotnej komórek ziarnistych. Sugeruje się tym samym, iż procesy przemian hormonów steroidowych przebiegają najintensywniej w przedowulacyjnych pęcherzykach Graafa, po czym po owulacji ulegają one obniżeniu. Spadek aktywności enzymów szlaku steroidogenezy po owulacji może wiązać się z przemianami, jakim podlega jajnik po pęknięciu pęcherzyka Graafa. Wyniki badań przeprowadzonych przez autorkę niniejszej rozprawy nie wykazały obecności mRNA *Cyp19* w komórkach ziarnistych. Obecność produktu białkowego *Cyp19* w komórkach ziarnistych na początkowych etapach hodowli *in vitro* może stanowić pozostałość po aktywności translacyjnej komórek na wcześniejszych etapach folikulogenezy jajnikowej, natomiast brak produktu mRNA może wynikać z braku aktywności transkrypcyjnej genów szlaku steroidogenezy.

Chronowska i wsp. (2009) badali wpływ niesteroidowego inhibitora aromatazy – fadrozolu - na ekspresję aromatazy w komórkach ziarnistych pochodzących z małych (1-2 mm) i dużych (5-7 mm) pęcherzyków jajnikowych świni. Stwierdzili oni, że fadrozol obniżał ekspresję genu aromatazy w komórkach ziarnistych izolowanych z małych pęcherzyków po 72 godz. inkubacji oraz w GCs pozyskiwanych z dużych pęcherzyków po 48 godz. hodowli. Poziom ekspresji genu aromatazy był istotnie wyższy w komórkach ziarnistych dużych pęcherzyków w porównaniu z komórkami ziarnistymi małych pęcherzyków jajnikowych, niezależnie od sposobu ich traktowania. Schemat ekspresji *Cyp19* w komórkach ziarnistych pęcherzyków jajnika świni uzyskany w badaniach własnych potwierdza spostrzeżenia Chronowskiej i wsp. (2009), mówiące o najwyższej ekspresji genu kodującego aromatazę w komórkach ziarnistych izolowanych z dużych pęcherzyków antralnych na początkowych etapach hodowli *in vitro*.

W przytoczonych już wcześniej badaniach Vasconcelos i wsp. (2013) analizowano także ekspresję *Cyp19* w wycinkach ściany pęcherzyków antralnych (FWS, ang. *follicle wall sections*) była bezpośrednio po ich pobraniu z pęcherzyków lub hodowanych przez 24 lub 48 godz. w medium z surowicą (NDM, ang. *non-defined medium*) lub bez surowicy (DM, ang. *defined medium*). Wykazali oni, że ekspresja ta była bardzo niska w świeżo wyizolowanych FWS, nie ulegała ona również zmianie podczas inkubacji FWS w pożywce z surowicą.

Ekspresja *Cyp19* rosła natomiast po 48 godzinach hodowli bez surowicy (DM), w porównaniu z NDM lub ze świeżo izolowanymi FWS. Podwyższona ekspresja mRNA *Cyp19* i *Cyp11A1* (genów będących markerami pęcherzyków dominujących) wyraźnie wskazuje na to, że model *in vitro* FWS-DM przypomina ścianę pęcherzyków rosnących i/lub dominujących.

Celem kolejnych badań, przeprowadzonych przez Silva i wsp. (2000), były właściwości sekrecyjne komórek ziarnistych. Autorzy badali czy obserwowana wcześniej indukcja wydzielania estradiolu przez komórki ziarniste była hodowane w pożywce bez surowicy ma związek z podwyższonym poziomem mRNA *P450arom* oraz czy poziomy mRNA *P450arom* są wrażliwe na FSH w warunkach *in vitro*. Wydzielanie estradiolu przez komórki ziarniste oraz poziom mRNA *P450arom* rosły pomiędzy 2 a 4 dniem hodowli, jednak po tym czasie nie zmieniały się już w sposób statystycznie istotny. Synteza estradiolu oraz poziom mRNA *P450arom* korelowały ze sobą między 2 a 6 dniem hodowli, lecz gdy do analizy włączano dane z dnia 8, korelacji nie stwierdzano. Przytoczone wyniki badań są kolejnymi odnoszącymi się do zależności pomiędzy aktywnością steroidogenną komórek ziarnistych a wpływem FSH. Sugeruje się, iż synteza i sekrecja hormonów steroidowych w jajniku jest regulowana wydzielaniem FSH, co znajduje odzwierciedlenie w aktywności receptora dla tej gonadotropiny.

Wyniki badań własnych uzyskane przez autorkę rozprawy wskazują ponadto, że spadek ekspresji aromatazy w komórkach ziarnistych świni po 24 godzinach hodowli pierwotnej *in vitro* może być wynikiem zachodzącej luteinizacji. Zależność pomiędzy ekspresją genu i białka *Cyp19*, która jest ściśle związana z aktywnością steroidogenną pęcherzykowych komórek ziarnistych, a procesem luteinizacji dowodzi istotnego znaczenia tych mechanizmów dla przebieg folikulogenezy jajnikowej oraz przede wszystkim dla właściwości fizjologicznych komórek ziarnistych.

W wyniku przeprowadzonych badań wykazano, że ekspresja wybranych koneksyn na poziomie białka była najwyższa w pierwszych 48 godzinach hodowli *in vitro*, a w kolejnych pięciu przedziałach czasowych ulegała stopniowemu obniżeniu. Sugeruje to, iż podczas hodowli *in vitro* komórek warstwy ziarnistej jajnika komórki te tracą zdolność do tworzenia połączeń szczelinowych między sobą. W obecnej pracy zaobserwowano również brak powiązania między ekspresją wybranych koneksyn w komórkach ziarnistych jajnika świni a ich proliferacją w czasie rzeczywistym. W przedstawionych badaniach własnych autorka posłużyła się tym samym modelem krótkoterminowej hodowli pierwotnej jajnikowych

komórek ziarnistych izolowanych z dużych pęcherzyków (>6 mm), tj. komórek ziarnistych współtworzących pęcherzyki Graafa. Badania odnoszące się do poziomów ekspresji mRNA, ekspresji oraz lokalizacji białek Lhr, Fshr i Cyp19 wykazały ścisły związek pomiędzy formowaniem pęcherzyków przedowulacyjnych a luteinizacją komórek ziarnistych, zachodzącą w początkowych stadiach (24-48 godzina) hodowli *in vitro*. Badania przedstawione w niniejszej rozprawie wykazały ekspresję najważniejszych genów i białek z grupy koneksyn, tj. Cx43 i Cx45, natomiast nie wykazano ekspresji koneksyn Cx36, Cx37 i Cx40 na poziomie mRNA. Tym samym sugeruje się, iż ekspresja genów i białek z grupy koneksyn wykazuje tkankową specyficzność.

Przegląd dostępnego piśmiennictwa nie dostarcza zbyt wielu danych na temat schematu ekspresji koneksyn w komórkach ziarnistych jajnika podczas hodowli *in vitro*, skupiając się raczej na roli tych białek w poszczególnych etapach folikulo- i oogenezy. Wang i wsp. (2009) badali ekspresję tych białek w komórkach wieńca promienistego w celu określenia koneksyn(y) w głównej mierze przyczyniających się do tworzenia połączeń szczelinowych między CCs oraz możliwego związku między ich/jej ekspresją a wynikiem procedury zapłodnienia *in vitro* (IVF). Badacze wykazali ekspresję Cx43 w połączeniach szczelinowych między komórkami wieńca promienistego, nie stwierdzili oni natomiast ekspresji Cx37 w tych komórkach sugerując, że koneksyna ta występuje wyłącznie między CCs a oocytem, podobnie jak ma to miejsce u myszy. Poziom ekspresji Cx43 dodatnio korelował z jakością zarodka, a także był istotnie wyższy u pacjentek, które zaszły w ciążę, w porównaniu z pacjentkami, u których procedura IVF zakończyła się niepowodzeniem (Wang i wsp., 2009). Przytoczone badania wskazują jednoznacznie na istotną rolę koneksyn i tworzonych przez nie połączeń szczelinowych we wzajemnej interakcji pomiędzy oocytem a bezpośrednio przylegającymi komórkami wieńca promienistego. Niezwykle istotnym wynikiem jest także wykazanie dodatniej korelacji między poziomami ekspresji Cx43 w komórkach wieńca promienistego a jakością rozwijającego się zarodka.

W innych badaniach Kōks i wsp. (2010) porównywali transkryptom komórek ziarnistych występujących w płynie pęcherzykowym (FGCs, ang. *floating granulosa cells*) z transkryptomem komórek wieńca promienistego (CCs) pozyskanych od kobiet poddanych procedurze zapłodnienia *in vitro* i wykazali oni podwyższoną ekspresję *GJA1*, *GJA5* i *GJA7* (odpowiednio *Cx43*, *Cx40* i *Cx45*) w komórkach wieńca promienistego. Przytoczone wyniki badań przeprowadzonych na ludzkich jajnikowych komórkach ziarnistych oraz komórkach wieńca promienistego potwierdzają spostrzeżenia autorki o ekspresji koneksyn i obecności

połączeń typu neksus w jajniku. Autorzy badań wykazując wyższy poziom ekspresji koneksyn w komórkach wieńca promienistego sugerują tym samym obecność licznych białkowych połączeń szczelinowych tworzących się pomiędzy oocytem a otaczającymi go komórkami somatycznymi. Uzyskane wyniki wskazują na wysoką aktywność metaboliczną komórek wieńca promienistego, co prawdopodobnie ściśle koreluje z kontrolą wzrostu i dojrzewania komórki jajowej. Dlatego też, kolejne badania powinny skupiać się nad wykazaniem roli połączeń szczelinowych jako nowego markera skuteczności dojrzewania oocytu i jego zdolności do zapłodnienia. Uzyskane przez Kõks i wsp. (2010) wyniki mówiące o niższej ekspresji koneksyn w ludzkich komórkach ziarnistych występujących w płynie pęcherzykowym potwierdzają spostrzeżenia autorki uzyskane na modelu komórek ziarnistych jajników świni, wskazujące na niższy status przemian metabolicznych zachodzących w tych komórkach. Wyniki badań autorki sugerują, iż spadek ekspresji mRNA i kodowanych przez nie białek koneksynowych może być skutkiem utraty zdolności do tworzenia połączeń komórkowych przez komórki ziarniste w późniejszych stadiach hodowli pierwotnej, w porównaniu z komórkami ziarnistymi świeżo izolowanymi z przedowulacyjnych pęcherzyków Graafa. Ponadto uzyskane wyniki mogą wskazywać na obniżenie aktywności metabolicznej komórek ziarnistych, regulowanej wymianą substancji drobnocząsteczkowych pomiędzy nimi, jak również zachodzącymi zmianami fenotypowymi komórek i ich różnicowaniem się w kierunku komórek luteinowych na początkowych etapach hodowli pierwotnej *in vitro*.

Wszystkie powyższe badania własne polegały na wykorzystaniu mikroskopii konfokalnej w analizach lokalizacji białek oraz techniki qPCR w analizie ekspresji mRNA *Lhr*, *Fshr*, *Cyp19* i wybranych koneksyn (*Cx36*, *Cx37*, *Cx40*, *Cx43* i *Cx45*) na modelu krótkoterminowej hodowli pierwotnej *in vitro* jajnikowych komórek ziarnistych. Zmiany profilu transkryptomycznego oraz lokalizacja wymienionych białek wskazują na modyfikacje biochemiczne i metaboliczne, jakim podlegają te komórki w hodowli pierwotnej. Tym samym, uzyskane wyniki potwierdzają wcześniejsze badania Kossowskiej-Tomaszczuk i wsp. (2009) na modelu ludzkich jajnikowych komórek ziarnistych podlegających procesowi różnicowania się w hodowli pierwotnej. Przytoczone wyniki badań wskazują na dużą plastyczność komórek ziarnistych oraz wykazywanie przez nie cech komórek macierzystych. Dlatego też kolejnym etapem badań była analiza całego transkryptomu jajnikowych komórek ziarnistych przy wykorzystaniu techniki mikromacierzy ekspresyjnych. Mikromacierzowa analiza ekspresji genów w komórkach izolowanych z warstwy ziarnistej pęcherzyków jajnika

świni miała na celu znalezienie nowych markerów molekularnych zaangażowanych w regulację procesu proliferacji i wzrostu komórek podczas krótkoterminowej hodowli pierwotnej.

Trzy spośród wytypowanych w wyniku eksperymentu mikromacierzowego genów (*CDK1*, *MASTL* i *CDC20*) to geny odgrywające istotną rolę w przebiegu cyklu komórkowego. *CDK1* (ang. *cyclin dependent kinase 1*) jest genem kodującym białko będące podjednostką katalityczną czynnika MPF (ang. *M-phase promoting factor*), niezbędnego komórkom eukariotycznym do przejścia fazy G1/S oraz G2/M cyklu komórkowego. *CDK1* jest jedyną CDK niezbędną do „napędzania” mitozy u ssaków, co wykazano na myszach z nokautami genów *Cdk2*, *Cdk3*, *Cdk4* i *Cdk6*. Myszy te były żywe, ponieważ kinaza *Cdk1* kompensowała brak pozostałych *Cdk*, w przeciwieństwie do myszy z delecją genu *Cdk1*, u których stwierdzano wczesną śmiertelność zarodków wynikającą z niemożności podjęcia przez nie mitozy (Santamaria i wsp., 2007; Diril i wsp., 2012). Immunohistochemiczna analiza ekspresji *Cdk1* w jajnikach myszy, przeprowadzona przez Persson i wsp. (2005) wykazała, że białko to ulegało ekspresji w komórkach ziarnistych oraz oocytach na wszystkich etapach folikulogenezy.

