

Česká zemědělská univerzita v Praze

Fakulta agrobiologie, potravinových a přírodních zdrojů

Katedra veterinárních disciplín



**Histonový kód a jeho regulace během časného
embryonálního vývoje prasete**

Diplomová práce

Autor práce: Pavla Jelínková

Vedoucí práce: Ing. Tereza Žalmanová, Ph.D.

© 2016 ČZU v Praze

Čestné prohlášení

Prohlašuji, že svou diplomovou práci "Histonový kód a jeho regulace během časného embryonálního vývoje prasete" jsem vypracovala samostatně pod vedením vedoucího diplomové práce a s použitím odborné literatury a dalších informačních zdrojů, které jsou citovány v práci a uvedeny v seznamu literatury na konci práce. Jako autorka uvedené diplomové práce dále prohlašuji, že jsem v souvislosti s jejím vytvořením neporušila autorská práva třetích osob.

V Praze dne 4. 4. 2016

Poděkování

Ráda bych touto cestou poděkovala Ing. Janu Nevoralovi, Ph.D., Ing. Tereze Žalmanové, Ph.D. a Ing. Kateřině Zámostné za odborné vedení, velkou trpělivost a ochotnou pomoc a spolupráci při vypracování diplomové práce. Dále bych ráda poděkovala své rodině za podporu a trpělivost.

Histonový kód a jeho regulace během časného embryonálního vývoje prasete

Souhrn

U samčího i samičího prvojádra zygoty dochází po oplození k epigenetickým změnám, od kterých se odvíjí kvalita zygoty a úspěšnost časného embryonálního vývoje savců. Mezi prvojádry zygoty je krátce po oplození patrná epigenetická asymetrie, kdy u samčího prvojádra probíhá aktivní demethylace DNA, zatímco DNA maternálního prvojádra zůstává methylováno. Navíc u samčího prvojádra dochází k procesu acetylace histonů chromatinu, zatímco genom samičího prvojádra si ponechává histony více methylované. Asymetrie prvojader a jejich epigenetický stav předvídá úspěšnost reprogramace genomu a tím úspěšnost embryonálního vývoje. Pro úspěšný vývoj embrya je tedy nezbytná správná formace obou prvojader zygoty, kterou regulují post-translační modifikace histonů utvářející tzv. histonový kód. Byla stanovena hypotéza, že tento histonový kód je regulován aktivitou NADP⁺-dependentních histon deacetyláz, sirtuinů.

V experimentu byly použity plně dorostlé prasečí oocyty, které byly po *in vitro* zrání oplozeny prasečími spermii. Po izolaci zygot, kultivovaných s přidavkem aktivátoru sirtuinů resveratrolu, byla provedena imunofluorescenční analýza přítomnosti acetylovaného a methylovaného histonu H3 na lyzinu K9 u prvojader zygoty. Z výsledků je u kontrolní skupiny patrná asymetrie mezi oběma prvojádry zygoty, kde samčí prvojádru vykazuje vyšší intenzitu acetylace a naproti tomu samičí prvojádru vyšší intenzitu methylovaného signálu. U všech pokusných skupin došlo po přidavku resveratrolu u samičího prvojádru k výraznému zvýšení intenzity signálu methylovaného histonu H3 na lyzinu K9 a naopak u prvojádru samčího k výraznému snížení intenzity signálu acetylovaného histonu H3 na lyzinu K9.

Sirtuiny jsou zapojeny do regulace histonového kódu v prasečí zygotě a lze se domnívat, že sehrávají také úlohu během dalšího embryonálního vývoje, což je předmětem dalšího studia.

Klíčová slova: oocyt, zygota, histon, histonový kód, sirtuin

Histone code and its regulation during early embryonic development in pigs

Summary

Both pronuclei of the zygote undergo epigenetic changes after fertilization, which determines the quality of the zygote and successful early mammalian embryonic development. Shortly after fertilization epigenetic asymmetry among the pronuclei of the zygote is evident, while the paternal pronucleus undergoes active DNA demethylation, the DNA of the maternal pronucleus remains methylated. The male pronucleus in addition undergoes histone acetylation, whereas the histones of the female pronucleus remain methylated. Asymmetry of pronuclei and their epigenetic status predicts successful reprogramming of the genome, and thus the success of embryonic development. For the successful development of the embryo is therefore required correct formation of both of these pronuclei of the zygote and this formation of pronuclei is regulated by post-translational histone modifications called histone code. It was hypothesized that the histone code is regulated by the activity of NADP⁺ - dependent histone deacetylases, sirtuins.

In the experiment were used fully grown in vitro matured pig oocytes that were fertilized with pig spermatozoa in vitro. After isolation of zygotes cultured with addition of the activator sirtuin resveratrol was performed immunofluorescence analysis of acetylated and methylated histone H3 at lysine K9 of pronuclei of the zygotes. From the results of control group asymmetry between the pronuclei of the zygote is evident; wherein the male pronucleus exhibits higher acetylation intensity contrast female pronucleus exhibits higher methylation intensity. After adding resveratrol to all experimental groups female pronucleus showed a significant increase of the methylated histone H3 at lysine K9, and contrary to the male pronucleus significant decrease of acetylated histone H3 at lysine K9.

Sirtuins are involved in the regulation of histone code in porcine zygote and it can be assumed that they also play a role during subsequent embryonic development, which is the subject of further study.

Keywords: oocyte, zygote, histone, histone code, sirtuin

Obsah

1. Úvod	7
2. Cíl práce	8
3. Literární rešerše	9
3.1 Zrání oocyty	9
3.2 Oplození	11
3.3 Časný embryonální vývoj	13
3.3.1 Formace prvojader a vznik zygoty.....	14
3.3.2 Reaktivace embryonálního genomu a vývoj do blastocysty.....	15
3.3.3 Chromatin embrya a epigenetické změny v průběhu embryonálního vývoje	17
3.4 Post-translační modifikace	19
3.4.1 Fosforylace a ADP ribosylace	20
3.4.2 Ubikvitinace a SUMOylace	21
3.4.3 Acetylace histonů.....	21
3.4.4 Methylace histonů.....	21
3.5 Histondeacetylázy	22
3.5.1 Sirtuiny a jejich zapojení do regulace epigenetických změn	24
3.5.1.1 Signalizace sirtuinů během časně embryogeneze.....	26
4. Materiál a metodika	29
4.1 Izolace a zrání prasečích oocytů <i>in vitro</i>	29
4.2 Oplození oocytů <i>in vitro</i> a kultivace embryí <i>in vitro</i>	29
4.3 Aktivátory sirtuinu	30
4.4 Imunofluorescence a analýza obrazu	30
4.5 Statistická analýza	30
5. Výsledky	31
5.1 Efekt resveratrolu na modifikaci H3K9 v prvojádrech prasečích zygot	31
5.2 Efekt resveratrolu na metylaci histonu H3 v prvojádrech prasečích zygot....	33
5.3 Efekt resveratrolu na acetylaci histonu H3 v prvojádrech prasečích zygot	35
5.4 Efekt BML-278 na metylaci histonu H3 v prvojádrech prasečích zygot.....	37
5.5 Efekt BML-278 na acetylaci histonu H3 v prvojádrech prasečích zygot	39
5.6 Efekt BML-278 a resveratrolu na embryonální vývoj prasete.....	41
6. Diskuze	42
7. Závěr	45
8. Seznam literatury	46
9. Seznam použitých zkratk	61

1. Úvod

Fertilizací je započat proces, kdy se z oocyty, jakožto specializované haploidní samičí pohlavní buňky, stává po oplození spermií totipotentní zygota. Oocyt dokončuje proces meiózy, vyděluje se druhé pólové tělísko a dochází k formaci paternálního a maternálního prvojádra. Krátce po oplození jsou obě prvojádra z větší části transkripčně neaktivní a zygota je závislá na mRNA a proteinech nashromážděných v oocyty. Až po té, v průběhu několika dělení zygoty, dochází k reaktivaci genomu.

Od momentu vzniku zygoty až do doby, kdy se z dělicí zygoty stává embryo, je dynamicky regulován chromatin jádra. Za základní jednotku chromatinu je považován nukleozóm skládající se z oktameru histonů, který je ovinut dvouřetězcovou DNA. DNA je modifikováno přidáním methylových skupin k CpG ostrůvkům, čímž dochází k methylaci DNA. U histonů dochází k tzv. post-translačním modifikacím, které řídí přechod mezi transkripčně aktivním euchromatinem a inaktivním heterochromatinem a ovlivňují tak expresi genů. Post-translační modifikace hrají klíčovou roli v regulaci i jiných biologických procesech jako je replikace DNA, segregace chromosomů a dalších. Utvoření typické konformace chromatinu je výsledkem spolupůsobení různých typů a specifických míst post-translačních modifikací histonů, které tak vytváří tzv. histonový kód. Tento dědičný kód zajišťuje epigenetickou informaci, kterou může předat mateřská buňka buňce dceřiné. Na tvorbě histonového kódu se podílí specifické enzymy, kterými je tento kód ustanoven a regulován (Bao *et al.*, 2014).

Histonový kód je regulován řadou enzymů, mezi něž patří již studované sirtuiny, u kterých je znám jejich protektivní účinek. Předmětem dalších studií by ale měl být i jejich účinek na úrovni histonového kódu, jakožto významných histonových deacetyláz.

2. Cíl práce

Cílem práce je ověřit hypotézu, že post-translační modifikace histonů, histonový kód, regulují tvorbu prvojader v zygotě a jsou výsledkem aktivity NADP⁺ - dependentních histon deacetyláz, sirtuinů.

3. Literární rešerše

3.1 Zrání oocyty

Aby se z nezralého oocyty stal oocyt schopný oplození, podstupuje komplexní změny na úrovni cytoplazmy a chromatinu v průběhu meiózy (Voronina *et* Wessel, 2003). Savčí oocyty do meiózy vstupují již během embryonálního vývoje samice, která je ve svém průběhu velmi časně přerušena tzv. prvním meiotickým blokem. Oocyt je v tomto období obklopován granulózními buňkami. Část z nich se později diferencuje v buňky vejconosného hrbolku, *cumulus oophorus*, nazývané častěji jako kumulární buňky. Vrstva kumulárních buněk, která přiléhá k *zoně pellucidě* oocyty, se dále diferencuje v buňky *corona radiata*. Tyto buňky společně s oocytem a okolním stromatem tvoří ovariální folikul, který po hormonální stimulaci pohlavně dospělé samice prodělává další růst. V dorostlém terciálním folikulu, tzv. Graafově folikulu, nastávají důležité změny samotného oocyty. Klíčovou změnou pro získání oplození schopnosti oocyty je meiotické zrání. Toto období začíná uvolněním prvního bloku a je zakončeno spontánním ustanovením druhého meiotického bloku. Probíhající děje v tomto období jsou důležitým předpokladem pro budoucí ovulaci oocyty, jeho oplození a následný embryonální vývoj (Tosti *et al.*, 2013).

K prvnímu bloku meiózy dochází v době kolem narození a trvá až do období puberty, kdy rostou hormonálně stimulované folikuly spolu s oocyty v tzv. folikulárních vlnách. Následně se z nich stávají plně dorostlé oocyty ve stádiu zárodečného váčku (GV, Germinal Vesicle), nazvaném podle dobře viditelného jádra (Motlik *et* Fulka, 1976). Jedná se o plně dorostlé, ale dosud nezralé oocyty, stále zablokované v prvním meiotickém bloku v profázi I ve stádiu diplotene (Ye *et al.*, 2003). K přerušení prvního meiotického bloku a následné ovulaci dochází v důsledku nárůstu hladiny luteinizačního hormonu (LH) prostřednictvím snížení hladiny molekul druhých posílů - cAMP a cGMP, které znovuzahájení meiotického zrání inhibují. Kvůli absenci příslušných LH receptorů na oocyty nepůsobí LH přímo na oocyt, ale na granulózní buňky vnitřní stěny folikulu (shrnutí v Liu *et al.*, 2013).

Zrání oocyty bývá pro lepší definici konkrétních mechanismů a funkcí děleno do dvou procesů. Jedná se o propojené děje tzv. jaderného a cytoplazmatického zrání. Cytoplazmatické zrání představuje biochemické procesy, ve kterých je nezbytné zapojení klíčových regulačních molekul. Cytoplazmatické změny oocyty vedou k jadernému zrání, charakterizovaném kondenzací chromosomů, rozpadem zárodečného váčku, pokračováním

meiózy fázemi prvního meiotického dělení (metafáze I, anafáze I a telofáze I) a vydělením prvního pólového tělíska. Jaderné zrání oocyty je spontánně zablokováno v metafázi druhého meiotického dělení (MII) (Ferreira *et al.*, 2009; Meinecke *et al.*, 2001).

Charakteristickým dějem přerušování prvního meiotického bloku a re-iniciace meiózy je rozpad zárodečného váčku (GVBD, Germinal Vesicle Breakdown). Důležitou roli v rozpadu zárodečného váčku hraje M-fázi podporující faktor (MPF, M-Phase Promoting Factor), jehož aktivita je pozitivně regulována kinázou WEE1 a fosfatázou CDC25 (Oh *et al.*, 2010). Podstatou prvního meiotického bloku je přítomnost inaktivního komplexu katalytické podjednotky CDK1 a regulační podjednotky cyklinu B, tzv. pre-MPF. Neaktivní forma MPF je udržována vysokými hladinami druhého posla cAMP prostřednictvím aktivace protein kinázy A (PKA, cAMP-dependentní kináza). PKA inaktivuje fosfatázu CDC25 a naopak aktivuje kinázu WEE1, která CDK1 inhibuje. Vysoké hladiny cAMP a aktivní protein kináza A tak hrají důležitou roli v udržení meiotického bloku do doby, kdy oocyt doroste do své konečné velikosti (Grieco *et al.*, 1994; Kishimoto, 2003; Han *et al.*, 2006; Chen *et al.*, 2010).

Další klíčová kináza regulující zrání oocyty je MAP kináza (MAPK, Mitogen Activated Protein Kinase) aktivovaná prostřednictvím nadřazených kináz. Na vrcholu této signální kaskády stojí Mos kináza (MAPKKK), která dále aktivuje MAPK kinázu (MAPKK), vedoucí k aktivaci MAP kinázy (MAPK) (Soeda *et al.*, 2013). MAPK a MPF vzájemně interagují a jsou v nezralém oocyty přítomny v neaktivní formě. K tomu, aby vlivem jejich působení nastalo GVBD, musí dojít k jejich aktivaci. Doba aktivace MPF a MAPK se u různých modelových druhů liší (Kishimoto, 2003). Např. u oocytů hvězdice a myši dochází k aktivaci MAPK po aktivaci MPF a GVBD (Abrieu *et al.*, 2001), naproti tomu u prasečích oocytů je MAPK aktivována před nebo současně s aktivací MPF v době GVBD (Hunter, 2000). Sato (2015) uvádí, že u savců aktivace MAPK nastává před GVBD, kdy je fosforylací aktivovaná MAPK přemístěna z cytoplazmy do zárodečného váčku. U savců je obecně aktivace MAPK nezbytná pro obnovení meiotického zrání, pokud se oocyt nachází ve svém přirozeném prostředí folikulu s jeho inhibičními účinky, zatímco spontánní obnovení meiózy u oocytů vyjmutých z folikulárního prostředí je na aktivaci MAPK nezávislé (Fan *et al.*, 2004; Liu *et al.*, 2013).

Jednou z funkcí MAPK, přítomné rovněž v kumulárních buňkách, je urychlení aktivace MPF prostřednictvím narušení mezibuněčných spojů typu gap junction, které hrají

významnou roli v komunikaci mezi oocytem a kumulárními buňkami. Uzavírání spojů gap junction nastává vlivem působení LH, který způsobuje aktivaci MAPK v granulózích a kumulárních buňkách. MAPK podporuje fosforylaci hlavního ovariálního gap junction proteinu connexinu 43 a tím se přes modifikované spoje snižuje průtok inhibičních faktorů meiotického zrání, jako je cGMP. Následně dochází k poklesu cAMP a nepřímo k aktivaci MPF (Liang *et al.*, 2007).

Dynamika MPF a MAPK se během meiotického zrání oocytů liší. Krátce před GVBD aktivita MPF stoupá, následně přechodně klesá v anafázi prvního meiotického dělení a opětovně aktivita vzrůstá v MII, kdy se ovulovaný oocyt nachází ve druhém meiotickém bloku, a přetrvává až do okamžiku oplození. Aktivita MAPK naproti tomu v období přechodu z metafáze I do metafáze II neklesá, zůstává konstantní. Bylo prokázáno, že trvalou aktivitou MAPK mezi dvěma meiotickými bloky se zabraňuje vstupu do interfáze a replikaci DNA, kdy chromosomy zůstávají kondenzované (Fan *et al.*, 2004). Důležitou roli v následném druhém meiotickém bloku hraje kináza označovaná jako Mos, která je součástí tzv. cytostatického faktoru (CSF), který je schopný fyziologicky zastavit proces meiotického zrání oocytu a ustanovit druhý meiotický blok (Gross *et al.*, 2000). K dokončení meiózy dochází přirozeně průnikem spermie nebo v *in vitro* podmínkách partenogeneticky (Stojkovic *et al.*, 1999), kdy aktivita MAPK i MPF klesá, CSF je inaktivován, a druhý meiotický blok je prolomen. Klíčovým faktorem zůstává MPF, který je po oplození inaktivován dříve než MAPK, a právě jeho inaktivace je nezbytná pro výstup z druhého meiotického bloku a dokončení meiózy (Sun *et al.*, 2003). K inaktivaci MPF dochází po oplození proteolytickou degradací cyklinu B prostřednictvím proteazomální aktivity anafázi podporujícího komplexu/cyklozomu (APC/C, Anaphase Promoting Complex/Cyclosome) a jeho koaktivátoru CDH1 (Nixon *et al.*, 2002).

3.2 Oplození

Jako oplození se označuje proces, při kterém dochází ke splynutí dvou gamet, samčí spermie a samičího oocytu. V přirozených podmínkách se oplození oocytu uskutečňuje ve vejcovodu, který umožňuje transport oocytu, splynutí oocytu se spermií a časný embryonální vývoj embrya (Brüssow *et al.*, 2008). Při procesu ovulace, která nastává u prasnic 44 hod. po nástupu říje, se do vejcovodu uvolňuje komplex kumulárních buněk a oocytu (COC, Cumulus-Oocyte Complex). V místě, kde došlo k prasknutí zralého folikulu,

se vytváří žluté tělísko (CL, Corpus Luteum) produkující progesteron, který v případě oplození hraje důležitou roli v udržení březosti (Stocco *et al.*, 2007).

Před samotným setkáním spermie s ovulovaným oocytem musí nejprve dojít ke kapacitaci spermií, důležitému procesu ve vývoji spermie k získání schopnosti oplození. V průběhu kapacitace spermie podstupuje odstraňování inhibičních faktorů a modifikaci membránových proteinů a lipidů (Wassarman, 1999). Do doby ovulace oocyty je kapacitace spermií zdržena v krčku vejcovodu. Tato část vejcovodu slouží jako funkční rezervoár spermií, odkud jsou kapacitované spermie postupně uvolňovány (Brüssow *et al.*, 2008). Jen kapacitované spermie jsou schopné následně prodělat hyperaktivaci a při navázání na oocyt akrozomální reakci (Tateno *et al.*, 2013). Hyperaktivní pohyb je energický pohyb spermií, při kterém se spermie pohybují v kruzích s asymetrickým vlněním bičíku a který usnadňuje oddělení spermií od stěny vejcovodu a následné dosažení místa oplození (Ho *et Suarez*, 2001). K oocytu se kapacitovaná spermie dostává také za pomoci procesů chemotaxe a termotaxe. Při termotaxi je spermie orientována pomocí teplotního gradientu, v rámci kterého se pohybuje směrem k prostředí s vyšší teplotou. V dřívějších studiích bylo u prasat prokázáno, že při ovulaci je v místě oplození o 1 – 2 °C vyšší teplota než v rezervoáru spermií (Bahat *et Eisenbach*, 2010; Coy *et al.*, 2012). Když je spermie pomocí termotaxe dopravena na teplejší místo do těsnější blízkosti oocyty, přibližuje se spermie dále k oocytu pomocí chemotaxe, kdy se uplatňují chemické stimuly. Jako chemoatraktant, který spermii naviguje směrem k oocytu, působí progesteron uvolňovaný z kumulárních buněk oocyty (Guidobaldi *et al.*, 2008).

Jednou z přirozených bariér je pro spermii expandující obal kumulárních buněk, uvolňující do svého okolí kyselinu hyaluronovou. Tento fyziologický jev je označován jako kumulární expanze. Průchod expandovaným kumulem je umožněno pomocí proteinu PH-20, který je vázán na plazmatické membráně spermie a vykazuje hyaluronidázovou aktivitu. Prostřednictvím tohoto enzymu dochází ke štěpení hyaluronové kyseliny a průniku spermie k oocytu (Talbot, 1984; Chan *et al.*, 1999). Po zdolání obalu expandovaných kumulárních buněk dochází v *in vivo* podmínkách k penetraci spermie do oocyty. Další bariérou pro spermie je glykoproteinový obal oocyty - *zona pellucida*. Vazba spermie na zonální glykoprotein 3 (ZP3, Zona Pellucida Glycoprotein 3) indukuje tzv. akrozomální reakci (Wassarman *et al.*, 2001).

Při akrozomální reakci dochází k vylití obsahu akrozómu, překrývající apikální část hlavičky spermie. K exocytóze akrozómu dochází na několika místech splynutím vnitřní

a vnější akrozomové membrány (Chen *et al.*, 2013). Akrozóm obsahuje hydrolytické enzymy, které jsou právě při akrozomální reakci uvolněny na vnější straně membrány spermie a umožňují penetraci spermie do oocytu. Mezi enzymy z akrozomového váčku patří především hyaluronidáza, schopná rozrušovat spoje buněk *corona radiata* a akrozin, který rozpouští *zonu pellucidu* (Wassarman *et al.*, 2001).

Jakmile se spermie dostane přes bariéry kumulárních buněk a *zony pellucidy*, proniká do perivitelinního prostoru a dochází ke kontaktu s plazmatickou membránou oocytu. Následuje proces aktivace oocytu. Aktivace oocytu spouští chemické změny v oocytu zahrnující kortikální reakci, dokončení druhého meiotického dělení a tvorbu samčího a samičího prvojádra (Fan *et al.*, 2003). Důležitou roli v aktivaci oocytu hraje uvolňování vápenatých iontů (Ca^{2+}) z intracelulárních zásob oocytu při fúzi spermie s plazmatickou membránou oocytu (Tulsiani, 2012). Jedná se o tzv. Ca^{2+} oscilaci, kdy dochází k periodickým vlnám Ca^{2+} koncentrace (Ito *et* Kashiwazaki, 2012). V době kontaktu spermie s oocytom dochází při Ca^{2+} - dependentní kortikální reakci k vylití obsahu kortikálních granul uložených ve zralém oocytu těsně pod plazmatickou membránou. Výsledkem uvolněných enzymů z kortikálních granul do perivitelinního prostoru je tzv. polyspermní blok, který brání tomu, aby byl oocyt oplozen více spermii najednou (Tulsiani, 2012). Polyspermie se nejčastěji vyskytuje právě u prasat, kde zejména v podmínkách *in vitro* stojí za selháváním technik asistované reprodukce u prasat. Bylo zjištěno, že v *in vivo* podmínkách se výskyt polyspermie pohybuje mezi 30 – 40 % a v podmínkách *in vitro* může být její výskyt vyšší než 65 % (shrnuto v Sun *et* Nagai, 2003). V přirozených podmínkách je v děloze po deponování ejakulátu většina spermií eliminována a pouze malé procento z nich se dostane až k místu oplození. Právě tato redukce počtu spermií je jedním z přirozených způsobů obrany proti polyspermii v *in vivo* podmínkách (Bedford, 2008). Samotný polyspermní blok, za který je odpovědný oocyt, se projevuje ztvrdnutím *zony pellucidy* (*zona pellucida* hardening) a inaktivací receptorů na jejím povrchu pro ostatní spermie (Liu, 2011).

3.3 Časný embryonální vývoj

Časný embryonální vývoj představuje v přirozených podmínkách období od oplození oocytu po implantaci embrya v děloze matky a zahrnuje procesy, které jsou důležité pro úspěšnost následujícího embryonálního vývoje. Mezi tyto procesy patří např. načasování prvního buněčného dělení, tvorba prvojader, reaktivace embryonálního genomu, kompaktace moruly a formace blastocysty (Duranthon *et al.*, 2008).

Po oplození je zahájeno dokončení druhého meiotického dělení v důsledku inaktivace MPF (Rothschild *et* Ruvinsky, 2011). Dochází k vydělení druhého pólového tělíska do perivitellinního prostoru (Chang *et al.*, 2009). Současně dochází k procesu dekondenzace spermie a záměně protaminů za histony. Následuje formování samičího a samčího prvojádra. Obě prvojádra následně migrují v oocytu k sobě, zatímco u nich probíhá replikace. Dosud stabilní jaderná membrána prvojader se po jejich přiblížení rozpadá. V tomto okamžiku je oplozený oocyt označován jako zygota (Gilbert, 2000). Následuje buněčné dělení, které je počátkem budoucích 115 dní embryonálního vývoje plodu (Bazer *et* Johnson, 2014).

Z celkového počtu ovulovaných a oplozených oocytů jich 30 – 50 % v embryonálním vývoji neuspěje. Míra penetrace je u *in vitro* dozrálých oocytů podstatně nižší než v *in vivo* podmínkách, stejně tak vyšší procento *in vitro* dozrálých oocytů po monospermním oplození nedokončí ani druhé meiotické dělení a nedosáhne stádia blastocysty (Laurincik *et al.*, 1994). Mezi 12. a 13. dnem březosti je uváděna 20 – 30 % embryonální mortalita. Další kritické období v embryonálním vývoji prasete je mezi 20. a 30. dnem, kdy je přežití embrya závislé na správném vývoji placenty (Rothschild *et* Ruvinsky, 2011).

3.3.1 Formace prvojader a vznik zygoty

Po splynutí spermie s vajíčkem nebo po partenogenetické aktivaci oocytu dochází k nárůstu Ca^{2+} koncentrace v oocytu a tím k snížení aktivity CSF. Tato změna vede ke snížení aktivity MPF prostřednictvím degradace cyklinu B, zprostředkované APC/C. Po oplození se rovněž snižuje aktivita MAPK. Inaktivace MPF nastává po oplození velmi rychle, oproti defosforylaci a inaktivaci MAPK. Toto snížení MPF aktivity je spojováno se zahájením procesu aktivace oocytu, tedy přerušením druhého meiotického bloku, zatímco snížení MAPK aktivity koreluje s počátkem tvorby prvojader (Fan *et* Sun, 2004). Inaktivace MAPK je tak pro tvorbu prvojader nezbytná (Sun *et* Nagai, 2003).

Zatímco oocyt musí dokončit proces meiózy a vyloučit polovinu genetické informace v podobě druhého pólového tělíska, hlavička spermie podstupuje dramatické biochemické a cytologické změny. Jedním z nejdůležitějších dějů je výměna protaminů za histony, aby mohlo později dojít k replikaci DNA. Protaminy byla většina DNA v jádře spermie sbalena do kompaktnější formy a bylo tak dosaženo velké stability DNA do momentu penetrace spermie do oocytu (Ward, 2010). Zpětná výměna histonů za protaminy spočívá v redukci protaminových disulfidových vazeb pomocí enzymů a rozvolnění stočených chromatinových smyček. Teprve poté, během dekondenzace hlavičky spermie, jsou protaminy nahrazeny

histony (Shimada *et al.*, 2000; Nakazawa *et al.*, 2002). Poté, co u spermie dochází k rozvolnění chromosomů a histony nahradily protaminy, kolem dekonenzovaného chromatinu se vytvoří jaderná membrána. V takto vzniklém samčím prvojádře probíhá stejně jako v samičím prvojádře syntéza DNA (Gilbert, 2000). U prasat dochází k replikaci DNA v samičím prvojádře časově nezávisle na zformování samčího prvojádra. U jiných savců nastává replikace samčí DNA až po zformování samčího prvojádra. Tento tzv. checkpoint DNA replikace dosud nebyl u prasat zcela popsán (Rothschild *et Ruvinsky*, 2011).

V prvojádrech se utváří základ jádérka, které je také důležité pro následný časný embryonální vývoj. Poněvadž jádérko spermie zaniklo již v průběhu procesu spermatogeneze, jsou jádérka vzniklá v obou prvojádrech mateřského původu (Lefevre, 2008). Jadérko vzniká na konci mitózy kolem oblastí genomu ležících na chromosomu, které se označují jako regiony organizéru jádérka (NOR, Nucleolus Organiser Region). Každá NOR oblast se skládá z krátkých sekvencí rDNA označovaných jako jednotka rDNA kódující prekurzory rRNA. Právě po transkripci rDNA genů začíná tvorba jádérka (Oestrup *et al.*, 2009; Shaw *et Doonan*, 2005). Jadérko, které můžeme pozorovat jen v interfázi buněčného cyklu, je místem syntézy rRNA a tvorby ribozomálních podjednotek (Lefevre, 2008). Transkripce rDNA genů a vytvoření jádérka je tedy nezbytným předpokladem pro syntézu proteinů a pro další úspěšný vývoj embrya.

Jadérko vzniká v jádře z tzv. nukleolárních prekurzorových tělísek (NPB, Nucleolus Precursor Bodies). Tyto kulovité útvary vznikají v jádře během prvních dvou buněčných cyklů embryonálního vývoje. U prasete se během čtyř-buněčného stádia (tj. třetího buněčného cyklu) kolem NPB tvoří denzní fibrilární oblasti, fibrilární centra a granulární částice. Fibrilárně granulární jádérko je pak plně vyvinuto u šestnácti-buněčného embrya (pátý buněčný cyklus) (Hyttel *et al.*, 2000).

3.3.2 Reaktivace embryonálního genomu a vývoj do blastocysty

Po splynutí prvojader je u zygoty zahájeno mitotické dělení (Foulek, 2001), které vede k vytvoření dvou-buněčného zárodku s dvěma diploidními jádry, z nichž každé obsahuje sadu maternálních a paternálních chromosomů (Li *et al.*, 2003). Množící se buňky, které jsou po každém dělení menší, jsou označovány jako blastomery. Vzniká tak postupně dvou-buněčné a čtyř-buněčné stádium. Do stádia čtyř-buněčného embrya se uplatňují proteiny a mRNA maternálního původu, které byly vytvořeny oocytem již v jeho stádiu růstu a zrání. Tato zásoba slouží po oplození oocyty pro počátek vývoje embrya a umožní pokračování

časného embryonálního vývoje až do chvíle, kdy embryo začne být transkripčně aktivní v produkci své vlastní mRNA a proteinů.

Zahájení vlastní tvorby mRNA a proteinů embryem, neboli embryonální genomová aktivace (EGA, Embryonic Genome Activation), je součástí období přechodu z maternálního genomu na embryonální (MZT, Maternal to Zygotic Transition) započatého ihned po oplození. MZT je postupný proces skládající se z několika fází (Bogliotti *et Ross*, 2015). Nejprve dochází k degradaci maternálního mRNA, proteinů a maternálních transkriptů, které jsou v další fázi nahrazeny prvními embryonálními transkripty tzv. malé aktivace genomu (minor genome activation). V neposlední řadě nastává celkové reprogramování genové exprese, které vede k syntéze velkého množství nových transkriptů nezbytných pro další embryonální vývoj (Schultz, 2002; Langley *et al.*, 2014).

Genom embrya je aktivován stupňovitě a s mezidruhovou specifitou. U myši dochází k majoritní aktivaci genomu ve dvou-buněčném stádiu, u králíka a skotu ve stádiu 8 - 16 buněk, u člověka ve stádiu 4 - 8 buněk (Bogliotti *et Ross*, 2015). U prasat byla zjištěna ve dvou-buněčném stádiu minoritní genomová aktivace a k majoritní aktivaci genů dochází ve čtyř-buněčném zárodku, odpovídající třetímu buněčnému cyklu embryonálního vývoje (Anderson, 2001; Maddox-Hyttel *et al.*, 2007).

Po úspěšné aktivaci embryonálního genomu prasete následuje dělení na osmi a šestnácti-buněčné embryo a poté nastává proces kompaktace dosud volných blastomer do organizované buněčné masy. Při vzájemném stlačování buněk dochází ke zmenšování mezibuněčných prostor a formaci mezibuněčných spojů. Mezi tyto mezibuněčné spoje patří spoje typu tight junction, důležité pro zadržení blastocoelové tekutiny, a spoje typu gap junction nutné k zajištění mezibuněčné komunikace. Mezi 2. a 3. dnem vývoje tak v *in vivo* podmínkách dochází k formaci kompaktní moruly. V této fázi se zárodky v *in vivo* podmínkách přesouvají z prostředí vejcovodu do děložních rohů (Rothschild *et Ruvinsky*, 2011). Vnější blastomery moruly se diferencují v tzv. trofoektoderm, který dává základ budoucím plodovým obalům a placentě. Z vnitřních blastomer moruly se stává vnitřní buněčná masa, ze které se později vyvíjí vlastní embryo (Foulk, 2001; Bambang *et al.*, 2010). Do mezibuněčných prostor mezi buňkami trofoektodermu a embryoblastu začne pronikat tekutina. Vznikající dutinky postupně splývají v jednotnou dutinu vyplněnou tekutinou a kolem pátého dne embryonálního vývoje je tak dosaženo útvaru blastocysty (Sadler, 2010; Bazer *et Johnson*, 2014). V *in vitro* podmínkách je vývoj zygoty do stádia blastocysty delší

oproti podmínkám *in vivo* a blastocysty, které se vyvíjejí v podmínkách *in vitro*, mají nižší počet blastomer (Stokes *et al.*, 2005).

3.3.3 Chromatin embrya a epigenetické změny v průběhu embryonálního vývoje

Základní jednotkou chromatinu, obsahujícího DNA, histony a proteiny nehistonové povahy, je nukleozóm (Obr. 1). Nukleozóm se skládá z oktameru histonů a z dvouřetězcové DNA, která vytváří kolem nukleozómu dvě neúplné otáčky o délce 146 párů bází (Yuan *et Zhu*, 2012). Ovinutím DNA kolem nukleozómu dochází ke zkrácení molekuly DNA přibližně o 1/3 její původní délky. Nukleozómy jsou navzájem odděleny volnou DNA, tzv. linker DNA (Plopper *et al.*, 2013).

Hlavní strukturní proteiny chromatinu jsou histony. Tyto malé proteiny o hmotnosti 11 - 15 kDa mají vysoký obsah kladně nabitých (bazických) aminokyselin lyzinu a argininu, které umožňují vazbu na záporně nabitou molekulu DNA. Chromatin obsahuje 5 typů histonů: H1, H2A, H2B, H3 a H4 (Cooper, 2000). Všechny tyto histony, kromě H1, tvoří vnitřní jádro nukleozómu, kde jsou zastoupeny po dvou molekulách. Mimo histonový oktamer leží histon H1 (spojovací histon). Ten se váže ke specifické oblasti nukleozómu, přitahuje jednotlivé nukleozómy těsně k sobě a umožňuje tak kondenzaci chromatinu. Histonů je v jádře buňky značné množství a jejich celková hmotnost je přibližně stejná jako hmotnost samotné DNA (Plopper *et al.*, 2013).

Histony, podobně jako DNA, podstupují v prenatálním i postnatálním vývoji epigenetické změny. K těmto epigenetickým změnám dochází ihned po oplození u samčího a samičího genomu zygoty. Jedná se o dědičné změny v genové expresi bez změny v sekvenci DNA. Jednou z epigenetických změn je methylace DNA. Methylace DNA spočívá v přidání methylové skupiny na uhlík v páté pozici cytosinu v CpG dinukleotidu (pár cytosin-guanin), v důsledku čehož dochází k potlačení transkripce genů. Tento přenos je katalyzován prostřednictvím enzymů DNA methyltransferáz (Bird, 1986; Moore *et al.*, 2013).

Pro úspěšnou reaktivaci embryonálního genomu a následnému zahájení transkripce genů specifických pro embryo, je tedy zapotřebí úplné demethylace DNA samčího a samičího původu (Wu *et al.*, 2014; Bogliotti *et Ross*, 2015). K demethylaci DNA může docházet buď pasivně při replikaci, nebo aktivně prostřednictvím specifických enzymů (Ma *et al.*, 2014). Během několika hodin po oplození je v průběhu formování prvojader u savců aktivně

demethylován samčí genom, což následně umožní nástup transkripce u samčího prvojádra. Naproti tomu samičí genom zůstává methylován a až po dvou-buněčném stádiu zárodku dochází k jeho postupné pasivní demethylaci (Haaf, 2006). Demethylace DNA je spojována s aktivitou enzymů rodiny TET (Ten Eleven Translocation). Prostřednictvím enzymu TET3 dochází k aktivní demethylaci DNA samčího genomu krátce po oplození oocyty. Prostřednictvím těchto enzymů dochází k oxidaci 5-methylcytosinu na 5-hydroxymethylcytosin, který je pak z DNA sekvence vystřižen a nahrazen nemodifikovaným cytosinem (Guo *et al.*, 2014; Bogliotti *et Ross*, 2015).

Mimo procesu methylace DNA dochází u postranních řetězců histonových aminokyselin k post-translačním modifikacím jako je např. methylace, acetylace, fosforylace a ubikvitinace. Zatímco DNA methylace je spojována s transkripční inaktivitou, modifikace jaderných histonů jsou regulátorem aktivace i inaktivace přepisu genů v závislosti na jejich specifické modifikaci a vzájemných kombinacích (Bogliotti *et Ross*, 2015). Do regulace exprese genů během MZT jsou zapojeny dva hlavní typy histonových modifikací: acetylace lyzinu a tri-methylace lyzinu. Právě methylace lyzinu na histonu 3 (H3) ovlivňuje načasování aktivace genů během MZT (Lee *et al.*, 2014). Např. methylace lyzinu v pozici 4 na histonu H3 (H3K4me) a acetylace lyzinu v pozici 14 na histonu H3 (H3K14ac) jsou spojovány s aktivací transkripce, naproti tomu methylací lyzinu v pozici 9 (H3K9me) a deacetylací lyzinu v pozici 14 (H3K14) dochází k umlčení některých genů (Lagger *et al.*, 2002; Lepikhov *et Walter*, 2004; Morgan *et al.*, 2005). Další modifikací hrající roli v regulaci EGA a potlačování transkripční aktivity je i tri-methylace lyzinu v pozici 27 na histonu H3 (H3K27me3) (Bogliotti *et Ross*, 2015).

Prostřednictvím popsaných epigenetických změn, methylace DNA a modifikace histonů, dochází v prasečí zygotě k asymetrii mezi maternálním a paternálním genomem, která je patrná již na úrovni prvojader. U samčího prvojádra je oproti prvojádru samičímu patrná nižší úroveň methylace histonů a vyšší acetylace histonů H3 a H4. Naopak u samičího prvojádra je přítomna slabá úroveň acetylace a silná úroveň methylace H3K9me2/3 a H3K27me3 (Adenot *et al.*, 1997; Van der Heijden *et al.*, 2005; Morgan *et al.*, 2005; Santos *et al.*, 2005; Ma *et al.*, 2015). Nízká úroveň methylace histonů samčího genomu krátce po oplození je následkem záměny protaminů za histony (Feil, 2009). Asymetrie mezi prvojádry je spojována i s rozdílnou methylací DNA, v důsledku výše popsané aktivní demethylace DNA u samčího prvojádra a zachování methylovaného DNA u prvojádra samičího (Dean *et al.*, 2001; Beaujean *et al.*, 2004; Morgan *et al.*, 2005; Hou *et al.*, 2008;

Feil, 2009). Naopak studie Jeong *et al.* (2007) uvádí, že u prasat po oplození nedochází u samčího prvojádra k aktivní demethylaci DNA a navíc je samčí genom charakteristický trimethylací H3K9.

Adekvátní epigenetické změny rozhodují o struktuře chromatinu a s ním spojené transkripční aktivitě či inaktivitě zygoty. Jsou důležité při procesu přechodu totipotentní zygoty na diferencované embryo exprimující své vlastní geny. Post-translační modifikace v kombinaci s methylací DNA, jakožto klíčoví regulátoři genové exprese zygoty, vytvářejí tzv. histonový kód, který je dešifrován prostřednictvím histon-vazebných proteinů.

3.4 Post-translační modifikace

Bylo prokázáno, že chromatin není statickou jednotkou a je formován post-translačními modifikacemi histonů, které utvářejí histonový kód. Tyto post-translační modifikace hrají důležitou roli v regulaci transkripce a opravě DNA (Luger *et al.*, 2012). Mezi nejčastější post-translační modifikace, které se podílejí na tvorbě histonového kódu, je řazena methylace a acetylace lyzinu, dále methylace argininu, fosforylace serinu, ubikvitinace a SUMOylace lyzinu (Bogliotti *et Ross*, 2015). Na histonovém kódu se mimo těchto známých typů modifikací podílí i méně časté typy modifikací jako např. propionylace, butyrylace apod.

K modifikacím nejčastěji dochází na N-terminálních koncích histonových proteinů a v mnohem menší míře na centrálních (globulárních) částech a C-terminálních koncích histonů, což je nejspíše způsobeno horším přístupem pro modifikující enzymy. Míra post-translačních modifikací se u jednotlivých histonů liší, např. nejvíce modifikací podstupuje H3 a H4, naproti tomu u H2A a H2B dochází k modifikacím relativně málo (Biswas *et al.*, 2011). Post-translační modifikace předurčují tvorbu dvou různých stavů chromatinu rozlišených podle jeho stupně kondenzace: heterochromatinu a euchromatinu (Biel *et al.*, 2005). Prostřednictvím post-translačních modifikací je tedy umožněna změna kondenzace chromatinu v závislosti na stádiu buněčného cyklu. Transkripčně aktivní euchromatin se vyskytuje v interfázi buněčného cyklu, kdy se buňka připravuje na dělení a dochází k transkripci genů a replikaci DNA. DNA se tak stává přístupná pro proteiny potřebné pro expresi genů a replikaci v důsledku rozvolněného stavu euchromatinu, kde se DNA nachází ve formě 30 nm silných vláken organizovaných do velkých smyček. Interfázový chromatin je z 10 % tvořen naopak vysoce kondenzovaným heterochromatinem, kde jsou geny umlčeny a k DNA nemohou přistoupit aktivátory transkripce, rekombinace či proteiny

důležité pro opravu DNA (Cooper, 2000). Přeměnou euchromatinu na transkripčně neaktivní heterochromatin dochází ke stabilizaci genomu a inhibici transkripce specifických genů. V důsledku post-translačních modifikací je tak ovlivňována genová exprese prostřednictvím chromatin remodelujících enzymů (Biswas *et al.*, 2011). V chromatin-remodelujících enzymech, jako je např. histonacetyltransferáza (HAT) či histonmethyltransferáza (HMT), se nacházejí domény určující specifitu vazby. Např. v mnohých HAT enzymech jsou obsaženy bromodomény, které se specificky vážou na acetylované histony a v jiných enzymech jsou zastoupeny chromodomény, vážající se na histony methylované (Bottomley, 2004).

3.4.1 Fosforylace a ADP ribosylace

Při regulaci stupně kondenzace chromatinu je důležitá i fosforylace serinových, threoninových a tyrozinových zbytků histonů, kontrolována enzymy kinázou a fosfatázou. Prostřednictvím kináz je katalyzován přenos fosfátu z ATP na hydroxylovou skupinu specifického proteinu, naopak enzymem fosfatázou dochází k defosforylaci. Během mitózy a meiózy je fosforylace zodpovědná za kondenzaci chromatinu, avšak v interfázi zároveň zajišťuje transkripci genů (Biel *et al.*, 2005; Bannister *et al.*, 2011). Fosforylace je významnou epigenetickou změnou v reakci na poškození DNA, kdy v důsledku indukce DNA zlomů je fosforylován v pozici serinu 139 histon H2AX (γ H2AX). Tento histon je jednou z nejkonzervovanějších variant histonu H2A a jeho fosforylace je časným markerem poškození DNA (Rogakou *et al.*, 1998; Redon *et al.*, 2010). Prostřednictvím γ H2AX dochází k rekrutaci DNA reparačních a signalizačních proteinů, podílejících se na rekonstrukci poškozené DNA nebo dočasné zástavě buněčného cyklu. γ H2AX tak hraje významnou roli v udržování stability genomu (Bonner *et al.*, 2008).

Další epigenetickou modifikací, která se také významně podílí na opravě DNA, je ADP ribosylace. V tomto případě je na histony napojena větší molekula ADP-ribóza. Na arginin nebo glutamátový zbytek histonů je přenášena jedna či více molekul. V případě většího počtu molekul se jedná o poly-ADP-ribosylaci, která je katalyzována prostřednictvím poly-ADP-ribóza-polymerázy (PARP). Tato modifikace je dále zapojena do remodelace chromatinu, genové exprese a mnoha dalších buněčných procesů (Bannister *et al.*, 2011).

3.4.2 Ubikvitinace a SUMOylace

Jiným mechanismem modifikace dochází k připojení polypeptidů ubikvitinu nebo SUMO (Small Ubiquitin-Related Modifier) na lyzinový zbytek cílového proteinu. Přenos těchto molekul je realizován několika specifickými enzymy, jako jsou ubikvitin a SUMO-aktivátory, konjugázy, ligázy nebo proteázy. Při sumoylaci histonu H4 dochází k vazbě histondeacetylázy (HDAC) a heterochromatin proteinu 1 (HP1, Heterochromatin Associated Protein 1) k transkribovanému genu. Tato změna vede ke kondenzaci chromatinu a tedy inhibici transkripce genu. Sumoylace ostatních histonů nebyla dosud u eukaryot prozkoumána. Tato post-translační modifikace je mimo inhibice transkripce zapojena např. i do transportu mezi cytoplazmou a jádrem, do udržení integrity chromosomů a stability genomu. Při sumoylaci většinou dochází ke stabilizaci proteinu oproti polyubikvitinaci, která předurčuje protein k rozkladu v proteazomu. Jako častá histonová modifikace se vyskytuje ve formě monoubikvitinace (Luger *et al.*, 2012).

3.4.3 Acetylce histonů

Doposud nejvíce prostudovanou modifikací histonů je acetylce, která se týká lyzinových zbytků. Do regulace acetylce chromatinu jsou zapojeny enzymy rodin histonacetyltransferáz (HAT) a histondeacetyláz (HDAC). Prostřednictvím HAT je přenášen acetyl z acetylkoenzymu A na ϵ -amino skupinu lyzinu. Při hyperacetylaci dochází k rozvolnění struktury chromatinu neutralizací pozitivního náboje histonu. Oddálením DNA od nukleozómů se tak DNA promoteru stává přístupná pro transkripční faktory, což umožní aktivaci genové transkripce (Bannister *et Kouzarides*, 2011; Thiagalingam *et al.*, 2003). K rozvolnění chromatinu napomáhají již zmíněné enzymy s bromodomény, které nasedají na acetylované lyziny histonů (Bottomley, 2004). Při hypoacetylaci dochází k opačnému procesu, tedy navrácení ke kompaktnímu stavu chromatinu.

3.4.4 Methylce histonů

Významnou post-translační modifikací je methylce histonů. V tomto případě mohou být lyziny histonů modifikovány připojením jedné, dvou či tří methylových skupin (mono-, di-, tri-methylce), zatímco u argininu dochází k mono- nebo di-methylaci. K methylaci dochází prostřednictvím enzymu HMT a vratnost procesu methylce je umožněna histondemethylázou (HDM). Jako první HMT byl popsán enzym SUV39H1, jehož cílem je výhradně H3K9 (Bannister *et Kouzarides*, 2011). Dalším enzymem, s několikanásobně vyšší

histonmethyltransferázovou aktivitou ve srovnání s SUV39H1 je G9A, který methyluje nejen H3K9, ale i H3K27 (Tachibana *et al.*, 2002).

Jedním z nejznámějších příkladů umlčení genů, ve kterých sehraává roli právě methylace, je deaktivace jednoho z X chromosomů. Tento jev nastává běžně u samic v časném embryonálním vývoji savců. V tomto případě dochází ke změně konformace chromosomu X na heterochromatin, který úzce souvisí s methylací DNA a modifikacemi histonů a to především methylací H3K27 a H4K20. Inaktivovaný X chromosom je v samičím embryu patrný jako tzv. Barrovo tělísko (Chadwick *et Willard*, 2003). V umlčování genů prostřednictvím konformace heterochromatinu hraje důležitou roli již zmíněný SUV39H1, který ve spojení s HP1, vázajícího se na methylovaný H3K9, usnadňuje vyšší kondenzaci chromatinu (Biel *et al.*, 2005). Proces methylace není vždy spojován s kondenzací chromatinu. Jak již bylo zmíněno např. při methylaci na H3K9 dochází k transkripční inaktivaci chromatinu a naopak při methylaci H3K4 je chromatin transkripčně aktivní. Rozdílný účinek na formaci chromatinu je tak dán specifickou lokalizací methylace (Lagger *et al.*, 2002).

3.5 Histondeacetylázy

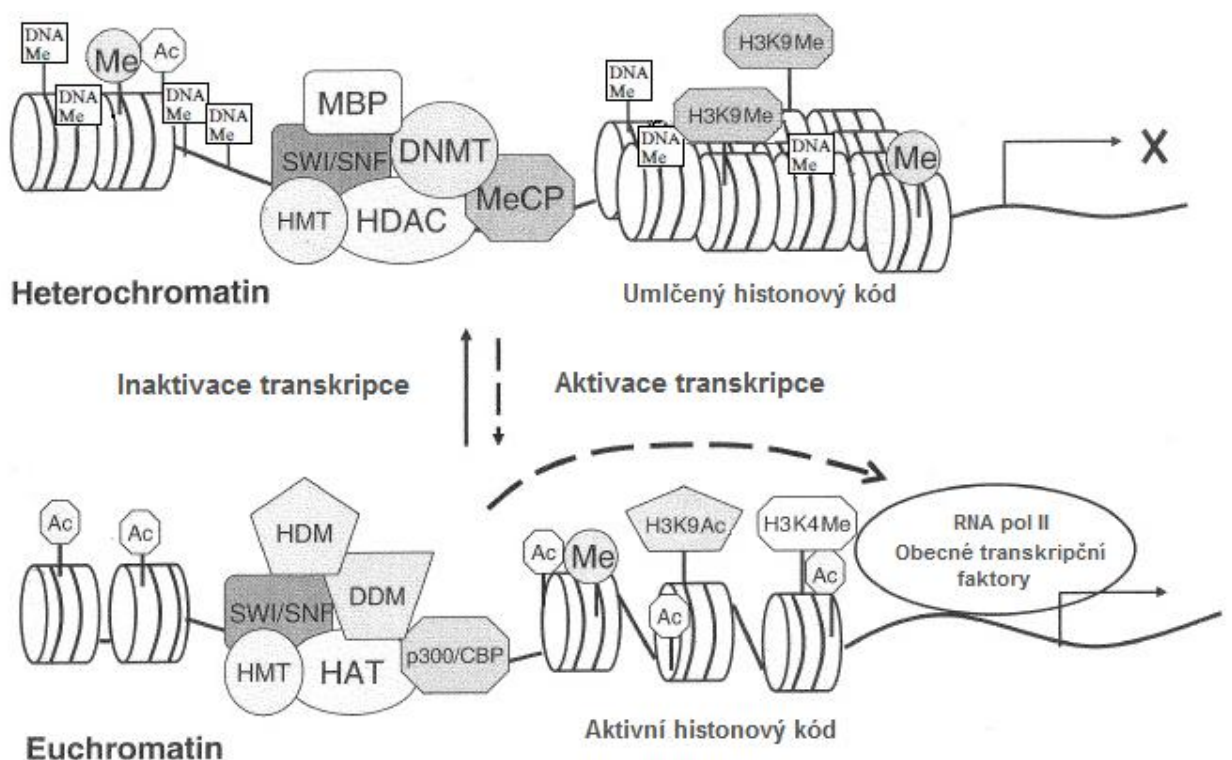
HDAC je skupina enzymů uvolňujících acetylové skupiny z ϵ -aminoskupiny lyzinu histonů a mnoha ne-histonových proteinů. Prostřednictvím aktivity HDAC dochází k těsnějšímu uspořádání chromatinu a umlčení specifických genů (De Ruijter *et al.*, 2003). U savců bylo dosud identifikováno 18 HDAC. Některé z nich jsou lokalizovány v jádře, kde jsou jejich cílem histony a některé jsou lokalizovány i v cytosolu. HDAC jsou klasifikovány do čtyř tříd dle podobnosti s histonovými deacetylázami izolovaných z kvasinek: RPD3 protein (I. třída), HDA1 protein (II. třída) a SIR2 protein (III. třída) (Escobar *et al.*, 2010).

Do I. třídy HDAC jsou řazeny HDAC1, 2, 3 a 8, lokalizované především v jádře, ačkoli u HDAC3 může docházet k transportu z jádra do cytoplazmy. Do II. třídy jsou řazeny HDAC4, 5, 6, 7, 9 a 10, u kterých dochází k transportu mezi jádrem a cytoplazmou (De Ruijter *et al.*, 2003). III. třída je tvořena rodinou sirtuinů (SIR, Silent Information Regulators) a IV. třída jediným zástupcem HDAC11, který nevykazuje sekvenční podobnost s HDAC kvasinek jako ostatní třídy.

HDACs jsou někdy dále rozdělovány do dvou skupin dle požadavků katalytické domény. Do první rodiny jsou řazeny HDAC1-11, které ke své deacetylační aktivitě vyžadují

Zn^{2+} jako kofaktor (Zn^{2+} - dependentní deacetylázy). Naproti tomu druhá rodina sirtuinů je závislá na přítomnosti nikotinamidadenin dinukleotidu (NAD^+), jakožto důležitého kofaktoru jejich enzymatické aktivity (NAD^+ - dependentní histon deacetylázy) (Escobar *et al.*, 2010).

Aktivita HDACs může být ovlivněna jejich post-translačními modifikacemi a řadou inhibitorů. Jako první z inhibitorů byl objeven trichostatin A (TSA), který inhibuje všechny HDACs kromě sirtuinů. Mezi inhibitory HDAC se dále řadí butyrát, vorinostat, oxamflatin, trapoxin A, apicidin, a další (Thiagalingam *et al.*, 2003; De Ruijter *et al.*, 2003; Dokmanovic *et al.*, 2007). V důsledku inhibice HDAC dochází k akumulaci acetylovaných histonů a tím k expresi specifických genů. Naopak na potlačení exprese genů se podílí aktivita HDAC s procesem methylace DNA. Oba děje jsou úzce spjaty a vzájemně se ovlivňují. Do rekrutace HDAC jsou zapojeny DNA methyltransferázy, dále proteiny vázající se na methylované CpG ostrůvky (MBP, Methyl-CpG Binding Proteins) a domény vázající methylovanou DNA (MBD, Methyl-CpG Binding Domain). Mezi MBD proteiny jsou řazeny např. MeCP1 a MeCP2, které obsahují vazebná místa pro korepresory nebo HDACs (Zou *et al.*, 2011). V prvním kroku dochází k methylaci DNA. Na methylovanou DNA se vážou MBP, které rekrutují HDAC, v důsledku čehož dochází k deacetylaci histonů. Po deacetylaci histonů je dále umožněna methylace histonů a tím dochází ještě k těsnějšímu uspořádání chromatinu a regulaci histonového kódu. Transkripční umlčení se proto vyznačuje hypermethylací DNA, deacetylací histonů a následnou methylací H3K9 (Vaissière *et al.*, 2008).



Obr. 1: HDACs a regulace histonového kódu (upraveno dle Thiagalingam *et al.*, 2003). SWI/SNF: chromatin remodelující komplex, DNA Me: methylace DNA, Me: methylace histonu, Ac: acetylace histonu, p300/CBP: CREB vazebný protein, DDM: DNA demethyláza.

Skrze post-translační modifikace se podílí na utváření histonového kódu důležitá skupina HDACs sirtuiny, které jsou zapojeny do širokého spektra biologických funkcí.

3.5.1 Sirtuiny a jejich zapojení do regulace epigenetických změn

Do skupiny specifických NAD⁺ - dependentních histondeacetyláz, souhrnně označovaných jako sirtuiny, bylo u savců identifikováno 7 izoform (SIRT1 - 7) (Vaquero *et al.*, 2004; Kwak *et al.*, 2012). Podstatou deacetylační aktivity sirtuinů je přenos acetylové skupiny z proteinu na ADP - ribózovou část NAD⁺ za vzniku O-acetyl-ADP-ribózy (Milner, 2009). Sirtuiny jsou na rozdíl od ostatních tříd deacetyláz rezistentní vůči běžným inhibitorům deacetyláz (Xu *et al.*, 2007; Olmos *et al.*, 2011; Albani *et Forloni*, 2014). Sirtuiny zastávají nejrozličnější buněčné funkce v závislosti na jejich lokalizaci v buňce (Tab. 2). Dosud nejlépe charakterizovaný SIRT1 je lokalizován převážně v jádře a SIRT2 v cytoplazmě, ale může docházet k jejich migraci mezi jádrem a cytoplazmou. SIRT3, SIRT4, a SIRT5 jsou lokalizovány v mitochondriích, ačkoli u SIRT3 dochází při buněčném stresu k transportu z jádra do mitochondrie. SIRT6 je jaderný a SIRT7 jadérkový sirtuin (Cantó *et Auwerx*, 2012; Kwak *et al.*, 2012; Villalba *et Alcaín*, 2012). Prostřednictvím sirtuinů dochází v jádře k deacetylaci histonových proteinů, ale jejich cílem jsou rovněž proteiny nehistonové povahy (Albani *et Forloni*, 2014).

Sirtuin	Třída	Lokalizace	Enzymatická aktivita
SIRT1	I	Jádro, cytosol	Deacetylase
SIRT2	I	Cytosol, jádro	Deacetylase, demyristoylace
SIRT3	I	Mitochondrie	Deacetylase
SIRT4	II	Mitochondrie	ADP-ribosylace
SIRT5	III	Mitochondrie	Deacetylase, demalonylace, desukcinylace
SIRT6	IV	Jádro	Deacetylase, ADP-ribosylace
SIRT7	IV	Jadérko	Deacetylase

Tabulka 1: Lokalizace a enzymatická aktivita sirtuinů v buňce (upraveno podle Gomes *et al.*, 2015).

SIRT1 je nejvíce prostudovaným členem rodiny sirtuinů, který se podílí na regulaci nejrůznějších buněčných procesů determinující životaschopnost buňky. Jedná se o anti-apoptotický účinek, potlačení volných kyslíkatých radikálů (ROS, Reactive Oxygen Species), ochranu neuronů a další (Sauve, 2009; Olmos *et al.*, 2011). SIRT1, podobně jako ostatní sirtuiny, je zodpovědný za deacetylaci a inaktivaci jednoho z proteinů nehistonové povahy p53 a jiných nádorových supresorů. Proto se SIRT1 stává potenciálním faktorem studia vzniku rakoviny. Je však známo, že p53 pomocí negativní zpětné vazby reguluje transkripci SIRT1, kdy inaktivace p53 může snížit úroveň exprese SIRT1, čímž se zvýší aktivita p53. Podobně dochází i k mechanismu negativní zpětné vazby u proteinů FOXO, působících za určitých okolností také jako nádorové supresory. Účinek SIRT1, jakožto nádorového supresoru nebo promoteru, je tedy závislý na mnoha faktorech zahrnujících např. věk, typ tkáně, množství a distribuce specifických cílů pro SIRT1 a faktorů regulujících SIRT1 (Deng, 2009; Wilking *et Ahmad*, 2015).

SIRT2 je převážně lokalizován v cytoplazmě, ale ve fázi G2/M buněčného cyklu dochází k jeho přesunu z cytoplazmy do jádra, kde způsobuje deacetylaci H4K16 a tím stabilizaci genomu (Villalba *et Alcaín*, 2012). Cílem SIRT2 jsou také již zmíněné transkripční faktory, zahrnující p53 a FOXO proteiny (Olmos *et al.*, 2011).

SIRT3, SIRT4, a SIRT5 jsou lokalizovány v mitochondriích, kde pravděpodobně hrají roli v regulaci transkripce mitochondriálního genomu. Ovlivňují aktivitu metabolických enzymů skrze deacetylaci a/nebo mono-ADP-ribosylaci. U SIRT3, který je zároveň histonovou deacetylázou, dochází v důsledku stresového stimulu k přesunu z jádra do mitochondrií, kde SIRT3 ovlivněním detoxikace ROS snižuje riziko poškození makromolekul (Olmos *et al.*, 2011). Inhibicí SIRT3 dochází ke zhoršení formace myších blastocyst *in vitro*, v důsledku vzniku ROS, což je důkazem jeho protektivního účinku proti oxidativnímu stresu (Kawamura *et al.*, 2010).

Aktivitou SIRT6 je převážně ADP-ribosylace, ale zastává funkci i histonové deacetylázy. SIRT6 je odpovědný za odolnost proti poškození DNA, za opravu DNA zlomů a potlačení genomové nestability. Po jeho navázání na nukleární faktor NF- κ B, dochází prostřednictvím SIRT6 k deacetylaci H3K9, což zabraňuje navázání tohoto faktoru na chromatin. Tímto mechanismem může být ovlivňována exprese cílových genů tohoto proteinu, důležitých pro buněčnou apoptózu, nebo zastavení buněčného cyklu vlivem genotoxického a oxidativního stresu. Jeho nadměrná exprese vyvolává u rakovinných buněk

masivní apoptózu, proto je SIRT6 dalším sirtuinem studovaným v rámci léčby rakoviny (McCord *et al.*, 2009; Olmos *et al.*, 2011; Villalba *et. Alcaín*, 2012).

SIRT7 nacházející se v jádru, pozitivně reguluje transkripci ribozomálních DNA genů (Olmos *et al.*, 2011). Rovněž je faktorem ovlivňující vývoj rakoviny skrze specifickou deacetylaci H3K18, která způsobuje potlačení exprese tumor supresorových genů, vedoucí k proliferaci nádorových buněk. Hypoacetylace H3K18 je tak spojována s agresivním typem rakoviny (Paredes *et al.*, 2014; Yu *et al.*, 2014).

Aktivita sirtuinů je ovlivňována aktivátory, inhibitory a post-translačními modifikacemi sirtuinů. Serinové a tyrozinové zbytky sirtuinů mohou být fosforylovány a lyzinové zbytky modifikovány sumoylací. Např. fosforylací SIRT2 na Ser-368 a Ser-331 dochází k inhibici jeho deacetylační aktivity (Kwak *et al.*, 2012). Nejvíce aktivátorů bylo identifikováno pro SIRT1, z nichž nejprostudovanější je polyfenol resveratrol (RSV), přírodní sloučenina s antioxidantními účinky, běžně se vyskytující v červeném víně. Účinnější v aktivaci SIRT1 jsou však syntetické molekuly než RSV (Villalba *et Alcaín*, 2012). Inhibitorem sirtuinů je např. sirtinol a produkt deacetylační reakce sirtuinů - nikotinamid (NAM). Působením těchto inhibitorů dochází k vývojovým defektům a ke zvýšení hladiny ROS v průběhu embryonálního vývoje (Kwak *et al.*, 2012).

3.5.1.1 Signalizace sirtuinů během časně embryogeneze

U sirtuinů byl v několika studiích prokázán příznivý účinek na zrání oocyty a následný embryonální vývoj (Kwak *et al.*, 2012; Lee *et al.*, 2010; Sato *et al.*, 2014; Itami *et al.*, 2015). Aktivita SIRT1 je zvyšována prostřednictvím aktivátoru resveratrolu, prostřednictvím inhibice cAMP fosfodiesterázy. Po zvýšení SIRT1 aktivity resveratrolem byl prokázán pozitivní efekt na zrání prasečího oocyty a schopnost dosažení stádia blastocysty (Itami *et al.*, 2015). V důsledku aktivity SIRT1 dochází také ke zvýšení počtu a zlepšení kvality mitochondrií u zrajících prasečích oocytů (Sato *et al.*, 2014). U myši byl zjištěn pozitivní efekt SIRT1 na životaschopnost oocyty za stresových podmínek (Di Emido *et al.*, 2014), kdy prostřednictvím působení resveratrolu na aktivaci SIRT1 dochází k redukci ROS a snížení exprese genů se vztahem k apoptóze. Výsledkem aktivace sirtuinů je tedy zlepšení vývojového potenciálu embrya a počtu buněk blastocysty prasat (Kwak *et al.*, 2012; Lee *et al.*, 2010).

V souhrnu je mezi pozitivní účinky sirtuinů řazena ochrana proti poškození DNA, reakce na DNA zlomy, dále ovlivnění nejrůznějších životních funkcí embrya, zahrnující metabolismus mitochondrií, proces apoptózy nebo udržování délky telomer chromosomů (Palacios *et al.*, 2010; Pillai *et al.*, 2014; Sato *et al.*, 2014). Pozitivní vliv SIRT1 na embryonální vývoj je dobře znám, jeho signalizace v průběhu embryonálního vývoje však zatím zůstává nedostatečně prostudována.

Deacetylační aktivita SIRT1 je spojována s epigenetickou regulací na úrovni histonů, kdy dochází deacetylací H3K9ac, H3K14ac a H4K16ac k ovlivnění transkripce genů. Dále je prostřednictvím SIRT1 nepřímo modifikována DNA, kdy dochází ke zvýšení aktivity DNA methyltransferázy (DNMT1) (Martínez-Redondo *et Vaquero*, 2013).

Aktivací SIRT1 dochází také k deacetylaci celé řady substrátů ne-histonové povahy, jako jsou p53, FOXO, NF- κ B, EZH2, Ku-70, eNOS a jiné (Houtkooper *et al.*, 2012; Martínez-Redondo *et Vaquero*, 2013). Regulací ne-histonového proteinu p53 je ovlivňována kvalita embrya. U proteinu p53, který hraje roli v reakci na poškození DNA, je jeho exprese během embryonálního vývoje spojována s negativním vlivem na kvalitu blastocysty. Protein p53 je regulován prostřednictvím SIRT1, kdy dochází k inaktivaci p53 v důsledku jeho deacetylace. Deacetylovaný p53 je následně degradován pomocí tzv. E3 ubikvitin ligázy MDM2 v proteazomu. Prostřednictvím degradace v proteazomu jsou dále regulovány již zmíněné proteiny rodiny FOXO. Při stresových podmínkách dochází deacetylací SIRT1 k inhibici schopnosti FOXO3A vyvolat buněčnou smrt a zároveň dochází ke zvýšení schopnosti FOXO3A zajistit rezistenci vůči oxidativnímu stresu. Výsledkem deacetylace FOXO3A je totiž stimulace exprese antioxidantů katalázy a mangan superoxid dismutázy (MnSOD), čímž je pozitivně ovlivňován časný embryonální vývoj (Daitoku *et al.*, 2011; Di Emido *et al.*, 2014; shrnuto v Pillai *et al.*, 2014; Tollini *et al.*, 2014).

Dalším z důležitých ne-histonových cílů SIRT1, pozitivně ovlivňující časný embryonální vývoj, je methyltransferáza SUV39H1, kterou SIRT1 reguluje. Prostřednictvím aktivace SUV39H1 dochází ke zvýšené methylaci H3K9, což svědčí o již zmíněné spojitosti dějů deacetylace a methylace histonů. Methylace je v tomto případě umožněna až po předešlé deacetylaci sirtuiny. Nejprve dochází k navázání SIRT1 na SUV39H1, čímž se tato methyltransferáza stává stabilní. Ke stabilizaci SUV39H1 dochází prostřednictvím potlačení degradace SUV39H1 v proteazomu zapříčiněné výše zmíněnou ubikvitin ligázou MDM2 (Bosch-Presegué *et al.*, 2011). Mimo to SUV39H1 je prostřednictvím SIRT1 deacetylována

na lyzinovém zbytku K266, čímž dochází ke zvýšení aktivity SUV39H1. Poté je prostřednictvím aktivity SIRT1 navázána methyltransferáza na chromatin. Aktivitou SIRT1 dochází k deacetylaci H3K9 a následně je tak umožněna tri-methylace H3K9 methyltransferázou a transkripčně umlčeny geny. V důsledku zvýšené aktivity SIRT1 tedy ve vyšší míře dochází k H3K9me3, vazbě HP1 a utváření heterochromatinu, čímž dochází k regulaci histonového kódu (Zhang *et* Kraus, 2010; Bosch-Presegué *et* Vaquero, 2015).

4. Materiál a metodika

4.1 Izolace a zrání prasečích oocytů *in vitro*

Oocyty byly získávány z vaječníků dovážených z jatek (Jatky Plzeň a.s., Plzeň, Česká republika), kde byly odebírány od 6 – 8 měsíců starých necyklujících prasniček (kříženci plemene Landrace x Bílé ušlechtilé). Do laboratoře byly vaječníky převáženy při teplotě 39 °C. Kumulo-oocytární komplexy (COCs) byly získávány z ovariálních folikulů o průměru 2 - 5 mm pomocí aspirační stříkačky a jehly 20G a zpracovány v HEPES-pufrovaném médiu Tyrodového acetátu obsahujícího 0,01% (w/v) polyvinyl alkohol (TL-HEPES-PVA). Pro *in vitro* zrání (IVM) byly vybrány pouze plně dorostlé oocyty s neporušenou cytoplazmou a celistvým obalem z kumulárních buněk. Pro IVM bylo použito modifikované kultivační médium mTCM199 (Gibco, Life Technologies, UK), obsahující 0,1% PVA, 3,05 mM D-glukózu, 0,91 mM sodium pyruvát, 0,57 L-cystein, 0,5 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ LH (Sigma-Aldrich, USA), 0,5 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ FSH (Sigma), 10 ng.mL^{-1} epidermální růstový faktor (Sigma), 10 % prasečí folikulární tekutiny, 75 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ penicillin G a 50 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ streptomycin. Po 22 hod. kultivace byly COCs přemístěny do modifikovaného kultivačního média mTCM199 bez LH a FSH a následně kultivovány dalších 22 hod.

4.2 Oplození oocytů *in vitro* a kultivace embryí *in vitro*

Po 44 hod. IVM byly odstraněny kumulární buňky pomocí 0,1% hyaluronidázy v TL-HEPES-PVA a oocyty ve stádiu MII s prvním pólovým tělískem byly vybrány pro *in vitro* oplození (IVF). Oocyty byly třikrát promyty modifikovaným Tris-pufrovaným médiem (mTBM; Abeydeera *et al.*, 1998) s 0,2% bovinním sérovým albuminem (BSA; A7888; Sigma) a přemístěny do 100 ml mTBM, pokrytého minerálním olejem v Petriho miskách o průměru 35 mm. Ekvilibrace v miskách probíhala při teplotě 38,5 °C a ve směsi vzduchu s 5 % CO₂ do okamžiku přidání spermií. Spermie byly připraveny následujícím způsobem: Z dovezené inseminační dávky byl odebrán objem, ve kterém je obsaženo 100 milionů spermií a následně tento objem centrifugován při 1500 rpm po dobu 5 min. Následně byly spermie dvakrát promyty ve fosfátovém pufru (PBS) s 0,1% PVA (PBS-PVA). Spermie byly následně rozředěny v médiu mTCM na koncentraci 1×10^7 a nakonec přidány v objemu 5 μl k oocytům (při výsledné koncentraci 10^5). Oocyty byly se spermii inkubovány 6 hod. při teplotě 38,5 °C a ve směsi vzduchu s 5 % CO₂. Po šesti hodinách byly oocyty promyty

v PZM3 médiu obsahujícího 0,4% BSA BSA (A6003; Sigma) a dále kultivovány. Celková doba kultivace činila 22 hod. od IVF.

4.3 Aktivátory sirtuinu

Aktivace a inhibice SIRT1 byla provedena v PZM3 během *in vitro* kultivace (IVC) časného vývoje zygoty. Jako aktivátory byly použity: resveratrol (3,0 μ M, 6,25 μ M, 12,5 μ M; nescifický aktivátor sirtuinů, Abcam, ab120726) a alternativně BML-278 (3,0 μ M; selektivní SIRT1 aktivátor, Abcam, ab144536).

4.4 Imunofluorescence a analýza obrazu

Po 22 hod. IVC byla u zygot odstraněna *zona pellucida* 0,5% pronázou a zygoty byly dále zpracovány dle modifikované metodiky publikované Yi *et al.* (2014). Směs myší mono-klonální anti-histon H3 (di-methyl K9, tri-methyl K9) protilátky (H3K9me2/3; ab71604, Abcam, UK; 1:200) a králičí mono-klonální anti-histon H3 (acetyl K9) protilátky (H3K9ac; ab32129, Abcam, Cambridge, UK; 1:200) byla aplikována přes noc při teplotě 4 °C. Následně byly oocyty dvakrát promyty a poté inkubovány s fluorescein isothiocyanate (FITC) konjugovaným kozím anti-myším (GAM) IgG (62-6511; Invitrogen, Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, MA, USA; 1:200) a cyanin dye (Cy5) konjugovaným kozím anti-králičím (GAR) IgG (111-175-144; Jackson ImmunoResearch Laboratories Inc., West Grove, PA, USA) po dobu 40 min. při pokojové teplotě. Poté byly zygoty dvakrát promyty a montovány do Vectashieldu s 4'6'-diamidino-2-phenylindole (DAPI; Vector Laboratories Inc., Burlingame, CA, USA). Obrázky byly pořízeny pomocí Ti-U mikroskopu (Nikon Co., Tokyo, Japan), CCD kamery Clara Interline (Andor Technology PLC, Belfast, Northern Ireland) a programu NIS Elements Ar (Nikon Co., Tokyo, Japan). Negativní kontroly byly připraveny za stejných podmínek jako pozitivní vzorky s vynecháním specifických protilátek. Pozitivní vzorky byly vyhodnoceny a vztaženy k negativní kontrole při srovnatelném nastavení optické dráhy. Analýza obrazu byla provedena pomocí NIS Elements. Intenzita signálu H3K9ac a H3K9me2/3 prvojader byla vyjádřena poměrem k intenzitě signálu cytoplazmy zygoty a relativně vyjádřena úrovní acetylace/methylace.

4.5 Statistická analýza

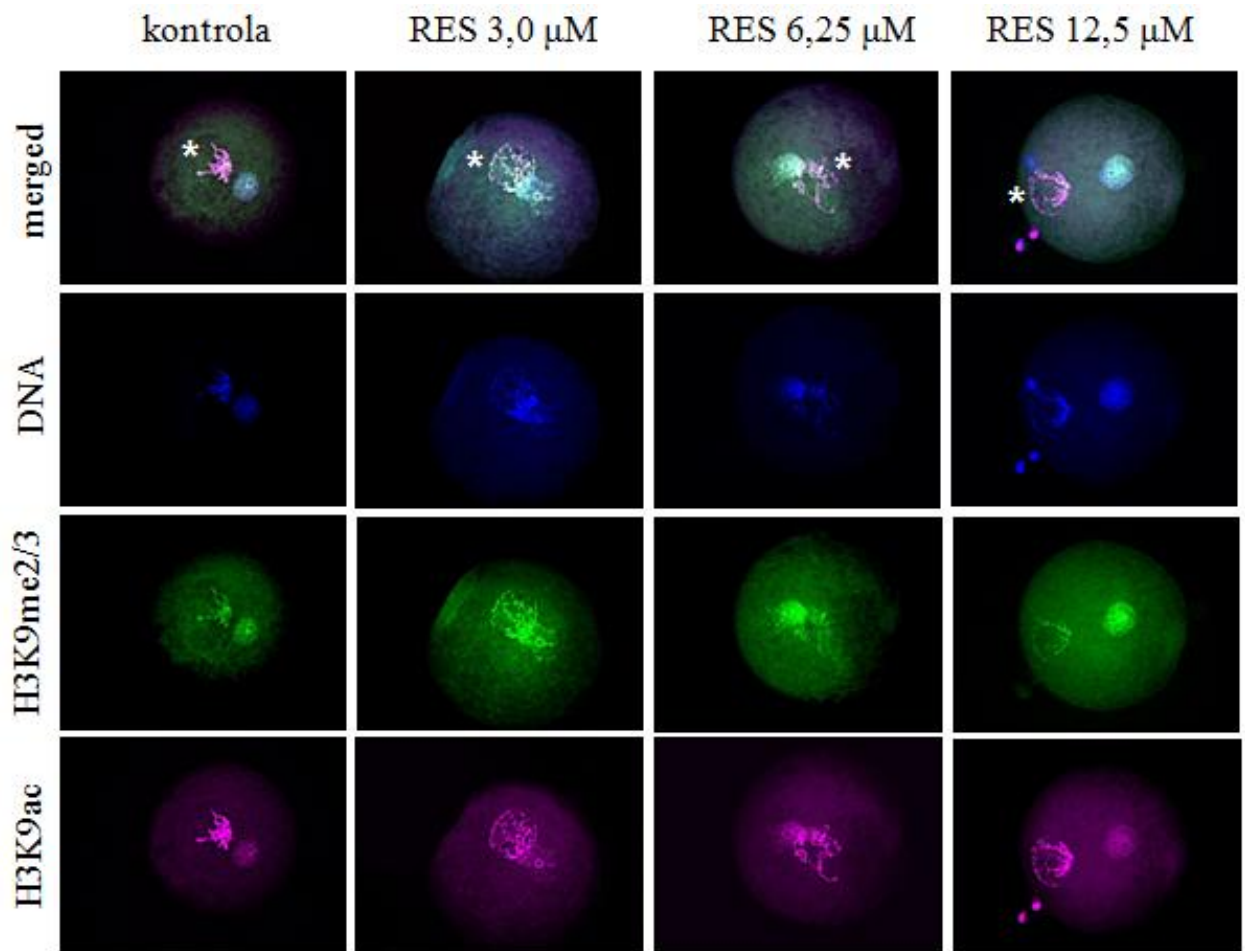
Experimenty byly opakovány min. 3x. Data získaná z experimentů pak byla zpracována prostřednictvím obecných lineárních modelů (GLM) v programu SAS. Pro stanovení významných rozdílů mezi skupinami byl použit t-test. Hodnota $P < 0,05$ byla považována za statisticky významnou.

5. Výsledky

5.1 Efekt resveratrolu na modifikaci H3K9 v prvojádrech prasečích zygot

Přítomnost a intenzita signálu acetylovaného a methylovaného histonu H3 na lyzinu K9 u samčího a samičího prvojádra v prasečí zygotě byla zjišťována pomocí imunofluorescence a analýzy obrazu, viz obrázek 1. Analyzovány byly zygoty 22 hod. po *in vitro* oplození. *In vitro* kultivované zygoty byly ošetřeny resveratrolelem v koncentraci 3 – 12,5 μM .

U kontrolní skupiny je patrná asymetrie mezi samčím a samičím prvojádrem, která je charakteristická vyšší intenzitou H3K9ac a nižší intenzitou H3K9me_{2/3} samčího prvojádra (označeno hvězdičkou) na rozdíl od prvojádra samičího, viz obrázek 1. Z výsledků získaných a zanesených do grafu je patrné, že po přidavku resveratrolu došlo k výraznému zvýšení (až o 37 %) intenzity signálu methylovaného histonu H3 na lyzinu K9 a naopak k výraznému snížení (až o 32 %) intenzity signálu acetylovaného histonu H3 na lyzinu K9 u prvojader zygoty, viz obrázek 2 a 3.

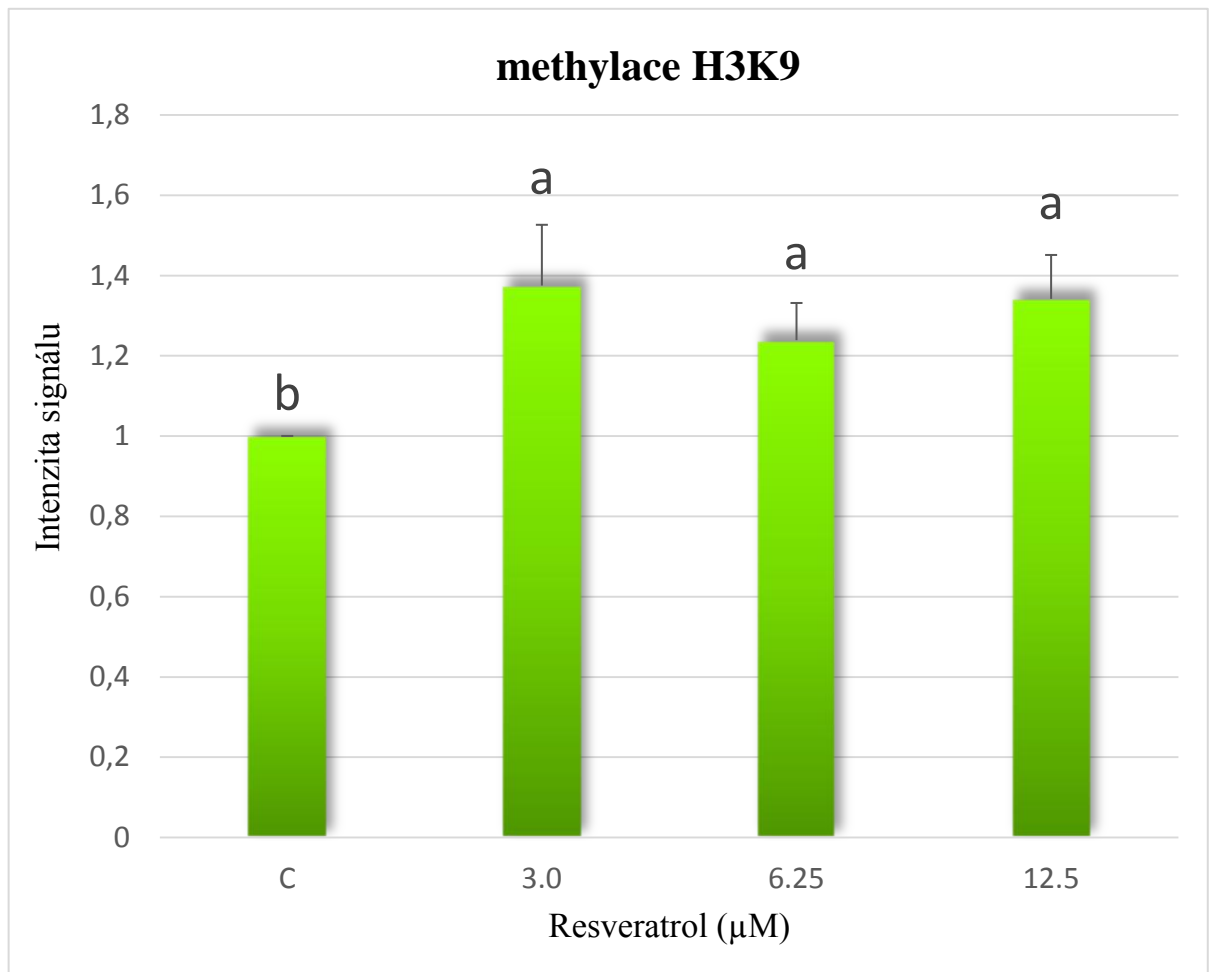


Obrázek 1: Acetylace a methylace histonu H3 na lyzinu K9 v prvojádrech prasečích zygot. Rozdílná intenzita signálu acetylovaného (fialově; H3K9ac) a methylovaného (zeleně; H3K9me2/3) histonu H3 na lyzinu K9. RES: resveratrol, hvězdička: samčí prvojádro.

5.2 Efekt resveratrolu na metylaci histonu H3 v prvojádrech prasečích zygot

Cílem experimentu bylo ovlivnit histonový kód ve prospěch methylace histonu pomocí aktivátoru sirtuinu, resveratrolu. Pro tento účel bylo využito imunofluorescenčního barvení methylovaného histonu H3 na lyzinu K9.

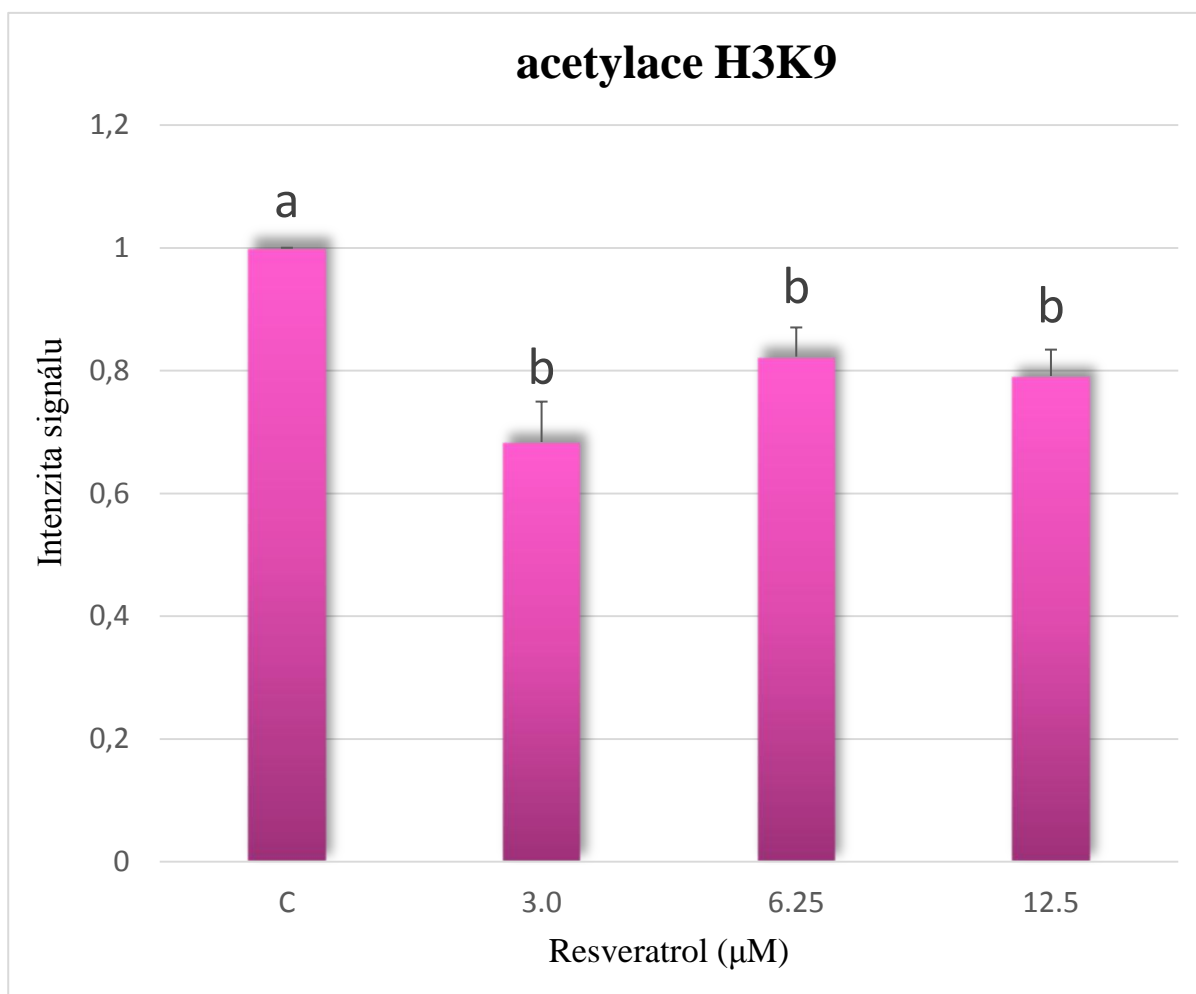
Přídavkem resveratrolu byla ovlivněna intenzita methylace histonu H3 na lyzinu K9 (H3K9me_{2/3}) u prasečích zygot, kde došlo ke statisticky signifikantnímu nárůstu methylovaného histonu H3 na K9, oproti kontrolní skupině. Sledovaný fenomén v prvojádrech je patrný z obrázku 1. Nejvyšší intenzity signálu H3K9me_{2/3} bylo dosaženo při koncentraci resveratrolu 3,0 μ M a 12,5 μ M, kdy došlo k nárůstu intenzity signálu o 37 a 34 %. Rozdíly byly statisticky významné ($P \leq 0,05$), viz obrázek 2. Ke statisticky signifikantnímu rozdílu nedošlo v rámci jednotlivých pokusných skupin koncentrací resveratrolu 3,06 μ M, 6,25 μ M a 12,5 μ M.



Obrázek 2: Kvantifikace H3K9me2/3 histonu v prasečí zygotě. Na ose y je znázorněna relativní intenzita signálu methylovaného histonu H3 na lyzinu K9. Na ose x je znázorněna koncentrace resveratrolu v μM . ^{a,b}Statisticky významné rozdíly ($P < 0,05$). H3K9me2/3: di-/tri-methylovaný histon H3 na lyzinu K9; C: kontrolní skupina.

5.3 Efekt resveratrolu na acetylaci histonu H3 v prvojádrech prasečích zygot

Přídavkem resveratrolu byla ovlivněna intenzita acetylace histonu H3 na lyzinu K9 (H3K9ac) u prasečích zygot, kde došlo ke statisticky signifikantnímu poklesu acetylovaného histonu H3 na K9, oproti kontrolní skupině. Sledovaný fenomén v prvojádrech je patrný z obrázku 1. Nejnižší intenzity signálu H3K9ac bylo dosaženo při koncentraci resveratrolu 3,0 μM a 12,5 μM , kdy došlo k poklesu intenzity signálu o 32 a 21 %. Rozdíly byly statisticky významné ($P \leq 0,05$), viz obrázek 3. Ke statisticky signifikantnímu rozdílu nedošlo v rámci jednotlivých pokusných skupin koncentrací resveratrolu 3,06 μM , 6,25 μM a 12,5 μM .

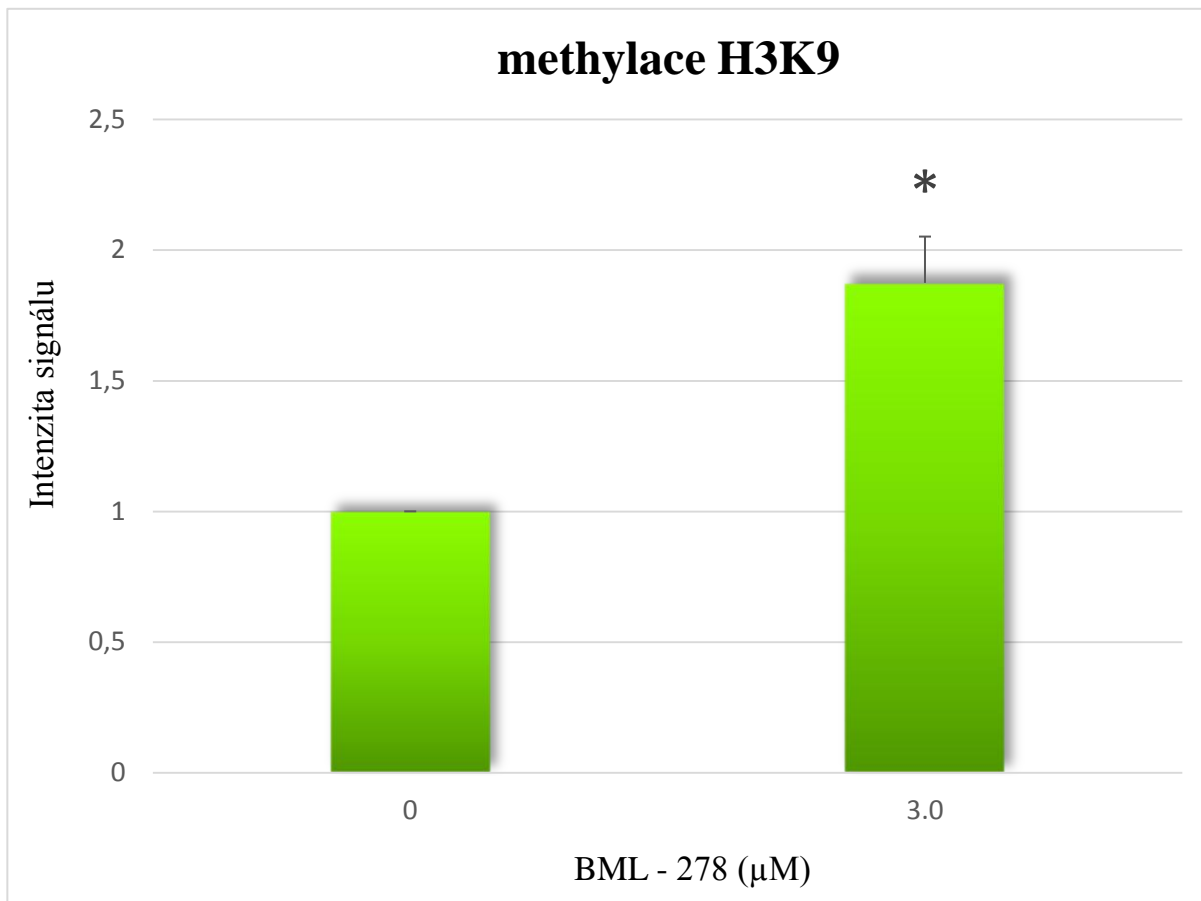


Obrázek 3: Kvantifikace acetylovaného histonu v prasečí zygote. Na ose y je znázorněna relativní intenzita signálu acetylovaného histonu H3 na lyzinu K9. Na ose x je znázorněna koncentrace resveratrolu v μM , neselektivního aktivátoru sirtuinu. ^{a,b}Statisticky významné rozdíly ($P < 0,05$). H3K9ac: acetylovaný histon H3 na lyzinu K9; C: kontrolní skupina.

5.4 Efekt BML-278 na metylaci histonu H3 v prvojádrech prasečích zygot

Přídavkem selektivního SIRT1 aktivátoru BML-278 byl potvrzen vliv aktivace SIRT1 na metylaci histonu H3 na lyzinu K9, kdy přídavkem BML-278 byla intenzita methylace signifikantně ovlivněna. Po přidání BML-278 o koncentraci 3,0 μM bylo dosaženo vyšší methylace H3K9me2/3 u prasečích zygot, kdy došlo k nárůstu intenzity signálu o 87 % oproti kontrolní skupině. Rozdíly byly statisticky významné ($P \leq 0,05$), viz obrázek 4.

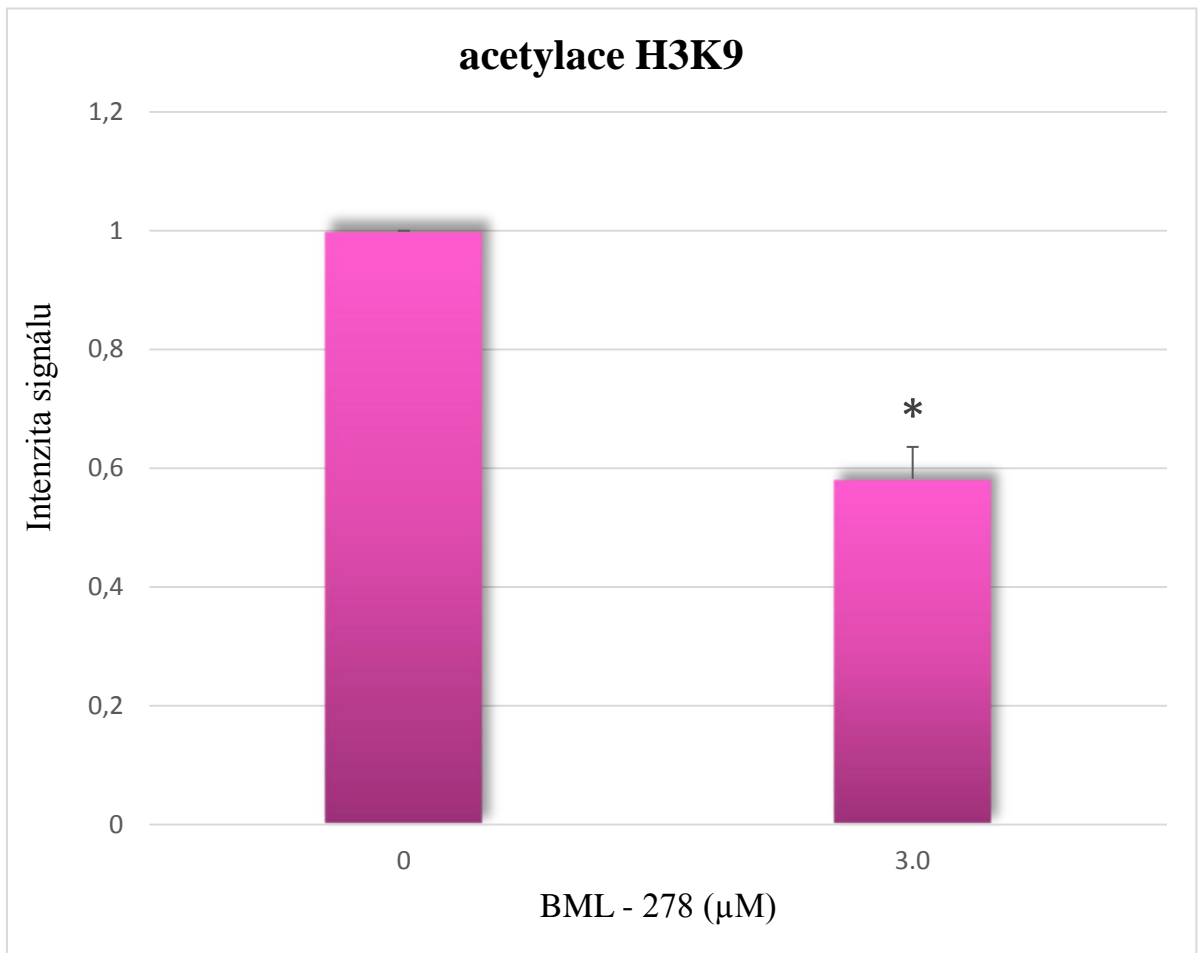
Z výsledků získaných a zanesených do grafu je patrné, že intenzita signálu methylovaného histonu H3 na lyzinu K9 se výrazněji zvýšila po přídavku selektivního SIRT1 aktivátoru BML-278 v porovnání s intenzitou signálu methylovaného histonu H3 na lyzinu K9 po přídavku aktivátoru resveratrolu, viz obrázek 2 a 4.



Obrázek 4: Kvantifikace intenzity signálu methylovaného histonu v prasečí zygote při použití přídatku BML-278. Na ose y je znázorněna relativní intenzita signálu methylovaného histonu H3 na lyzinu K9. Na ose x je znázorněna koncentrace BML-278 v μM, selektivního aktivátoru SIRT1. *Statisticky významný rozdíl s kontrolní skupinou ($P < 0,05$).

5.5 Efekt BML-278 na acetylaci histonu H3 v prvojádrech prasečích zygot

Přídavkem selektivního SIRT1 aktivátoru BML-278 byl potvrzen vliv aktivace SIRT1 na acetylaci histonu H3 na lyzinu K9. Po přidání BML-278 o koncentraci 3,0 μM došlo ke snížení acetylace histonu H3 na lyzinu K9, kdy pokles intenzity signálu oproti kontrolní skupině činil 42 %. Rozdíly byly statisticky významné ($P \leq 0,05$), viz obrázek 5.



Obrázek 5: Kvantifikace intenzity signálu acetylovaného histonu v prasečí zygote při použití přídatku BML-278. Na ose y je znázorněna relativní intenzita signálu acetylovaného histonu H3 na lyzinu K9. Na ose x je znázorněna koncentrace BML-278 v μM , selektivního aktivátoru SIRT1. *Statisticky významný rozdíl s kontrolní skupinou ($P < 0,05$).

5.6 Efekt BML-278 a resveratrolu na embryonální vývoj prasete

Po přidavku aktivátorů sirtuinů nebyly nalezeny významné rozdíly mezi kontrolou, procentem penetrovaných oocytů, procentem polyspermií a procentem rýhujících se zygot. Z výsledků je patrné, že přidavkem resveratrolu či BML nebyl signifikantně ovlivněn žádný ze sledovaných ukazatelů v tabulce 2.

Skupiny	% ± S. E. M.				
	Kontrola	Resveratrol 3 μm	Resveratrol 6,25 μm	Resveratrol 12,5 μm	BML 3 μm
% penetrovaných oocytů	49,89 ± 4,60 ^a	32,46 ± 9,50 ^a	52,58 ± 13,04 ^a	57,07 ± 10,83 ^a	51,29 ± 11,88 ^a
% polyspermie	24,81 ± 4,20 ^A	38,19 ± 19,12 ^A	20,07 ± 7,38 ^A	22,99 ± 6,74 ^A	19,51 ± 8,10 ^A
% rýhování	16,92 ± 2,41 ¹	11,42 ± 5,07 ¹	12,78 ± 4,59 ¹	6,51 ± 2,76 ¹	15,12 ± 5,05 ¹

Tabulka 2: Efekt aktivátorů sirtuinů na procento penetrovaných oocytů, procento polyspermií a procento rýhujících se zygot. ^{A,a,1}: Statisticky významné rozdíly (P<0,05).

6. Diskuze

V jádře každé buňky je uložena genetická informace jedince, zapsaná do struktury deoxyribonukleové kyseliny. Tato jaderná DNA je spolu s histony a proteiny nehistonové povahy základem chromatinu. Během buněčného dělení je chromatin složitě uspořádán do struktury chromosomů, které byly poprvé uceleně popsány německým vědcem Waltherem Flemmingem (shrnutí v Trojer *et* Reinberg, 2007). K dynamickým proměnám struktury chromatinu v průběhu vývoje jedince dochází prostřednictvím souhry různých enzymů, z nichž nejznámější jsou HDACs a HATs (shrnutí v Bosch-Presegué *et* Vaquero, 2015). Uspořádání chromatinu do specifické konformace je vypovídajícím znakem jeho inaktivní či aktivní formy. Tyto dvě formy chromatinu, aktivní euchromatin a inaktivní heterochromatin, byly poprvé pojmenovány v roce 1928 (Heitz, 1928).

Tato diplomová práce je zaměřena na epigenetické procesy doprovázející utváření heterochromatinu, s jehož formací jsou spojené histondeacetylázy, zvané sirtuiny. Aktivita SIRT1, studovaná v této diplomové práci, je uváděna v souvislosti s oběma typy později objeveného heterochromatinového uspořádání: fakultativního a konstitutivního heterochromatinu (shrnutí v Bosch-Presegué *et* Vaquero, 2011). Znakem konstitutivního heterochromatinu jsou histonové modifikace H3K9me3 a H3K27me1 (Schotta *et al.*, 2004). Konstitutivní heterochromatin je stabilní uspořádání chromatinu neobsahující žádné geny. Tento kondenzovaný heterochromatin je běžný v centromerové a telomerové oblasti chromosomu. Naproti tomu fakultativní heterochromatin je reverzibilní forma, kdy oblasti tohoto uspořádání chromatinu mohou v jedné buňce znamenat inaktivní konformaci a v jiné buňce konformaci aktivní. Příkladem fakultativního chromatinu je jeden ze dvou X chromosomů u samic savců, jehož inaktivace začíná v časném embryonálním vývoji (shrnutí v Plopper *et al.*, 2013).

Epigenetické procesy methylace DNA a histonové modifikace jsou významnými regulátory struktury chromatinu a genové exprese. Jejich důležitou rolí je již zmíněná inaktivace X chromosomu nebo důležitý proces genového imprintingu, jehož podstatou je rozdílná exprese genu závisící na jeho paternálním či maternálním původu. V časném embryonálním vývoji dochází k dynamickým proměnám epigenetických procesů. Od okamžiku oplození až po splynutí prvojaderné zygoty byl u myši v samičím prvojádře detekován acetylovaný lyzin histonu H4, dále s transkripční inaktivitou spojené methylace histonu H3K9me2/3, H3K27me1, H4K20me3 a naopak s aktivací transkripce genů spojená

methylace H3K4. Naproti tomu při formaci samčího prvojádra byla zjištěna vysoká intenzita acetylace zapříčiněna výměnou protaminů za acetylované histony. Poté byla u samčího prvojádra detekována náhrada acetylových zbytků za methylové, což vede k výskytu H3K4me1, H3K9me1 a H3K27me (shrnutu v Shi *et Wu*, 2009).

V rámci řešení této diplomové práce byla v *in vitro* podmínkách u samčího a samičího prvojádra prasečí zygoty prokázána přítomnost asymetrie. Toto zjištění je v souladu s pozorováním u myšího a ovčího oocyty (Hou *et al.*, 2008), kdy byla ve shodě s naší studií prokázána vyšší intenzita acetylace histonů u samčího prvojádra oproti prvojádru samičímu. Příčinou nízké intenzity acetylace samičího prvojádra je větší koncentrace histondeacetyláz v tomto chromatinu (Gioia *et al.*, 2005). Podobně se v této studii shodoval výsledek s vyšší intenzitou H3K9me3 u samičího prvojádra. Stejných výsledků bylo dosaženo u myších zygot ve studii Ma *et al.* (2015), kde samčí prvojádru nevykazovalo žádný nebo pouze slabý signál H3K9me2. Tyto výsledky jsou ve shodě i s dalšími publikacemi zaměřených na regulaci H3K9me u myších zygot (Liu *et al.*, 2004; Van der Heijden *et al.*, 2005). Ve studii Huang *et al.* (2007) byla asymetrie prokázána u myších zygot kultivovaných *in vitro* i v *in vivo* podmínkách, kdy tato asymetrie mezi intenzitou H3K9me maternálního prvojádra a intenzitou H3K9me paternálního prvojádra byla u myší patrná do dvou-buněčného stádia embryonálního vývoje. Naproti tomu odlišné výsledky byly prokázány u prasat, kde ve studii Jeong *et al.*, (2007) byl H3K9me2/3 patrný u obou prvojader zygoty.

V případě di-methylace H3K9 je tato post-translační modifikace zapříčiněna působením jiného enzymu než je tomu při procesu tri-methylace tohoto histonu. H3K9me2 je výsledkem působení methyltransferázy G9A, zatímco H3K9me3 je katalyzována enzymem SUV39H1. Na H3K9me2/3 dochází k navázání HP1 jeho chromodoménou a utvoření uzavřené konformace chromatinu, heterochromatinu. Absence tohoto heterochromatinového markeru je důvodem procesu demethylace DNA, která nastává u samčího prvojádra krátce po oplození. Naopak u prvojádra samičího dochází k navázání chromodomény proteinu HP1 na H3K9me2/3, což má za následek udržení methylovaného DNA genomu samičího prvojádra zygoty. Tyto mechanismy zapříčiňující epigenetické remodelace v časném embryonálním vývoji byly prokázány u zygot myší.

Post-translační modifikace jaderných histonů, uspořádaných v histonový kód, úzce souvisí s DNA methylací. V několika studiích byla popsána odlišnost těchto epigenetických remodelací v časném embryonálním vývoji v rámci různých druhů zvířat. Ve studii Park *et al.*

(2007) byla u zygot skotu zjištěna DNA demethylace výhradně samčího prvojádra. Toto publikované tvrzení však není ve shodě s výsledky studie Beaujean *et al.* (2004) u zygot ovcí. Rozdíly jsou patrné i u publikací týkající se této problematiky u prasat. Zatímco ve studiích Dean *et al.* (2001), Gioia *et al.* (2005) a Fulka *et al.* (2006) bylo prokázáno demethylované DNA samčího prvojádra, ve studii Jeong *et al.* (2007) nebyla tato aktivní demethylace DNA samčího prvojádra prasete zjištěna. Demethylace DNA samčího prvojádra prasečí zygoty je proto dána do souvislosti s kvalitou zrání oocytů, kdy se tato kvalita odvíjí od specifických podmínek při *in vivo* či *in vitro* zrání (Gioia *et al.*, 2005).

Při řešení této diplomové práce byl zkoumán vliv NADP⁺-dependentních histon deacetyláz, sirtuinů na formaci prvojader prasečí zygoty. Účinek vybraného sirtuinu SIRT1 byl aktivován přidavkem resveratrolu. Mnoho studií je zaměřeno na funkci SIRT1, jakožto klíčového regulátoru obrany buňky proti stresu. Např. ve studii Luo *et al.* (2001) bylo u SIRT1 zjištěno, že v reakci na poškození DNA a oxidativní stres dochází k potlačení buněčné apoptózy závislé na proteinu p53. V další studii byla zjištěna odolnost vůči oxidativnímu stresu prostřednictvím SIRT1 v důsledku ovlivnění funkce proteinu FOXO3 (Brunet *et al.*, 2004). Podobně jako v této diplomové práci byl v několika studiích zkoumán význam resveratrolu spojeného s aktivací SIRT1. Např. u skotu ve studii Kordowitzki *et al.* (2015) byl u oocytů zkoumán vliv SIRT1 na kvalitu zrání oocytů a následný časný embryonální vývoj, kde po přidání 1 μm resveratrolu došlo k pozitivnímu ovlivnění vývojové schopnosti oocytů. Také ve studii Wang *et al.* (2014) u oocytů skotu byl přidavkem resveratrolu prokázán pozitivní efekt na zrání oocyty, formaci blastocysty a zvýšení průměrného počtu buněk blastocysty. U prasat bylo stejných výsledků dosaženo ve studii Lee *et al.* (2010), kde přidavek resveratrolu (0,5 μm) působil pozitivně na formaci a kvalitu blastocysty. V později publikovaných studiích Kwak *et al.* (2012), Itami *et al.* (2015) byl prokázán pozitivní efekt resveratrolu jak na vývojový potenciál oocyty, tak na formaci blastocysty prasete.

Zatímco příznivé účinky byly potvrzeny u nižších koncentrací resveratrolu, vlivem vysokých koncentrací resveratrolu ($\geq 10 \mu\text{m}$) dochází k nepříznivému vlivu na zrání oocytů a následný embryonální vývoj. U skotu byl po přidavku 20 a 40 μm resveratrolu zjištěn negativní efekt na zrání oocytů, kde došlo k výraznému snížení počtu oocytů, které došly do stádia MII (Pocar *et al.*, 2004). U prasat ve studii Kwak *et al.* (2012) došlo obdobně po přidání vysoké koncentrace resveratrolu (25 μm) do kultivačního média k toxickému efektu na vyvíjející se embrya.

7. Závěr

Projev genetické výbavy jedince není založen pouze v prosté sekvenci nukleotidů DNA. Neméně důležitým regulátorem genové exprese jsou epigenetické změny, probíhající nejen na šroubovici DNA, ale i na jaderných histonech. Epigenetické procesy jsou jedním z nejsložitějších dějů v buňce a pro dokonalejší porozumění mechanismů epigenetiky modifikujících funkci genů, je třeba jejich dalšího studování.

Do procesu regulace histonového kódu jsou zapojeny enzymy, z nichž studované histonové deacetylázy mohou tento histonový kód významným způsobem ovlivnit. A proto aktivace těchto histonových deacetyláz prostřednictvím jejich aktivátoru je jedním z významných způsobů regulace histonového kódu v časném embryonálním vývoji.

Cílem práce bylo potvrdit hypotézu, že formace prvojader v zygotě je regulována post-translačními modifikacemi histonů a tento histonový kód je ovlivňován aktivitou NADP⁺-dependentních histon deacetyláz, sirtuinů. Předkládaná diplomová práce hypotézu potvrdila.

Z výsledků práce vyplynulo, že byla u prasat potvrzena asymetrie mezi prvojádry zygoty. Po přidavku resveratrolu a BML-278, aktivátorů sirtuinů, byl změněn histonový kód ve prospěch deacetylace sledovaného histonu H3K9, následkem čehož došlo ke zvýšení jeho methylace.

V mnoha studiích byl popsán pozitivní efekt SIRT1 nejenom na zrání oocytů, ale i embryonální vývoj až do stádia blastocytu. Signální kaskáda SIRT1 v časném embryonálním vývoji je však nedostatečně prostudována. Další studium SIRT1 jakožto významného regulátoru epigenetických procesů a jeho zapojení do dynamiky histonového kódu je příležitostí pro zlepšování *in vitro* produkce embryí nejen v asistované reprodukci hospodářských zvířat ale i člověka.

8. Seznam literatury

Abeydeera, L. R., Wang, W. H., Cantley, T. C., Rieke, A., Prather, R. S., Day, B. N. 1998. Presence of epidermal growth factor during in vitro maturation of pig oocytes and embryo culture can modulate blastocyst development after in vitro fertilization. *Molecular Reproduction and Development*. 51 (4). 395 – 401.

Abrieu, A., Dorée, M., Fisher, D. 2001. The interplay between cyclin-B-Cdc2 kinase (MPF) and MAP kinase during maturation of oocytes. *Journal of Cell Science*. 114 (2). 257 – 267.

Adenot, P. G., Mercier, Y., Renard, J. P., Thompson, E. M. 1997. Differential H4 acetylation of paternal and maternal chromatin precedes DNA replication and differential transcriptional activity in pronuclei of 1-cell mouse embryos. *Development*. 124 (22). 4615 – 4625.

Albani, D., Forloni, G. 2014. The catalytic activity of sirtuins in physiology and disease from the epigenetic point of view. *Epigenetics of Degenerative Diseases*. 1 (1). 32 – 39.

Anderson, J. E., Matteri, R. L., Abeydeera, L. R., Day, B. N., Prather, R. S. 2001. Degradation of maternal Cdc25c during the maternal to zygotic transition is dependent upon embryonic transcription. *Molecular Reproduction and Development*. 60 (2). 181 – 188.

Bahat, A., Eisenbach, M. 2010. Human sperm chemotaxis is mediated by phospholipase C and inositol trisphosphate receptor Ca^{2+} channel. *Biology of Reproduction*. 82 (3). 606 – 616.

Bambang, K. N., Karasu, T., Gebeh, A., Taylor A. H., Marczyklo, T. H., Lam, P., Willets, J. M., Konje, J. C. 2010. From Fertilisation to Implantation in Mammalian Pregnancy - Modulation of Early Human Reproduction by the Endocannabinoid System. *Pharmaceuticals*. 3 (9). 2910 – 2929.

Bannister, A. J., Kouzarides, T. 2011. Regulation of chromatin by histone modifications. *Cell Research*. 21 (3). 381 – 395.

Bazer, F. W., Johnson, G. A. 2014. Pig blastocyst-uterine interactions. *Differentiation*. 87 (1 – 2). 52 – 65.

Beaujean N, Hartshorne G, Cavilla J, Taylor J, Gardner J, Wilmut I, Meehan R, Young L. 2004. Non-conservation of mammalian preimplantation methylation dynamics. *Current Biology*. 14 (7). 266 – 267.

Bedford, J. M. 2008. Puzzles of mammalian fertilization - and beyond. *The International Journal of Developmental Biology*. 52 (5 – 6). 415 – 426.

Biel, M., Wascholowski, V., Giannis, A. 2005. Epigenetics - An epicenter of gene regulation: Histones and histone-modifying enzymes. *Angewandte Chemie International Edition*. 44 (21). 3186 – 3216.

Bird, A. P. 1986. CpG-rich islands and the function of DNA methylation. *Nature*. 321 (6067). 209 – 213.

Biswas, M., Voltz, K., Smith, J. C., Langowski, J. 2011. Role of histone tails in structural stability of the nucleosome. *PLOS Computational Biology*. 7 (12). 1 – 12.

Bogliotti, Y. S., Ross, P. J. 2015. Molecular mechanisms of transcriptional and chromatin remodeling around embryonic genome activation. *Animal Reproduction*. 12 (1). 52 – 61.

Bonner, W. M., Redon, Ch. E., Dickey, J. S., Nakamura, A. J., Sedelnikova, O. A., Solier, S., Pommier, Y. 2008. γ H2AX and cancer. *Nature Reviews Cancer*. 8 (12). 957 – 967.

Bosch-Presegué, L., Vaquero, A. 2011. The dual role of sirtuins in cancer. *Genes Cancer*. 2 (6). 648 – 662.

Bosch-Presegué, L., Vaquero, A. 2015. Sirtuin-dependent epigenetic regulation in the maintenance of genome integrity. *Febs Journal*. 282 (9). 1745 – 1767.

Bottomley, M. J. 2004. Structures of protein domains that create or recognize histone modifications. *EMBO Reports*. 5 (5). 464 – 469.

Brunet, A., Sweeney, L. B., Sturgill, J. F., Chua, K. F., Greer, P. L., Lin, Y., Tran, H., Ross, S. E., Mostoslavsky, R., Cohen, H. Y., Hu, L. S., Cheng, H. L., Jedrychowski, M. P., Gygi, S. P., Sinclair, D. A., Alt, F. W., Greenberg, M. E. 2004. Stress-dependent regulation of FOXO transcription factors by the SIRT1 deacetylase. *Science*. 303 (5666). 2011 – 2015.

Brüssow, K. P., Rátky, J., Rodriguez-Martinez, H. 2008. Fertilization and early embryonic development in the porcine fallopian tube. *Reproduction in Domestic Animals*. 43. 245 – 251.

Cantó, C., Auwerx, J. 2012. Targeting SIRT1 to improve metabolism: all you need is NAD⁺? *Pharmacological Reviews*. 64 (1). 166 – 187.

Cooper, G. M. 2000. *The Cell: A Molecular Approach*. 2nd ed. Sinauer Associates. Sunderland. p. 689. ISBN: 0878931066. Dostupný také z: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK9839>>

Coy, P., Garcia-Vazquez, F. A., Visconti, P. E., Aviles, M. 2012. Roles of the oviduct in mammalian fertilization. *Reproduction*. 144 (6). 649 – 660.

Daitoku, H., Sakamaki, J., Fukamizu, A. 2011. Regulation of FoxO transcription factors by acetylation and protein-protein interactions. *Biochimica et Biophysica Acta*. 1813 (11). 1954 – 1960.

De Ruijter, A. J., Van Gennip, A. H., Caron, H. N., Kemp, S., Van Kuilenburg, A. B. 2003. Histone deacetylases (HDACs): characterization of the classical HDAC family. *Biochemical Journal*. 370. 737 – 749.

Dean, W., Santos, F., Stojkovic, M., Zakhartchenko, V., Walter, J., Wolf, E., Reik, W. 2001. Conservation of methylation reprogramming in mammalian development: Aberrant reprogramming in cloned embryos. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 98 (24). 13734 – 13738.

Deng, Ch. 2009. SIRT1, Is It a Tumor Promoter or Tumor Suppressor? *International Journal of Biological Sciences*. 5 (2). 147–152.

Di Emidio, G., Falone, S., Vitti, M., D'Alessandro, A. M., Vento, M., Di Pietro C., Amicarelli, F., Tatone, C. 2014. SIRT1 signalling protects mouse oocytes against oxidative stress and is deregulated during aging. *Human Reproduction*. 29 (9). 2006 – 2017.

Dokmanovic, M., Clarke, C., Marks, P. A. 2007. Histone deacetylase inhibitors: Overview and perspectives. *Molecular Cancer Research*. 5 (10). 981 – 989.

Duranthon, V., Watson, A. J., Lonergan, P. 2008. Preimplantation embryo programming: transcription, epigenetics, and culture environment. *Reproduction*. 135 (2). 141 – 150.

Escobar, J., Pereda, J., Arduini, A., Sandoval, J., Sabater, L., Aparisi, L., López-Rodas, G., Sastre, J. 2010. Protein phosphatases and chromatin modifying complexes in the inflammatory cascade in acute pancreatitis. *World Journal of Gastrointestinal Pharmacology Therapeutics*. 1 (3). 75 – 80.

Fan, H. Y., Huo, L. J., Meng, X. Q., Zhong, Z. S., Hou, Y., Chen, D. Y., Sun, Q. Y. 2003. Involvement of calcium/calmodulin-dependent protein kinase II (CaMKII) in meiotic maturation and activation of pig oocytes. *Biology of Reproduction*. 69 (5). 1552 – 1564.

Fan, H. Y., Sun, Q. Y. 2004. Involvement of mitogen-activated protein kinase cascade during oocyte maturation and fertilization in mammals. *Biology of Reproduction*. 70 (3). 535 – 547.

Feil, R. 2009. Epigenetic asymmetry in the zygote and mammalian development. *The International Journal of Developmental Biology*. 53 (2-3). 191 – 201.

Ferreira, E. M., Vireque, A. A., Adona, P. R., Meirelles, F. V., Ferriani, R. A., Navarro, P. A. A. S. 2009. Cytoplasmic maturation of bovine oocytes: Structural and biochemical modifications and acquisition of developmental competence. *Theriogenology*. 71 (5). 836 – 848.

Fouk, R. A. 2001. From fertilization to implantation. *Early Pregnancy*. 5 (1). 61 – 62.

Fulka, J., Fulka, H., Slavik, T., Okada, K., Fulka, J. Jr. 2006. DNA methylation pattern in pig in vivo produced embryos. *Histochemistry and Cell Biology*. 126 (2). 213 – 217.

Gilbert, S. F. 2000. *Developmental Biology*. 6th ed. Sinauer Associates. p. 709. ISBN: 0878932437.

Gioia, L., Barboni, B., Turriani, M., Capacchietti, G., Pistilli, M.G., Berardinelli, P., Mattioli, M. 2005. The capability of reprogramming the male chromatin after fertilization is dependent on the quality of oocyte maturation. *Reproduction*. 130 (1). 29 – 39.

Gomes, P., Outeiro, T. F., Cavadas, C. 2015. Emerging Role of Sirtuin 2 in the Regulation of Mammalian Metabolism. *Trends in Pharmacological Sciences*. 36 (11). 756 – 768.

Grieco, D., Avvedimento, E. V., Gottesman, M. E. 1994. A role for cAMP-dependent protein kinase in early embryonic divisions. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 91 (21). 9896 – 9900.

Gross, S. D., Schwab, M. S., Taieb, F. E., Lewellyn, A. L., Qian, Y. W., Maller, J. L. 2000. The critical role of the MAP kinase pathway in meiosis II in *Xenopus* oocytes is mediated by p90(Rsk). *Current Biology*. 10 (8). 430 – 438.

Guidobaldi, H. A., Teves, M. E., Uñates, D. R., Anastasia, A., Giojalas, L. C. 2008. Progesterone from the Cumulus Cells Is the Sperm Chemoattractant Secreted by the Rabbit Oocyte Cumulus Complex. *PLoS One*. 3 (8). 3040.

Guo, F., Li, X., Liang, D., Li, T., Zhu, P., Guo, H., Wu, X., Wen, L., Gu, T. P., Hu, B., Walsh, C. P., Li, J., Tang, F., Xu, G. L. 2014. Active and Passive Demethylation of Male and Female Pronuclear DNA in the Mammalian Zygote. *Cell Stem Cell*. 15 (4). 447 – 458.

Haaf, T. 2006. Methylation dynamics in the early mammalian embryo: Implications of genome reprogramming defects for development. *Current Topics in Microbiology and Immunology*. 310. 13 – 22.

Han, S. J., Conti, M. 2006. New pathways from PKA to the Cdc2/cyclin B complex in oocytes: Wee1B as a potential PKA substrate. *Cell Cycle*. 5 (3). 227 – 231.

Heitz, E. 1928. Das Heterochromatin der Moose. *Jahrbücher für Wissenschaftliche Botanik*. 69. 762 – 818.

Ho, H. C., Suarez, S. S. 2001. Hyperactivation of mammalian spermatozoa: function and regulation. *Reproduction*. 122 (4). 519 – 526.

Hou, J., Liu, L., Zhang, J., Cui, X. H., Yan, F. X., Guan, H., Chen, Y. F., An, X. R. 2008. Epigenetic modification of histone 3 at lysine 9 in sheep zygotes and its relationship with DNA methylation. *BMC Developmental Biology*. 8. 1 – 9.

Houtkooper, R. H., Pirinen, E., Auwerx, J. 2012. Sirtuins as regulators of metabolism and healthspan. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*. 13 (4). 225 – 238.

Huang, J. C., Lei, Z. L., Shi, L. H., Miao, Y. L., Yang, J. W., Ouyang, Y. C., Sun, Q. Y., Chen, D. Y. 2007. Comparison of histone modifications in in vivo and in vitro fertilization mouse embryos. *Biochemical and Biophysical Research Communications*. 354 (1). 77 – 83.

Hunter, M. G. 2000. Oocyte maturation and ovum quality in pigs. *Reviews of Reproduction*. 5 (2). 122 – 130.

Hyttel, P., Laurincik, J., Viuff, D., Fair, T., Zakhartchenko, V., Rosenkranz, C., Avery, B., Rath, D., Niemann, H., Thomsen, P. D., Schellander, K., Callesen, H., Wolf, E., Ochs, R. L., Greve, T. 2000. Activation of ribosomal RNA genes in preimplantation cattle and swine embryos. *Animal Reproduction Science*. 60. 49 – 60.

Chadwick, B. P., Willard, H. F. 2003. Chromatin of the Barr body: histone and non-histone proteins associated with or excluded from the inactive X chromosome. *Human Molecular Genetics*. 12 (17). 2167 – 2178.

Chan, C. P., Gupta, S., Mark, G. E. 1999. Identification of linear surface epitopes on the guinea pig sperm membrane protein PH-20. *Life Science*. 64 (22). 1989 – 2000.

Chang, H. Y., Minahan, K., Merriman, J. A., Jones, K. T. 2009. Calmodulin-dependent protein kinase gamma 3 (CamKII gamma 3) mediates the cell cycle resumption of metaphase II eggs in mouse. *Development*. 136 (24). 4077 – 4081.

Chen, H., Kui, C., Chan, H. C. 2013. Ca (2⁺) mobilization in cumulus cells: role in oocyte maturation and acrosome reaction. *Cell Calcium*. 53 (1). 68 – 75.

Chen, L., Li, Z., Zwolinska, A. K., Smith, M. A., Cross, B., Koomen, J., Yuan, Z. M., Jenuwein, T., Marine, J. C., Wright, K. L., Chen, J. 2010. MDM2 recruitment of lysine methyltransferases regulates p53 transcriptional output. *The EMBO Journal*. 29 (15). 2538 – 2552.

Itami, N., Shirasuna, K., Kuwayama, T., Iwata, H. 2015. Resveratrol improves the quality of pig oocytes derived from early antral follicles through sirtuin 1 activation. *Theriogenology*. 83 (8). 1360 – 1367.

Ito, J., Kashiwazaki, N. 2012. Molecular mechanism of fertilization in the pig. *Animal Science Journal*. 83 (10). 669 – 682.

Jeong, Y. S., Yeo, S., Park, J. S., Lee, K. K., Kang, Y. K. 2007. Gradual development of a genome-wide H3-K9 trimethylation pattern in paternally derived pig pronucleus. *Developmental Dynamics*. 236 (6). 1509 – 1516.

Kanka, J. 2003. Gene expression and chromatin structure in the pre-implantation embryo. *Developmental Dynamics*. 232 (1). 3 – 19.

Kawamura, Y., Uchijima, Y., Horike, N., Tonami, K., Nishiyama, K., Amano, T., Asano, T., Kurihara, Y., Kurihara, H. 2010. Sirt3 protects in vitro-fertilized mouse preimplantation embryos against oxidative stress-induced p53-mediated developmental arrest. *The Journal of Clinical Investigation*. 120 (8). 2817 – 2828.

Kishimoto, T. 2003. Cell-cycle control during meiotic maturation. *Current Opinion in Cell Biology*. 15 (6). 654 – 663.

Kordowitzki, P., Bernal, S. M., Herrmann, D., Aldag, P., Lucas-Hahn, A., Niemann, H. 2015. Effects of resveratrol supplementation during in vitro maturation and in vitro fertilization on developmental competence of bovine oocytes. *Animal Reproduction*. 12 (3). 738.

Kwak, S. S., Hyun, S. H. 2012. The Effects of Resveratrol on Oocyte Maturation and Preimplantation Embryo Development. *Journal of Embryo Transfer*. 27 (2). 71 – 80.

Kwak, S. S., Cheong, S. A., Yoon, J. D., Jeon, Y., Hyun, S. H. 2012. Expression patterns of sirtuin genes in porcine preimplantation embryos and effects of sirtuin inhibitors on in vitro embryonic development after parthenogenetic activation and in vitro fertilization. *Theriogenology*. 78 (7). 1597 – 1610.

Lagger, G., O'Carroll, D., Rembold, M., Khier, H., Tischler, J., Weitzer, G., Schuettengruber, B., Hauser, C., Brunmeir, R., Jenuwein, T., Seiser, C. 2002. Essential function of histone deacetylase 1 in proliferation control and CDK inhibitor repression. *The EMBO Journal*. 21 (11). 2672 – 2681.

Langley, A. R., Smith, J. C., Stemple, D. L., Harvey, S. A. 2014. New insights into the maternal to zygotic transition. *Development*. 141 (20). 3834 – 3841.

Laurincik, J., Rath, D., Niemann, H. 1994. Differences in pronucleus formation and first cleavage following in vitro fertilization between pig oocytes matured in vivo and in vitro. *Journal of Reproduction and Fertility*. 102 (2). 277 – 284.

Lee, K., Wang, C., Chaille, J. M., Machaty, Z. 2010. Effect of resveratrol on the development of porcine embryos produced in vitro. *Journal of Reproduction and Development*. 56 (3). 330 – 335.

Lee, M. T., Bonneau, A. R., Giraldez, A. J. 2014. Zygotic genome activation during the maternal-to-zygotic transition. *Annual Review of Cell and Developmental Biology*. 30. 581 – 613.

Lefevre, B. 2008. The nucleolus of the maternal gamete is essential for life. *BioEssays*. 30 (7). 613 – 616.

Lepikhov, K., Walter, J. 2004. Differential dynamics of histone H3 methylation at positions K4 and K9 in the mouse zygote. *BMC Developmental Biology*. 4. 12.

Li, W. Y., Zhang, J. K., Yu, W. D., Liu, G. S., Chen, Q. G. 2003. Expression of stage-specific genes during zygotic gene activation in preimplantation mouse embryos. *Zoological Science*. 20 (11). 1389 – 1393.

Liang, C. G., Su, Y. Q., Fan, H. Y., Schatten, H., Sun, Q. Y. 2007. Mechanisms regulating oocyte meiotic resumption: roles of mitogen-activated protein kinase. *Molecular endocrinology*. 21 (9). 2037 – 2055.

Liu, H., Kim, J. M., Aoki, F. 2004. Regulation of histone H3 lysine 9 methylation in oocytes and early pre-implantation embryos. *Development*. 131 (10). 2269 – 2280.

Liu, L., Kong, N., Xia, G., Zhang, M. 2013. Molecular control of oocyte meiotic arrest and resumption. *Reproduction Fertility and Development*. 25 (3). 463 – 471.

Liu, M. 2011. The biology and dynamics of mammalian cortical granules. *Reproductive Biology and Endocrinology*. 9. 1 – 17.

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.

Luo, J., Nikolaev, A. Y., Imai, S., Chen, D., Su, F., Shiloh, A., Guarente, L., Gu, W. 2001. Negative control of p53 by Sir2alpha promotes cell survival under stress. *Cell*. 107 (2). 137 – 148.

Ma, J. Y., Zhang, T., Shen, W., Schatten, H., Sun, Q. Y. 2014. Molecules and mechanisms controlling the active DNA demethylation of the mammalian zygotic genome. *Protein and Cell*. 5 (11). 827 – 836.

Ma, X. S., Chao, S. B., Huang, X. J., