

JIHOČESKÁ UNIVERZITA V ČESKÝCH BUDĚJOVICÍCH
ZEMĚDĚLSKÁ FAKULTA

Studijní program: B4103 Zootechnika

Studijní obor: Zootechnika

Katedra: Katedra zootechnických věd

Vedoucí katedry: prof. Ing. Miloslav Šoch, CSc., dr. h. c.

Bakalářská práce

**Gasotransmise v epigenetických regulacích gametogeneze
a embryogeneze**

Vedoucí bakalářské práce: Ing. Roman Konečný, Ph.D.

Konzultant bakalářské práce: doc. Ing. Jan Nevoral, Ph.D.

Autor bakalářské práce: Jiří Brichcín

České Budějovice, 2020

JIHOČESKÁ UNIVERZITA V ČESKÝCH BUDĚJOVICÍCH

Zemědělská fakulta

Akademický rok: 2018/2019

ZADÁNÍ BAKALÁŘSKÉ PRÁCE

(projektu, uměleckého díla, uměleckého výkonu)

Jméno a příjmení: Jiří BRICHČÍN
Osobní číslo: Z17171
Studijní program: B4103 Zootechnika
Studijní obor: Zootechnika
Téma práce: Gasotransmise v epigenetických regulacích gametogeneze a embryogeneze
Zadávající katedra: Katedra zootechnických věd

Zásady pro vypracování

Skupina gasotransmiterů zahrnuje v současné době tři známé plynné molekuly se schopností přenosu buněčného signálu: oxid dusnatý, oxid uhelnatý a sulfan.

Právě sulfan představuje molekulu s vysokým potenciálem modulovat strukturu proteinů a aktivitu enzymů, odpovědných za epigenetické změny chromatinu buněk.

Tyto epigenetické regulace představují dynamický systém zejména v procesu spermiogeneze, oogeneze a časného embryonálního vývoje.

Cílem bakalářské práce je vytvořit kvalitní rešerši, která propojí dva dosud separátně řešené problémy (tj. gasotransmise a epigenetické změny).

Současně bude probíhat experimentální práce na modelu laboratorní myši s cílem lokalizovat sulfan-uvolňující enzymy a SIRT1 v oocytech a embryích.

Rozsah pracovní zprávy: 25 – 35 stran
Rozsah grafických prací: 1 tabulka, 6 obrázků
Forma zpracování bakalářské práce: tištěná/elektronická

Seznam doporučené literatury:

Adamkova K, Yi Y-J, Petr J, Zalmanova T, Hoskova K, Jolinkova P, et al. SIRT1-dependent modulation of methylation and acetylation of histone H3 on lysine 9 (H3K9) in the zygotic pronuclei improves porcine embryo development. J Anim Sci Biotechnol. 2017;8.

Nevoral J, Žalmanová T, Zámotná K, Kott T, Kučerová-Chrpová V, Bodart J-F, et al. Endogenously produced hydrogen sulfide is involved in porcine oocyte maturation in vitro. Nitric oxide Biol Chem [Internet]. 2015 [cited 2018 Jan 9];51:24-35. Available from: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1089860315300215>

Nevoral J, Bodart J-F, Petr J. Gasotransmitters in Gametogenesis and Early Development: Holy Trinity for Assisted Reproductive Technology-A Review. Oxid Med Cell Longev [Internet]. 2016 [cited 2018 Jan 9];2016:1730750. Available from: <http://www.hindawi.com/journals/omcl/2016/1730750/>

Nevoral J, Petr J, Gelaude A, Bodart J-F, Kucerova-Chrpova V, Sedmikova M, et al. Dual effects of hydrogen sulfide donor on meiosis and cumulus expansion of porcine cumulus-oocyte complexes. Sun Q-Y, editor. PLoS One [Internet]. 2014 [cited 2018 Jan 9];9:e99613. Available from: <http://dx.plos.org/10.1371/journal.pone.0099613>

Elektronické informační zdroje Akademické knihovny JU v Č. Budějovicích (internetové databáze): ISI Web of Knowledge (Web of Science), Pubmed, příslušné odborné a vědecké časopisy.

Vedoucí bakalářské práce: Ing. Roman Konečný, Ph.D.
Katedra zootechnických věd

Konzultant bakalářské práce: Ing. Jan Nevoral, Ph.D.

Datum zadání bakalářské práce: 15. března 2019

Termín odevzdání bakalářské práce: 30. června 2020


doc. RNDr. Petr Bartoš, Ph.D.
děkan

**JIHOČESKÁ UNIVERZITA
V ČESKÝCH BUDĚJOVICÍCH
ZEMĚDĚLSKÁ FAKULTA**
studijní oddělení LS
Budejovická 1508, 370 05 České Budějovice


prof. Ing. Miloslav Šoch, CSc., dr. h. c.
vedoucí katedry

V Českých Budějovicích dne 10. června 2020

Prohlášení

Prohlašuji, že v souladu s § 47b zákona č. 111/1998 Sb. v platném znění souhlasím se zveřejněním své bakalářské práce, a to v nezkrácené podobě, v úpravě vzniklé vypuštěním vyznačených částí archivovaných Zemědělskou fakultou elektronickou cestou ve veřejně přístupné části databáze STAG, provozované Jihočeskou univerzitou v Českých Budějovicích na jejích internetových stránkách, a to se zachováním mého autorského práva k odevzdanému textu této kvalifikační práce. Souhlasím dále s tím, aby toutéž elektronickou cestou byly v souladu s uvedeným ustanovením zákona č. 111/1998 Sb. zveřejněny posudky školitele a oponentů práce i záznam o průběhu a výsledku obhajoby kvalifikační práce. Rovněž souhlasím s porovnáním textu mé kvalifikační práce s databází kvalifikačních prací Theses.cz provozovanou Národním registrem vysokoškolských kvalifikačních prací a systémem na odhalování plagiátů.

V Českých Budějovicích dne 18. června 2020

.....

podpis

Poděkování

Mé díky patří doc. Ing. Janu Nevoralovi, Ph.D.,

za trpělivost, vlídný přístup, ochotu a školení.

Za odborné rady, co vedly mě vždy správným směrem,

v honbě za enzymy, Sirtuinem.

Rovněž děkuji Ing. Romanu Konečnému, Ph.D.,

že se ujal této práce vedení.

Abstrakt

S rostoucími problémy v oblasti reprodukce hospodářských zvířat i člověka se zvyšuje i potřeba znalostí mechanismů, podílejících se na regulaci správného průběhu gametogeneze a embryogeneze. Pro experimentální část této práce byly vybrány komponenty z dvou odlišných, povětšinou separátně zkoumaných, oborů, tj. gasotransmiterů a epigenetických mechanismů, které jsou nezbytné pro správný průběh tvorby gamet a časného embryonálního vývoje. Z řad gasotransmiterů byl vybrán sulfan, a jako jeho možný substrát byla zvolena histon deacetyláza Sirtuin 1 (SIRT1). Ověření výskytu těchto komponent probíhalo pomocí imunocytochemického barvení na oocytech a embryích laboratorní myši (*Mus musculus*).

Pro lokalizaci sulfanu byly vybrány dva sulfan-uvolňující enzymy, cystationin- β -syntáza (CBS) a 3-merkaptopyruvat sulfurtransferáza (3-MPST). Vůbec poprvé je zde prezentován výskyt těchto enzymů ve stádiích časného embryonálního vývoje. Enzym CBS byl detekován výhradně v cytosolu, výjimku tvořil zralý (MII) oocyt, kde byla zjištěna vyšší intenzita signálu v oblasti jádra. Enzym 3-MPST byl lokalizován, v nezralém (GV) oocytu jak v jádře, tak i v cytosolu. MII oocyt nevykazoval přítomnost enzymu. Ve stádiu zygoty byly detekovány klastry 3-MPST v cytosolu. Dvoubuněčné embryo a blastocysta vykazovaly výskyt 3-MPST v cytosolu i v jádře. V oblasti jádra bylo zjištěno vyšší množství enzymu než v cytosolu. SIRT1 byl lokalizován v oblasti chromatinu s výjimkou MII oocytu, kde kopíroval vzor dělicího vřetenka.

Lokalizací výskytu sulfan-uvolňujících enzymů CBS a 3-MPST a histon deacetylázy SIRT1 v oocytech a embryích byla potvrzena hypotéza, že jsou výše zmíněné enzymy exprimovány v oocytech a embryích myši, jakožto regulátory časného embryonálního vývoje. Na základě těchto výsledků lze předpokládat interakci sulfanu a epigenetických regulací, k jejichž dalšímu popisu je zapotřebí další experimentální práce.

Klíčová slova: sulfan-uvolňující enzymy, CBS, 3-MPST, *Mus musculus*, SIRT1, oocyty

Abstract

As the problems with the reproduction of livestock and humans starting to increase, the need for knowledge of mechanisms involved in regulating the correct process of gametogenesis and embryogenesis also rises. For the experimental part of this work, two components from two different, mostly separately explored fields, i.e. gasotransmitters and epigenetic mechanisms, which are necessary for the correct process of gametes production and early embryonic evolution were chosen. Hydrogen sulfide was chosen from the series of gasotransmitters, and histone deacetylase Sirtuin 1 (SIRT1) was chosen as its possible substrate. Confirmation of the presence of these components was carried out by immunocytochemical staining on oocytes and embryos of laboratory mice (*Mus musculus*).

Two hydrogen sulfide-releasing enzymes, cystathionine- β -synthase (CBS) and 3-mercaptopyruvate sulfurtransferase (3-MPST) were selected for the localization of hydrogen sulfide. For the first time, the existence of these enzymes in early embryonic development stage is presented. The CBS enzyme was detected mainly in the cytosol, an exception was formed by a mature (MII) oocyte, where higher signal strength was detected in the nucleus section. The enzyme 3-MPST was localized, in immature (GV) oocyte stage, in the nucleus, and cytosol. MII oocyte did not show the presence of an enzyme. At the stage of the zygote, clusters of 3-MPST were detected in the cytosol. The two-cell embryo and blastocyst showed the occurrence of 3-MPST in the cytosol and nucleus. A higher amount of the enzyme was found in the nucleus area compared to the cytosol. SIRT1 was localized in the chromatin area except for MII oocyte, where the pattern of the spindle was copied.

By locating the presence of hydrogen sulfide-releasing enzymes CBS and 3-MPST and histone deacetylase SIRT1 in oocytes and embryos, the hypothesis that the above-mentioned enzymes are expressed in oocytes and mouse embryos as regulators of early embryonic development have been confirmed. Based on the mentioned findings, the interaction of hydrogen sulfide and epigenetic regulations can be expected, therefore further experimental work is suggested in this field.

Keywords: hydrogen sulfide-releasing enzymes, CBS, 3-MPST, *Mus musculus*, SIRT1, oocytes

Obsah

1. Úvod.....	9
2. Literární přehled	10
2.1 Gametogeneze, meiotické dělení.....	10
2.1.1 Meiotické (redukční) dělení	10
2.1.1.1 První meiotické dělení.....	10
2.1.1.2 Druhé meiotické dělení	12
2.1.2 Spermioogeneze	12
2.1.3 Oogeneze.....	13
2.2 Embryogeneze	14
2.3 Histonový kód a modifikace.....	17
2.3.1 Struktura chromatinu.....	17
2.3.2 Varianty histonů	17
2.3.3 Post-translační modifikace	20
2.3.3.1 Metylace	20
2.3.3.2 Acetylace	22
2.3.3.3 Histon deacetylázy jako regulátory acetylace histonů.....	22
2.3.3.4 Fosforylace	24
2.3.3.5 Ubiquitinace	25
2.4 Gasotransmitery.....	26
3. Cíle práce	29
4. Materiál a metody	30
5. Výsledky	33
5.1 Lokalizace sulfan-uvolňujících enzymů v oocytech	33
5.1.1 CBS	33
5.1.2 3-MPST	35
5.2 Lokalizace SIRT1 v oocytech	37
6. Diskuse.....	39
7. Závěr	43
8. Seznam obrázků.....	44
9. Seznam tabulek	44
10. Seznam zkratk	44
11. Seznam použité literatury	46

1. Úvod

Produkce gamet, jejich následná fúze a postzygotický vývoj jsou klíčové mechanismy pro budoucí vývoj organismu a zachování druhu. Vzhledem k rostoucím problémům s plodností, ať už v lidské populaci nebo i v případě intenzivně šlechtěných hospodářských zvířat, je hlubší znalost této problematiky více než žádoucí.

Tvorba pohlavních buněk a raný embryonální vývoj je spojen s rozsáhlou přestavbou chromatinu. Za jeho správnou modulaci jsou zodpovědné epigenetické mechanismy. Jejich správná funkce je esenciální pro správný průběh gametogeneze a časně embryogeneze. V případě disfunkce některých epigenetických mechanismů dochází k výraznému poklesu kvality gamet, časně embryonální odúmrti, a tedy i poklesu fertilizační schopnosti.

V buněčné signalizaci vždy sehrávaly unikátní úlohu ne-proteinové molekuly druhých posílů. V současné době jsou středem zájmu tzv. gasotransmitery, plynné molekuly se schopností přenosu buněčného signálu: oxid dusnatý, oxid uhelnatý a sulfan. Z těchto gasotransmiterů je právě sulfan kandidátním modulátorem enzymatické aktivity a proteinů odpovědných za epigenetické změny.

Propojení epigenetiky a gasotransmiterů umožňuje nový pohled na problematiku gametogeneze a embryogeneze a dává další možnosti studia poruch reprodukčních mechanismů a také jejich reparace.

2. Literární přehled

2.1 Gametogeneze, meiotické dělení

Embryonální vývoj je proces započatý splynutím samčí a samičí gamety, produktů gametogeneze. Tvorba pohlavních buněk je unikátní díky redukci počtu chromozómů v buňce z diploidního stavu ($2n$) na haploidní (n) v procesu redukčního dělení (Kočárek et al., 2010). Díky tomuto mechanismu mohou dát gamety vzniknout novému diploidnímu organismu (Jelínek et Jelínek, 2006).

V případě špatné distribuce chromozómů (tj. aneuploidie, polyploidie) do gamet dochází k vážným nemocem, které narušují embryonální vývoj, anebo jsou takové chyby zcela letální (Alberts et al., 1998). Meióza zahrnuje dvě po sobě jdoucí dělení, jejichž průběh je odlišný (Jelínek et Jelínek, 2006).

2.1.1 Meiotické (redukční) dělení

2.1.1.1 První meiotické dělení

Na počátku meiotického dělení dochází k duplikaci všech chromozómů, tj. předchází jí S-fáze obdobně jako v případě mitózy. Každý chromozóm je tvořen dvěma sesterskými chromatidami. První redukční dělení je sled následujících fází: profáze I, metafáze I, anafáze I a telofáze I (Jelínek et Jelínek, 2006).

Profáze I

První profáze se dělí do pěti stádií: Leptotene, Zygotene, Pachytene, Diplotene a Diakineze (Snustad et Simmons, 2010) a je nejvýznamnějším a nejdelším článkem (Jelínek et Jelínek, 2006).

Leptotenní fáze je charakteristická kondenzací chromatinu. V zygotenní fázi se k sobě homologní chromozómy přibližují a tvoří synapse. Synapse jsou většinou doprovázeny bílkovinnými strukturami, synaptonemálním komplexem, který se podílí na párování chromozómů (Snustad et Simmons, 2010) a funkčně připomíná „uzavírání zipu“. Proces konjugace je podmíněn sblížením homologních chromozómů po celé své délce. Výsledkem této fáze je poloviční počet konjugovaných párů chromozómů (Vacek, 2006).

V pachytenním stádiu dochází ke tvorbě bivalentů, tetrad chromatid, z kondenzovaných chromozómů (Snustad et Simmons, 2010). Také dochází ke vzniku

dvouřetězcových zlomů, které se podílejí na rekombinaci homologických chromozómů. Reparace zlomů může probíhat za vzniku *crossing overů*, tedy procesu překřížení homologních chromozómů a výměny úseků DNA, které jsou jedním ze způsobů zajištění genetické variability. Díky dvouřetězcovým zlomům jsou oocyty náchylné k poškození (Reichman et al., 2017). Na tvorbě těchto zlomů se podílejí modifikace histonů, jako metylace (Hayashi et al., 2005).

V diplotenní fázi se od sebe separují homologní chromozómy a na konci fáze jsou spojeny jen chiasmata, místy, kde v pachytene docházelo ke *crossing overům* (Kočárek et al., 2010). Ve fázi diakineze chromozómy stále kondenzují a jaderný obal začíná zanikat. Mikrotubulární vlákna dělicího vřeténka prostupují do jádra a napojují se na kinetochory chromozómů. Chromozómy jsou stále propojeny chiasmata (Snustad et Simmons, 2010).

Metafáze I

Bivalenty se přemístí do centrální (ekvatoriální) roviny a chromozómy se přichytí k dělicímu vřeténku. Orientace centromer homologických chromozómů k opačným pólům je náhodná a je tak zaručena nezávislá segregace genů bez vazebných interakcí (Kočárek et al., 2010).

Anafáze I

Během anafáze I dochází k oddělení homologických chromozómů, tento proces se nazývá chromosomální disjunkce. Chromozómy se shromáždí u opačných pólů buňky (Snustad et Simmons, 2010). Dceřiná buňka zdědí jeden homologní chromozóm z bivalentu (Kočárek et al., 2010).

Telofáze I

Během posledního stádia prvního meiotického dělení dochází k zániku dělicího vřeténka. Dceřiné buňky jsou od sebe odděleny membránou, dojde k dekondenzaci chromozómů a k vytvoření jader v každé dceřiné buňce. U některých druhů nedochází k úplné dekondenzaci a vývoj pokračuje ihned druhým meiotickým dělením. Buňky vzniklé prvním redukčním dělením obsahují haploidní počet chromozómů. Chromozómy obsahují dvě chromatidy, které vlivem možné výměny genetického materiálu v průběhu pachytene nemusí být identické (Snustad et Simmons, 2010).

2.1.1.2 Druhé meiotické dělení

V průběhu profáze II dochází ke kondenzaci chromozómů a jejich uchycení na dělicí vřeténko. Posun chromozómů do ekvatoriální roviny je charakteristický pro metafázi II. V anafázi II se centromery rozdělí a umožní tak rozchod sesterských chromatid do dceřiných buněk. Telofáze II je charakteristická shromažďováním jednochromatidových chromozómů v blízkosti pólů, kolem nich vzniká dceřiné jádro. Každé dceřiné jádro obsahuje haploidní sadu chromozómů. Na rozdíl od mitózy, které je meióza druhým dělením podobná, je výsledkem meiózy haploidní sada chromozómů a buňky nejsou geneticky identické (Snustad et Simmons, 2010).

2.1.2 Spermioogeneze

Vznik spermii se dělí na dvě stádia. Spermiocytogenezi, která zahrnuje množení, růst a meiotické zrání, a spermiohistogenezi (metamorfózu) (Jelínek et Jelínek, 2006).

V raném postnatálním období jsou v samčích gonádách identifikovatelné pohlavní buňky – velké, světlé buňky uložené v buňkách podpůrných. Podpůrná funkce je realizována Sertoliho buňkami, které jsou produktem epitelu pohlavních žláz. Před stádiem adolescence dochází k rozvoji semenotvorných kanálků ze zárodečných pruhů (Sadler, 2011). V období spermiocytogeneze dochází k množení spermiogonií vzniklých z gonocytů. Vlivem opakovaného dělení spermiogonií dochází ke vzniku generací buněk s označením A, I a B. Fáze množení je zastavena vznikem B generace. V následné růstové fázi dochází u spermiogonií B ke zvětšení, tímto zvětšením vzniká spermiocyt I. řádu. Zrací fáze je charakteristická dělením spermiocytů I. řádu na spermiocyty II. řádu a redukcí chromozómů do haploidního stavu. Spermiocyt II. řádu dává svým dělením vzniknout dvěma spermatidám (Jelínek et Jelínek, 2006).

V průběhu spermiohistogeneze procházejí spermatidy řadou změn. Dochází k nahrazení většiny histonů protaminy a tím je dosaženo kompaktnějšího chromatinu (Rathke et al., 2014). Protaminy se vyskytují ve dvou formách, protamin 1 (P1) a protamin 2 (P2). Poměr protaminů P1 a P2 je druhově odlišný. V mužských spermiiích zůstává přibližně 15 % histonů nenahrazeno (Bench et al., 1996). Vlivem protaminů je dosaženo až šestinásobného zhuštění DNA, než je tomu u mitotických chromozómů (Fuentes-Mascorro et al., 2000). Chromatin kondenzuje do toroidních

struktur, které se od nukleozómu liší substitucí histonů za protaminy a také transkripčně neaktivní DNA (Casas et Vavouri, 2014). Toroidy jsou organizované do stejně velkých smyček přiléhajících k toroidní ose vykonávající precesní pohyb (Hud et al., 1995). Velikost toroidu je ovlivněna nukleační smyčkou, která svou velikostí ovlivňuje průměr, a koncentrací roztoku solí, která pozitivně koreluje s jeho šířkou (Conwell et al., 2003).

Dalším krokem je tvorba hydrolytických enzymů. V přední části spermie dochází k vytvoření akrosómu, který díky hydrolytickým enzymům napomáhá fertilizaci (Sadler, 2011). Mikrotubulární vlákna se shlukují do svazků, které vytvoří kaudální manžetu. Díky mikrotubulům dochází k prodloužení jádra, organely se přemísťují do kaudální části buňky. Spermiohistogeneze je ukončena oddělením funkčně nepotřebných organel ve formě tzv. cytoplazmatické kapky (Jelínek et Jelínek, 2006). Morfologie hlaviček spermií je druhově rozdílná. U lidí a řady savců se vyskytuje kulatý typ hlavičky, u myši je to typ háčkovitý (García-Vázquez et al., 2016).

Fyziologie spermiogeneze je častou příčinou neplodnosti. Stejně tak je celý proces, coby unikátní model pro studium buněčného cyklu, dosud nepopsán. Z těchto důvodů je další výzkum spermiogeneze nezbytný (doc. Ing. Jan Nevoral, Ph.D., *in verb*).

2.1.3 Oogeneze

V průběhu embryonálního vývoje dochází k přesunu buněk entodermu vaječníků do kůry ovarií, tyto buňky se dále modifikují v oogonie. Jejich dělením a obklopením vrstvou buněk vznikají primordiální folikuly (Jelínek et Jelínek, 2006). Růstem těchto folikulů dochází k přeměně plochých buněk na kubické a vlivem produkce glykoproteinů se vytvoří *zona pellucida*. Před koncem prenatálního vývoje dochází k zahájení meiotického dělení do profáze I, kde je do nástupu pohlavní dospělosti pozastaveno (Sadler, 2011). V průběhu ovariálních cyklů dochází k znovuoobnovení dělení a po první fázi meiózy je výsledkem oocyt II. řádu a pólové tělísko (Jelínek et Jelínek, 2006). Oocyt II. řádu obsahuje převážnou většinu cytoplazmy (Sabó et al., 2004). Druhé meiotické dělení je spuštěno po ovulaci kontaktem spermie s membránou oocyta II. řádu. Z tohoto dělení vystupuje ovum (zralé vajíčko) a pólocyt (Albertini, 2015). V případě, že nedojde v MII fázi

k oplodnění oocytu, dochází k degradačním procesům nazývaným stárnutí (Liang et al., 2012).

Pólocyt, ač dceřiná buňka, je oproti oocytu nepřiměřeně malý. Rozdílná velikost dceřiných buněk je dána asymetrickým umístěním dělicího vřeténka, které se díky interakci mezi buněčnou membránou a centriolou pohybuje (Hyman et White, 1987; Hyman, 1989). Ačkoliv je poměr dvou sesterských buněk enormní, jejich genetická výbava a vývojový potenciál je srovnatelný. Bylo zjištěno, že po nahrazení maternálního prvojádra druhým pólovým tělískem, které není do normálního vývoje nikdy zakomponováno, je zachována dobrá schopnost vývoje. Tento potenciál se v závislosti na stáří druhého pólového tělíska snižuje (Wakayama et al., 1997).

Přítomnost prvního pólového tělíska prokazuje fakt proběhlého zrání oocytu (Sharma et al., 2018), druhé pólové tělísko pak signalizuje oplozený oocyt (Sato et Blandau, 1979). Pólocyty lze využít k diagnostice některých genetických poruch. Analýzou prvního pólového tělíska lze určit zdravý oocyt, v případě že matka byla pro genetickou poruchu heterozygotní. Odstraněním pólocyту nebyly prokázány žádné negativní vlivy na oplození a vývoj embrya (Verlinsky et al., 1990). Podle morfologie a kvality prvního pólového tělíska lze určit kvalita embrya. Vyšší fragmentace byla zaznamenána u embryí, jejichž první pólocyt byl porušen, v porovnání s nefragmentovanými pólocyty. S neporušenými pólovými tělísky koreluje i ranější vznik blastocysty, nidace embrya a jeho následný vývoj, který je přibližně dvojnásobný, než je tomu u fragmentovaných pólových tělísek (Ebner et al., 2002).

Celkový počet pólových tělísek se pohybuje mezi dvěma a třemi. Pólocyt vzniklý prvním meiotickým dělením se může účastnit druhého meiotického dělení a dát tak vzniknout dvěma pólovým tělískům, nebo degraduje, vstřebá se a v takovém případě jsou pólová tělíska jen dvě (Sabó et al., 2004). Kromě *zony pellucidy* se na tvorbě obalu oocytu a gamety podílí i *corona radiata*, která se granulárními buňkami připojuje k první zmíněné vrstvě (Jelínek et Jelínek, 2006).

2.2 Embryogeneze

Fertilizace u savců je započata v ampulární části vejcovodu, kde dochází ke kontaktu ovulovaného oocytu se spermii. Z milionů spermií se jich do tohoto místa dostane jen několik set. Pro oplození je nezbytný sled několika stádií zrání samčích gamet. První fází je kapacitace (Slípka et Tonar, 2019). K této fázi dochází

v samičích pohlavních cestách a je nezbytná pro schopnost spermií oplodnit oocyt (Chang, 1984). Dalším stupněm zrání spermie je akrozomální reakce. Vlivem enzymů hyaluronidázy a následně akrozinu dochází k průniku spermie skrz *corona radiata* a *zona pellucida* do oocytu. Dotykem povrchů gamet dochází ke spuštění kortikální reakce (Sadler, 2011). Kortikální granula vypustí lysozymové enzymy do perivitelinního prostoru a společně s polysacharidy se podílejí na ztvrdnutí *zóny pellucidy* a zvětšení perivitelinního prostoru, čímž dochází k vytvoření bariery proti dalším spermiím (Slípka et Tonar, 2019).

Spermie se dostává do ooplazmy, kde pomocí proteazómů dochází k oddělení bičíku od hlavičky spermie a také k odpoutání centrioly (Rawe et al., 2008). Díky centriole, kterou do oocytu přináší spermie, je možné dokončit druhé meiotické dělení. Produktem je druhé pólové tělísko a zralý oocyt. Chromozómy oocytu vytvářejí měchýřkovité samičí prvojádru (Sadler, 2011). Dekondenzací jádra spermie je umožněna výměna histonů, ostatních jaderných proteinů a přeměna v měchýřkovité samčí prvojádru (Vacek, 1992), na této přeměně se mimojiné podílí i proteazómy, struktury podílející se na degradaci (Rawe et al., 2008).

Spermie proniká během oplození do oocytu a tak je v průběhu embryogeneze nutná eliminace paternálních mitochondrií. Paternální mitochondrie jsou v ooplazmě ubiquitinovány a následně lysozomy degradovány, proto je dědičnost mitochondriální DNA možná po maternální linii (Rojansky et al., 2016). Panují však i opačné názory, kdy bylo zjištěno, že paternální mitochondriální DNA nemusí vždy zanikat. Otcovská mitochondriální DNA byla detekována v několika případech v placentě a různých tělních tkáních (Luo et al., 2013). U jedné myši byla dokonce paternální mitochondriální DNA nalezena ve tkáni vaječníků, což by znamenalo možný přenos mitochondriální DNA otce na potomstvo přes maternální linii (Gyllensten et al., 1991).

Fúze obou gamet dává vzniknout diploidní zygotě. Oplozením vajíčka je geneticky určeno pohlaví plodu, to je v případě savců závislé na spermii, která může nést Y nebo X chromozóm (Slípka et Tonar, 2019).

Zygota prochází rýhováním – řadou mitotických dělení, při kterých počet blastomer (dceřiných buněk) roste geometrickou řadou (Slípka et Tonar, 2019). Větší blastomery se dělí v porovnání s menšími blastomery dříve, díky tomu vznikají přechodná stádia s lichými počty blastomer (Vacek, 1992). *Zona pellucida* stále

ohraničuje zygotu, tento fakt způsobuje, že ve „vyšších“, po dvoubuněčném stádiu následujících stádiích, dochází po každém dělení ke zmenšování blastomer (Slípka et Tonar, 2019).

Do dělohy se dostává plod v 16-ti buněčném stádiu, ve stádiu moruly (Slípka et Tonar, 2019). Dalším krokem vývoje je stádium blastocysty, které je charakteristické rozprostřením blastomer po obvodu, tím uvnitř vzniká dutina blastocoel (Vacek, 1992). Ve stádiu expandované blastocysty dochází k procesu zvanému „*hatching*“, procesu, při kterém dojde k uvolnění blastocysty mimo *zonu pellucidu* (Sathananthan et al., 2003). „*Hatching*“ blastocysty je důležitým krokem pro nidaci a její další vývoj. Tento proces je závislý na velikosti tlaku, na kterém se podílejí ionty, voda, osmolarita a tvrdost *zony pellucidy*. Hodnota tlaku byla sledována i u zamražených embryí, výsledkem bylo zjištění, že v porovnání s čerstvými embryi mražená embrya vykazují snížený tlak, a tedy i nižší životaschopnost (Leonavicius et al., 2018). Sathananthan et al. (2003) uvádí, že se na „*hatchingu*“ podílí buňky označované jako „*zona-breakers*“, které svojí lysozomální aktivitou napomáhají porušit *zonu pellucidu*.

Blastocysta se v děloze pohybuje a je vyživována jejím sekretem. V tomto stádiu dochází k rozrůznění trofoblastu a embryoblastu, kterým blastocysta přisedá na stěnu děložní sliznice a dochází k nidaci (Vacek, 1992). Časný embryonální vývoj z pohledu časové osy je demonstrován tabulkou 1.

Tabulka 1: Časný embryonální vývoj myši (Theiler, 2013; Hill, 2020).

Den embr. vývoje	Průběh vývoje	Stádium (počet buněk)
1. (E 1.0)	Dělení zygoty ve více buněčná stádia (k prvnímu dělení dochází do 24 hodin).	Zygota, morula (1-4)
2. (E 2.0)	Dělení buněk.	Morula (4-16)
3. (E 3.0)	Dělení buněk, přeměna moruly v blastocystu.	Morula – blastocysta (16-40)
4. (E 4.0)	Blastocysta je bez <i>zony pellucidy</i> , trofoblast a embryoblast je diferencovaný, dochází k nidaci.	blastocysta

Klíčovým rozhraním embryonálního vývoje je implantace (E 4.0). Tento mezník odděluje časný embryonální vývoj od post-implantačního vývoje, který je charakteristický vývojem orgánových soustav (Theiler, 2013; Hill, 2020). Mimoto je vývoj až do nidace univerzální pro myš i pro člověka (Kirkegaard et al., 2011; Theiler, 2013).

2.3 Histonový kód a modifikace

2.3.1 Struktura chromatinu

Genetická informace je zapsána ve formě DNA, v organismu se nejčastěji vyskytuje v B pravotočivé formě, jejíž strukturu objasnili Watson et Crick (1953). DNA společně s histony a dalšími bílkoviny tvoří chromatin (Luger et al., 2012), který je uspořádán do nukleozómů, struktur tvořených oktamerem histonů a 146 párů bází dlouhým úsekem DNA. Do struktury oktameru jsou zakomponovány 4 typy histonů: H2A, H2B, H3 a H4, každý z těchto histonů je zastoupen dvěma kopiemi (Luger et al., 1997). Struktura histonů je v rámci eukaryot velmi konzervovaná (Ouzounis et Kyrpides, 1996). Histon H1 společně s dalšími proteiny spojuje jednotlivé nukleozómy a podílí se tak na tvorbě sekundárních struktur (Luger et al., 2012; Shahid et al., 2019). Změny ve struktuře, dynamice a stabilitě na nukleozómové úrovni ovlivňují kondenzaci chromatinu na vyšších stupních. Nejvyšší formou kondenzovaného chromatinu je metafázový chromozóm (Luger et al., 2012).

Epigenetické modifikace, ač „neviditelné“ v zápisu genetické informace, jsou pro centrální dogma molekulární genetiky nepostradatelné. Modifikace postihují DNA a histony, díky těmto mechanismům se podílejí, kromě jiného, na stavu kondenzace nebo dekonenzace chromatinu a tím i řídí samotné centrální dogma molekulární genetiky, tedy genovou manifestaci přepisem genů do proteinů (Luger et al., 2012).

2.3.2 Varianty histonů

Díky post-translačním modifikacím (PTMs) se mění funkce histonů, dochází k jejich aktivaci, nebo represi, podílejí se na apoptóze, buněčném cyklu, ovlivňují buněčné dělení atd. PTMs hrají významnou roli ve variabilitě a jsou nepostradatelným článkem v regulaci genomu a fenotypu (Zhao et Garcia, 2015). Některé varianty histonů jsou popsány níže.

Histon H1

Fosforylace histonu H1 v různých fázích buněčného cyklu umožňuje dekonduzaci chromatinu a přístupnost transkripčním faktorům (Sarg et al., 2006).

Histon H2A

Histon H2A má tři podskupiny, H2A1-H2A2, H2AX a H2AZ. H2AX je z celkového množství zastoupen ve 2-25 %. H2AZ tvoří 10% část a procentuální zastoupení H2A1-H2A2 je doplňkem k předchozím dvěma podskupinám (Rogakou et al., 1998).

Modifikace histonu H2AX jsou spojeny s dvouřetězcovými zlomy v DNA (Zhao et Garcia, 2015). Fosforylovaný histon H2AX na serinu 139, známý jako γ H2AX, je lokalizován v místech dvouřetězcových zlomů DNA, indukovaných ionizujícím zářením. Fosforylace je iniciována DNA dependentní proteinovou kinázou (DNA-PK) (Rogakou et al., 1998). Dále je rozvinuta kaskádou enzymů na jejímž vrcholu je acetylovaný (ac) histon H4 na lysinu (K) 16 (H4K16ac). Tato modifikace histonu umožňuje přístup reparačním mechanismům (Jiang et al., 2018).

Histon H2B

Fosforylace (ph) histonu H2B na serinu 14 (H2BS14ph) se vyskytuje v apoptických buňkách za stavu, kdy dochází k fragmentaci nukleozomální DNA (Ajiro, 2000). Enzym RAD6, závislý na ubiquitinaci (u) histonu H2B na lysinu 123 (H2BK123u) způsobuje metylaci (me) na histonu H3K4. V případě mutace v H2AK123 se podílí na umlčování telomer (Sun et Allis, 2002).

Histon H3

Metylace histonu H3 na lysinu 4 hraje nepostradatelnou roli v embryonálním vývoji, kdy se podílí na modelaci vzorců genové exprese. I u adultních jedinců hraje tato modifikace důležitou roli. Při snížení množství tri-metylovaného histonu H3K4 (H3K4me3) byl zjištěn negativní vliv na srdeční tkáň (Stein et al., 2011). Tri-metylace histonu H3K4 je katalizována metyltransferázou Meisetz. Meisetz se vyskytuje ve varlatech a v oocytech v profázním meiotickém stádiu, v případě její disfunkce jsou obě pohlaví sterilní (Hayashi et al., 2005). Acetylce a metylce histonu H3K4 sdílí stejné místo, ovšem v rozdílném čase. H3K4ac je zodpovědný za genovou expresi. Na acetylaci H3K4 se podílejí histon acetyltransferázy (HATs) GCN5 a RTT109. Histon deacetyláza (HDAC) HST1 deacetyluje histon v euchromatinu,

v heterochromatinu je tento krok zprostředkován SIRT1. Regulace H3K4ac je zprostředkována metylací H3K4 (Guillemette et al., 2011).

Acetylovaný histon H3K9ac signalizuje transkripční aktivitu, ale často bývá i signifikátorem porušené DNA (Khobta et al., 2010). Selektivní histon metyltransferázy (HMTs) SUV39H1 a SUV39H2 metylují histon H3 na lysinu 9 (H3K9), díky čemuž mění dynamiku chromatinu. Obě HMTs jsou si velmi podobné, rozdíl mezi nimi tvoří přibližně 40 %, rozdílem je prodloužený N konec SUV39H2. Exprese SUV39H2 je nejvíce exprimovaná v 10. dnu embryonálního vývoje (E 10,5), s postupujícím vývojem má sestupný charakter, podobná křivka exprese postihuje i SUV39H1. Ačkoliv je v embryonálním vývoji lokalizace dosti podobná, v tělech adultních jedinců je jejich distribuce rozdílná. SUV39H1 je determinován ve více než deseti tělních tkáních, oproti tomu SUV39H2 je exprimován pouze ve varlatech, v ranných stádiích spermatogeneze (O'Carroll et al., 2000).

Histon H4

Histon H4K5 je monometylován enzymem SMYD3. Tato metyltransferáza se podílí na vzniku rakovinného bujení. H4K5me je tedy markerem, díky kterému lze toto bujení detekovat (Van Aller et al., 2012).

Methyltransferáza SET5 monometylující H4K8me se společně s dalšími komplexy modifikujícími chromatin podílí na stresové odpovědi a buněčném růstu (Green et al., 2012).

Histon H4K16ac, zodpovědný za dekonduzaci chromatinu, je nepostradatelnou složkou v inaktivaci X chromozómu. Disfunkce se podílí na vzniku rakoviny (Jeppesen et Turner, 1993; Zhu et al., 2015).

Zrání oocytů, pilíř, na kterém je založen další vývoj, je ovlivňován H4K16ac. HDAC2 se podílí na deacetylaci této histonové modifikace a tím zajišťuje správný průběh segregace chromozómů. Nadměrné množství H4K16ac působí na kinetochory, čímž se snižuje jejich funkčnost (Ma et Schultz, 2013). Nezbytnou roli hraje H4K16ac i v oblasti spermiogeneze. Acetylace je zprostředkována HAT MOF. U knock-outovaných jedinců tohoto enzymu došlo k rapidnímu zmenšení varlat v poměru k velikosti těla. Byl determinován i vyšší podíl apoptických spermatocytů. Tyto fakty ukazují na významný vliv acetylace H4K16 ve spermiogenezi (Jiang et al., 2018).

2.3.3 Post-translační modifikace

DNA a histony jsou upravovány různými typy PTMs, například metylací, acetylací, fosforilací a ubiquitinací. Principem PTMs je navázání konkrétní skupiny na aminokyseliny charakteristické pro danou modifikaci (Shahid et al., 2019). Lokalizace PTMs se kromě vazby na konkrétní aminokyseliny odvíjí i od struktury nukleozómu. N-konce histonů vystupují ven z nukleozómu, a proto jsou snadno přístupné skupinám proteinů, které se na regulaci PTMs podílejí. Jedna skupina „*writers*“ je tvořena enzymy, jež se podílejí na připojování skupin k histonům, například HMTs, HATs nebo kinázy. Druhá skupina „*readers*“ zahrnuje struktury, které se podílejí na identifikaci specifických modifikací, jako reparační mechanismy DNA nebo transkripční faktory. Další skupinu tvoří „*erasers*“, které zprostředkovávají odstranění připojených skupin, v případě metylové skupiny, umístěné na histonech, se jedná o histon demetylázy (HDMs) (Sidoli et al., 2012). Vlivem PTMs je ovlivňována struktura chromatinu, tedy proces jeho kondenzace a dekonenzace, čímž se PTMs podílí na regulaci genové exprese (Shahid et al., 2019).

2.3.3.1 Metylace

Principem metylace je navázání metylové skupiny (CH₃) na aminokyselinu lysin. Těchto skupin může být na lysin umístěno několik, maximálně však tři. Díky tomu je působnost metylace značně rozsáhlá, protože odlišný počet metylových skupin má odlišné účinky. V současné době je metylace považována za nejvíce rozšířenou PTM a škála substrátů je velmi rozmanitá (Lanouette et al., 2014).

Významným substrátem je DNA. Přenos metylové skupiny je zprostředkován pomocí enzymů – metyltransferáz. Příkladem může být metyltransferáza DNMT1, která se podílí na přenosu informací o metylaci na nově syntetizovaná vlákna DNA (Jeffries, 2018). Metyltransferázy DNMT3a a DNMT3b jsou zapojeny do *de novo* metylace a jsou nezbytné pro normální vývoj jedince (Okano et al., 1999). Metyltransferáza DNMT3L se podílí na regulaci metylace *de novo* dvou výše zmíněných metyltransferáz skupiny DNMT3. V případě nedostatku DNMT3L byla zjištěna nedostatečná metylace v místech působení DNMT3a. Po doplnění DNMT3a dojde k částečné obnově metylace. DNMT3L pozitivně ovlivňuje a podílí se na metylaci zprostředkované DNMT3a (Veland et al., 2019).

Metylace je PTM vyskytující se v promotorech, kde ovlivňuje genovou aktivitu (Ambrosi et al., 2017). Přibližně 800 až 1000 bp před transkripčními místy jsou řetězce dinukleotidů guaninu a cytosinu tzv. „CpG ostrovy“ (Jeffries, 2018). Metylací cytosinu v těchto oblastech dochází k tomu, že transkripční faktor nerozpozná sekvenci DNA, na kterou nasedá a nedochází k transkripci (Shahid et al., 2019). Dalším typem opakujících se sekvencí jsou například C-H-H nebo C-H-G motivy (H představuje jinou bázi než G), které jsou metylovány v pluripotentních kmenových buňkách a embryonální tkáni (Ambrosi et al., 2017).

Demetylace je možné dosáhnout jak aktivní cestou (mechanismy nejsou závislé na replikaci), tak i pasivně (Ooi et Bestor, 2008). Pasivní formou demetylace je disfunkce DNMT1. Postupnými replikacemi tak dochází k pasivní demetylaci (He et al., 2017). Významnou složkou podílející se na demetylaci jsou enzymy skupiny TET, které mohou demetylovat DNA pomocí oxidace 5 – metylcytosinu. Metylová skupina může být replikací pasivně demetylována, nebo zpět navrácena na cytosin pomocí thymin DNA glykosylázy (TDG) a iterativní oxidace (Kohli et Zhang, 2013). V zygotách dochází k eliminaci methylace paternálního genomu. Díky analýze před první S fází buněčného cyklu, tedy bez účasti replikace, bylo zjištěno, že demetylace probíhá aktivním způsobem (Oswald et al., 2000). Stejný způsob demetylace je uveden i v práci Mayer et al. (2000), kde je navíc uvedena problematika demetylace maternálního genomu, ke které dochází po několika embryonálních děleních. Epigenetické přeprogramování se významně podílí na epigenetické dědičnosti mezi generacemi, na vývoji pluripotentních a totipotentních buněk a na imprintingu (Feng et al., 2010).

Metylace histonů hraje nepostradatelnou roli v embryonálním vývoji, kde zajišťuje správnou expresi genů. Při chybné metylaci může docházet k vývojovým vadám a k poškození orgánů. Hlavním místem methylace je histon H3, ale ostatní histony jsou metylovány také (Jambhekar et al., 2019). Represe nebo exprese genů závisí na počtu metylových skupin a na jejich lokalizaci (Zhao et Garcia, 2015). Příkladem může být histon H3K4, který se svou tri-metilací podílí na fertilitě (Hayashi et al., 2005). Také di- a tri-metylované histony H3K36 a H3K79 se podílejí na genové aktivitě. Metylace histonů H3K9 a H3K27 má na geny represivní účinek (Jambhekar et al., 2019).

2.3.3.2 Acetylace

Proces acetylace zahrnuje přenos acetylové skupiny z acetyl coenzymu A na sekvence lysinu za pomoci acetyltransferáz. Odstranění acetylové skupiny je zajištěno deacetylázami (Shahid et al., 2019). Acetylované histony se vyskytují v místech transkripčně aktivního chromatinu (Hebbes et al., 1988). Díky navázání záporně nabytých acetylových skupin HATs na kladně nabitou molekulu lysinu dochází k porušení a vazebných interakcí mezi záporně nabitou DNA a histony. Tento způsob zaručí, že je DNA rozvolněná, a tedy přístupná transkripčním faktorům (Shahid et al., 2019).

Deacetylované histony jsou lokalizovány v oblastech transkripčně neaktivního heterochromatinu (Jeppesen et Turner, 1993). Utlumení exprese genů je ovlivněno histon deacetylázami (HDACs), které oddělí acetyl od lysinu. Dochází k obnovení vazeb histonů s DNA řetězcem a jeho kondenzaci (Shahid et al., 2019).

2.3.3.3 Histon deacetylázy jako regulátory acetylace histonů

HDACs se dělí do čtyř tříd. První třída deacetyláz zahrnuje HDAC1, 2 a 3. Druhou skupinu tvoří HDAC4, 5, 6, 7, 9 a 10. Třetí skupinou jsou sirtuiny (Gregoretti et al., 2004). Později byla detekována HDAC11, která byla spolu s dalšími, této deacetyláze podobnými, proteiny vyčleněna do čtvrté skupiny (Gao et al., 2002; Gregoretti et al., 2004).

Třída sirtuinů zahrnuje 7 NAD^+ -dependentních enzymů (SIRT1 až SIRT7) (Morris, 2013). Sirtuiny jsou považovány za klíčové činitele v udržení homeostatických stavů, snižují náchylnost vůči degenerativním onemocněním, podílejí se na růstu buněk, metabolismu a toleranci stresu (Schwer et Verdin, 2008; Bao et Sack, 2010; Sack, 2011). Panují názory, že s činností sirtuinů v organismu souvisí kalorický příjem, pozitivní dopad kalorické restrikce vede právě k aktivaci sirtuinů (Sack, 2011).

Nejvíce probádanou deacetylázou z rodiny sirtuinů je Sirtuin 1 (SIRT1), ostatní členové skupiny na své hlubší prozkoumání čekají (Morris, 2013). Lokalizace SIRT1 je závislá na typu a stáří buněk. V neuronech byl SIRT1 detekován v cytoplazmě, protipólem jsou spermatocyty, kde je tato HDAC exprimována v jádře. V endymálních buňkách byl SIRT1, kromě cytoplazmy, zjištěn i v jádře. Jaderný SIRT1 se podílí na mechanismu, díky kterému dochází k potlačení apoptózy

způsobené stresovými faktory (Tanno et al., 2007). SIRT1 je zaměřen například na deacetylaci histonů H3K9ac a H4K16ac. V případě, že je SIRT1 nepřítomen nebo inhibován například nikotinamidem nebo sirtinolem, selektivním inhibitorem pro SIRT1 a SIRT2, jsou tyto modifikace v nadbytku (Vaquero et al., 2004; Adamkova et al., 2017; Nevoral et al., 2019). Aktivátorem SIRT1 je resveratrol, přítomný v běžné potravě, díky kterému dochází k deacetylaci. Uvolněné místo po odstranění acetylové skupiny, například na histonu H3K9, může být obsazeno metylovou skupinou. Deacetylase H3K9ac pomocí SIRT1 pozitivně koreluje s rychlostí vývoje blastocyst (Adamkova et al., 2017).

SIRT1 do svého pole působnosti zahrnuje i acetylovaný histon H1, tato deacetylase je nezbytná pro správnou kondenzaci chromatinu v mitotických chromozómech (Fatoba et Okorokov, 2011).

V průběhu vývoje oocyty dochází k relokizaci SIRT1. SIRT1 je přítomen v zárodečném váčku nezralých oocytů a jen nepatrně zastoupen v ooplazmě. Dělicí vřeténka oocyty metafáze I meiotického dělení jsou SIRT1 prosté, naopak v metafázi II vzor dělicího vřeténka, tedy α -tubulin, koreluje se SIRT1. Jako aktivátor SIRT1 byl použit na rozdíl od nescifického resveratrolu, specificky vázaný BML-278, který snižuje množství acetylovaného α -tubulinu (Nevoral et al., 2019). Na deacetylaci tubulinu se podílí i SIRT2, který je lokalizovaný výhradně v cytoplazmě a může být přítomen i v jádře (North et al., 2003).

SIRT3, 4 a 5 jsou enzymy detekované v mitochondriích. Nejvýznamnější roli při mitochondriální deacetylaci hraje SIRT3. Při jeho knock-outování se projevila hyperacetylase, tento stav ale neměl žádný dopad na životaschopnost jedinců ani na jejich plodnost (Lombard et al., 2007). SIRT4 se podílí na zrání oocytů, při zvýšené expresi tohoto enzymu nedochází ke správné distribuci mitochondrií v průběhu vývoje. Nadprodukce SIRT4 má vliv na snížení ATP a zvýšení produkce volných kyslíkových radikálů (*reactive oxygen species* – ROS) (Zeng et al., 2018). Deacetylační aktivita SIRT5 je slabší než u ostatních sirtuinů, funguje spíše jako demalonyláza a desukcinyláza než deacetyláza díky tomu může mít v porovnání s ostatními sirtuiny i méně cílových substrátů (Peng et al., 2011).

SIRT6 je celoplošně rozmístěn v jádře a je vázán na chromatin. Podílí se na reparaci DNA, jeho absence způsobuje větší náchylnost k poškození DNA, například k translokaci chromozómů (Mostoslavsky et al., 2006).

SIRT7 je jaderným enzymem podílejícím se na aktivování RNA polymerázy I a tím tedy i genové exprese. Jeho množství pozitivně koreluje s metabolicky aktivními tkáněmi, s játry a varlaty (Ford et al., 2006).

2.3.3.4 Fosforylace

Fosforylace je modifikací, při níž je přenesena fosfátová skupina z vysokoenergetického donoru, většinou ATP, na aminokyseliny threonin, serin nebo tyrosin. Enzymy řídící tuto se nazývají kinázy (Xue et al., 2010). Skupina těchto enzymů je velmi obsáhlá, je v ní zahrnuto více než 500 kináz (Caenepeel et al., 2004).

Tato PTM cílí na množství substrátů. Fosforylace například reguluje cytochromoxidázu (COX), enzym spojený s dýchacím řetězcem, a tedy s produkcí energie. Fosforylace serinu (S) 58 v jedné z podjednotek COX je podstatou její regulace zprostředkované protein kinázou A (PKA). Fosforylace S58 zamezuje vazbě ATP, tím dochází k alosterické inhibici ATP a k regulaci oxidativní fosforylace (Acin-Perez et al., 2011).

Do ochrany nervového systému je zapojena kináza PINK1, která společně s ubiquitin ligázou, Parkinem, chrání organismus před Parkinsonovou chorobou. PINK1 je lokalizován v mitochondriích, kde je zapojen do udržení homeostáze. Dalším místem výskytu je cytosol, kde jeho funkce není příliš známa (Beilina et al., 2005). Dagda et al. (2014) uvádí, že cytosolový PINK1 ovlivňuje délku neuritu a dendritů. V jiné studii je uvedeno, že cytosolová forma 53 kDa je velmi nestabilní, ale v přítomnosti ubiquitinovaného lysinu 63 se stává stabilním. PINK1 – 53 se podílí na degradaci zdravých mitochondrií, to by mohlo korelovat s ochranou buněk proti oxidačnímu stresu (Lim et al., 2015).

PTMs mohou být ovlivněny i samotné enzymy, které katalyzují další PTMs. Příkladem mohou být výše zmíněné enzymy TET, oxidázy s funkcí demetylace, jsou často na svém N konci fosforylovány. Na snížení fosforylace se podílí glykosyltransferáza OGT, která katalyzuje navázání N-acetylglukosaminu pomocí O-glykosidické vazby (O-GlcNAcylylace) na OH skupinu treoninu a serinu a tím je snížen počet míst vhodných pro ubiquitinaci. V rámci skupiny TET enzymů

vykazovala distribuce O-GlcNAcylatione různý vzor, ve všech případech ale došlo k poklesu ubiquitinace (Bauer et al., 2015).

Do oprav poškozené DNA je zapojena fosforylace histonů. Významný je v tomto ohledu histon γ H2AX (fosforylace na serinu 139), který usnadňuje přístup reparačních mechanismů. Dalšími faktory, do kterého fosforylace zasahuje je kondenzace chromatinu a regulace genové exprese. Fosforylovaný histon H3 na serinu 10 se podílí na kondenzaci chromatinu v průběhu meiózy a mitózy (Rossetto et al., 2012). Varianta histonu H3.3 fosforylovaná na serinu 31 podporuje aktivitu acetyltransferázy, a tím napomáhá genové expresi (Martire et al., 2019).

2.3.3.5 Ubiquitinace

Ubiquitin je polypeptid složený ze 76 aminokyselin (Dworkin-Rastl et al., 1984). Při ubiquitinaci dochází k jeho napojení do cílového místa především na lysin (Pickart, 2001). Připojení ubiquitinu je realizováno enzymatickou cestou, na napojení se konkrétně podílí E1 ubiquitin aktivující enzym, E2 ubiquitin spojovací enzym a E3 ubiquitin ligáza. Enzymy E2 a E3 jsou exprimovány ve více formách, což umožňuje velmi přesné zacílení na konkrétní protein a jeho regulaci (Hochstrasser, 2009).

Na protein se může připojovat různé množství ubiquitinu. Díky obsahu sedmi lysinů, které jsou hlavním cílem tohoto markeru. Další možností je navazování ubiquitinů na sebe za vzniku polyubiquitinace. Polyubiquitinované proteiny na lysinu 48 jsou odsouzeny k degradaci, ke které dochází v 26S proteazomu. Tento proces je započat vazbou polyubiquitinovaného proteinu na 19S regulační část proteasomu. Procesem závislým na ATP dochází k linearizaci proteinu a k jeho postupnému posouvání směrem k 20S centrální části, kde je protein degradován. Ubiquitinové „značky“ jsou odděleny a znovu použity (Bochtler et al., 1999; Hochstrasser, 2009). Ubiquitinační značení nedetekuje jen degradaci, například monoubiquitinace se podílí na regulaci histonů a stejně jako multiubiquitinace také na endocytóze (Haglund et al., 2003). Již zmíněná polyubiquitinace se kromě degradace podílí i na reparaci DNA v závislosti na napojení ubiquitinového řetězce na lysin, v případě reparace se jedná o lysin 46 (Spence et al., 1995).

Ubiquitin ligázy Parkin a MUL1 jsou nezbytné pro eliminaci paternální mitochondriální DNA v časném vývoji embrya. Proces přenosu mitochondriální DNA je díky tomu odkázán na maternální linii (Rojansky et al., 2016).

Ubiquitinace také modifikuje histony, kde hraje významnou roli v opravě poškozené DNA. Jsou známi 4 E3 ligázy, které do tohoto procesu zasahují. Každá z ligáz je specifická a ubiquitínuje jen daná místa. RNF168 ubiquitináza modifikuje lysin 13 a lysin15. Ubiquitinázy BRCA1 a BARD1 modifikují lysin 127 a 129, *in vitro* i lysin 125. Ubiquitin ligáza PRC1 modifikuje lysin119, v případě jeho delece je jeho funkce přemístěna na lysin 118 (Uckelmann et Sixma, 2017).

Nepostradatelnou roli hraje ubiquitinace i v oblasti reprodukce. Ubiquitinovaný histon H2A má vliv na správný průběh spermatogeneze, při jeho absenci je výsledkem sterilita. Destabilizace chromatinu vyvolaná uH2A by mohla korelovat s výměnou histonů za protaminy (Baarends et al., 1999).

2.4 Gasotransmitery

Termín gasotransmiter je označením malé plynné molekuly se schopností přenášet signál, jsou jimi například oxid uhelnatý (CO), oxid dusnatý (NO) a v poslední době i sulfan (H₂S). Gasotransmitery dokáží snadno prostupovat buněčnými membránami bez asistence membránových receptorů nebo transportérů. Tento fakt je ovlivněn dobrou rozpustností plyných molekul v tucích (Yang et al., 2016).

Oxid dusnatý je jako signální molekula známa již několik dekad i jeho funkce jsou zevrubněji prozkoumány. Naproti tomu sulfan jakožto gasotransmiter na odhalení většiny svých regulačních funkcí teprve čeká (Nevoral et al., 2016).

Jedná se o bezbarvý, jedovatý plyn zapáchající po zkažených vejcích, dobře mísitelný s vodou a ve vyšších koncentracích se stává velmi toxickým. Právě pro svoji toxicitu byl dříve hojně studován (Reiffenstein et al., 1992), dnes se však bádání uchyluje směrem chápání sulfanu jako gasotransmiteru.

Gasotransmitery jsou uvnitř organismu produkovány specifickými enzymy a ve fyziologických koncentracích jsou nepostradatelné. Abnormální produkce těchto molekul je spojena s funkcemi imunitního systému, dlouhověkostí, přežíváním buněk, vaskulárním systémem, metabolismem a odolností vůči stresu (Yang et al., 2016).

Sulfan může být v organismu přítomen ve dvou formách, jako plynná molekula nebo vázaná v buňkách ve formě sulfanové síry. Sulfan může, stejně jako oxid uhelnatý a oxid dusnatý svými vazbami na proteiny, cílit na proteinové substráty,

kterých v současné době není mnoho odhaleno, a za pomoci S-sulfhydratace ovlivňovat jejich funkce. S-sulfhydratovaný protein je vlivem nukleofility značně nestabilní, to se podepisuje i na stálosti této vazby. Do odstranění S-sulfhydratace je zakomponován thioredoxin, který kromě funkce S-denitrosylázy zahrnuje i funkci S-desulfhydratázy (Yang, 2017).

Sulfan vzniká několika metabolickými drahami. Na jedné z nich se podílí enzym cystationin- γ -lyáza (CSE), který je fyziologicky aktivován kalcium-kalmodulinem za vzniku sulfanu. Delecí tohoto enzymu bylo u myši zjištěno snížené množství sulfanu v srdci a dalších částích oběhového systému, dalším projevem byla snížená endotelní vazorelaxace a hypertenze. Sulfan produkovaný enzymem CSE se tedy podílí na regulaci krevního tlaku a vazodilataci kontraktilitou hladké svaloviny (Yang et al., 2008). S tímto tvrzením je v rozporu zjištění autorů Kuo et al. (2016), kteří uvádějí, že v koronálních arteriálních buňkách endotelu dochází k expresi sulfanu enzymem 3-merkaptopyruvát sulfurtransferázou (3-MPST) a nikoli CSE. Produkce sulfanu CSE byla inhibována propargylglycinem a i přesto se tato modulace na produkci sulfanu neprojevila. Účinky sulfanu korelují s přítomností oxidu dusnatého; za jeho přítomnosti dochází k vazokonstrikci, stav bez oxidu dusnatého pak vede k vazodilataci.

V mozku je sulfan syntetizován pomocí enzymu cystationin- β -syntázy (CBS). Knock-outovaný CBS měl u myši za následek výrazně sníženou produkci sulfanu. Byla zkoumána i aktivace CBS kalmodulinem. Jeho vlivem byl produkován jen sporadický výskyt sulfanu, po přidání Ca^+ iontů se jeho aktivační schopnost výrazně zlepšila. Výsledkem je zjištění, že tento aktivátor je Ca^+ -dependentní. Kromě kalmodulinu byla zjištěna produkce sulfanu při elektrické stimulaci a také působením L-glutamátu (Eto et al., 2002).

Kromě mozkových aktivátorů byly detekovány i jiné cesty aktivace CBS. Bylo zjištěno, že samci mívají vyšší expresi sulfanu než samice a kastráti. Po podání testosteronu samicím a kastrátům se v mozku zvýšilo množství SAM (S adenosyl-L-methyonin), který je aktivátorem CBS a tím tedy i nepřímo stimulatorem produkce sulfanu. Tento fakt ukazuje na vliv testosteronu ve vztahu k regulaci sulfanu (Eto et Kimura, 2002).

Gasotransmitery hrají významnou roli v oblasti reprodukce. Oxid dusnatý se podílí na vývoji oocytů, spermií, na akrozomální reakci, fertilizaci a embryonálním vývoji. Na rozdíl od oxidu dusnatého o zapojení sulfanu do reprodukce není mnoho známo (Nevoral et al., 2016). V oocytech byly lokalizovány všechny tři známé sulfan-uvolňující enzymy; CSE, CBS a 3-MPST. Byl zjištěn vliv sulfanu na meiotické zrání oocytů. Jednotlivé enzymy jsou schopny se v produkci sulfanu zastupovat. Absencí všech enzymů je docíleno inhibice meiotického dělení, tato inhibice je vratná (Nevoral et al., 2015). Dále je znám účinek sulfanu proti stárnutí oocytů. I přesto, že vliv třetí plynné molekuly, oxidu uhelnatého, v reprodukční oblasti není rozluštěn, je více než zřejmé, že gasotransmitery jsou pro regulaci reprodukce nepostradatelné (Nevoral et al., 2016).

3. Cíle práce

Cílem praktické části bylo ověřit hypotézu, kdy jsem předpokládal, že se sulfan-uvolňující enzymy exprimují v oocytech a embryích myši, stejně jako histon deacetyláza SIRT1, kde se podílejí na regulaci časného embryonálního vývoje. Pro ověření této hypotézy byly vytyčeny následující cíle:

I) Prokázat pomocí imunocytochemického barvení přítomnost sulfan-uvolňujících enzymů CBS a 3-MPST v oocytech a embryích.

II) Prokázat pomocí imunocytochemického barvení přítomnost SIRT1 v oocytech a embryích.

4. Materiál a metody

Praktická část této práce byla vypracována v Biomedicínském Centru v Plzni v Laboratoři reprodukční medicíny.

Chemikálie

Všechny základní chemikálie pro manipulaci a kultivace oocytů byly nakoupeny v Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, USA), pokud není uvedeno jinak. V experimentech byly použity následující primární protilátky: anti-CBS, anti-3-MPST a anti-SIRT1. Jako sekundární protilátky byla použita kombinace protilátek anti-mouse-AlexaFluor 488 a anti-rabbit AlexaFluor 647, nebo anti-rabbit-Alexa-Fluor 488 a anti-mouse AlexaFluor 647. Primární i sekundární protilátky byly ředěny v poměru 1:200. Základní použité chemikálie, včetně výrobce a katalogového čísla jsou demonstrovány tabulkou 2.

Tabulka 2: Základní použité chemikálie.

Název chemikálie	Výrobce	Katalogové číslo
4'6'-diamidino-2-fenylindol (DAPI)	Vector Laboratories Inc	H-1200
Anti-CBS	Abcam	ab96252
Anti-3-MPST	Abcam	ab85377
Anti-SIRT1	Abcam	ab104833
Anti-rabbit AlexaFluor 488	Abcam	ab150077
Anti-rabbit AlexaFluor 647	Abcam	ab150079
Anti-mouse AlexaFluor 488	Abcam	ab150113
Anti-mouse AlexaFluor 647	Abcam	ab150115
BSA (bovinní sérum albumin)	Sigma – Aldrich®	A7906
Falloidin	Cell Signaling technology®	13054
PFA (parafolmaldehyd)	Sigma – Aldrich®	P6148
PBS (fosfátem pufrovaný roztok)	Sigma – Aldrich®	P5368
PVA (polyvinyl-alkohol)	Sigma – Aldrich®	341584
Triton X-100	Sigma – Aldrich®	93443
Tween 20	Sigma – Aldrich®	P1379

Laboratorní zvířata

Jako modelový organismus pro experimentální část práce byla použita laboratorní myš (*Mus musculus*) kmene C57BL/6J. Pro model oocytů, postrádajících SIRT1, byl vytvořen kondicionální knock-out (*Sirt1^{-/-}*), exprimující SIRT1 v celém organismu mimo oocytů. Zvířata byla chována v režimu 12 hodin světla a 12 hodin tmy. Při teplotě 21 °C ± 1 °C a relativní vzdušné vlhkosti 60 %. Se zvířaty bylo

zacházeno v souladu se Zákonem 246/1992 Sb., o ochraně zvířat proti týrání. Všechny úkony byly provedeny v rámci schváleného projektu pokusů (MSMT-11925/2016-3). Samicím bylo intraperitoneální injekcí podáno 5 IU PMSG (gonadotropin séra březích klisen – *pregnant mare serum gonadotropin*). Za 48 hodin byly usmrceny cervikální dislokací a z ovárií byly izolovány nezralé oocyty ve stádiu zárodečného váčku (GV, *germinal vesicle*). Pro izolaci *in vivo* ovulovaných oocytů byly použity samice, kterým bylo podáno PMSG, a následně byly ošetřeny 5 IU hCG (humánní choriový gonadotropin – *human chorionic gonadotropin*). Po 16 hodinách byly *in vivo* dozralé oocyty vypláchnuty z vejcovodů. Po stejné hormonální stimulaci a přirozeném zapuštění prověřeným samcem byla z vejcovodů, resp. dělohy, izolována embrya ve stádiu dvou buněk, resp. blastocyst.

Fixace

Fixace oocytů a embryí probíhala podle dvou schémat. Při prvním, tradičním, způsobu fixace byly oocyty ponechány 30 minut při pokojové teplotě v 4% paraformaldehydu (PFA) v PBS s 0,1 % polyvinyl alkoholu (PVA). V druhém způsobu, alternativním, byl použit k fixování roztok PFA-Triton X-100 po dobu 15 minut, při 37 °C. Postup fixace následoval po permeabilizaci oocytů v 0,03% Tweenu v PBS-PVA po dobu 60 sekund, při 37 °C. Takto zafixované oocyty byly skladovány při teplotě 4 °C a následně podrobeny procesu imunocytochemického barvení.

Imunocytochemie (ICC)

Předem izolované a fixované oocyty a embrya byly zpracovány podle postupu uvedeného níže. (Objem roztoků, ve kterých probíhal oplach, permeabilizace a inkubace oocytů s primárními a sekundárními protilátkami byl 50 µl).

1. Oocyty byly 3x po sobě blokovány v 1% roztoku BSA v PBS s Tweenem 20.
2. Na dobu 15 minut byly oocyty permeabilizovány v roztoku PBS, který obsahoval 0,3 % Tweenu 20 a 0,04 % Tritonu X-100.
3. Oocyty byly oplachovány ve 3 kapkách 1% roztoku BSA v PBS s Tweenem 20 a ve čtvrté kapce byly ponechány po dobu 15 minut.
4. Oocyty byly po dobu 1 hodiny inkubovány s primárními, specifickými, protilátkami (produkovaných v myši a králíkovi; při použití dvou protilátek nesměli být jejich donoři stejného druhu). Použité protilátky jsou specifikovány v podkapitole chemikálie.

5. Oocyty byly blokovány 4x po sobě po dobu 15 minut v 1% roztoku BSA v PBS s Tweenem 20.
6. Oocyty byly inkubovány se sekundárními protilátkami po dobu 1 hodiny (jako sekundární protilátky byly použity protilátky získávané z kozího organismu, jednalo se o protilátky proti myším a králičím protilátkám, spojené s floresceinem). Použité protilátky jsou popsány v podkapitole chemikálie.
7. Oocyty byly oplachovány 15 minut 4x po sobě v 1% roztoku BSA v PBS s Tweenem 20 (pro lokalizaci β -aktinu byl 3. oplach nahrazen roztokem phalloidinu, ředěném v poměru 1:200 s 1% roztokem BSA v PBS s Tweenem, pokud byla odstraněna *zona pellucida*, byl tento krok přeskočen).
8. Oocyty byly montovány mezi podložní a krycí sklo za použití 4 μ l roztoku Vectashieldu s 4'6'-diamidino-2-fenylindolem (DAPI).
9. Krycí sklo bylo k podložnímu sklu přichyceno pomocí bezbarvého laku.
10. Připravené preparáty byly před snímáním za pomoci fluorescenční mikroskopie skladovány při 4 °C, pro dlouhodobé skladování byly preparáty uloženy do mrazáku při - 20 °C.

Negativních kontrol bylo docíleno vynecháním primárních protilátek. S oocyty použitými k negativní kontrole se v ostatních krocích postupovalo shodně s ostatními oocyty. Intenzita signálu mezi negativní kontrolou a vzorky byla porovnávána pomocí programu ImageJ (NIH, Bethesda, CA, USA).

Konfokální mikroskopie a analýza obrazu

Preparáty byly prohlíženy a snímány konfokálním mikroskopem Olympus IX83 (Olympus, Německo), za použití objektivu 100x a programu VisiView® (Visitron Systems GmbH, Německo). Další analýza získaného obrazu probíhala v programu ImageJ.

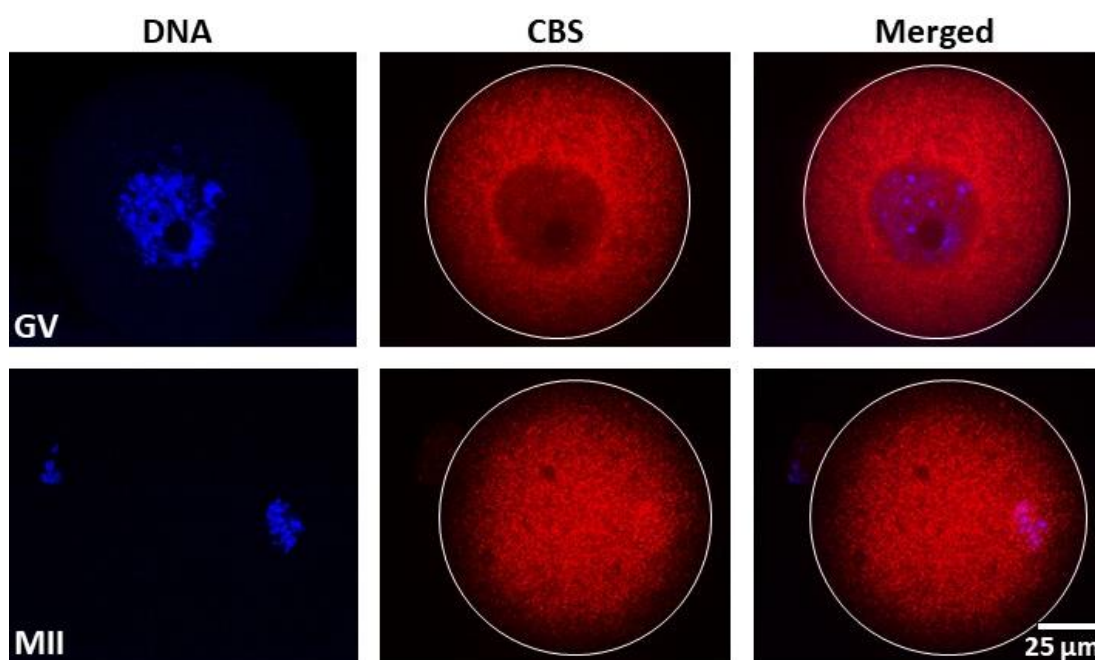
5. Výsledky

V praktické části byly zpracovány oocyty podle metodiky uvedené výše. Byly pořízeny snímky některých stádií sulfan-uvolňujících enzymů CBS (obrázek 1 a 2) a 3-MPST (obrázek 3 a 4). Dále byla lokalizována histon deacetyláza SIRT1, jejíž intracelulární distribuce je v jednotlivých stádiích demonstrována obrázky 5 a 6.

5.1 Lokalizace sulfan-uvolňujících enzymů v oocytech

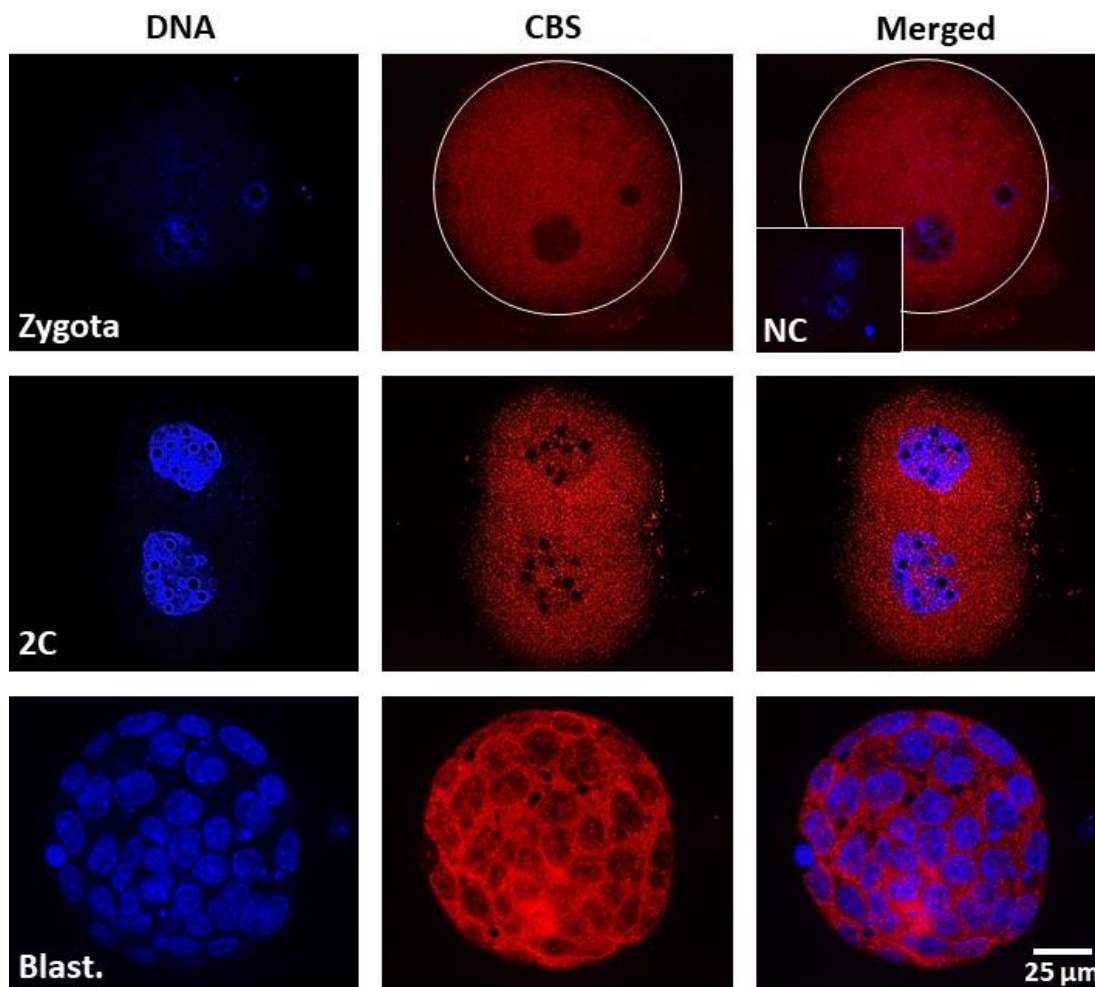
5.1.1 CBS

Prvním z mapovaných sulfan-uvolňujících enzymů byl enzym CBS, jehož výskyt v oocytech a embryích myši byl prokázán. V nezralém oocytu ve stádiu zárodečného váčku byl CBS lokalizován v cytosolu. Oocyt ve stádiu MII vykazoval distribuci v cytosolu a s vyšší intenzitou i v jádře (obrázek 1).



Obrázek 1: Reprezentativní snímky výskytu CBS v prezygotických stádiích. V řádcích jsou chronologicky znázorněna jednotlivá stadia vývoje. V prvním a druhém sloupci jsou zobrazeny jednotlivé barevné kanály. V posledním sloupci s označením „Merged“ byly vrstvy pro lepší vizualizaci překryvu jednotlivých kanálů sloučeny. Zkratky: GV (nezralý oocyt ve stádiu zárodečného váčku), MII (*in vivo* ovulovaný a zralý oocyt ve stádiu metafáze II).

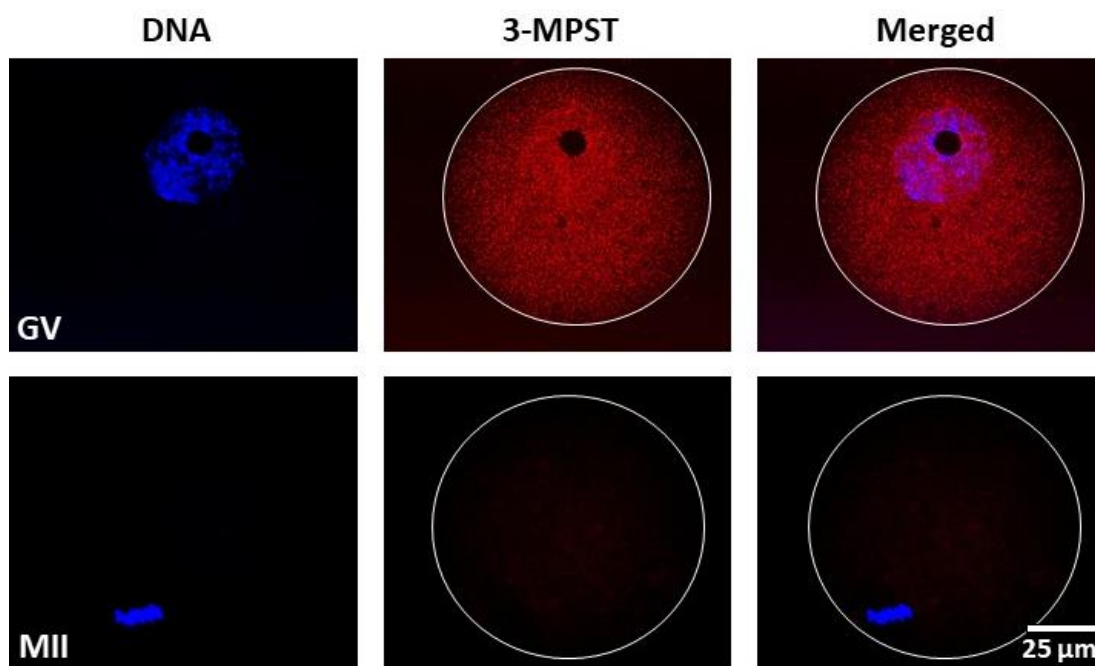
Rovněž byl prokázán výskyt CBS v zygotě, dvoubuněčném embryu a blastocystě. Ve všech těchto stádiích byl zjištěn výskyt enzymu v cytosolu (obrázek 2). Ve stádiu zygoty byla provedena pro ověření specifčnosti primárních protilátek negativní kontrola, kde byla v protokolu ICC vynechána primární protilátka.



Obrázek 2: Reprezentativní snímky výskytu CBS ve stádiu zygoty a postzygotických stádiích. V řádcích jsou chronologicky znázorněna jednotlivá stádia vývoje. V prvním a druhém sloupci jsou zobrazeny jednotlivé barevné kanály. V posledním sloupci s označením „Merged“ byly vrstvy pro lepší znázornění překryvu jednotlivých kanálů sjednoceny a ve stádiu zygoty je v tomto sloupci umístěna i negativní kontrola. Zkratky: 2C (dvoubuněčné embryo), Blast. (blastocysta), NC (negativní kontrola).

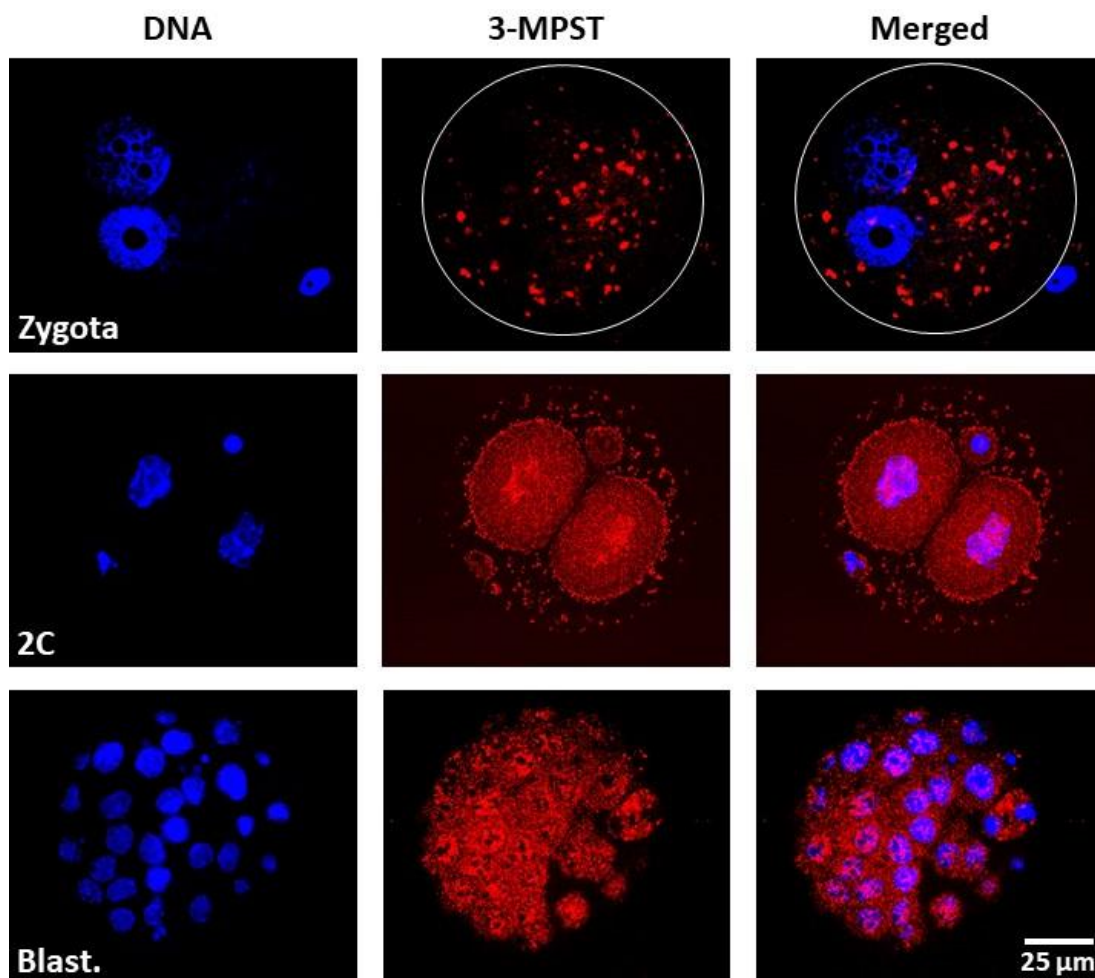
5.1.2 3-MPST

Druhým mapovaným enzymem podílejícím se na produkci sulfanu byl 3-MPST. I u tohoto enzymu byl potvrzen jeho výskyt (s výjimkou MII stádia). V nezralém oocytu ve stádiu zárodečného váčku byl 3-MPST exprimován v cytosolu i v jádře, a to s podobnou intenzitou. Oocyt ve stádiu MII nevykazoval přítomnost 3-MPST (obrázek 3).



Obrázek 3: Reprezentativní snímky výskytu 3-MPST v prezygotických stádiích. V řádcích jsou chronologicky znázorněna jednotlivá stádia vývoje. V prvním a druhém sloupci jsou zobrazeny jednotlivé barevné kanály. V posledním sloupci s označením „Merged“ byly vrstvy pro lepší vizualizaci překryvu jednotlivých kanálů sloučeny. Zkratky: GV (nezralý oocyt ve stádiu zárodečného váčku), MII (*in vivo* ovulovaný a zralý oocyt ve stádiu metafáze II).

V zygotě je 3-MPST distribuován v cytosolu, kde vytváří klastry. Ve fázi dvoubuněčného embrya a blastocysty byl enzym produkován více než ve stádiu zygoty. Kromě cytosolu byl v těchto stádiích detekován 3-MPST také v jádře, a to s vyšší intenzitou (obrázek 4).

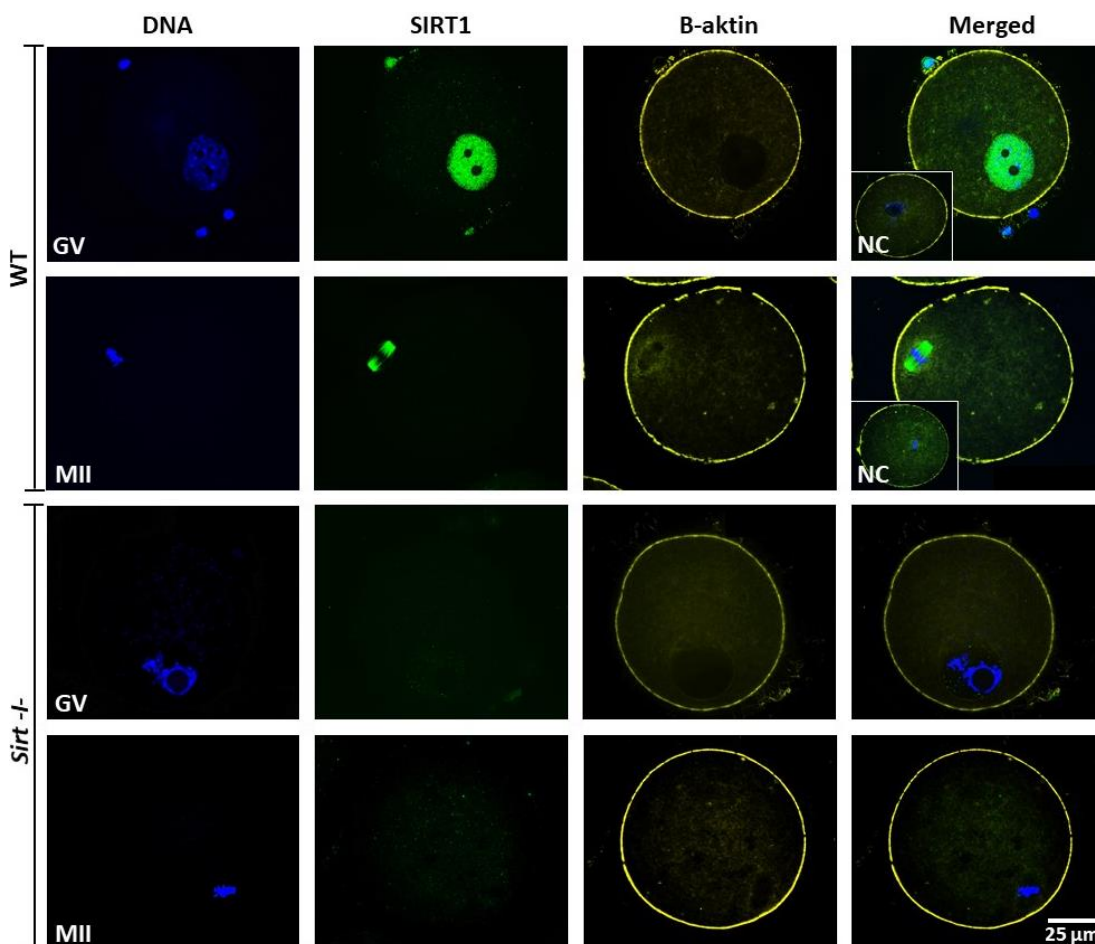


Obrázek 4: Reprezentativní snímky výskytu 3-MPST ve stádiu zygoty a postzygotických stádiích. V řádcích jsou chronologicky znázorněna jednotlivá stadia vývoje. V prvním a druhém sloupci jsou zobrazeny jednotlivé barevné kanály. V posledním sloupci s označením „Merged“ byly vrstvy pro lepší znázornění překryvu jednotlivých kanálů sjednoceny. Zkratky: 2C (dvoubuněčné embryo), Blast. (blastocysta).

5.2 Lokalizace SIRT1 v oocytech

Jako možný substrát sulfanu byl vybrán SIRT1, proto bylo nezbytné prokázat jeho lokalizaci v oocytech a embryích, které jsou znázorněny na obrázcích 5 a 6.

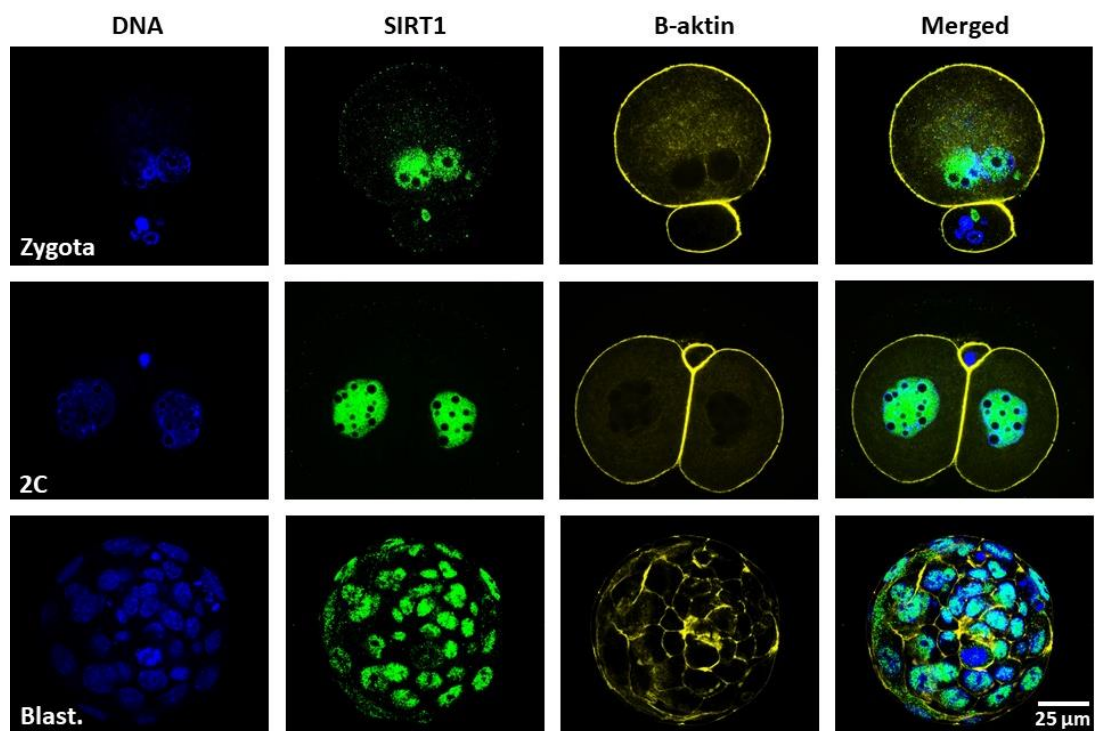
V prvním a druhém řádku obrázku 5 jsou prezentována stádia GV oocytu a MII oocytu, získané z myši divokého typu (WT – *wild-type*). U těchto stádií byla pořízena negativní kontrola, inkubace tedy probíhala bez primární protilátky a díky tomu byla potvrzena její specifita. Ve stádiu GV byl detekován překryv SIRT1 s chromatinem. V případě MII stádia SIRT1 kopíruje vzor dělicího vřeténka. Ve třetím a čtvrtém řádku jsou znázorněna stádia GV oocytu a MII oocytu získané z myši *Sirt1* prosté. Rozdíl mezi *Sirt1*^{-/-} a WT oocyty je zřejmý a experiment prokázal, že model *Sirt1*^{-/-} oocytů neexprimuje SIRT1.



Obrázek 5: Reprezentativní snímky lokalizace SIRT1 v prezygotických stádiích. V prvních dvou řádcích jsou demonstrována stádia GV a MII pro WT společně s negativními kontrolami. Ve třetím a čtvrtém řádku jsou znázorněna stádia GV a MII pro *Sirt1*^{-/-}. V prvním, druhém a třetím sloupci jsou zobrazeny jednotlivé barevné kanály. V posledním sloupci s označením „Merged“ byly vrstvy, pro lepší vizualizaci překryvu jednotlivých kanálů, sloučeny, u WT jsou v tomto sloupci zobrazeny i negativní kontroly. Zkratky: WT GV (nezralý oocyt ve stádiu zárodečného váčku – divoký typ), MII WT (*in vivo* ovulovaný a zralý oocyt ve stádiu metafáze II – divoký typ), *Sirt1*^{-/-} GV (nezralý oocyt ve stádiu

zárodečného vajíčku s knock-outovaným genem pro SIRT1), *Sirt1*^{-/-} MII (*in vivo* ovulovaný a zralý oocyt ve stádiu metafáze II s knock-outovaným genem pro SIRT1), NC (negativní kontrola).

V zygotickém stádiu a všech postzygotických stádiích se pracovalo již pouze s WT oocyty, tedy s oocyty pocházejícími z jedinců s fyziologickou hladinou exprimovaného genu, v tomto případě *Sirt1*. V zygotě byl SIRT1 zjištěn v prvojádrech. Ve stádiu dvoubuněčného embrya patrného z druhého řádku a blastocysty zobrazené ve třetím řádku je zřejmé, že se SIRT1 vyskytuje v jádrech blastomer (obrázek 6).



Obrázek 6: Reprezentativní snímky výskytu SIRT1 ve stádiu zygoty a postzygotických stádiích. V řádcích jsou chronologicky znázorněna jednotlivá stadia vývoje. V prvním, druhém a třetím sloupci jsou zobrazeny jednotlivé barevné kanály. V posledním sloupci s označením „Merged“ byly vrstvy pro lepší znázornění překryvu jednotlivých kanálů sjednoceny. Zkratky: 2C (dvoubuněčné embryo), Blast. (blastocysta).

6. Diskuse

Interakce gasotransmiterů a epigenetických modifikací jsou dosud málo prozkoumanou problematikou. Plynné přenašeče buněčného signálu představují pro epigenetiku „přidanou hodnotu“ v možnosti zásahu do regulace genové exprese. Více regulačních činitelů se podílí na větší přesnosti jednotlivých dějů, jako kondenzace chromatinu zralého oocyty, tvorba prvojader v zygotě, reaktivace embryonálního genomu a diferenciaci embryonálních buněk. Plynné molekuly přenášející buněčný signál jsou mechanismem, díky kterému je docíleno větší přesnosti regulace na časové i prostorové ose.

Byla pozorována distribuce dvou sulfan-uvolňujících enzymů. Reprezentativní snímky CBS pro stádia GV, MII jsou prezentovány na obrázku 1. Autoři Nevoral et al. (2015) pozorovali lokalizaci sulfan-uvolňujících enzymů v GV, MI a MII stádiích prasečích oocytů. U enzymu CBS uvádějí podobnou hladinu výskytu ve sledovaných stádiích, což odpovídá i výsledkům této bakalářské práce. Odchylna od výše zmíněné studie je ovšem patrná z obrázku 1 u MII oocyty, kde byla, kromě výskytu CBS v cytosolu, zjištěna i vazba CBS na chromatin. Odlišnosti v lokalizaci enzymu mohou být způsobeny například použitím jiného modelového organismu, poukazující na evoluční plasticitu těchto enzymů. Tuto domněnku potvrzují autoři Nevoral et al. (2016), kteří přibližují mezidruhové rozdíly sulfanu v prasečích oocyttech a oocyttech *Xenopus* (drápatky). V případě prasečích oocytů se sulfan vyznačuje protektivní funkcí, to se ovšem nedá říci o *Xenopus* oocyttech, kde byl zjištěn vliv sulfanu ve formě oxidativního stresu.

Pro další možné znázornění variability sulfan-uvolňujících enzymů jsem využil databáze Uniprot.org. Porovnal jsem sekvence těchto enzymů u různých organismů, konkrétně u *Xenopus sp.*, myši a člověka. U enzymu 3-MPST byla zjištěna identita 60,6 %, u CBS 66,6 % a u CTH byla shoda vyhodnocena na pouhých 9,4 %. Tato zjištění poukazují na nekonzervativnost sulfanové signalizace a jsou ve shodě s prací autorů Nevoral et al. (2016).

Reprezentativní snímky enzymu CBS byly také pořízeny pro stádia zygoty, dvoubuněčného embrya a blastocysty, které jsou patrné z obrázku 2. Podle dohledatelných zdrojů byla v této práci vůbec poprvé pozorována stádia časného

embryonálního vývoje. Byla zjištěna distribuce CBS s výrazným zastoupením v cytosolu.

Druhým pozorovaným sulfan-uvolňujícím enzymem byl enzym 3-MPST. Tento enzym byl lokalizován ve stádiích GV a MII (obrázek 3), a také ve stádiích zygoty, dvoubuněčného embrya a blastocysty (obrázek 4). Ve stádiu GV oocyty se 3-MPST vyskytoval jak v cytosolu, tak i v jádře, a to s podobnou intenzitou. V případě MII oocyty nebyl potvrzen výskyt 3-MPST. Tyto výsledky se shodují se zjištěním autorů Nevoral et al. (2015), kteří pozorovali sestupný trend výskytu 3-MPST v průběhu zrání oocytů ve stádiích GV, MI, MII. Divergence je ovšem patrná u MII oocyty, kde autoři uvádějí nízkou hladinu 3-MPST v cytosolu. Tento fakt ale nic nemění na sestupném množství 3-MPST. Autoři Nevoral et al. (2015) připisují enzymu 3-MPST význam při znovuoobjevení meiotického dělení, kdy je exprimován ve stádiu GV oocyty a v následných stádiích (MI a MII) už jeho hladina jen klesá.

Oplozením vzniká nový impuls, který přináší mnoho změn, mimo jiné i znovuzahájení exprese 3-MPST, který se již ve stádiu zygoty znovu vyskytuje. Dalším možným vysvětlením výskytu 3-MPST v zygotě by mohl být potenciální přenos tohoto enzymu spermií.

Distribuce enzymu 3-MPST v zygotě, dvoubuněčném embryu a blastocystě je opět podle dohledatelných zdrojů poprvé pozorována v této práci. Ve stádiu zygoty byl enzym 3-MPST lokalizován v cytosolu, kde tvořil klastry. Ve dvoubuněčném embryu a blastocystě se 3-MPST vyskytoval jak v cytosolu, tak i v jádře. V oblasti jádra byla v těchto stádiích zjištěna vyšší intenzita signálu než v cytosolu.

Na příkladech CBS a 3-MPST je demonstrována lokalizace výskytu sulfan-uvolňujících enzymů. Jejich zastoupení v gametách a embryonálním vývoji je různé. Společně se však podílejí na udržování optimálního množství sulfanu v prostředí buněk. Tato domněnka je v souladu s tvrzením autorů Nevoral et al. (2015), kteří uvádějí možnou substituci jednotlivých enzymů.

Mimo zrání oocytů je sulfan zjevně spojen s procesy stárnutí buněk, které postihují také oocyty (Vollenhoven et Hunt, 2018). Ošetření oocytů sulfanem tak vedlo ke snížení fragmentace oocytů. Inhibice naopak stárnutí oocytů podporovala, a také byl zaznamenán pokles endogenně produkovaného sulfanu (Krejčova et al., 2015). Tyto poznatky potvrzují, že sulfan je klíčovou molekulou životaschopnosti buněk

a jeho nedostatek může být příčinou předčasného selhání reprodukce, subfertility anebo infertility (Nevoral et al., 2016).

Pro ověření myšlenky, že sulfan reguluje expresi SIRT1, která je zmíněná i v práci Du et al. (2019), bylo nutné lokalizovat výskyt tohoto enzymu. Z obrázku 5 a 6 je patrná výrazná závislost vazby SIRT1 na jádro, v cytosolu tato deacetyláza vykazovala jen velmi slabý signál. V případě MII stádia oocyty je SIRT1 lokalizován v oblasti dělicího vřeténka. Toto zjištění je v souladu s výsledky pozorovanými v několika studiích. V případě GV oocytů a MII oocytů (Nevoral et al., 2019) a zygotických prvojader (Adamkova et al., 2017). Kromě oocytů shodných s výše zmíněnými publikacemi, byl zkoumán, v předložené práci, vývoj ve stádiích dvoubuněčného embrya a blastocysty. SIRT1 vykazoval stejný vzor jako v případě časnějších stádií a udržoval asociaci s chromatinem.

Ve studii Nevoral et al. (2019) je demonstrována distribuce SIRT1 v prezygotických stádiích oocyty. U nezralého GV oocyty byl SIRT1 situován v zárodečném váčku. Jeho rozpadem dochází k přemístění SIRT1 do cytoplasmy a k následné eliminaci v MI fázi. SIRT1 vykazuje v MII oocyty vzor shodný s dělicím vřeténkem, které je tvořeno acetylovaným α -tubulinem. Podle zjištěné distribuce SIRT1 v GV a MII oocytech byla následně přezkoumáno jeho působení. V zárodečném váčku byla zjištěna epigenetická regulace histonů, která i přes zjevnou re-lokalizaci v MII oocytech ovlivňovala i nadále histonový kód, ovšem ne-epigenetickým způsobem. Dalším zjištěním bylo prokázání vlivu SIRT1 na eliminaci poškození DNA v oocytech v MII fázi.

Vlastní předložené výsledky lokalizace SIRT1 výhradně v jádře během embryonálního vývoje poukazují zejména na histonové cíle SIRT1 v těchto stádiích vývoje. V souladu s tímto předpokladem lze očekávat substráty SIRT1 v podobě histonů a jejich modifikací, jako jsou histony H1, H2B, H3 a H4 na různých lysinových koncích (Kurdistani et al., 2004), nebo jiné proteinové struktury, jako jsou například transkripční faktory p53 a FOXO3a (Karbasforooshan et Karimi, 2017).

Jeden z cílů SIRT1 je prezentován autory Adamkova et al. (2017), kteří uvádějí vliv deacetylázy na metylaci histonu H3K9; snížením acetylace histonu je uvolněno místo pro metylaci H3K9. Vlivem používání selektivního aktivátoru BML-278 a inhibitorů (sirtinolu a nikotinamidu) byla modulována hladina SIRT1. Při použití

nízké koncentrace BML-278 došlo k výraznému zrychlení tvorby blastocyst. Inhibice SIRT1 se na vývoji blastocyst negativně neprojevila.

Na rozdíl od blastocyst, kde inhibice SIRT1 nemá negativní vliv na vývoj, ve spermiogenezi hraje tato deacetyláza nepostradatelnou roli. Bylo zjištěno, že jedinci se sníženým množstvím SIRT1, kromě menší životaschopnosti a velikosti, produkují abnormální spermie. U myši s knock-outovaným SIRT1 byla prokázána znatelně nižší produkce spermií a z hlediska kvality vykazovaly gamety vyšší podíl poškození. Dále bylo zjištěno 85 proteinů ve tkáni varlat, které podléhají regulaci SIRT1. Vliv inhibice na oogenezi nebyla pozorována (Coussens et al., 2008). Lze předpokládat, že SIRT1 v embryu i v dalším post-implantačním vývoji sehrává regulační úlohu, vedoucí k správné oogenezi a spermiogenezi. Také lze očekávat, že je SIRT1 zapojen do diferenciaci primordiálních zárodečných buněk do pohlavních buněk již v období osídlení gonadální lišty, odehrávající se před narozením. Na základě dřívějšího zjištění Adamkova et al. (2017) a Nevoral et al. (2019), také zde lze očekávat zapojení histonových i ne-histonových substrátů, které společně vedou k regulaci chromatinu a diferenciaci pohlavních buněk.

Distribuce SIRT1 deacetylázy dává možnost interakce s DNA a možnost velkého rozptylu na škále regulace genové exprese (Coussens et al., 2008; Adamkova et al., 2017; Nevoral et al., 2019). Expresí SIRT1 je ovlivňována sulfanem; zvýšením produkce CSE, a tím i sulfanu, byla prokázána pozitivní korelace s expresí SIRT1. K procesu regulace SIRT1 sulfanem dochází mechanismem sulphydratace. Tato post-translační modifikace se váže na dvě domény Zn^{2+} SIRT1 a tímto způsobem zvyšuje jeho aktivitu (Du et al., 2019).

Jak SIRT1, tak i sulfan jsou nepostradatelnými činiteli ve správném průběhu gametogeneze a embryogeneze (Krejčova et al., 2015; Adamkova et al., 2017; Nevoral et al., 2019). Proto by obě tyto komponenty mohly mít velký potenciál v aplikaci do reprodukční medicíny. Například ve snaze podpořit správný průběh vývoje gamet (Coussens et al., 2008; Krejčova et al., 2015) a následné embryogeneze a odvrátit tak negativní vlivy (Adamkova et al., 2017; Nevoral et al., 2019).

7. Závěr

Předložená práce potvrdila hypotézu, že jsou sulfan-uvolňující enzymy, stejně jako histon deacetyláza SIRT1, exprimovány v oocytech a embryích myši, kde se podílejí na regulaci časného embryonálního vývoje.

Epigenetické mechanismy a gasotransmitery jsou zkoumány převážně odděleně. Propojení obou těchto spolu interagujících odvětví dává možnost nového pohledu na tyto separátně studované obory a otevírá prostor pro lepší pochopení regulačních mechanismů.

Jako zástupce enzymů zasahujících do epigenetických regulací byl vybrán SIRT1. Tato histon deacetyláza je distribuována výhradně v jádře s výjimkou MII oocyty, kde kopíruje vzor dělicího vřeténka.

Vliv SIRT1 na kvalitu gamet i časných embryonálních stádií je více než zřejmý (Coussens et al., 2008; Adamkova et al., 2017; Nevorál et al., 2019). SIRT1 kromě epigenetické modulace působí i ne-epigenetickým způsobem, díky němuž je umocněna možnost regulovat genovou expresi (Nevořal et al., 2019).

Ze skupiny gasotransmiterů byla zkoumána distribuce sulfanu, o kterém jsou známy pozitivní účinky na gametogenezi a embryogenezi (Krejčova et al., 2015; Nevořal et al., 2016). Byla pozorována distribuce dvou sulfan-uvolňujících enzymů. CBS se vyskytoval výhradně v cytosolu, kromě MII oocyty, kde byl s větší intenzitou zjištěn v oblasti chromatinu. Enzym 3-MPST se v GV oocyty vyskytoval jak v cytosolu, tak i v jádře. MII byl shledán 3-MPST prostý. V zygotě byl zjištěn výskyt enzymu v cytosolu, kde tvořil klastry. Ve stádiu dvoubuněčného embrya a blastocysty byl zjištěn výskyt 3-MPST v cytosolu i v jádře, vyšší intenzita signálu byla detekována v oblasti chromatinu.

Dosažené výsledky představují charakteristický model myších oocytů a embryí pro další studium sulfan-uvolňujících enzymů a SIRT1, jejich vzájemné interakce a molekulární signalizace. Další experimenty budou zaměřeny na prokázání enzymatické produkce sulfanu v oocytech a embryích zde zmapovanými enzymy, a její dopad na aktivitu SIRT1. Následně budou studovány epigenetické změny odvozené od aktivity SIRT1 v oocytech a embryích.

8. Seznam obrázků

Obrázek 1: Reprezentativní snímky výskytu CBS v prezygotických stádiích.....	33
Obrázek 2: Reprezentativní snímky výskytu CBS ve stádiu zygoty a postzygotických stádiích.....	34
Obrázek 3: Reprezentativní snímky výskytu 3-MPST v prezygotických stádiích....	35
Obrázek 4: Reprezentativní snímky výskytu 3-MPST ve stádiu zygoty a postzygotických stádiích.....	36
Obrázek 5: Reprezentativní snímky lokalizace SIRT1 v prezygotických stádiích....	37
Obrázek 6: Reprezentativní snímky výskytu SIRT1 ve stádiu zygoty a postzygotických stádiích.....	38

9. Seznam tabulek

Tabulka 1: Časný embryonální vývoj myši.....	16
Tabulka 2: Základní použité chemikálie.....	30

10. Seznam zkratk

2C	dvoubuněčné embryo
3-MPST	3-merkaptopyruvat sulfurtransferáza
ac	acetylace
CBS	cystationin- β -syntáza
COX	cytochromoxidáza
CSE	cystationin- γ -lyáza
DNA-PK	DNA dependentní proteinová kináza
GV oocyt	nezralý oocyt ve stádiu zárodečného váčku (<i>germinal vesicle</i>)
HATs	histon acetyltransferázy
HDACs	histon deacetylázy
HDMs	histon demetylázy
HMTs	histon metyltransferázy
K	lysin

me	metylace
MII oocyt	zralý oocyt ve stádiu metafáze II
P1	protamin 1
P2	protamin 2
ph	fosforylace
PKA	protein kináza A
PTMs	post-translační modifikace
ROS	volné kyslíkové radikály (<i>reactive oxygen species</i>)
S	serin
SIRT1	Sirtuin 1
<i>Sirt1</i> ^{-/-}	knock-outovaný gen <i>Sirt1</i>
TDG	thymin DNA glykosyláza
TET	skupina enzymů schopných demethylace
u	ubiquitinace
WT	divoký typ (<i>wild type</i>)

11. Seznam použité literatury

ACIN-PEREZ, R., GATTI, D. L., BAI, Y., MANFREDI, G. (2011): Protein phosphorylation and prevention of cytochrome oxidase inhibition by ATP: coupled mechanisms of energy metabolism regulation. *Cell metabolism*, 13(6): 712-719.

ADAMKOVA, K., YI, Y. J., PETR, J., ZALMANOVA, T., HOSKOVA, K., JELINKOVA, P., MORAVEC, J., KRALICKOVA, M., SUTOVSKY, M., SUTOVSKY, P., NEVORAL, J. (2017): SIRT1-dependent modulation of methylation and acetylation of histone H3 on lysine 9 (H3K9) in the zygotic pronuclei improves porcine embryo development. *Journal of animal science and biotechnology*, 8(1): 83.

AJIRO, K. (2000): Histone H2B phosphorylation in mammalian apoptotic cells An association with DNA fragmentation. *Journal of Biological Chemistry*, 275(1): 439-443.

ALBERTINI, D. F. (2015): The mammalian oocyte. In: PLANT, T. M., ZELEZNIK, A. J. (ed.): *Knobil and Neill's Physiology of reproduction*. 4th edition. Cambridge, Academic Press, s. 59–97.

ALBERTS, B., BRAY, D., JOHNSON, A., LEWIS, J., RAFF, M., ROBERTS, K., WALTER, P. (1998): *Základy buněčné biologie*. Ústí nad Labem, Espero Publishing, s. 304-308.

AMBROSI, C., MANZO, M., BAUBEC, T. (2017): Dynamics and context-dependent roles of DNA methylation. *Journal of molecular biology*, 429(10): 1459-1475.

BAARENDS, W. M., HOOGERBRUGGE, J. W., ROEST, H. P., OOMS, M., VREEBURG, J., HOEIJMAKERS, J. H., GROOTEGOED, J. A. (1999): Histone ubiquitination and chromatin remodeling in mouse spermatogenesis. *Developmental biology*, 207(2): 322-333.

BAO, J., SACK, M. N. (2010): Protein deacetylation by sirtuins: delineating a post-translational regulatory program responsive to nutrient and redox stressors. *Cellular and molecular life sciences*, 67(18): 3073-3087.

- BAUER, C., GÖBEL, K., NAGARAJ, N., COLANTUONI, C., WANG, M., MÜLLER, U., KREMMER, E., ROTTACH, A., LEONHARDT, H. (2015): Phosphorylation of TET proteins is regulated via O-GlcNAcylation by the O-linked N-acetylglucosamine transferase (OGT). *Journal of Biological Chemistry*, 290(8): 4801-4812.
- BEILINA, A., VAN DER BRUG, M., AHMAD, R., KESAVAPANY, S., MILLER, D. W., PETSKO, G. A., COOKSON, M. R. (2005): Mutations in PTEN-induced putative kinase 1 associated with recessive parkinsonism have differential effects on protein stability. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 102(16): 5703-5708.
- BENCH, G. S., FRIZ, A. M., CORZETT, M. H., MORSE, D. H., BALHORN, R. (1996): DNA and total protamine masses in individual sperm from fertile mammalian subjects. *Cytometry: The Journal of the International Society for Analytical Cytology*, 23(4): 263-271.
- BOCHTLER, M., DITZEL, L., GROLL, M., HARTMANN, C., HUBER, R. (1999): The proteasome. *Annual review of biophysics and biomolecular structure*, 28(1): 295-317.
- CAENEPEEL, S., CHARYDCZAK, G., SUDARSANAM, S., HUNTER, T., MANNING, G. (2004): The mouse kinome: discovery and comparative genomics of all mouse protein kinases. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 101(32): 11707-11712.
- CASAS, E., VAVOURI, T. (2014): Sperm epigenomics: challenges and opportunities. *Frontiers in genetics*, 5: 330.
- CONWELL, C. C., VILFAN, I. D., HUD, N. V. (2003): Controlling the size of nanoscale toroidal DNA condensates with static curvature and ionic strength. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA*, 100(16): 9296-9301.
- COUSSENS, M., MARESH, J. G., YANAGIMACHI, R., MAEDA, G., ALLSOPP, R. (2008): Sirt1 deficiency attenuates spermatogenesis and germ cell function. *PloS one*, 3(2): e1571.

- DAGDA, R. K., PIEN, I., WANG, R., ZHU, J., WANG, K. Z., CALLIO, J., DAS BANERJEE, T., DAGDA, R. Y., CHU, C. T. (2014): Beyond the mitochondrion: cytosolic PINK 1 remodels dendrites through protein kinase A. *Journal of neurochemistry*, 128(6): 864-877.
- DU, C., LIN, X., XU, W., ZHENG, F., CAI, J., YANG, J., CUI, Q., TANG, C., CAI, J., XU, G., GENG, B. (2019): Sulfhydrated sirtuin-1 increasing its deacetylation activity is an essential epigenetics mechanism of anti-atherogenesis by hydrogen sulfide. *Antioxidants & redox signaling*, 30(2): 184-197.
- DWORKIN-RASTL, E., SHRUTKOWSKI, A., DWORKIN, M. B. (1984): Multiple ubiquitin mRNAs during *Xenopus laevis* development contain tandem repeats of the 76 amino acid coding sequence. *Cell*, 39(2): 321-325.
- EBNER, T., MOSER, M., SOMMERGRUBER, M., YAMAN, C., PFLEGER, U., TEWS, G. (2002): First polar body morphology and blastocyst formation rate in ICSI patients. *Human Reproduction*, 17(9): 2415-2418.
- ETO, K., KIMURA, H. (2002): The production of hydrogen sulfide is regulated by testosterone and S-adenosyl-l-methionine in mouse brain. *Journal of neurochemistry*, 83(1): 80-86.
- ETO, K., OGASAWARA, M., UMEMURA, K., NAGAI, Y., KIMURA, H. (2002): Hydrogen sulfide is produced in response to neuronal excitation. *Journal of Neuroscience*, 22(9): 3386-3391.
- FATOBA, S. T., OKOROKOV, A. L. (2011): Human SIRT1 associates with mitotic chromatin and contributes to chromosomal condensation. *Cell Cycle*, 10(14): 2317-2322.
- FENG, S., JACOBSEN, S. E., REIK, W. (2010): Epigenetic reprogramming in plant and animal development. *Science*, 330(6004): 622-627.
- FORD, E., VOIT, R., LISZT, G., MAGIN, C., GRUMMT, I., GUARENTE, L. (2006): Mammalian Sir2 homolog SIRT7 is an activator of RNA polymerase I transcription. *Genes & development*, 20(9): 1075-1080.
- FUENTES-MASCORRO, G., SERRANO, H., ROSADO, A. (2000): Sperm chromatin. *Archives of andrology*, 45(3): 215-225.

- GARCÍA-VÁZQUEZ, F. A., GADEA, J., MATÁS, C., HOLT, W. V. (2016): Importance of sperm morphology during sperm transport and fertilization in mammals. *Asian journal of andrology*, 18(6): 844-850.
- GAO, L., CUETO, M. A., ASSELBERGS, F., ATADJA, P. (2002): Cloning and functional characterization of HDAC11, a novel member of the human histone deacetylase family. *Journal of Biological Chemistry*, 277(28): 25748-25755.
- GREEN, E. M., MAS, G., YOUNG, N. L., GARCIA, B. A., GOZANI, O. (2012): Methylation of H4 lysines 5, 8 and 12 by yeast Set5 calibrates chromatin stress responses. *Nature structural & molecular biology*, 19(3): 361-363.
- GREGORETTI, I., LEE, Y. M., GOODSON, H. V. (2004): Molecular evolution of the histone deacetylase family: functional implications of phylogenetic analysis. *Journal of molecular biology*, 338(1): 17-31.
- GUILLEMETTE, B., DROGARIS, P., LIN, H. H. S., ARMSTRONG, H., HIRAGAMI-HAMADA, K., IMHOF, A., BONNEIL, E., THIBAUT, P., VERREAULT, A., FESTENSTEIN, R. J. (2011): H3 lysine 4 is acetylated at active gene promoters and is regulated by H3 lysine 4 methylation. *PLoS genetics*, 7(3): e1001354.
- GYLLENSTEN, U., WHARTON, D., JOSEFSSON, A., WILSON, A. C. (1991): Paternal inheritance of mitochondrial DNA in mice. *Nature*, 352(6332): 255-257.
- HAGLUND, K., DI FIORE, P. P., DIKIC, I. (2003): Distinct monoubiquitin signals in receptor endocytosis. *Trends in biochemical sciences*, 28(11): 598-604.
- HAYASHI, K., YOSHIDA, K., MATSUI, Y. (2005): A histone H3 methyltransferase controls epigenetic events required for meiotic prophase. *Nature*, 438(7066): 374-378.
- HE, S., SUN, H., LIN, L., ZHANG, Y., CHEN, J., LIANG, L., LI, Y., ZHANG, M., YANG, X., WANG, X., WANG, F., ZHU, F., CHEN, J., PEI, D., ZHENG, H. (2017): Passive DNA demethylation preferentially up-regulates pluripotency-related genes and facilitates the generation of induced pluripotent stem cells. *Journal of Biological Chemistry*, 292(45): 18542-18555.
- HEBBES, T. R., THORNE, A. W., CRANE-ROBINSON, C. (1988): A direct link between core histone acetylation and transcriptionally active chromatin. *The EMBO journal*, 7(5): 1395-1402.

- HILL, M. A. (2020): Embryology: Mouse Development [online]. 2020 [cit. 2020-05-05]. Dostupné z: https://embryology.med.unsw.edu.au/embryology/index.php/Mouse_Development
- HOCHSTRASSER, M. (2009): Origin and function of ubiquitin-like proteins. *Nature*, 458(7237): 422-429.
- HUD, N. V., DOWNING, K. H., BALHORN, R. (1995): A constant radius of curvature model for the organization of DNA in toroidal condensates. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 92(8): 3581-3585.
- HYMAN, A. A. (1989): Centrosome movement in the early divisions of *Caenorhabditis elegans*: a cortical site determining centrosome position. *The Journal of cell biology*, 109(3): 1185-1193.
- HYMAN, A. A., WHITE, J. G. (1987): Determination of cell division axes in the early embryogenesis of *Caenorhabditis elegans*. *The Journal of cell biology*, 105(5): 2123-2135.
- CHANG, M. C. (1984): The meaning of sperm capacitation a historical perspective. *Journal of andrology*, 5(2): 45-50.
- JAMBHEKAR, A., DHALL, A., SHI, Y. (2019): Roles and regulation of histone methylation in animal development. *Nature reviews. Molecular cell biology*, 20(10): 625–641.
- JEFFRIES, M. A. (2018): Epigenetic editing: How cutting-edge targeted epigenetic modification might provide novel avenues for autoimmune disease therapy. *Clinical Immunology*, 196: 49-58.
- JELÍNEK, F., JELÍNEK, K. (2006): Morfologie hospodářských zvířat. 2. vydání. České Budějovice, Jihočeská univerzita v Českých Budějovicích, Zemědělská fakulta, s. 34-43.
- JEPPESEN, P., TURNER, B. M. (1993): The inactive X chromosome in female mammals is distinguished by a lack of histone H4 acetylation, a cytogenetic marker for gene expression. *Cell*, 74(2): 281-289.

- JIANG, H., GAO, Q., ZHENG, W., YIN, S., WANG, L., ZHONG, L., ALI, A., KHAN, T., HAO, Q., FANG, H., SUN, X., XU, P., PANDITA, T. K., JIANG, X., SHI, Q. (2018): MOF influences meiotic expansion of H2AX phosphorylation and spermatogenesis in mice. *PLoS genetics*, 14(5): e1007300.
- KARBASFOROOSHAN, H., KARIMI, G. (2017): The role of SIRT1 in diabetic cardiomyopathy. *Biomedicine & pharmacotherapy*, 90: 386–392.
- KHOBTA, A., ANDERHUB, S., KITSER, N., EPE, B. (2010): Gene silencing induced by oxidative DNA base damage: association with local decrease of histone H4 acetylation in the promoter region. *Nucleic acids research*, 38(13): 4285–4295.
- KIRKEGAARD, K., JUHL HINDKJAER, J., INGERSLEV, H. J. (2011): Human embryonic development after blastomere removal: a time-lapse analysis, *Human Reproduction*, 27(1): 97-105.
- KOČÁREK, E., PÁNEK, M., NOVOTNÁ, D. (2010): Klinická cytogenetika I.: úvod do klinické cytogenetiky: vyšetřovací metody v klinické cytogenetice. 2. vydání. Praha, Karolinum, s. 44-49.
- KOHLI, R. M., ZHANG, Y. (2013): TET enzymes, TDG and the dynamics of DNA demethylation. *Nature*, 502(7472): 472-479.
- KREJCOVA, T., SMELCOVA, M., PETR, J., BODART, J. F., SEDMIKOVA, M., NEVORAL, J., DVORAKOVA, M., VYSKOCILOVA, A., WEINGARTOVA, I., KUCEROVA-CHRPOVA, V., CHMELIKOVA, E., TUMOVA, L., JILEK, F. (2015): Hydrogen sulfide donor protects porcine oocytes against aging and improves the developmental potential of aged porcine oocytes. *PLoS one*, 10(1): e0116964.
- KUO, M. M., KIM, D. H., JANDU, S., BERGMAN, Y., TAN, S., WANG, H., PANDEY, D. R., ABRAHAM, T. P., SHOUKAS, A. A., BERKOWITZ, D. E., SANTHANAM, L. (2016): MPST but not CSE is the primary regulator of hydrogen sulfide production and function in the coronary artery. *American Journal of Physiology-Heart and Circulatory Physiology*, 310(1): H71-H79.
- KURDISTANI, S. K., TAVAZOIE, S., GRUNSTEIN, M. (2004): Mapping global histone acetylation patterns to gene expression. *Cell*, 117(6): 721-733.

- LANOUILLE, S., MONGEON, V., FIGEYS, D., COUTURE, J. F. (2014): The functional diversity of protein lysine methylation. *Molecular systems biology*, 10(4): 724.
- LEONAVICIUS, K., ROYER, C., PREECE, C., DAVIES, B., BIGGINS, J. S., SRINIVAS, S. (2018): Mechanics of mouse blastocyst hatching revealed by a hydrogel-based microdeformation assay. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 115(41): 10375-10380.
- LIANG, X., MA, J., SCHATTEN, H., SUN, Q. (2012): Epigenetic changes associated with oocyte aging. *Sci China Life Sci*, 55(8): 670–676.
- LIM, G. G., CHUA, D. S., BASIL, A. H., CHAN, H. Y., CHAI, C., ARUMUGAM, T., LIM, K. L. (2015): Cytosolic PTEN-induced putative kinase 1 is stabilized by the NF- κ B pathway and promotes non-selective mitophagy. *Journal of Biological Chemistry*, 290(27): 16882-16893.
- LOMBARD, D. B., ALT, F. W., CHENG, H. L., BUNKENBORG, J., STREEPER, R. S., MOSTOSLAVSKY, R., KIM, J., YANCOPOULOS, G., VALENZUELA, D., MURPHY, A., YANG, Y., CHEN, Y., HIRSCHHEY, M. D., BRONSON, R. T., HAIGIS, M., GUARENTE, L. P., FARESE JR, R. V., WEISSMAN, S., VERDIN, E., SCHWER, B. (2007): Mammalian Sir2 homolog SIRT3 regulates global mitochondrial lysine acetylation. *Molecular and cellular biology*, 27(24): 8807-8814.
- LUGER, K., DECHASSA, M. L., TREMETHICK, D. J. (2012): New insights into nucleosome and chromatin structure: an ordered state or a disordered affair? *Nature reviews Molecular cell biology*, 13(7): 436-447.
- LUGER, K., MÄDER, A. W., RICHMOND, R. K., SARGENT, D. F., RICHMOND, T. J. (1997): Crystal structure of the nucleosome core particle at 2.8 Å resolution. *Nature*, 389(6648): 251-260.
- LUO, S. M., GE, Z. J., WANG, Z. W., JIANG, Z. Z., WANG, Z. B., OUYANG, Y. C., HOU, Y., SCHATTEN, H., SUN, Q. Y. (2013): Unique insights into maternal mitochondrial inheritance in mice. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 110(32): 13038-13043.

- MA, P., SCHULTZ, R. M. (2013): Histone deacetylase 2 (HDAC2) regulates chromosome segregation and kinetochore function via H4K16 deacetylation during oocyte maturation in mouse. *PLoS genetics*, 9(3): e1003377.
- MARTIRE. S., GOGATE, A. A., WHITMILL, A., TAFESSU, A., NGUYEN, J., TENG, Y. C., TASTEMEL, M., BANASZYNSKI, L. A. (2019): Phosphorylation of histone H3.3 at serine 31 promotes p300 activity and enhancer acetylation. *Nature Genetics*, 51(6): 941-946.
- MAYER, W., NIVELEAU, A., WALTER, J., FUNDELE, R., HAAF, T. (2000): Demethylation of the zygotic paternal genome. *Nature*, 403(6769): 501-502.
- MORRIS, B. J. (2013): Seven sirtuins for seven deadly diseases of aging. *Free Radical Biology and Medicine*, 56: 133-171.
- MOSTOSLAVSKY, R., CHUA, K. F., LOMBARD, D. B., PANG, W. W., FISCHER, M. R., GELLON, L., LIU, P., MOSTOSLAVSKY, G., FRANCO, S., MURPHY, M. M., MILLS, K. D., PATEL, P., HSU, J. T., HONG, A. L., FORD, E., CHENG, H. L., KENNEDY, C., NUNEZ, N., BRONSON, R., FRENDEWEY, D., AUERBACH, W., VALENZUELA, D., KAROW, M., HOTTIGER, M. O., HURSTING, S., BARRETT, J. C., GUARENTE, L., MULLIGAN, R., DEMPE, B., YANCOPOULOS, G. D., ALT, F. W. (2006): Genomic instability and aging-like phenotype in the absence of mammalian SIRT6. *Cell*, 124(2): 315-329.
- NEVORAL, J., BODART, J. F., PETR, J. (2016): Gasotransmitters in gametogenesis and early development: holy trinity for assisted reproductive technology—a review. *Oxidative medicine and cellular longevity*, 2016: 1730750.
- NEVORAL, J., LANDSMANN, L., STIAVNICKA, M., HOSEK, P., MORAVEC, J., PROKESOVA, S., RIMNACOVA, H., KOUTNA, E., KLEIN, P., HOSKOVA, K., ZALMANOVA, T., FENCLOVA, T., PETR, J., KRALICKOVA, M. (2019): Epigenetic and non-epigenetic mode of SIRT1 action during oocyte meiosis progression. *Journal of Animal Science and Biotechnology*, 10(1): 67.

- NEVORAL, J., ŽALMANOVÁ, T., ZÁMOSTNÁ, K., KOTT, T., KUČEROVÁ-CHRPOVÁ, V., BODART, J. F., GELAUDE, A., PROCHÁZKA, R., ORSÁK, M., ŠULC, M., KLEIN, P., DVOŘÁKOVÁ, M., WEINGARTOVÁ, I., VÍGHOVÁ, A., HOŠKOVÁ, K., KREJČOVÁ, T., JÍLEK, F., PETR, J. (2015): Endogenously produced hydrogen sulfide is involved in porcine oocyte maturation in vitro. *Nitric Oxide*, 51: 24-35.
- NORTH, B. J., MARSHALL, B. L., BORRA, M. T., DENU, J. M., VERDIN, E. (2003): The human Sir2 ortholog, SIRT2, is an NAD⁺-dependent tubulin deacetylase. *Molecular cell*, 11(2): 437-444.
- O'CARROLL, D., SCHERTHAN, H., PETERS, A. H., OPRAVIL, S., HAYNES, A. R., LAIBLE, G., REA, S., SCHMID, M., LEBERSORGER, A., JERRATSCH, M., SATTLER, L., MATTEI, M. G., DENNY, P., BROWN, S. D., SCHWEIZER, D., JENUWEIN, T. (2000): Isolation and characterization of Suv39h2, a second histone H3 methyltransferase gene that displays testis-specific expression. *Molecular and cellular biology*, 20(24): 9423-9433.
- OKANO, M., BELL, D. W., HABER, D. A., LI, E. (1999): DNA methyltransferases Dnmt3a and Dnmt3b are essential for de novo methylation and mammalian development. *Cell*, 99(3): 247-257.
- OOI, S. K., BESTOR, T. H. (2008): The colorful history of active DNA demethylation. *Cell*, 133(7): 1145-1148.
- OSWALD, J., ENGEMANN, S., LANE, N., MAYER, W., OLEK, A., FUNDELE, R., DEAN, W., REIK, W., WALTER, J. (2000): Active demethylation of the paternal genome in the mouse zygote. *Current Biology*, 10(8): 475-478.
- OUZOUNIS, C. A., KYRPIDES, N. C. (1996): Parallel origins of the nucleosome core and eukaryotic transcription from Archaea. *Journal of Molecular Evolution*, 42(2): 234-239.
- PENG, C., LU, Z., XIE, Z., CHENG, Z., CHEN, Y., TAN, M., LUO, H., ZHANG, Y., HE, W., YANG, K., ZWAANS, B. M., TISHKOFF, D., HO, L., LOMBARD, D., HE, T. CH., DAI, J., VERDIN, E., YE, Y., ZHAO, Y. (2011): The first identification of lysine malonylation substrates and its regulatory enzyme. *Molecular & cellular proteomics*, 10(12): M111.012658.

- PICKART, C. M. (2001): Mechanisms underlying ubiquitination. *Annual review of biochemistry*, 70(1): 503-533.
- RATHKE, C., BAARENDS, W. M., AWE, S., RENKAWITZ-POHL, R. (2014): Chromatin dynamics during spermiogenesis. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1839(3): 155-168.
- RAWE, V. Y., DÍAZ, E. S., ABDELMASSIH, R., WÓJCIK, C., MORALES, P., SUTOVSKY, P., CHEMES, H. E. (2008): The role of sperm proteasomes during sperm aster formation and early zygote development: implications for fertilization failure in humans. *Human Reproduction*, 23(3): 573-580.
- REIFFENSTEIN, R. J., HULBERT, W. C., ROTH, S. H. (1992): Toxicology of hydrogen sulfide. *Annual review of pharmacology and toxicology*, 32(1): 109-134.
- REICHMAN, R., ALLEVA, B., SMOLIKOVE, S. (2017): Prophase I: preparing chromosomes for segregation in the developing oocyte. In Arur, S. (Ed.): Signaling-mediated control of cell division : From oogenesis to oocyte-to-embryo development. Cham, Springer International Publishing, s. 125-173.
- ROGAKOU, E. P., PILCH, D. R., ORR, A. H., IVANOVA, V. S., BONNER, W. M. (1998): DNA double-stranded breaks induce histone H2AX phosphorylation on serine 139. *Journal of biological chemistry*, 273(10): 5858-5868.
- ROJANSKY, R., CHA, M. Y., CHAN, D. C. (2016): Elimination of paternal mitochondria in mouse embryos occurs through autophagic degradation dependent on PARKIN and MUL1. *Elife*, 5: e17896.
- ROSSETTO, D., AVVAKUMOV, N., CÔTÉ, J. (2012): Histone phosphorylation: a chromatin modification involved in diverse nuclear events. *Epigenetics*, 7(10): 1098-1108.
- SABÓ, A., HAMZOVÁ, S., KRČMÉRY, V., TIMKOVÁ, J. (2004): Základy bunkovej biológie a genetiky. Bratislava, SAP – Slovak Academic Press spol. s r.o., 191 s.
- SACK, M. N. (2011): Caloric excess or restriction mediated modulation of metabolic enzyme acetylation—proposed effects on cardiac growth and function. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Molecular Cell Research*, 1813(7): 1279-1285.

- SADLER, T. W. (2011): Langmanova lékařská embryologie. Praha, Grada Publishing a.s., 289 s.
- SARG, B., HELLIGER, W., TALASZ, H., FÖRG, B., LINDNER, H. H. (2006): Histone H1 phosphorylation occurs site-specifically during interphase and mitosis: identification of a novel phosphorylation site on histone H1. *Journal of Biological Chemistry*, 281(10): 6573-6580.
- SATHANANTHAN, H., MENEZES, J., GUNASHEELA, S. (2003): Mechanics of human blastocyst hatching in vitro. *Reproductive biomedicine online*, 7(2): 228-234.
- SATO, K., BLANDAU, R. J. (1979): Second meiotic division and polar body formation in mouse eggs fertilized in vitro. *Gamete Research*, 2(4): 283-293.
- SHAHID, Z., SIMPSON, B., SINGH, G. (2020): Genetics, Histone Code. In StatPearls. Treasure Island (FL), StatPearls Publishing. [cit. 2020-06-14]. Dostupné z: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK538477/>
- SHARMA, A., TIWARI, M., GUPTA, A., PANDEY, A. N., YADAV, P. K., CHAUBE, S. K. (2018): Journey of oocyte from metaphase-I to metaphase-II stage in mammals. *Journal of cellular physiology*, 233(8): 5530-5536.
- SCHWER, B., VERDIN, E. (2008): Conserved metabolic regulatory functions of sirtuins. *Cell metabolism*, 7(2): 104-112.
- SIDOLI, S., CHENG, L., JENSEN, O. N. (2012): Proteomics in chromatin biology and epigenetics: Elucidation of post-translational modifications of histone proteins by mass spectrometry. *Journal of proteomics*, 75(12): 3419-3433.
- SLÍPKA, J., TONAR, Z. (2019): Základy embryologie. Praha, Karolinum, s. 21-33.
- SNUSTAD, D. P., SIMMONS, M. J. (2010): Principles of genetics. 5th edition. John Wiley & Sons, s. 26-32.
- SPENCE, J., SADIS, S., HAAS, A. L., FINLEY, D. (1995): A ubiquitin mutant with specific defects in DNA repair and multiubiquitination. *Molecular and cellular biology*, 15(3): 1265-1273.

- STEIN, A. B., JONES, T. A., HERRON, T. J., PATEL, S. R., DAY, S. M., NOUJAIM, S. F., MILSTEIN, M. L., KLOS, M., FURSPAN, P. B., JALIFE, J., DRESSLER, G. R. (2011): Loss of H3K4 methylation destabilizes gene expression patterns and physiological functions in adult murine cardiomyocytes. *The Journal of clinical investigation*, 121(7): 2641-2650.
- SUN, Z. W., ALLIS, C. D. (2002): Ubiquitination of histone H2B regulates H3 methylation and gene silencing in yeast. *Nature*, 418(6893): 104-108.
- TANNO, M., SAKAMOTO, J., MIURA, T., SHIMAMOTO, K., HORIO, Y. (2007): Nucleocytoplasmic shuttling of the NAD⁺-dependent histone deacetylase SIRT1. *Journal of Biological Chemistry*, 282(9): 6823-6832.
- THEILER, K. (2013): The house mouse: atlas of embryonic development. Springer Science et Business Media, 178 s.
- UCKELMANN, M., SIXMA, T. K. (2017): Histone ubiquitination in the DNA damage response. *DNA repair*, 56: 92-101.
- VACEK, Z. (2006): Embryologie: učebnice pro studenty lékařství a oborů všeobecná sestra a porodní asistentka. Praha, Grada Publishing a.s., s. 11-40.
- VACEK, Z. (1992): Embryologie pro pediatrii. 2. vydání. Praha, Karolinum a Nakladatelství a vydavatelství JP, 314 s.
- VAN ALLER, G. S., REYNOIRD, N., BARBASH, O., HUDDLESTON, M., LIU, S., ZMOOS, A. F., MCDEVITT, P., SINNAMON, R., LE, B. CH., MAS, G., ANNAN, R., SAGE, J., GARCIA, B. A., TUMMINO, P. J., GOZANI, O., KRUGER, R. G. (2012): Smyd3 regulates cancer cell phenotypes and catalyzes histone H4 lysine 5 methylation. *Epigenetics*, 7(4): 340-343.
- VAQUERO, A., SCHER, M., LEE, D., ERDJUMENT-BROMAGE, H., TEMPST, P., REINBERG, D. (2004): Human SirT1 interacts with histone H1 and promotes formation of facultative heterochromatin. *Molecular cell*, 16(1): 93-105.
- VELAND, N., LU, Y., HARDIKAR, S., GADDIS, S., ZENG, Y., LIU, B., ESTECIO, M. R., TAKATA, Y., LIN, K., TOMIDA, M. W., SHEN, J., SAHA, D., GOWHER, H., ZHAO, H., CHEN, T. (2019): DNMT3L facilitates DNA methylation partly by maintaining DNMT3A stability in mouse embryonic stem cells. *Nucleic acids research*, 47(1): 152-167.

- VERLINSKY, Y., GINSBERG, N., LIFCHEZ, A., VALLE, J., MOISE, J., STROM, C. M. (1990): Analysis of the first polar body: preconception genetic diagnosis. *Human reproduction*, 5(7): 826-829.
- VOLLENHOVEN, B., HUNT, S. (2018): Ovarian ageing and the impact on female fertility. *F1000Research*, 7: F1000 Faculty Rev-1835.
- WAKAYAMA, T., HAYASHI, Y., OGURA, A. (1997): Participation of the female pronucleus derived from the second polar body in full embryonic development of mice. *Reproduction*, 110(2): 263-266.
- WATSON, J. D., CRICK, F. H. (1953): Molecular Structure of Nucleic Acids: A Structure for Deoxyribose Nucleic Acid. *Nature* 171(4356): 737–738.
- XUE, Y., GAO, X., CAO, J., LIU, Z., JIN, C., WEN, L. YAO, X., REN, J. (2010): A summary of computational resources for protein phosphorylation. *Current Protein and Peptide Science*, 11(6): 485-496.
- YANG, G. (2017): Gasotransmitters and protein post-translational modifications. *MOJ Proteomics & Bioinformatics*, 5(4): 122-124.
- YANG, G., SENNER, A., JI, Y., PEI, Y., PLUTH, M. D. (2016): Gasotransmitters in biology and medicine: molecular mechanisms and drug targets. *Oxidative medicine and cellular longevity*, 2016: 4627308.
- YANG, G., WU, L., JIANG, B., YANG, W., QI, J., CAO, K., MENG, Q., MUSTAFA, A. K., MU, W., ZHANG, S., SNYDER, S. H., WANG, R. (2008): H₂S as a physiologic vasorelaxant: hypertension in mice with deletion of cystathionine gamma-lyase. *Science*, 322(5901): 587–590.
- ZENG, J., JIANG, M., WU, X., DIAO, F., QIU, D., HOU, X., WANG, H., LI, L., LI, CH., GE, J., LIU, J., OU, X., WANG, Q. (2018): SIRT 4 is essential for metabolic control and meiotic structure during mouse oocyte maturation. *Aging cell*, 17(4): e12789.
- ZHAO, Y., GARCIA, B. A. (2015): Comprehensive catalog of currently documented histone modifications. *Cold Spring Harbor perspectives in biology*, 7(9): a025064.

ZHU, L., YANG, J., ZHAO, L., YU, X., WANG, L., WANG, F., CAI, Y., JIN, J. (2015): Expression of hMOF, but not HDAC4, is responsible for the global histone H4K16 acetylation in gastric carcinoma. *International journal of oncology*, 46(6): 2535-2545.