Chociaż przez długi czas sądzono, że kompleksy białkowe *CDK1/cyklina B* wystarczają do rozpoczęcia mitozy, nowsze badania wykazały, że w procesie tym niezbędna jest również jednoczesna inaktywacja fosfatazy białkowej 2A (*PP2A*, ang. *protein phosphatase 2A*), zachodząca za pośrednictwem kinazy *MASTL* (Vigneron i wsp., 2009; Vigneron i wsp., 2016). *MASTL* (ang. *microtubule associated serine/threonine kinase like*) jest ludzkim ortologiem genu *Gwl* (ang. *greatwall*), zidentyfikowanego w 2004 roku jako ważny regulator mitozy u *Drosophila* (Yu i wsp., 2004; Voets i Wolthuis, 2010). *MASTL* odgrywa kluczową rolę w fazie M cyklu komórkowego, działając jako regulator wejścia w mitozę i jej progresji poprzez wywieranie dodatniego sprzężenia zwrotnego na białkowe kompleksy *CDK1/cyklina B*. Działanie *MASTL* polega na inaktywacji *PP2A* w czasie fazy M cyklu komórkowego, co jest niezbędne do podtrzymania wysokiej aktywności czynnika MPF (Burgess i wsp., 2010; Álvarez-Fernández i wsp., 2013). *PP2A* ponownie uzyskuje aktywność, gdy *CDK1* ulega inaktywacji podczas metafazy, do czego wymagane jest rozpoznanie cykliny B1 przez *CDC20* (ang. *cell division cycle 20*) i *APC/C* (ang. *anaphase-promoting complex/cyclosome*) (Yu H., 2007).

CDC20, białko po raz pierwszy opisane przez Weinstein i wsp. (1994) pod nazwą p55CDC, ulega powszechnej ekspresji w komórkach proliferujących. Transkrypt genu *CDC20* wykryto we wszystkich badanych liniach komórkowych podczas wykładniczej fazy ich wzrostu, a jego ekspresja zanikała, gdy komórki te poddawano chemicznej indukcji różnicowania się (Weinstein i wsp., 1994). Mansur i wsp. (2017) wykazali, że bisfenol A (BPA, ang. *bishenol A*) w dawce 20 µg/ml w sposób statystycznie istotny obniżał ekspresję *CDC20* w złuteinizowanych przyściennych komórkach ziarnistych (MGCs) w hodowli *in vitro*. Obniżoną ekspresję genu *CDC20* obserwowano również w CCs kobiet z nadwagą/otyłością (Merhi i wsp., 2015). Yamamuro i wsp. (2008) zbadali ekspresję genu *CDC20* w oocytach świni i stwierdzili, że jej poziomy rosły podczas dojrzewania oocytów i były najwyższe w momencie osiągnięcia przez te komórki stadium metafazy II.

Kolejne dwa geny, *PDE5A* (ang. *phosphodiesterase 5A*) i *PDE3A* (ang. *phosphodiesterase 3A*), to geny kodujące enzymy biorące udział w degradacji cyklicznych nukleotydów. Dzięki katalizowaniu hydrolizy cAMP i cGMP obie fosfodiesterazy stanowią ważne czynniki regulujące wewnątrzkomórkowe stężenia tych wtórnych przekazników, a co za tym idzie, ich efekty biologiczne. PDE5A jest izoformą ulegającą ekspresji w komórkach ziarnistych, cechującą się szczególną swoistością substratową wobec cGMP (Vaccari i wsp., 2009; Azevedo i wsp., 2014; Egbert i wsp., 2016). Hydrolizuje ona cGMP w komórkach ziarnistych oraz zmniejsza transfer tego cyklicznego nukleotydu do oocytu, czego skutkiem jest spontaniczne wznowienie mejozy przez oocyt (Wang i wsp., 2008; Vaccari i wsp., 2009). PDE3A natomiast ulega ekspresji w oocytach i ma zdolność hydrolizy zarówno cAMP jak i cGMP (Richard i wsp., 2001; Shitsukawa i wsp., 2001; Azevedo i wsp., 2014; Petersen i wsp., 2015).

Przeprowadzona w ramach obecnych badań analiza transkryptomu jajnikowych komórek ziarnistych wykazała statystycznie istotny spadek ekspresji *PDE5A* w każdym z trzech badanych przedziałów czasowych hodowli pierwotnej. W dostępnej literaturze liczba obserwacji dotyczących ekspresji tego genu w tkankach jajnika jest stosunkowo niewielka. Egbert i wsp. (2016) zaobserwowali, że w przedowulacyjnych pęcherzykach jajnikowych sygnał LH zwiększał aktywność PDE5 poprzez jej fosforylację, sugerując tym samym, że indukowana przez LH redukcja poziomów cGMP nie wynikała jedynie ze zmniejszenia aktywności cyklazy guanylowej. Zahamowanie aktywności PDE5 częściowo tłumilo wznowienie mejozy wywoływane przez LH, na co wskazywał rozpad otoczki jądrowej oocytu (NEBD, ang. *nuclear envelope breakdown*), lecz do całkowitego wstrzymania

odpowiedzi na LH niezbędna była inhibicja aktywności zarówno PDE5, jak również PDE1 (Egbert i wsp., 2016).

Sasseville i wsp. (2006) wykazali, że PDE3A jest główną fosfodiesterazą powodującą degradację cAMP w oocyty, która reguluje wznowienie mejozy w okresie do 3 godzin przed GVBD (ang. *germinal vesicle breakdown*). Myszy z nokautem genu *Pde3a* (*Pde3a* (-/-)) były żywe i owulowały prawidłową ilość oocytów, lecz były całkowicie niepłodne z powodu zatrzymania owulowanych oocytów w stadium pęcherzyka zarodkowego (GV, ang. *germinal vesicle*) i niemożności ich zapłodnienia (Masciarelli i wsp., 2004; Shen i wsp., 2010). Oocyty myszy *Pde3a* (-/-) nie wykazywały aktywności PDE związanej z cAMP, co skutkowało podwyższonymi poziomami cAMP, a także nie podlegały spontanicznemu dojrzewaniu *in vitro* (Masciarelli i wsp., 2004). Przeprowadzone przez Masciarelli i wsp. (2004) badania wykazały, że PDE3A odgrywa w oocytach szczególną rolę, której nie zastąpią, bądź czynnościowo nie zrekompensują inni członkowie rodziny genów *PDE*, ani też inna fosfodiesteraza należąca do rodziny PDE3, tj. PDE3B.

Uzyskane w ramach powyższej rozprawy wyniki badań wskazują na rolę receptorów hormonów gonadotropowych (Lhr i Fshr) oraz aromatazy Cyp19 w folikulogenezie i formowaniu przedowulacyjnych pęcherzyków Graafa oraz ich wpływie na indukcję procesu luteinizacji komórek ziarnistych *in vitro*. Ponadto autorka wykazała, iż ekspresja koneksyn u świni domowej wykazuje specyficzność tkankową (nie wszystkie z genów i białek z grupy analizowanych koneksyn ulegają ekspresji w komórkach ziarnistych jajnika) oraz wskazała na możliwą zależność pomiędzy ekspresją koneksyn a indukcją procesu luteinizacji komórek ziarnistych. Badania wykonane przy pomocy mikromacierzy ekspresyjnych pozwoliły autorce wyłonić grupy funkcyjne genów, których ekspresja jest specyficzna dla komórek ziarnistych. Tym samym autorka wytypowała geny (transkrypty) markerowe, które mogą odgrywać istotną rolę w regulacji wielu procesów fizjologicznych, kluczowych podczas proliferacji i wzrostu komórek ziarnistych w warunkach *in vitro*.

5.1. Ograniczenia badań

Przeprowadzone w ramach niniejszej rozprawy doktorskiej badania nie są pozbawione pewnych ograniczeń. Komórki ziarniste stanowiące materiał do badań każdorazowo pobierane były z pęcherzyków jajnikowych pochodzących od kilkudziesięciu świń, a następnie zbierane do wspólnej puli. Było to podyktowane faktem, iż ilość materiału możliwa do uzyskania od jednego zwierzęcia byłaby niewystarczająca do założenia hodowli

komórkowej, a tym samym do przeprowadzenia dalszych analiz. Z tego też względu przyjąć należy, że przeprowadzone badania mają raczej charakter populacyjny (przesiewowy) niż specyficzny osobniczo.

Ekspresję komórkową wybranych antygenów oceniano w oparciu o technikę immunofluorescencyjną, która – choć jest uznaną techniką badawczą wykorzystywaną do oceny ekspresji białek – posiada pewne ograniczenia. Wynikają one głównie z faktu, że o ile na podstawie uzyskanych wyników możliwe jest dokonanie oceny jakościowej, to trudnym jest wykonanie analiz ilościowych. By zapewnić wiarygodność prezentowanych wyników, metodologię stanowiącą podstawę analiz ekspresji wybranych antygenów uzupełniono o zastosowanie ilościowej techniki pomiaru poziomu ekspresji genów - qPCR.

Jednym z większych problemów związanych z szerszym wykorzystaniem mikromacierzy RNA w eksperymentach biologicznych jest ich koszt, dlatego też autorka przeprowadzając badania własne z wykorzystaniem tej techniki ograniczyła się do trzech przedziałów czasowych hodowli pierwotnej komórek ziarnistych. Taka kosztochłonność wykonania mikromacierzy RNA powoduje również, że liczba prób badanych w eksperymentach mikromacierzowych jest dużo niższa niż liczba testowanych zmiennych (genów). Testowanie dużej ilości zmiennych na małej liczbie prób badanych może utrudniać przeprowadzenie analizy statystycznej, jak również prowadzić do fałszywie pozytywnych lub fałszywie negatywnych wyników.

6. WNIOSKI

Na podstawie wyników przeprowadzonych badań wyciągnięto następujący wniosek główny:

1. Właściwości fizjologiczne komórek ziarnistych wynikają z ich profilu proliferacyjnego oraz zdolności do wzrostu w warunkach krótkoterminowej hodowli pierwotnej.

Wniosek ten sformułowano w oparciu o następujące wnioski szczegółowe:

1. Najwyższy poziom ekspresji genów *Lhr* i *Fshr* odnotowano w początkowych godzinach hodowli; sugeruje się zatem, że spadek ekspresji wymienionych genów w późniejszych etapach hodowli może wskazywać na obecność komórek nie w pełni złuteinizowanych. Wzrost ekspresji *Cx43* i *Cx45* w 24-48 godzinie hodowli świadczy o najwyższej aktywności metabolicznej komórek ziarnistych w tych przedziałach czasowych. Wzrost ekspresji białka aromatazy *Cyp19* w 24-48 godz. hodowli wskazuje na aktywność procesu aromatyzacji androgenów do estrogenów w komórkach ziarnistych.
2. Faza logarytmicznego wzrostu proliferacji komórek obejmowała okres pomiędzy 24 a 100 godziną hodowli; sugeruje się, że proces luteinizacji dotyczy komórek ziarnistych utrzymywanych w warunkach hodowli pierwotnej w przedziale czasowym 24-48. Przedział ten stanowi początkowy etap fazy logarytmicznego wzrostu proliferacji komórek.
3. Posługując się techniką mikromacierzy ekspresyjnych wytypowano nowe markery molekularne, tj. *CDK1*, *MASTL*, *CDC20*, *PDE3A* i *PDE5A*, których poziom ekspresji wykazuje silny związek z regulacją procesu proliferacji i wzrostu komórek ziarnistych w warunkach *in vitro*.

7. STRESZCZENIE

Najważniejszymi czynnikami regulującymi zachodzące w jajnikach podstawowe zjawiska, takie jak folikulogeneza, steroidogeneza czy owulacja, są hormony gonadotropowe (FSH i LH), a ich działanie jest możliwe dzięki ekspresji swoistych receptorów (LHR, FSHR). Funkcja endokryjna jajnika zachodzi głównie dzięki przyściennym komórkom ziarnistym, które pod wpływem gonadotropin nabywają zdolności do syntezy znacznych ilości estradiolu, co jest możliwe dzięki zachodzącej w nich ekspresji aromatazy (CYP19). Oba te zjawiska są niezbędne dla prawidłowego wzrostu i rozwoju pęcherzyków jajnikowych oraz będącej ich zwieńczeniem owulacji. W nieunaczynionej warstwie ziarnistej pęcherzyków jajnikowych ważna jest również regulacja i koordynacja metabolizmu oraz działania komórek ziarnistych, możliwa m. in. dzięki ekspresji koneksyn (Cx) tworzących rozległą sieć połączeń szczelinowych. Połączenia te umożliwiają sprzężenie poszczególnych komórek ziarnistych w rodzaj rozbudowanego i zintegrowanego czynnościowo syncytium, a także dwukierunkową komunikację między komórkami wieńca promienistego a oocytem, co jest warunkiem prawidłowego przebiegu folikulogenezy oraz nabycia przez oocyt kompetencji rozwojowej.

Głównym celem pracy było zbadanie właściwości fizjologicznych komórek ziarnistych wyrażonych ekspresją genów i białek regulujących procesy wzrostu i proliferacji tych komórek podczas krótkoterminowej hodowli pierwotnej. Cel ten zrealizowano w oparciu o następujące cele szczegółowe: (1) badanie ekspresji receptorów gonadotropin, aromatazy CYP19 oraz wybranych koneksyn w komórkach ziarnistych podczas krótkoterminowej hodowli pierwotnej; (2) określenie potencjału proliferacyjnego komórek ziarnistych w czasie rzeczywistym na modelu hodowli pierwotnej oraz (3) poszukiwanie nowych markerów molekularnych zaangażowanych w regulację procesu proliferacji i wzrostu komórek podczas krótkoterminowej hodowli pierwotnej.

Badania prowadzono na komórkach izolowanych z warstwy ziarnistej pęcherzyków jajnikowych świni domowej. Potencjał proliferacyjny komórek w trakcie hodowli pierwotnej określano przy zastosowaniu systemu do analizy komórek w czasie rzeczywistym (RTCA). Analizę ekspresji wybranych genów przeprowadzono w oparciu o metodę qPCR, natomiast do analizy ekspresji i lokalizacji wybranych białek zastosowano technikę immunofluorescencyjną. Mikromacierze ekspresyjne umożliwiły określenie ogólnego profilu ekspresji genów w komórkach ziarnistych oraz wytypowanie nowych markerów molekularnych.

Zmianie cech morfologicznych komórek ziarnistych w hodowli pierwotnej - od kształtu nieregularnie wielobocznego na początku, aż do wrzecionowatego i/lub podobnego do fibroblastów pod koniec hodowli - towarzyszył stopniowy wzrost ich proliferacji, która osiągnęła najwyższą wartość około 100 godziny hodowli.

Wykazano ekspresję następujących transkryptów w komórkach ziarnistych: *Lhr*, *Fshr*, *Cx43* oraz *Cx45*. Poziom mRNA *Lhr* był najwyższy w 48 godzinie hodowli; w kolejnych przedziałach czasowych ekspresja genu *Lhr* spadała. Podobny wzór ekspresji obserwowano w przypadku genu *Fshr*, którego ekspresja była najwyższa w 48 godzinie hodowli. Nie zaobserwowano istotnych statystycznie różnic na poziomie mRNA obu tych genów pomiędzy 24 godziną a kolejnymi przedziałami czasowymi hodowli pierwotnej ($p > 0,05$). Najwyższy poziom mRNA *Cx43* wykazano w 48 godzinie hodowli; w kolejnych przedziałach czasowych następował spadek ekspresji *Cx43*. Poziom mRNA *Cx45* był najwyższy w 24 godzinie hodowli; w pozostałych przedziałach czasowych obserwowano spadek ekspresji *Cx45*. Nie zaobserwowano istotnych statystycznie różnic na poziomie mRNA obu koneksyn (*Cx43* i *Cx45*) pomiędzy 24 godziną a kolejnymi przedziałami czasowymi hodowli pierwotnej ($p > 0,05$). W żadnym z analizowanych przedziałów czasowych hodowli pierwotnej nie wykazano ekspresji następujących transkryptów: *Cyp19*, *Cx36*, *Cx37* i *Cx40*.

Jakościowa analiza ekspresji wybranych białek w komórkach ziarnistych wykazała najwyższy poziom ekspresji *Cx36* w 24 i 48 godzinie hodowli pierwotnej; w kolejnych pięciu przedziałach czasowych hodowli obserwowano spadek ekspresji *Cx36* ($p < 0,001$). Ekspresja *Cx37* w komórkach ziarnistych utrzymywała się na porównywalnie niskim poziomie przez cały okres hodowli *in vitro*; różnice między poziomami ekspresji *Cx37* w 24 godz. hodowli i w pozostałych przedziałach czasowych nie osiągnęły istotności statystycznej. Najwyższy poziom ekspresji *Cx40* obserwowano w 24 godzinie hodowli *in vitro*. W kolejnych przedziałach czasowych wykazano statystycznie istotny spadek ekspresji tego białka ($p < 0,01$, $p < 0,001$, $p < 0,001$, $p < 0,001$, $p < 0,001$). Najwyższy poziom ekspresji *Cx43* obserwowano w 24 godzinie hodowli *in vitro*. W kolejnych przedziałach czasowych hodowli ekspresja *Cx43* spadała, osiągając poziom istotności statystycznej $p < 0,01$ w 72 i 144 godz. hodowli oraz $p < 0,001$ w 96, 120 i 168 godz. hodowli. Nie odnotowano istotnej statystycznie różnicy w poziomie ekspresji *Cx43* między 24 a 48 godziną hodowli. Najwyższy poziom ekspresji *Cx45* obserwowano w 24 godzinie hodowli *in vitro*. Spadek ekspresji *Cx45* w przedziałach czasowych 72-168 godz. osiągnął istotność statystyczną na poziomie $p < 0,001$. Nie odnotowano istotnej statystycznie różnicy w poziomie ekspresji *Cx45* między 24 a 48

godziną hodowli. Ekspresja białka *Lhr* osiągnęła najwyższy poziom w 48 godzinie hodowli *in vitro* ($p < 0,05$). W kolejnych pięciu przedziałach czasowych hodowli obserwowano spadek ekspresji *Lhr*, jednak tylko w 120 godzinie różnica ta osiągnęła istotność statystyczną ($p < 0,05$). Najwyższy poziom ekspresji białka *Fshr* wykazano w 24 godzinie hodowli *in vitro*. We wszystkich pozostałych przedziałach czasowych hodowli obserwowano spadek ekspresji *Fshr* ($p < 0,001$). Ekspresja *Cyp19* była najwyższa w 24 i 48 godzinie hodowli *in vitro*. Począwszy od 72 godziny hodowli obserwowano statystycznie istotny spadek ekspresji *Cyp19* ($p < 0,001$).

Za pomocą mikromacierzy ekspresyjnych przeanalizowano ekspresję ponad 24 tysięcy genów w trzech spośród siedmiu przedziałów czasowych hodowli pierwotnej (48 godz., 96 godz. i 144 godzina) oraz porównano ją z ekspresją genów w 24 godzinie hodowli, przy założeniu zmiany ekspresji > 2 (wzrost/spadek) oraz wartości $p < 0,05$. Wykazano zmianę ekspresji 1528 genów 48 godzinie hodowli *in vitro*, przy czym 694 geny charakteryzował wzrost ekspresji, natomiast spadek ekspresji dotyczył 834 genów. W 96 godzinie hodowli obniżeniu uległ poziom ekspresji 1213 genów, natomiast 1238 genów wykazało wzrost ekspresji. W trzecim z analizowanych przedziałów czasowych ekspresja 1023 genów uległa obniżeniu, a 844 geny wykazały wzrost ekspresji, co łącznie dało 1867 genów o zmienionych poziomach ekspresji w 144 godzinie hodowli. Dane pochodzące z mikromacierzy RNA przeanalizowano również pod kątem udziału genów w określonych procesach biologicznych, a tym samym ich współwystępowania w grupach ontologicznych (klasteryzacja). Spośród tych grup wytypowano 5 genów, których ekspresja: (1) powtarzała się w każdym z analizowanych przedziałów czasowych hodowli, oraz (2) w każdym z przedziałów czasowych geny te występowały w największej liczbie wytypowanych grup ontologicznych związanych z procesami reprodukcyjnymi. Były to: *CDK1*, *MASTL*, *CDC20*, *PDE3A* oraz *PDE5A*.

W głównym wniosku badań stwierdza się, że właściwości fizjologiczne komórek ziarnistych wynikają z ich profilu proliferacyjnego oraz zdolności do wzrostu w warunkach krótkoterminowej hodowli pierwotnej. Wnioski szczegółowe: (1) Najwyższy poziom ekspresji genów *Lhr* i *Fshr* odnotowano w początkowych godzinach hodowli; sugeruje się zatem, że spadek ekspresji wymienionych genów w późniejszych etapach hodowli może wskazywać na obecność komórek nie w pełni złuteinizowanych. Wzrost ekspresji *Cx43* i *Cx45* w 24-48 godzinie hodowli świadczy o najwyższej aktywności metabolicznej komórek ziarnistych w tych przedziałach czasowych. Wzrost ekspresji białka aromatazy *CYP19* w 24-48 godz. hodowli wskazuje na aktywność procesu aromatyzacji androgenów do estrogenów w

komórkach ziarnistych. (2) Faza logarytmicznego wzrostu proliferacji komórek obejmowała okres pomiędzy 24 a 100 godziną hodowli; sugeruje się, że proces luteinizacji dotyczy komórek ziarnistych utrzymywanych w warunkach hodowli pierwotnej w przedziale czasowym 24-48. Przedział ten stanowi początkowy etap fazy logarytmicznego wzrostu proliferacji komórek. (3) Posługując się techniką mikromacierzy ekspresyjnych wytypowano nowe markery molekularne, tj. *CDK1*, *MASTL*, *CDC20*, *PDE3A* i *PDE5A*, których poziom ekspresji wykazuje silny związek z regulacją procesu proliferacji i wzrostu komórek ziarnistych w warunkach *in vitro*.

8. ABSTRACT

The most important factors regulating basic phenomena in the ovaries, such as folliculogenesis, steroidogenesis or ovulation, are gonadotropic hormones (FSH and LH). Their action is made possible by the expression of specific receptors (LHR, FSHR). The endocrine function of the ovary occurs mainly due to the mural granulosa cells, which, under the influence of gonadotropins, acquire the ability to synthesize significant amounts of estradiol, which is possible thanks to the expression of aromatase (CYP19). Both of these phenomena are necessary for the normal growth and development of ovarian follicles, culminating in ovulation. In the non-vascularized granulosa layer of the ovarian follicles, regulation and coordination of metabolism and action of granulosa cells is also important, and is enabled by e.g. the expression of connexins (Cx) forming an extensive network of gap junction connections. These connections enable the coupling of individual granulosa cells into an extended and functionally integrated syncytium, as well as two-way communication between the cumulus oophorus cells and the oocyte, which is a prerequisite for the proper course of folliculogenesis and the acquisition of developmental competence by the oocyte.

The main objective of this study was to investigate the physiological properties of granulosa cells, manifested in the expression of genes and proteins regulating the growth and proliferation processes of these cells during short-term primary culture. This objective was achieved on the basis of the following specific objectives: (1) a study of the expression of gonadotropin receptors, CYP19 aromatase and selected connexins in granulosa cells during short-term primary culture; (2) the determination of the real-time proliferative potential of granulosa cells on the primary culture model and (3) the search for new molecular markers involved in regulation of cell proliferation and growth during short-term primary culture.

The studies were carried out on cells isolated from the granulosa layer of the ovarian follicles of domestic pig. The proliferation potential of cells during primary culture was determined using a real-time cell analysis system (RTCA). The expression analysis of selected genes was conducted using the qPCR method, while immunofluorescence was used to analyse the expression and location of selected proteins. Expression microarrays made it possible to determine the overall profile of gene expression in granular cells and to identify new molecular markers.

The change in the morphological characteristics of granulosa cells in primary culture - from irregularly polygonal shape at the beginning to spindle-shaped and/or fibroblast-like at the end of culture - was accompanied by a gradual increase in their proliferation, which reached a peak value around the 100th hour of culture.

The following transcripts were expressed in granulosa cells: *Lhr*, *Fshr*, *Cx43* and *Cx45*. The levels of *Lhr* were the highest in the 48th hour of culture, in subsequent time intervals its expression declined. A similar pattern of expression was observed for the *Fshr* gene, whose expression was highest at 48 hours of culture. There were no statistically significant differences in the mRNA levels of the two genes between 24 hours and subsequent primary culture time intervals ($p > 0.05$). The highest level of *Cx43* mRNA was demonstrated at 48 hours of culture; with a decrease in *Cx43* expression in subsequent time intervals. No statistically significant differences in the mRNA levels of the two connexins (*Cx43* and *Cx45*) were observed between 24 hours and next stages of primary culture ($p > 0.05$). The following transcripts were not expressed in any of the primary culture time intervals analyzed: *Cyp19*, *Cx36*, *Cx37* and *Cx40*.

Qualitative analysis of the expression of selected proteins in granulosa cells showed the highest level of *Cx36* expression at 24 and 48 hours of primary culture; a decrease in *Cx36* expression ($p < 0.001$) was observed in the next five culture time intervals. The expression of *Cx37* in granulosa cells remained at a comparably low level throughout the *in vitro* culture period; differences between *Cx37* expression levels at 24 hour of culture and other time intervals did not reach statistical significance. The highest level of *Cx40* expression was observed at 24h of *in vitro* culture. Subsequent time intervals showed a statistically significant decrease in this protein's expression ($p < 0.01$, $p < 0.001$, $p < 0.001$, $p < 0.001$, $p < 0.001$, $p < 0.001$). The highest level of *Cx43* expression was observed at 24h *in vitro* culture. In subsequent culture time intervals, *Cx43* expression declined, reaching the level of statistical significance ($p < 0.01$) at 72 and 144 culture hours and $p < 0.001$ in 96, 120 and 168 culture hours. There was no statistically significant difference in *Cx43* expression between 24 and 48 hours of culture. The highest level of *Cx45* expression was observed at 24 hours of *in vitro* culture. The decrease in *Cx45* expression over the 72-168 hour interval reached a statistical significance of $p < 0.001$. There was no statistically significant difference in *Cx45* expression between 24 and 48 hours of culture. *Lhr* protein expression peaked at 48 hours of *in vitro* culture ($p < 0.05$). A decrease in *Lhr* expression was observed in the next five culture time intervals, but only at 120 hours the difference reached statistical significance ($p < 0.05$). The

highest level of *Fshr* protein expression was demonstrated at 24h of *in vitro* culture. A decrease in *Fshr* expression ($p < 0.001$) was observed in all other culture time intervals. *Cyp19* expression was the highest at 24 and 48 hours of *in vitro* culture. Starting at 72 hours of culture, a statistically significant decrease in *Cyp19* expression ($p < 0.001$) was observed.

Expression microarrays analyzed the expression of more than 24000 genes in three of the seven primary culture time intervals (48 hours, 96 hours and 144 hours) and compared it with gene expression at 24 hours of culture, assuming a change in expression of >2 (increase/decrease) and $p < 0.05$ as statistically significant. A change in the expression of 1,528 genes was shown at 48 hours of *in vitro* culture, with 694 genes characterized by an increase in expression, while the decrease in expression was observed in 834 genes. At 96 hours of culture, 1213 genes were expressed, while 1238 genes showed an increase in expression. In the third time frame analyzed, the expression of 1023 genes was reduced and 844 genes showed an increase in expression, giving a total of 1867 genes with altered expression levels at 144 hours of culture. Data from RNA microarrays were also analyzed for gene participation in specific biological processes and thus their contribution to ontological groups (clusterization). Of these groups, 5 genes were selected whose expression: (1) was repeated in each of the culture time intervals analyzed, and (2) in each time interval, these genes were found in the largest number of selected ontological groups associated with reproductive processes. These were *CDK1*, *MASTL*, *CDC20*, *PDE3A* and *PDE5A*.

The study concludes that the physiological properties of granulosa cells are possible due to their proliferation profile and their ability to grow under short-term primary culture conditions. Specific conclusions: (1) The highest levels of *Lhr* and *Fshr* gene expression was recorded in the initial culture hours; it is therefore suggested that a decrease in the expression of these genes in the later stages of culture may indicate the presence of cells that are not fully luteinized. The increase in *Cx43* and *Cx45* expression at 24-48 hours of culture indicates the highest metabolic activity of granulosa cells in these time intervals. The increase in expression of the CYP19 aromatase protein in 24-48 hours of culture indicates the activity of the process of androgen aromatization to estrogen in granulosa cells. (2) The logarithmic growth phase of cell proliferation covered a period between 24 and 100 hours of culture; it is suggested that the luteinization process concerns granulosa cells maintained under primary culture conditions within a time frame of 24-48 hours of culture. Hence, this interval is the initial stage of the logarithmic phase of cell proliferative growth. (3) Using the expression microarray technique, new molecular markers have been selected, namely *CDK1*, *MASTL*,

CDC20, *PDE3A* and *PDE5A*, the level of expression of which has a strong link with the regulation of proliferation and growth of *in vitro* cultured granulosa cells.

9. PIŚMIENICTWO

Abdennebi L., Monget P., Pisselet C., Remy J.J. i wsp. Comparative expression of luteinizing hormone and follicle-stimulating hormone receptors in ovarian follicles from high and low prolific sheep breeds. *Biol Reprod.* 1999; 60: 845-854.

Ackert C.L., Gittens J.E., O'Brien M.J., Eppig J.J., Kidder G.M. Intercellular communication via connexin43 gap junctions is required for ovarian folliculogenesis in the mouse. *Dev Biol.* 2001; 233: 258-270.

Álvarez-Fernández M., Sánchez-Martínez R., Sanz-Castillo B., Gan P.P. i wsp. Greatwall is essential to prevent mitotic collapse after nuclear envelope breakdown in mammals. *Proc Natl Acad Sci USA.* 2013; 110: 17374-17379.

Areekijseeree M., Chuen-Im T. Effects of porcine follicle stimulating hormone, luteinizing hormone and estradiol supplementation in culture medium on ultrastructures of porcine cumulus oocyte complexes (pCOCs). *Micron.* 2012; 43: 251-257.

Areekijseeree M., Vejaratpimol R. In vivo and in vitro study of porcine oviductal epithelial cells, cumulus oocyte complexes and granulosa cells: a scanning electron microscopy and inverted microscopy study. *Micron.* 2006; 37: 707-716.

Azevedo M.F., Faucz F.R., Bimpaki E., Horvath A. i wsp. Clinical and molecular genetics of the phosphodiesterases (PDEs). *Endocr Rev.* 2014; 35: 195-233.

Baldrige D., Lecanda F., Shin C.S., Stains J., Civitelli R. Sequence and structure of the mouse connexin45 gene. *Biosci Rep.* 2001; 21: 683-689.

Bargiello T.A., Tang Q., Oh S., Kwon T. Voltage-dependent conformational changes in connexin channels. *Biochim Biophys Acta.* 2012; 1818: 1807-1822.

Barr L., Dewey M.M., Berger W. Propagation of action potentials and the structure of the nexus in cardiac muscle. *J Gen Physiol.* 1965; 48: 797-823.

Bédécarrats G.Y, Kaiser U.B. Differential regulation of gonadotropin subunit gene promoter activity by pulsatile gonadotropin-releasing hormone (GnRH) in perfused L beta T2 cells: role of GnRH receptor concentration. *Endocrinology.* 2003; 144: 1802-1811.

Belchetz P.E., Plant T.M., Nakai Y., Keogh E.J., Knobil E. Hypophysial responses to continuous and intermittent delivery of hypothalamic gonadotropin-releasing hormone. *Science.* 1978; 202: 631-633.

Belluardo N., Trovato-Salinaro A., Mudo G., Hurd Y.L., Condorelli D.F. Structure, chromosomal localization, and brain expression of human Cx36 gene. *J Neurosci Res.* 1999; 57: 740-752.

Bennett M.V., Zulin R.S. Electrical coupling and neuronal synchronization in the Mammalian brain. *Neuron.* 2004; 41: 495-511.

Berisha B., Bridger P., Toth A., Kliem H. i wsp. Expression and localization of gap junctional connexins 26 and 43 in bovine periovulatory follicles and in corpus luteum during different functional stages of oestrous cycle and pregnancy. *Reprod Domest Anim.* 2009; 44: 295-302.

- Bevans C.G., Harris A.L. Direct high affinity modulation of connexin channel activity by cyclic nucleotides. *J Biol Chem.* 1999; 274: 3720–3372
- Borowczyk E., Johnson M.L., Bilski J.J., Bilaska M.A. i wsp. Role of gap junctions in regulation of progesterone secretion by ovine luteal cells in vitro. *Reproduction.* 2007; 133: 641-651.
- Borowczyk E., Johnson M.L., Bilski J.J., Borowicz P.P. i wsp. Expression of gap junctional connexins 26, 32, and 43 mRNA in ovarian preovulatory follicles and corpora lutea in sheep. *Can J Physiol Pharmacol.* 2006; 84: 1011-1020.
- Bosco D., Haefliger J.A., Meda P. Connexins: key mediators of endocrine function. *Physiol Rev.* 2011; 91: 1393-1445.
- Braun T., Schofield P.R., Sprengel R. Amino-terminal leucine-rich repeats in gonadotropin receptors determine hormone selectivity. *EMBO J.* 1991; 10: 1885-1890.
- Braw-Tal R., Yossefi S. Studies in vivo and in vitro on the initiation of follicle growth in the bovine ovary. *J Reprod Fertil.* 1997; 109: 165-171.
- Britt K.L., Drummond A.E., Cox V.A., Dyson M. i wsp. An age-related ovarian phenotype in mice with targeted disruption of the Cyp 19 (aromatase) gene. *Endocrinology.* 2000; 141: 2614-2623.
- Britt K.L., Drummond A.E., Dyson M., Wreford N.G. i wsp. The ovarian phenotype of the aromatase knockout (ArKO) mouse. *J Steroid Biochem Mol Biol.* 2001; 79: 181-185.
- Bukovský A., Chen T.T., Wimalasena J., Caudle M.R. Cellular localization of luteinizing hormone receptor immunoreactivity in the ovaries of immature, gonadotropin-primed and normal cycling rats. *Biol Reprod.* 1993; 48: 1367-1382.
- Bulun S.E. Physiology and pathology of the female reproductive axis. W: Melmed S., Polonsky K.S., Larsen P.R., Kronenberg H.M. Williams Textbook of Endocrinology, 12th edition. Elsevier Saunders, Philadelphia, 2011, 582.
- Bulun S.E., Sebastian S., Takayama K., Suzuki T. i wsp. The human CYP19 (aromatase P450) gene: update on physiologic roles and genomic organization of promoters. *J Steroid Biochem Mol Biol.* 2003; 86: 219-224.
- Bulun S.E., Takayama k., Suzuki T., Sasano H. i wsp. Organization of the human aromatase p450 (CYP19) gene. *Semin Reprod Med.* 2004; 22: 5-9.
- Burger L.L., Haisenleder D.J., Aylor K.W., Marshall J.C. Regulation of intracellular signaling cascades by GnRH pulse frequency in the rat pituitary: roles for CaMK II, ERK, and JNK activation. *Biol Reprod.* 2008; 79: 947-953.
- Burgess A., Vigneron S., Brioude E., Labbé J.C. i wsp. Loss of human Greatwall results in G2 arrest and multiple mitotic defects due to deregulation of the cyclin B-Cdc2/PP2A balance. *Proc Natl Acad Sci USA.* 2010; 107: 12564-12569.
- Burns K.H., Yan C., Kumar T.R., Matzuk M.M. Analysis of ovarian gene expression in follicle-stimulating hormone beta knockout mice. *Endocrinology.* 2001; 142: 2742-2751.

- Camp T.A., Rahal J.O., Mayo K.E. Cellular localization and hormonal regulation of follicle-stimulating hormone and luteinizing hormone receptor messenger RNAs in the rat ovary. *Mol Endocrinol.* 1991; 5: 1405-1417.
- Carabatsos M.J., Sellitto C., Goodenough D.A., Albertini D.F. Oocyte-granulosa cell heterologous gap junctions are required for the coordination of nuclear and cytoplasmic meiotic competence. *Dev Biol.* 2000; 226: 167-179.
- Cárdenas H., Pope W.F. Androgen receptor and follicle-stimulating hormone receptor in the pig ovary during the follicular phase of the estrous cycle. *Mol Reprod Dev.* 2002; 62: 92-98.
- Carroll R.S., Corrigan A.Z., Vale W., Chin WW. Activin stabilizes follicle-stimulating hormone-beta messenger ribonucleic acid levels. *Endocrinology.* 1991; 129: 1721-1726.
- Cash J.N., Rejon C.A., McPherron A.C., Bernard D.J., Thompson T.B. The structure of myostatin:follistatin 288: insights into receptor utilization and heparin binding. *EMBO J.* 2009; 28: 2662-2676.
- Chang A.S., Dale A.N., Moley K.H. Maternal diabetes adversely affects preovulatory oocyte maturation, development, and granulosa cell apoptosis. *Endocrinology.* 2005; 146: 2445-2453.
- Chen S.A., Besman M.J., Sparkes R.S., Zollman S. i wsp. Human aromatase: cDNA cloning, Southern blot analysis, and assignment of the gene to chromosome 15. *DNA.* 1988; 7: 27-38.
- Cheng Y., Inoue N., Matsuda-Minehata F., Goto Y. i wsp. Changes in expression and localization of connexin 43 mRNA and protein in porcine ovary granulosa cells during follicular atresia. *J Reprod Dev.* 2005; 51: 627-637.
- Cherian P.P., Siller-Jackson A.J., Gu S., Wang X. i wsp. Mechanical strain opens connexin 43 hemichannels in osteocytes: a novel mechanism for the release of prostaglandin. *Mol Biol Cell.* 2005; 16: 3100-3106.
- Choi I., Simmen R.C., Simmen F.A. Molecular cloning of cytochrome P450 aromatase complementary deoxyribonucleic acid from periimplantation porcine and equine blastocysts identifies multiple novel 5'-untranslated exons expressed in embryos, endometrium, and placenta. *Endocrinology.* 1996; 137: 1457-1467.
- Chomczynski P., Sacchi N. Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction. *Anal Biochem.* 1987; 162: 156-159.
- Christenson L.K., Gunewardena S., Hong X., Spitschak M. i wsp. Research resource: preovulatory LH surge effects on follicular theca and granulosa transcriptomes. *Mol Endocrinol.* 2013; 27: 1153-1171.
- Chronowska E., Tománek M., Kott T. Effect of aromatase inhibitor (fadrazole) on proliferation, estradiol production and telomerase activity in pig granulosa cells in vitro. *Czech J Anim Sci.* 2009; 54: 566-574.
- Ciesiółka S., Budna J., Jopek K., Bryja A. i wsp. Time- and dose-dependent effects of 17 beta-estradiol on short-term, real-time proliferation and gene expression in porcine granulosa cells. *Biomed Res Int.* 2017; 9738640.
- Conley A., Hinshelwood M. Mammalian aromatases. *Reproduction.* 2001; 121: 685-695.

- Conley A.J., Corbin C.J., Hinshelwood M.M., Liu Z. i wsp. Functional aromatase expression in porcine adrenal gland and testis. *Biol Reprod.* 1996; 54: 497-505.
- Corbin C.J., Berger T., Ford J.J., Roselli C.E. i wsp. Porcine hypothalamic aromatase cytochrome P450: isoform characterization, sex-dependent activity, regional expression, and regulation by enzyme inhibition in neonatal boars. *Biol Reprod.* 2009; 81: 388-395.
- Corbin C.J., Khalil M.W., Conley A.J. Functional ovarian and placental isoforms of porcine aromatase. *Mol Cell Endocrinol.* 1995; 113: 29-37.
- Corbin C.J., Trant J.M., Conley A.J. Porcine gonadal and placental isozymes of aromatase cytochrome P450: sub-cellular distribution and support by NADPH-cytochrome P450 reductase. *Mol Cell Endocrinol.* 2001; 172: 115-124.
- Corbin C.J., Trant J.M., Walters K.W., Conley A.J. Changes in testosterone metabolism associated with the evolution of placental and gonadal isozymes of porcine aromatase cytochrome P450. *Endocrinology.* 1999; 140: 5202-5210.
- Coss D., Thackray V.G., Deng C.X., Mellon P.L. Activin regulates luteinizing hormone beta-subunit gene expression through Smad-binding and homeobox elements. *Mol Endocrinol.* 2005; 19: 2610-2623.
- Cui J. Shen Y., Li R. Estrogen synthesis and signaling pathways during aging: from periphery to brain. *Trends Mol Med.* 2013; 19:197-209.
- Davis J.S., Weakland L.L., Farese R.V., West L.A. Luteinizing hormone increases inositol trisphosphate and cytosolic free Ca²⁺ in isolated bovine luteal cells. *J Biol Chem.* 1987; 262: 8515-8521.
- Dekel N. Regulation of oocyte maturation. The role of cAMP. *Ann NY Acad Sci.* 1988; 541: 211-216.
- Demura M., Reierstad S., Innes J.E., Bulun S.E. Novel promoter I.8 and promoter usage in the CYP19 (aromatase) gene. *Reprod Sci.* 2008; 15: 1044-1053.
- Diaz F.J., Wigglesworth K., Eppig J.J. Oocytes determine cumulus cell lineage in mouse ovarian follicles. *J Cell Sci.* 2007; 120: 1330-1340.
- Dierich A., Sairam M.R., Monaco L., Fimia G.M. i wsp. Impairing follicle-stimulating hormone (FSH) signaling in vivo: targeted disruption of the FSH receptor leads to aberrant gametogenesis and hormonal imbalance. *Proc Natl Acad Sci USA.* 1998; 95: 13612-13617.
- Diril M.K., Ratnacaram C.K., Padmakumar V.C., Du T. i wsp. Cyclin-dependent kinase 1 (Cdk1) is essential for cell division and suppression of DNA replication but not for liver regeneration. *Proc Natl Acad Sci USA.* 2012; 109: 3826-3831.
- Durlej M., Knapczyk-Stwora K., Duda M., Galas J., Slomczynska M. The expression of FSH receptor (FSHR) in the neonatal porcine ovary and its regulation by flutamide. *Reprod Domest Anim.* 2011; 46: 377-384.
- Edson M.A., Nagaraja A.K., Matzuk M.M. The mammalian ovary from genesis to revelation. *Endocr Rev.* 2009; 30: 624-712.

- Egbert J.R., Uliasz T.F., Shuhaibar L.C., Geerts A. i wsp. Luteinizing hormone causes phosphorylation and activation of the cGMP phosphodiesterase PDE5 in rat ovarian follicles, contributing, together with PDE1 activity, to the resumption of meiosis. *Biol Reprod.* 2016; 94: 110.
- Elenes S., Martinez A.D., Delmar M., Beyer E.C., Moreno A.P. Heterotypic docking of Cx43 and Cx45 connexons blocks fast voltage gating of Cx43. *Biophys J.* 2001; 81: 1406-1418.
- Elvin J.A., Yan C., Wang P., Nishimori K., Matzuk M.M. Molecular characterization of the follicle defects in the growth differentiation factor 9-deficient ovary. *Mol Endocrinol.* 1999; 13: 1018-1034.
- Eppig J.J. Intercommunication between mammalian oocytes and companion somatic cells. *Bioessays.* 1991; 13: 569-574.
- Eppig J.J., O'Brien M., Wigglesworth K. Mammalian oocyte growth and development in vitro. *Mol Reprod Dev.* 1996; 44: 260-273.
- Eppig J.J., Pendola F.L., Wigglesworth K. Mouse oocytes suppress cAMP-induced expression of LH receptor mRNA by granulosa cells in vitro. *Mol Reprod Dev.* 1998; 49: 327-332.
- Eppig J.J., Wigglesworth K., Pendola F., Hirao Y. Murine oocytes suppress expression of luteinizing hormone receptor messenger ribonucleic acid by granulosa cells. *Biol Reprod.* 1997; 56: 976-984.
- Fernández-Vázquez G., Kaiser U.B., Albarracin C.T., Chin W.W. Transcriptional activation of the gonadotropin-releasing hormone receptor gene by activin A. *Mol Endocrinol.* 1996; 10:356-366.
- Ferris H.A, Shupnik M.A. Mechanisms for pulsatile regulation of the gonadotropin subunit genes by GNRH1. *Biol Reprod.* 2006; 74: 993-998.
- Fevold H.L. Synergism of follicle stimulating and luteinizing hormones in producing estrogen secretion. *Endocrinology.* 1941; 28: 33-36.
- Fiddes J.C., Goodman H.M. The gene encoding the common alpha subunit of the four human glycoprotein hormones. *J Mol Appl Genet.* 1981; 1: 3-18.
- Fisher C.R., Graves K.H., Parlow A.F., Simpson E.R. Characterization of mice deficient in aromatase (ArKO) because of targeted disruption of the cyp19 gene. *Proc Natl Acad Sci USA.* 1998; 95: 6965-6970.
- Fitzpatrick S.L., Carlone D.L., Robker R.L., Richards J.S. Expression of aromatase in the ovary: down-regulation of mRNA by the ovulatory luteinizing hormone surge. *Steroids.* 1997; 62: 197-206.
- Fitzpatrick S.L., Richards J.S. Regulation of cytochrome P450 aromatase messenger ribonucleic acid and activity by steroids and gonadotropins in rat granulosa cells. *Endocrinology.* 1991; 129: 1452-1462.
- Forge A., Becker D., Casalotti S., Edwards J. i wsp. Gap junctions in the inner ear: comparison of distribution patterns in different vertebrates and assesment of connexin composition in mammals. *J Comp Neurol.* 2003; 467: 207-231.

- Foxcroft G.R., Hunter M.G. Basic physiology of follicular maturation in the pig. *J Reprod Fertil Suppl.* 1985; 33: 1-19.
- Francis R.J., Lo C.W. Primordial germ cell deficiency in the connexin 43 knockout mouse arises from apoptosis associated with abnormal p53 activation. *Development.* 2006; 133: 3451-3460.
- Gabriel H.D., Jung D., Bützler C., Temme A. i wsp. Transplacental uptake of glucose is decreased in embryonic lethal connexin26-deficient mice. *J Cell Biol.* 1998; 140: 1453-1461.
- Ghosh D., Griswold J., Erman M., Pangborn W. X-ray structure of human aromatase reveals an androgen-specific active site. *J Steroid Biochem Mol Biol.* 2010; 118: 197-202.
- Gieske M.C., Kim H.J., Legan S.J., Koo Y. i wsp. Pituitary gonadotroph estrogen receptor-alpha is necessary for fertility in females. *Endocrinology.* 2008; 149: 20-27.
- Gittens J.E., Barr K.J., Vanderhyden B.C., Kidder G.M. Interplay between paracrine signaling and gap junctional communication in ovarian follicles. *J Cell Sci.* 2005; 118: 113-122.
- Goldberg G.S., Lampe P.D., Nicholson B.J. Selective transfer of endogenous metabolites through gap junctions composed of different connexins. *Nat Cell Biol.* 1999; 1: 457-459.
- Goodenough D.A., Paul D.L. Beyond the gap: functions of unpaired connexon channels. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 2003; 4: 285-294.
- Goodman R.L. Neural systems mediating the negative feedback actions of estradiol and progesterone in the ewe. *Acta Neurobiol Exp (Wars).* 1996; 56: 727-741.
- Graddy L.G., Kowalski A.A., Simmen F.A., Davis F.A i wsp. Multiple isoforms of porcine aromatase are encoded by three distinct genes. *J Steroid Biochem Mol Biol.* 2000; 73: 49-57.
- Grazul-Bilska A.T., Reynolds L.P., Bilski J.J., Redmer D.A. Effects of second messengers on gap junctional intercellular communication of ovine luteal cells throughout the estrous cycle. *Biol Reprod.* 2001; 65: 777-783.
- Grazul-Bilska A.T., Reynolds L.P., Kirsch J.D., Redmer D.A. Gap junctional intercellular communication of bovine luteal cells from several stages of the estrous cycle: effects of cyclic adenosine 3',5'-monophosphate. *Biol Reprod.* 1996; 54: 538-545.
- Gudermann T., Nichols C., Levy F.O., Birnbaumer M., Birnbaumer L. Ca²⁺ mobilization by the LH receptor expressed in *Xenopus* oocytes independent of 3',5'-cyclic adenosine monophosphate formation: evidence for parallel activation of two signaling pathways. *Mol Endocrinol.* 1992; 6: 272-278.
- Haisenleder D.J., Burger L.L., Walsh H.E., Stevens J. i wsp. Pulsatile gonadotropin-releasing hormone stimulation of gonadotropin subunit transcription in rat pituitaries: evidence for the involvement of Jun N-terminal kinase but not p38. *Endocrinology.* 2008; 149: 139-145.
- Haisenleder D.J., Dalkin A.C., Ortolano G.A., Marshall J.C., Shupnik M.A. A pulsatile gonadotropin-releasing hormone stimulus is required to increase transcription of the gonadotropin subunit genes: evidence for differential regulation of transcription by pulse frequency in vivo. *Endocrinology.* 1991; 128: 509-517.

- Han L., Wu C., Riaz H., Bai L. i wsp. Characterization of the mechanism of inhibin α -subunit gene in mouse anterior pituitary cells by RNA interference. *PloS One*. 2013; 8: e74596.
- Hardy K., Fenwick M., Mora J., Laird M. i wsp. Onset and heterogeneity of responsiveness to FSH in mouse preantral follicles in culture. *Endocrinology*. 2017; 158: 134-147.
- Harris S.M., Aschenbach L.C., Skinner S.M., Dozier B.L., Duffy D.M. Prostaglandin E2 receptors are differentially expressed in subpopulations of granulosa cells from primate periovulatory follicles. *Biol Reprod*. 2011; 85: 916-923.
- Hattori K., Orisaka M., Fukuda S., Tajima K. i wsp. Luteinizing hormone facilitates antral follicular maturation and survival via thecal paracrine signaling in cattle. *Endocrinology*. 2018; 159: 2337-2347.
- Hatzirodos N., Hummitzsch K., Irving-Rodgers H.R., Rodgers R.J. Transcriptome comparisons identify new cell markers for theca interna and granulosa cells from small and large antral ovarian follicles. *PLoS One*. 2015; 10: e0119800.
- Heckert L.L., Daley I.J., Griswold M.D. Structural organization of the follicle-stimulating hormone receptor gene. *Mol Endocrinol*. 1992; 6: 70-80.
- Hennet M.L., Combelles C.M. The antral follicle: a microenvironment for oocyte differentiation. *Int J Dev Biol*. 2012; 56: 819-831.
- Herve J.C., Derangeon M., Sarrouilhe D., Giepmans B.N., Bourmeyster N. Gap junctional channels are parts of multiprotein complexes. *Biochim Biophys Acta*. 2012; 1818: 1844-1865.
- Hickey G.J., Chen S.A., Besman M.J., Shively J.E. i wsp. Hormonal regulation, tissue distribution, and content of aromatase cytochrome P450 messenger ribonucleic acid and enzyme in rat ovarian follicles and corpora lutea: relationship to estradiol biosynthesis. *Endocrinology*. 1988; 122: 1426-1436.
- Hong Y., Li H., Yuan Y.C., Chen S. Molecular characterization of aromatase. *Ann N Y Acad Sci*. 2009; 1155: 112-120.
- Hummitzsch K., Irving-Rodgers H.F., Hatzirodos N., Bonner W. i wsp. A new model of development of the mammalian ovary and follicles. *PLoS One*. 2013; 8: e55578.
- Itahana K., Morikazu Y., Takeya T. Differential expression of four connexin genes, Cx-26, Cx-30.3, Cx-32, and Cx-43, in the porcine ovarian follicle. *Endocrinology*. 1996; 137: 5036-5044.
- Jacob A., Beyer E.C. Mouse connexin 45: genomic cloning and exon usage. *DNA Cell Biol*. 2001; 20: 11-19.
- Jeppesen J.V., Kristensen S.G., Nielsen M.E., Humaidan P. i wsp. LH-receptor gene expression in human granulosa and cumulus cells from antral and preovulatory follicles. *J Clin Endocrinol Metab*. 2012; 97: E1524-1531.
- Johnson M.L., Redmer D.A., Reynolds L.P., Grazul-Bilska A.T. Expression of gap junctional proteins connexin 43, 32, and 26 throughout follicular development and atresia in cows. *Endocrine*. 1999; 10: 43-51.

- Juneja S.C., Barr K.J., Enders G.C., Kidder G.M. Defects in the germ line and gonads of mice lacking connexin43. *Biol Reprod.* 1999; 60: 1263-1270.
- Kaiser U.B., Jakubowiak A., Steinberger A., Chin W.W. Differential effects of gonadotropin-releasing hormone (GnRH) pulse frequency on gonadotropin subunit and GnRH receptor messenger ribonucleic acid levels in vitro. *Endocrinology.* 1997; 138: 1224-1231.
- Ke F.C., Fang S.H., Lee M.T., Sheu S.Y. i wsp. Lindane, a gap junction blocker, suppresses FSH and transforming growth factor beta1-induced connexin43 gap junction formation and steroidogenesis in rat granulosa cells. *J Endocrinol.* 2005; 184: 555-566.
- Kempisty B., Ziółkowska A., Ciesiółka S., Piotrowska H. i wsp. Study on connexin gene and protein expression and cellular distribution in relation to real-time proliferation of porcine granulosa cells. *J Biol Regul Homeost Agents.* 2014; 28: 625-635.
- Khan-Dawood F.S., Yang J., Dawood M.Y. Expression of gap junction protein connexin-43 in the human and baboon (*Papio anubis*) corpus luteum. *J Clin Endocrinol Metab.* 1996; 81: 835-842.
- Khan-Dawood F.S., Yang J., Dawood M.Y. Hormonal regulation of connexin-43 in baboon corpora lutea. *J Endocrinol.* 1998; 157: 405-414.
- Kimura N., Konno Y., Miyoshi K., Matsumoto H., Sato E. Expression of hyaluronan synthases and CD44 messenger RNAs in porcine cumulus-oocyte complexes during in vitro maturation. *Biol Reprod.* 2002; 66: 707-717.
- Knight P.G. Roles of inhibins, activins, and follistatin in the female reproductive system. *Front Neuroendocrinol.* 1996; 17: 476-509.
- Köks S., Velthut A., Sarapik A., Altmäe S. i wsp. The differential transcriptome and ontology profiles of floating and cumulus granulosa cells in stimulated human antral follicles. *Mol Hum Reprod.* 2010; 16: 229-240.
- Kossowska-Tomaszczuk K., De Geyter C., De Geyter M., Martin I. i wsp. The multipotency of luteinizing granulosa cells collected from mature ovarian follicles. *Stem Cells.* 2009; 27: 210-219.
- Krysko D.V., Mussche S., Leybaert L., D'Herde K. Gap junctional communication and connexin43 expression in relation to apoptotic cell death and survival of granulosa cells. *J Histochem Cytochem.* 2004; 52: 1199-1207.
- Kumar N.M., Gilula N.B. The gap junction communication channel. *Cell.* 1996; 84: 381-388.
- Kumar T.R., Wang Y., Lu N., Matzuk M.M. Follicle stimulating hormone is required for ovarian follicle maturation but not male fertility. *Nat Genet.* 1997; 15: 201-204.
- La Barbera A.R. Follicle-stimulating hormone (FSH) receptors and FSH-responsive adenosine 3',5'-cyclic monophosphate production in porcine granulosa cells decline with follicular growth. *Endocr Res.* 1994; 20: 65-77.
- Lan R.X., Liu F., He Z.B., Chen C. i wsp. Immunolocalization of GnRHRI, gonadotropin receptors, PGR, and PGRMCI during follicular development in the rabbit ovary. *Theriogenology.* 2014; 81: 1139-1147.

- LaPolt P.S., Oikawa M., Jia X.C., Dargan C., Hsueh A.J. Gonadotropin-induced up- and down-regulation of rat ovarian LH receptor message levels during follicular growth, ovulation and luteinization. *Endocrinology*. 1990; 126: 3277-3279.
- Lautincik J., Kolodzieyski L., Elias V., Hyttel P. i wsp. Immunocytochemical localization of aromatase in the ovary of superovulated cattle, pigs and sheep. *Acta Vet Scand*. 1994; 35: 185-191.
- Layman L.C., Lee E.J., Peak D.B., Namnoum A. B. i wsp. Delayed puberty and hypogonadism caused by mutations in the follicle-stimulating hormone beta-subunit gene. *N Engl J Med*. 1997; 337: 607-611.
- Lee L., Asada H., Kizuka F., Tamura I. i wsp. Changes in histone modification and DNA methylation of the StAR and Cyp19a1 promoter regions in granulosa cells undergoing luteinization during ovulation in rats. *Endocrinology*. 2013; 154: 458-470.
- Lei Z.M., Mishra S., Zou W., Xu B. i wsp. Targeted disruption of luteinizing hormone/human chorionic gonadotropin receptor gene. *Mol Endocrinol*. 2001; 15: 184-200.
- Lewis K.A., Gray P.C., Blount A.L., MacConell L.A. i wsp. Betaglycan binds inhibin and can mediate functional antagonism of activin signalling. *Nature*. 2000; 404: 411-414.
- Li R., Norman R.J., Armstrong D.T., Gilchrist R.B. Oocyte-secreted factor(s) determine functional differences between bovine mural granulosa cells and cumulus cells. *Biol Reprod*. 2000; 63: 839-845.
- Liew S.H., Drummond A.E., Jones M.E., Findlay J.K. The lack of estrogen and excess luteinizing hormone are responsible for the female ArKO mouse phenotype. *Mol Cell Endocrinol*. 2010; 327: 56-64.
- Lindeberg M., Carlström K., Ritvos O., Hovatta O. Gonadotrophin stimulation of non-luteinized granulosa cells increases steroid production and the expression of enzymes involved in estrogen and progesterone synthesis. *Hum Reprod*. 2007; 22: 401-406.
- Ling N., Ying S.Y., Ueno N., Esch F. i wsp. Isolation and partial characterization of a Mr 32,000 protein with inhibin activity from porcine follicular fluid. *Proc Natl Acad Sci USA*. 1985; 82: 7217-7221.
- Liu J., Aronow B.J., Witte D.P., Pope W.F., La Barbera A.R. Cyclic and maturation-dependent regulation of follicle-stimulating hormone receptor and luteinizing hormone receptor messenger ribonucleic acid expression in the porcine ovary. *Biol Reprod*. 1998; 58: 648-658.
- Lu D.L., Peegel H., Mosier S.M., Menon K.M. Loss of lutropin/human choriogonadotropin receptor messenger ribonucleic acid during ligand-induced down-regulation occurs post transcriptionally. *Endocrinology*. 1993; 132: 235-240.
- Lucci C.M., Silva R.V., Carvalho C.A., Figueiredo R., Bão N. Light microscopical and ultrastructural characterization of goat preantral follicles. *Small Rumin Res*. 2001; 41: 61-69.
- Magoffin D.A. Ovarian theca cell. *Int J Biochem Cell Biol*. 2005; 37: 1344-1349.

- Mahendroo M.S., Mendelson C.R., Simpson E.R. Tissue-specific and hormonally controlled alternative promoters regulate aromatase cytochrome P450 gene expression in human adipose tissue. *J Biol Chem.* 1993; 268: 19463-19470.
- Maman E., Yung Y., Kedem A., Yerushalmi G.M. i wsp. High expression of luteinizing hormone receptors messenger RNA by human cumulus granulosa cells is in correlation with decreased fertilization. *Fertil sterol.* 2012; 97: 592-598.
- Mansur A., Israel A., Combelles C.M., Adir M. i wsp. Bisphenol-A exposure and gene expression in human luteinized membrana granulosa cells in vitro. *Hum Reprod.* 2017; 32: 409-417.
- Manthey D., Bukauskas F., Lee C.G., Kozak C.A., Willecke K. Molecular cloning and functional expression of the mouse gap junction gene connexin-57 in human HeLa cells. *J Biol Chem.* 1999; 274: 14716-14723.
- Marelli B.E., Diaz P.U., Salvetti N.R., Rey F., Ortega H.H. mRNA expression pattern of gonadotropin receptors in bovine follicular cysts. *Reprod Biol.* 2014; 14: 276-281.
- Martens J.W., de Winter J.P., Timmerman M.A., McLuskey A. i wsp. Inhibin interferes with activin signaling at the level of the activin receptor complex in Chinese hamster ovary cells. *Endocrinology.* 1997; 138: 2928-2936.
- Martin L.L., Holien J.K., Mizrachi D., Corbin C.J. i wsp. Evolutionary comparisons predict that dimerization of human cytochrome P450 aromatase increases its enzymatic activity and efficiency. *J Steroid Biochem Mol Biol.* 2015; 154: 294-301.
- Martinez A.D., Hayrapetyan V., Moreno A.P., Beyer E.C. Connexin43 and connexin45 form heteromeric gap junction channels in which individual components determine permeability and regulation. *Circ Res.* 2002; 90: 1100-1107.
- Masciarelli S., Horner K., Liu C., Park S.H. i wsp. Cyclic nucleotide phosphodiesterase 3A-deficient mice as a model of female infertility. *J Clin Invest.* 2004; 114: 196-205.
- Mayerhofer A., Garfield R.E. Immunocytochemical analysis of the expression of gap junction protein connexin 43 in the rat ovary. *Mol Reprod Dev.* 1995; 41: 331-338.
- McGee E.A., Perlas E., LaPolt P.S., Tsafiriri A., Hsueh A.J. Follicle-stimulating hormone enhances the development of preantral follicles in juvenile rats. *Biol Reprod.* 1997; 57: 990-998.
- McNutt N.S., Weinstein R.S. The ultrastructure of the nexus. A correlated thin-section and freeze-cleave study. *J Cell Biol.* 1970; 47: 666-688.
- Mendelson C.R., Kamat A. Mechanisms in the regulation of aromatase in developing ovary and placenta. *J Steroid Biochem Mol Biol.* 2007; 106: 62-70.
- Menon K.M., Menon B., Wang L., Gulappa T., Harada M. Molecular regulation of gonadotropin receptor expression: relationship to sterol metabolism. *Mol Cell Endocrinol.* 2010; 329: 26-32.
- Merhi Z., Polotsky A.J., Bradford A.P., Buyuk E. i wsp. Adiposity alters genes important in inflammation and cell cycle division in human cumulus granulosa cell. *Reprod Sci.* 2015; 22: 1220-1228.

- Mese G., Richard G., White T.W. Gap junctions: basic structure and function. *J Invest Dermatol.* 2007; 127: 2516-2524.
- Meunier H., Rivier C., Evans R.M., Vale W. Gonadal and extragonadal expression of inhibin alpha, beta A, and beta B subunits in various tissues predicts diverse functions. *Proc Natl Acad Sci USA.* 1988; 85: 247-251.
- Miller WL. Minireview: Regulation of steroidogenesis by electron transfer. *Endocrinology.* 2005; 146: 2544-2550.
- Monga R., Sharma I., Datta T.K., Singh D. Characterization of serum-free buffalo granulosa cell culture and analysis of genes involved in terminal differentiation from FSH- to LH-responsive phenotype. *Domest Anim Endocrinol.* 2011; 41: 195-206.
- Montaño E., Olivera M., Ruiz-Cortés Z.T. Association between leptin, LH and its receptor and luteinization and progesterone accumulation (P4) in bovine granulosa cell in vitro. *Reprod Domest Anim.* 2009; 44: 699-704.
- Motola S., Popliker M., Tsafri A. Response of follicle cells to ovulatory stimuli within the follicle and in primary culture. *Mol Cell Endocrinol.* 2008; 282: 26-31.
- Muttukrishna S., Sharma S., Barlow D.H., Ledger W. i wsp. Serum inhibins, estradiol, progesterone and FSH in surgical menopause: a demonstration of ovarian pituitary feedback loop in women. *Hum Reprod.* 2002; 17: 2535-2539.
- Nagyova E., Nemcova L., Bujnakova Mlynarcikova A., Blaha M. i wsp. Effect of bone morphogenetic protein-15 on gonadotropin-stimulated synthesis of hyaluronan and progesterone in porcine ovarian follicle. *J Physiol Pharmacol.* 2017; 68: 683-691.
- Nakamura T., Takio K., Eto Y., Shibai H., i wsp. Activin-binding protein from rat ovary is follistatin. *Science.* 1990; 247: 836-838.
- Nebert D.W., Wikvall K., Miller W.L. Human cytochromes P450 in health and disease. *Phil Trans R Soc B.* 2013; 368: 20120431.
- Nelles E., Bützler C., Jung D., Temme A. i wsp. Defective propagation of signals generated by sympathetic nerve stimulation in the liver of connexin32-deficient mice. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1996; 93: 9565-9570.
- Nelson D.R., Koymans L., Kamataki T., Stegeman J.J. i wsp. P450 superfamily: update on new sequences, gene mapping, accession numbers and nomenclature. *Pharmacogenetics.* 1996; 6: 1-42.
- Neuhaus I.M., Bone L., Wang S., Ionasescu V., Werner R. The human connexin32 gene is transcribed from two tissue-specific promoters. *Biosci Rep.* 1996; 16: 239-248.
- Ngezahayo A., Altmann B., Steffens M., Kolb H.A. Gap junction coupling and apoptosis in GFSHR-17 granulosa cells. *J Membr Biol.* 2005; 204: 137-144.
- Nielsen M.S., Axelsen L.N., Sorgen P.L., Verma V. i wsp. Gap junctions. *Compr Physiol.* 2012; 2: 1981-2035.

- Niessen H., Harz H., Bedner P., Krämer K., Willecke K. Selective permeability of different connexin channels to the second messenger inositol 1,4,5-trisphosphate. *J Cell Sci.* 2000; 113: 1365-1372.
- Nishimori K., Dunkel L., Hsueh A.J., Yamoto M., Nakano R. Expression of luteinizing hormone and chorionic gonadotropin receptor messenger ribonucleic acid in human corpora lutea during menstrual cycle and pregnancy. *J Clin Endocrinol Metab.* 1995; 80: 1444-1448.
- Nogueira M.F., Buratini J. Jr, Price C.A., Castilho A.C. i wsp. Expression of LH receptor mRNA splice variants in bovine granulosa cells: changes with follicle size and regulation by FSH in vitro. *Mol Reprod Dev.* 2007; 74: 680-686.
- Norris R.P., Freudzon M., Mehlmann L.M., Cowan A.E. i wsp. Luteinizing hormone causes MAP kinase-dependent phosphorylation and closure of connexin 43 gap junctions in mouse ovarian follicles: one of two paths to meiotic resumption. *Development.* 2008; 135: 3229-3238.
- Norris R.P., Ratzan W.J., Freudzon M., Mehlmann L.M. i wsp. Cyclic GMP from the surrounding somatic cells regulates cyclic AMP and meiosis in the mouse oocyte. *Development.* 2009; 136: 1869-1878.
- Norwitz E.R., Xu S., Jeong K.H., Bédécarrats G.Y. i wsp. Activin A augments GnRH-mediated transcriptional activation of the mouse GnRH receptor gene. *Endocrinology.* 2002; 143: 985-997.
- Oktay K., Briggs D., Gosden R.G. Ontogeny of follicle-stimulating hormone receptor gene expression in isolated human ovarian follicles. *J Clin Endocrinol Metab.* 1997; 82: 3748-3751.
- Okuma A., Kuraoka A., Iida H., Inai T. i wsp. Colocalization of connexin 43 and connexin 45 but absence of connexin 40 in granulosa cell gap junctions of rat ovary. *J Reprod Fertil.* 1996; 107: 255-264.
- Ophir L., Yung Y., Maman E., Rubinstein N. i wsp. Establishment and validation of a model for non-luteinized human mural granulosa cell culture. *Mol Cell Endocrinol.* 2014; 384: 165-174.
- Otsuka F., Yamamoto S., Erickson G.F., Shimasaki S. Bone morphogenetic protein-15 inhibits follicle-stimulating hormone (FSH) action by suppressing FSH receptor expression. *J Biol Chem.* 2001; 276: 11387-11392.
- Pakarainen T., Zhang F.P., Nurmi L., Poutanen M., Huhtaniemi I. Knockout of luteinizing hormone receptor abolishes the effects of follicle-stimulating hormone on preovulatory maturation and ovulation of mouse graafian follicles. *Mol Endocrinol.* 2005; 19: 2591-2602.
- Pannetier M., Fabre S., Batista F., Kocer A. i wsp. FOXL2 activates P450 aromatase gene transcription: towards a better characterization of the early steps of mammalian ovarian development. *J Mol Endocrinol.* 2006; 36: 399-413.
- Peng X.R., Hsueh A.J., LaPolt P.S., Bjersing L., Ny T. Localization of luteinizing hormone receptor messenger ribonucleic acid expression in ovarian cell types during follicle development and ovulation. *Endocrinology.* 1991; 129: 3200-3207.

- Persson J.L., Zhang Q., Wang X.Y., Ravnik S.E. i wsp. Distinct roles for the mammalian A-type cyclins during oogenesis. *Reproduction*. 2005; 130: 411-422.
- Petersen T.S., Kristensen S.G., Jeppesen J.V., Grøndahl M.L. i wsp. Distribution and function of 3',5'-cyclic-AMP phosphodiesterases in the human ovary. *Mol Cell Endocrinol*. 2015; 403: 10-20.
- Pierce J.G., Parsons T.F. Glycoprotein hormones: structure and function. *Annu Rev Biochem*. 1981; 50: 465—495.
- Piquette G.N., LaPolt P.S., Oikawa M., Hsueh A.J. Regulation of luteinizing hormone receptor messenger ribonucleic acid levels by gonadotropins, growth factors, and gonadotropin-releasing hormone in cultured rat granulosa cells. *Endocrinology*. 1991; 128: 2449-2456.
- Plotkin L.I., Manolagas S.C., Bellido T. Transduction of cell survival signals by connexin-43 hemichannels. *J Biol Chem*. 2002; 277: 8648-8657.
- Popovics P., Rekasi Z., Stewart A.J., Kovacs M. Regulation of pituitary inhibin/activin subunits and follistatin gene expression by GnRH in female rats. *J Endocrinol*. 2011; 210: 71-79.
- Praporski S., Ng S.M., Nguyen A.D., Corbin C.J. i wsp. Organization of cytochrome P450 enzymes involved in sex steroid synthesis: protein-protein interactions in lipid membranes. *J Biol Chem* 2009; 284: 33224-33232.
- Procházka R., Nemcová L., Nagyová E., Scsuková S., Mlynarciková A. Development of functional LH Receptors on pig cumulus-oocyte complexes cultured in vitro by a novel two-step culture system. *Mol Reprod Dev*. 2009; 76: 751-761.
- Quist A.P., Rhee S.K., Lin H., Lal R. Physiological role of gap-junctional hemichannels. Extracellular calcium-dependent isosmotic volume regulation. *J Cell Biol*. 2000; 148: 1063-1074.
- Rackauskas M., Neverauskas V., Skeberdis V.A. Diversity and properties of connexin gap junction channels. *Medicina (Kaunas)*. 2010; 46: 1-12.
- Rannikki A.S., Zhang F.P., Huhtaniemi I.T. Ontogeny of follicle-stimulating hormone receptor gene expression in the rat testis and ovary. *Mol Cell Endocrinol*. 1995; 107: 199-208.
- Remy J.J., Lahbib-Mansais Y., Yerle M., Bozon V. i wsp. The porcine follitropin receptor: cDNA cloning, functional expression and chromosomal localization of the gene. *Gene*. 1995; 163: 257-261.
- Revel J.P., Karnovsky M.J. Hexagonal array of subunits in intercellular junctions of the mouse heart and liver. *J Cell Biol*. 1967; 33: C7-C12.
- Rice S., Ojha K., Whitehead S., Mason H. Stage-specific expression of androgen receptor, follicle-stimulating hormone receptor, and anti-Müllerian hormone type II receptor in single, isolated, human preantral follicles: relevance to polycystic ovaries. *J Clin Endocrinol Metab*. 2007; 92: 1034-1040.

- Richard S., Baltz J.M. Prophase I arrest of mouse oocytes mediated by natriuretic peptide precursor C requires GJA1 (connexin-43) and GJA4 (connexin-37) gap junctions in the antral follicle and cumulus-oocyte complex. *Biol Reprod.* 2014; 90: 1-10.
- Richard F.J., Tsafiriri A., Conti M. Role of phosphodiesterase type 3A in rat oocyte maturation. *Biol Reprod.* 2001; 65: 1444-1451.
- Richards J.S., Bogovich K. Effects of human chorionic gonadotropin and progesterone on follicular development in the immature rat. *Endocrinology.* 1982; 111: 1429-1438.
- Richards J.S., Russell D.L., Robker R.L., Dajee M., Alliston T.N. Molecular mechanisms of ovulation and luteinization. *Mol Cell Endocrinol.* 1998; 145: 47-54.
- Roberts R.M., Smith G.W., Bazer F.W., Cibelli J. i wsp. Research priorities. Farm animal research in crisis. *Science.* 2009; 324: 468-469.
- Robertson D.M., Foulds L.M., Leversha L., Morgan F.J. i wsp. Isolation of inhibin from bovine follicular fluid. *Biochem Biophys Res Commun.* 1985; 126: 220-226.
- Rodgers R.J., Lavranos T.C., van Wezel I.L., Irving-Rodgers H.H. Development of the ovarian follicular epithelium. *Mol Cell Endocrinol.* 1999; 151: 171-179.
- Rousseau-Merck M.F., Atger M., Loosfelt H., Milgrom E., Berger R. The chromosomal localization of the human follicle-stimulating hormone receptor gene (FSHR) on 2p21-p16 is similar to that of the luteinizing hormone receptor gene. *Genomics.* 1993; 15: 222-224.
- Rousseau-Merck M.F., Misrahi M., Atger M., Loosfelt H. i wsp. Localization of the human luteinizing hormone/choriogonadotropin receptor gene (LHCGR) to chromosome 2p21. *Cytogenet Cell Genet.* 1990; 54: 77-79.
- Russell D.L., Robker R.L. Molecular mechanisms of ovulation: co-ordination through the cumulus complex. *Hum Reprod Update.* 2007; 13: 289-312.
- Sakaguchi M., Mihara K., Sato R. A short amino-terminal segment of microsomal cytochrome P-450 functions both as an insertion signal and as a stop-transfer sequence. *EMBO J.* 1987; 6: 2425-2431.
- Sakurada Y., Shiota M., Inoue K., Uchida N., Shiota K. New approach to in situ quantification of ovarian gene expression in rat using a laser microdissection technique: relationship between follicle types and regulation of inhibin-alpha and cytochrome P450aromatase genes in the rat ovary. *Histochem Cell Biol.* 2006; 126: 735-741.
- Salustri A., Yanagishita M., Hascall V.C. Synthesis and accumulation of hyaluronic acid and proteoglycans in the mouse cumulus cell-oocyte complex during follicle-stimulating hormone-induced mucification. *J Biol Chem.* 1989; 264: 13840-13847.
- Santamaria D., Barrière C., Cerqueira A., Hunt S. i wsp. Cdk1 is sufficient to drive the mammalian cell cycle. *Nature.* 2007; 448: 811-815.
- Sasseville M., Côté N., Guillemette C., Richard F.J. New insight into the role of phosphodiesterase 3A in porcine oocyte maturation. *BMC Dev Biol.* 2006; 6: 47.

Savoy-Moore R.T., Swartz K.H. Several GnRH stimulation frequencies differentially release FSH and LH from isolated, perfused rat anterior pituitary cells. *Adv Exp Med. Biol.* 1987; 219: 641-645.

Sebastian S., Bulun S.E. A highly complex organization of the regulatory region of the human CYP19 (aromatase) gene revealed by the Human Genome Project. *J Clin Endocrinol Metab.* 2001; 86: 4600-4602.

Segaloff D.L., Wang H.Y., Richards J.S. Hormonal regulation of luteinizing hormone/chorionic gonadotropin receptor mRNA in rat ovarian cells during follicular development and luteinization. *Mol Endocrinol.* 1990; 4: 1856-1865.

Sela-Abramovich S., Edry I., Galiani D., Nevo N., Dekel N. Disruption of gap junctional communication within the ovarian follicle induces oocyte maturation. *Endocrinology.* 2006; 147: 2280-2286.

Serikawa T., Fujita K., Nagata H., Oite T. i wsp. Maintenance of in vitro granulosa cell function by adenoviral mediated follicle stimulating hormone receptor gene transduction. *J Assist Reprod Genet.* 2006; 23: 199-206.

Serre-Beinier V., Mas C., Calabrese A., Caton D. i wsp. Connexins and secretion. *Biol Cell.* 2002; 94: 477-492.

Sethumadhavan K., Bellino F.I., Thotakura N.R. Estrogen synthetase (aromatase). The cytochrome P-450 component of the human placental enzyme is a glycoprotein. *Moll Cell Endocrinol.* 1991; 78: 25-32.

Shen W., Ahmad F., Hockman S., Ma J. i wsp. Female infertility in PDE3A(-/-) mice: polo-like kinase 1 (Plk1) may be a target of protein kinase A (PKA) and involved in meiotic arrest of oocytes from PDE3A(-/-) mice. *Cell Cycle.* 2010; 9: 4720-4734.

Shimizu K., Stopfer M. Gap Junctions. *Curr Biol.* 2013; 23: R1026-1031.

Shitsukawa K., Andersen C.B., Richard F.J., Horner A.K. i wsp. Cloning and characterization of the cyclic guanosine monophosphate-inhibited phosphodiesterase PDE3A expressed in mouse oocyte. *Biol Reprod.* 2001; 65: 188-196.

Shores E.M., Hunter M.G. Immunohistochemical localization of steroidogenic enzymes and comparison with hormone production during follicle development in the pig. *Reprod Fertil Dev.* 1999; 11: 337-344.

Shozu M., Sebastian S., Takayama K., Hsu W.T. i wsp. Estrogen excess associated with novel gain-of-function mutations affecting the aromatase gene. *N Engl J Med.* 2003; 348: 1855-1865.

Shupnik M.A., Gharib S.D., Chin W.W. Estrogen suppresses rat gonadotropin gene transcription in vivo. *Endocrinology.* 1988; 122: 1842-1846.

Silva J.M., Price C.A. Effect of follicle-stimulating hormone on steroid secretion and messenger ribonucleic acids encoding cytochromes P450 aromatase and cholesterol side-chain cleavage in bovine granulosa cells in vitro. *Biol Reprod.* 2000; 62: 186-191.

Simon A.M., Goodenough D.A., Li E., Paul D.L. Female infertility in mice lacking connexin 37. *Nature.* 1997; 385: 525-529.

- Simpson E.R., Mahendroo M.S., Means G.D., Kilgore M.W. i wsp. Aromatase cytochrome P450, the enzyme responsible for estrogen biosynthesis. *Endocr Rev.* 1994; 15: 342-355.
- Singh S.P., Wolfe A., Ng Y., DiVall S.A. i wsp. Impaired estrogen feedback and infertility in female mice with pituitary-specific deletion of estrogen receptor alpha (ESR1). *Biol Reprod.* 2009; 81: 488-496.
- Słomczyńska M., Tabarowski Z. Localization of androgen receptor and cytochrome P450 aromatase in the follicle and corpus luteum of the porcine ovary. *Anim Reprod Sci.* 2001; 65: 127-134.
- Smith G.W., Gentry P.C., Roberts R.M., Smith M.F. Ontogeny and regulation of luteinizing hormone receptor messenger ribonucleic acid within the ovine corpus luteum. *Biol Reprod.* 1996; 54: 76-83.
- Smits G., Campillo M., Govaerts C., Janssens V. i wsp. Glycoprotein hormone receptors: determinants in leucine-rich repeats responsible for ligand specificity. *EMBO J.* 2003; 22: 2692-2703.
- Söhl G., Theis M., Hallas G., Brambach S. i wsp. A new alternatively spliced transcript of the mouse connexin32 gene is expressed in embryonic stem cells, oocytes, and liver. *Exp Cell Res.* 2001; 266: 177-186.
- Söhl G., Willecke K. An update on connexin genes and their nomenclature in mouse and man. *Cell Commun Adhes.* 2003; 10: 173-180.
- Söhl G., Willecke K. Gap junctions and the connexin protein family. *Cardiovasc Res.* 2004; 62: 228-232.
- Spicer L.J., Aad P.Y., Allen D., Mazerbourg S., Hsueh A.J. Growth differentiation factor-9 has divergent effects on proliferation and steroidogenesis of bovine granulosa cells. *J Endocrinol.* 2006; 189: 329-339.
- Steinkampf M.P., Mendelson C.R., Simpson E.R. Regulation by follicle-stimulating hormone of the synthesis of aromatase cytochrome P-450 in human granulosa cells. *Mol Endocrinol.* 1987; 1: 465-471.
- Stout C.E., Costantin J.L., Naus C.C., Charles A.C. Intercellular calcium signaling in astrocytes via ATP release through connexin hemichannels. *J Biol Chem.* 2002; 277: 10482-10488.
- Sun Q.Y., Nagai T. Molecular mechanisms underlying pig oocyte maturation and fertilization. *J Reprod Dev.* 2003; 49: 347-359.
- Suzuki T., Sasano H., Tamura M., Aoki H. i wsp. Temporal and spatial localization of steroidogenic enzymes in premenopausal human ovaries: in situ hybridization and immunohistochemical study. *Mol Cell Endocrinol.* 1993; 97: 135-143.
- Talmadge K., Vamvakopoulos N.C., Fiddes J.C. Evolution of the genes for the beta subunits of human chorionic gonadotropin and luteinizing hormone. *Nature.* 1984; 307: 37-40.
- Thompson E.A., Siiteri P.K. Utilization of oxygen and reduced nicotinamide adenine dinucleotide phosphate by human placental microsomes during aromatization of androstenedione. *J Biol Chem.* 1974; 249: 5364-5372.

- Thompson T.B., Lerch T.F., Cook R.W., Woodruff T.K., Jardetzky T.S. The structure of the follistatin:activin complex reveals antagonism of both type I and type II receptor binding. *Dev Cell*. 2005; 9: 535-543.
- Tisdall D.J., Watanabe K., Hudson N.L., Smith P., McNatty K.P. FSH receptor gene expression during ovarian follicle development in sheep. *J Mol Endocrinol*. 1995; 15: 273-281.
- Toda K., Hayashi Y., Ono M., Saibara T. Impact of ovarian sex steroids on ovulation and ovulatory gene induction in aromatase-null mice. *Endocrinology*. 2012; 153: 386-394.
- Toda K., Takeda K., Okada T., Akira S. i wsp. Targeted disruption of the aromatase P450 gene (Cyp19) in mice and their ovarian and uterine responses to 17beta-oestradiol. *J Endocrinol*. 2001; 170: 99-111.
- Toda K., Terashima M., Kawamoto T., Sumimoto H. i wsp. Structural and functional characterization of human aromatase P-450 gene. *Eur J Biochem*. 1990; 193: 559-565.
- Tsang B.K., Ainsworth L., Downey B.R., Marcus G.J. Differential production of steroids by dispersed granulosa and theca interna cells from developing preovulatory follicles of pigs. *J Reprod Fertil*. 1985; 74: 459-471.
- Turner K.J., Macpherson S., Millar M.R., McNeilly A.S. i wsp. Development and validation of a new monoclonal antibody to mammalian aromatase. *J Endocrinol*. 2002; 172: 21-30.
- Vaccari S., Weeks J.L. 2nd, Hsieh M., Menniti F.S., Conti M. Cyclic GMP signaling is involved in the luteinizing hormone-dependent meiotic maturation of mouse oocytes. *Biol Reprod*. 2009; 81: 595-604.
- Vale W., Rivier J., Vaughan J., McClintock R. i wsp. Purification and characterization of an FSH releasing protein from porcine ovarian follicular fluid. *Nature*. 1986; 321: 776-779.
- Valiunas V., Polosina Y.Y., Miller H., Potapova I.A. i wsp. Connexin-specific cell-to-cell transfer of short interfering RNA by gap junctions. *J Physiol*. 2005; 568: 459-468.
- Vanselow J., Fürbass R., Zsolnai A., Kalbe C. i wsp. Expression of the aromatase cytochrome P450 encoding gene in cattle and sheep. *J Steroid Biochem Mol Biol*. 2001; 79: 279-288.
- Vasconcelos R.B., Salles L.P., Oliveira e Silva i., Gulart L.V. i wsp. Culture of bovine ovarian follicle wall sections maintained the highly estrogenic profile under basal and chemically defined conditions. *Braz J Med. Biol Res*. 2013. 46: 700-707.
- Veitch G.I., Gittens J.E., Shao Q., Laird D.W., Kidder G.M. Selective assembly of connexin37 into heterocellular gap junctions at the oocyte/granulosa cell interface. *J Cell Sci*. 2004; 117: 2699-2707.
- Vigneron S., Brioudes E., Burgess A., Labbé J.C. i wsp. Greatwall maintains mitosis through regulation of PP2A. *EMBO J*. 2009; 28: 2786-2793.
- Vigneron S., Robert P., Hached K., Sundermann L. i wsp. The master Greatwall kinase, a critical regulator of mitosis and meiosis. *Int J Dev Biol*. 2016; 60: 245-254.
- Vitt U.A., Hayashi M., Klein C., Hsueh A.J. Growth differentiation factor-9 stimulates proliferation but suppresses the follicle-stimulating hormone-induced differentiation of

cultured granulosa cells from small antral and preovulatory rat follicles. *Biol Reprod.* 2000; 62: 370-377.

Voets E., Wolthuis R.M. MASTL is the human orthologue of Greatwall kinase that facilitates mitotic entry, anaphase and cytokinesis. *Cell Cycle.* 2010; 9: 3591-3601.

Wang H.X., Tong D., El-Gehani F., Tekpetey F.R., Kidder G.M. Connexin expression and gap junctional coupling in human cumulus cells: contribution to embryo quality. *J Cell Mol Med.* 2009; 13: 972-984.

Wang Q.F., Farnworth P.G., Findlay J.K., Burger H.G. Inhibitory effect of pure 31-kilodalton bovine inhibin on gonadotropin-releasing hormone (GnRH)-induced up-regulation of GnRH binding sites in cultured rat anterior pituitary cells. *Endocrinology.* 1989; 124: 363-368.

Wang S., Ning G., Chen X., Yang J. i wsp. PDE5 modulates oocyte spontaneous maturation via cGMP-cAMP but not cGMP-PKG signaling. *Front Biosci.* 2008; 13: 7087-7095.

Watkins P.C., Eddy R., Beck A.K., Vellucci V. i wsp. DNA sequence and regional assignment of the human follicle-stimulating hormone beta-subunit gene to the short arm of human chromosome 11. *DNA.* 1987; 6: 205-212.

Weinstein J., Jacobsen F.W., Hsu-Chen J., Wu T., Baum L.G. A novel mammalian protein, p55CDC, present in dividing cells is associated with protein kinase activity and has homology to the *Saccharomyces cerevisiae* cell division cycle proteins Cdc20 and Cdc4. *Mol Cell Biol.* 1994; 14: 3350-3363.

Weiss J., Duca K.A., Crowley W.F Jr. Gonadotropin-releasing hormone-induced stimulation and desensitization of free alpha-subunit secretion mirrors luteinizing hormone and follicle-stimulating hormone in perfused rat pituitary cells. *Endocrinology.* 1990; 127: 2364-2371.

Weiss J., Guendner M.J., Halvorson L.M., Jameson J.L. Transcriptional activation of the follicle-stimulating hormone beta-subunit gene by activin. *Endocrinology.* 1995; 136: 1885-1891.

Wiater E., Lewis K.A., Donaldson C., Vaughan J. i wsp. Endogenous betaglycan is essential for high-potency inhibin antagonism in gonadotropes. *Mol Endocrinol.* 2009; 23: 1033-1042.

Wildt L., Häusler A., Marshall G., Hutchison J.S. i wsp. Frequency and amplitude of gonadotropin-releasing hormone stimulation and gonadotropin secretion in the rhesus monkey. *Endocrinology.* 1981; 109: 376-385.

Wu J., Emery B.R., Carrell D.T. In vitro growth, maturation, fertilization, and embryonic development of oocytes from porcine preantral follicles. *Biol Reprod.* 2001; 64: 375-381.

Yamada Y., Yamamoto H., Yonehara T., Kanasaki H. i wsp. Differential activation of the luteinizing hormone beta-subunit promoter by activin and gonadotropin-releasing hormone: a role for the mitogen-activated protein kinase signaling pathway in L beta T2 gonadotrophs. *Biol Reprod.* 2004; 70: 236-243.

Yamamuro T., Kano K., Naito K. Functions of FZR1 and CDC20, activators of the anaphase-promoting complex, during meiotic maturation of swine oocytes. *Biol Reprod.* 2008; 79: 1202-1209.

- Yamoto M., Shima K., Nakano R. Gonadotropin receptors in human ovarian follicles and corpora lutea throughout the menstrual cycle. *Horm Res.* 1992; 37: 5-11.
- Ye Z.C., Wyeth M.S., Baltan-Tekkok S., Ransom B.R. Functional hemichannels in astrocytes: a novel mechanism of glutamate release. *J Neurosci.* 2003; 23: 3588-3596.
- Yerle M., Galman O., Lahbib-Mansais Y., Gellin J. Localization of the pig luteinizing hormone/choriogonadotropin receptor gene (LHCGR) by radioactive and nonradioactive in situ hybridization. *Cytogenet Cell Genet.* 1992; 59: 48-51.
- Yong E.L., Hillier S.G., Turner M., Baird D.T. i wsp. Differential regulation of cholesterol side-chain cleavage (P450scc) and aromatase (P450arom) enzyme mRNA expression by gonadotrophins and cyclic AMP in human granulosa cells. *J Mol Endocrinol.* 1994; 12: 239-249.
- Yu H. Cdc20: a WD40 activator for a cell cycle degradation machine. *Mol Cell.* 2007; 27: 3-16.
- Yu J., Fleming S.L., Williams B., Williams E.V. i wsp. Greatwall kinase: a nuclear protein required for proper chromosome condensation and mitotic progression in *Drosophila*. *J Cell Biol.* 2004; 164: 487-492.
- Yu S.J., Yong Y.H., Cui Y. Oocyte morphology from primordial to early tertiary follicles of yak. *Reprod Domest Anim.* 2010; 45:779-785.
- Yung Y., Aviel-Ronen S., Maman E., Rubinstein N. i wsp. Localization of luteinizing hormone receptor protein in the human ovary. *Mol Hum Reprod.* 2014; 20: 844-849.
- Zeleznik A.J., Midgley A.R., Reichert L.E. Granulosa cell maturation in the rat: increased binding of human chorionic gonadotropin following treatment with follicle-stimulating hormone in vivo. *Endocrinology.* 1974; 95: 818-825.
- Zhang F.P., Poutanen M., Wilbertz J., Huhtaniemi I. Normal prenatal but arrested postnatal sexual development of luteinizing hormone receptor knockout (LuRKO) mice. *Mol Endocrinol.* 2001; 15: 172-183.
- Zhang M., Shi H., Segaloff D.L., Van Voorhis B.J. Expression and localization of luteinizing hormone receptor in the female mouse reproductive tract. *Biol Reprod.* 2001; 64: 179-187.
- Zhao H.B., Yu N., Fleming C.R. Gap junctional hemichannel-mediated ATP release and hearing controls in the inner ear. *Proc Natl Acad Sci USA.* 2005; 102: 18724-18729.
- Zhu J., Lin S.J., Zou C., Makanji Y. i wsp. Inhibin α -subunit N terminus interacts with activin type IB receptor to disrupt activin signaling. *J Biol Chem.* 2012; 287: 8060-8070.

10. SPIS RYCIN I TABEL

10.1. Ryciny

Ryc. 1. Schemat budowy pęcherzyka Graafa.

Ryc. 2. Ogólny schemat dodatnich i ujemnych pętli sprzężeń zwrotnych wywieranych przez poszczególne składowe osi podwzgórze-przysadka-jajnik.

Ryc. 3. Schemat budowy połączenia szczelinowego oraz typy półkanałów i kanałów koneksonowych.

Ryc. 4. Struktura genów koneksyn.

Ryc. 5. Schemat budowy cząsteczki koneksyny.

Ryc. 6. Schemat przepływu elektronów w kompleksie POR-aromataza.

Ryc. 7. Schematyczna budowa genu *CYP19* człowieka.

Ryc. 8. Schemat przedstawiający przebieg doświadczenia mikromacierzowego.

Ryc. 9. Schemat analizy bioinformatycznej wyników eksperymentu mikromacierzowego.

Ryc. 10. Morfologia komórek ziarnistych w poszczególnych przedziałach czasowych hodowli pierwotnej.

Ryc. 11. Wykres przedstawiający proliferację komórek ziarnistych świni hodowanych przez 168 godzin, wyrażoną wartością indeksu komórkowego.

Ryc. 12. Analiza uśrednionych poziomów ekspresji trzech genów z grupy housekeeping wykorzystanych w analizie qPCR jako geny referencyjne.

Ryc. 13. Analiza ekspresji genu *Lhr* w komórkach ziarnistych w poszczególnych przedziałach czasowych krótkoterminowej hodowli *in vitro*.

Ryc. 14. Analiza ekspresji genu *Fshr* w komórkach ziarnistych w poszczególnych przedziałach czasowych krótkoterminowej hodowli *in vitro*.

Ryc. 15. Analiza ekspresji genu *Cx43* w komórkach ziarnistych w poszczególnych przedziałach czasowych krótkoterminowej hodowli *in vitro*.

Ryc. 16. Analiza ekspresji genu *Cx45* w komórkach ziarnistych w poszczególnych przedziałach czasowych krótkoterminowej hodowli *in vitro*.

Ryc. 17. Ekspresja i lokalizacja komórkowa białka Cx36 w komórkach ziarnistych podczas 7-dniowej hodowli pierwotnej.

Ryc. 18. Ekspresja i lokalizacja komórkowa białka Cx37 w komórkach ziarnistych podczas 7-dniowej hodowli pierwotnej.

Ryc. 19. Ekspresja i lokalizacja komórkowa białka Cx40 w komórkach ziarnistych podczas 7-dniowej hodowli pierwotnej.

Ryc. 20. Ekspresja i lokalizacja komórkowa białka Cx43 w komórkach ziarnistych podczas 7-dniowej hodowli pierwotnej.

Ryc. 21. Ekspresja i lokalizacja komórkowa białka Cx45 w komórkach ziarnistych podczas 7-dniowej hodowli pierwotnej.

Ryc. 22. Ekspresja i lokalizacja komórkowa białka Lhr w komórkach ziarnistych podczas 7-dniowej hodowli pierwotnej.

Ryc. 23. Ekspresja i lokalizacja komórkowa białka Fshr w komórkach ziarnistych podczas 7-dniowej hodowli pierwotnej.

Ryc. 24. Ekspresja i lokalizacja komórkowa białka Cyp19 w komórkach ziarnistych podczas 7-dniowej hodowli pierwotnej.

Ryc. 25. Liczba genów o zmienionych poziomach ekspresji w poszczególnych przedziałach czasowych hodowli pierwotnej (48 godz., 96 godz. i 144 godz.) w stosunku do 24 godz., przy założeniu zmiany ekspresji > 2 (wzrost/spadek) oraz $p < 0,05$.

Ryc. 26. Wykres przedstawiający 17 wybranych grup ontologicznych o istotnie statystycznie zmienionym wzbogaceniu, wchodzących w skład klastra 42.

Ryc. 27. Mapy ciepłe obrazujące zmianę ekspresji genów w poszczególnych przedziałach czasowych hodowli.

10.2. Tabele

Tab. 1. Skład mieszaniny do eliminacji genomowego DNA.

Tab. 2. Skład mieszaniny do odwrotnej transkrypcji.

Tab. 3. Sekwencje starterów wykorzystanych do reakcji qPCR.

Tab. 4. Sekwencje starterów dla genów referencyjnych wykorzystanych do reakcji qPCR.

Tab. 5. Charakterystyka przeciwciał pierwszorzędowych użytych do badania immunofluorescencji.

Tab. 6. Charakterystyka przeciwciał drugorzędowych użytych do badania immunofluorescencji.

Tab. 7. Składniki buforu do hybrydyzacji.

Tab. 8. Komórkowa lokalizacja białka Cx36, Cx37, Cx40, Cx43 i Cx45.

Tab. 9. Komórkowa lokalizacja białka Lhr, Fshr i Cyp19.

Tab. 10. Charakterystyka genów wytypowanych w eksperymencie mikromacierzowym jako geny markerowe.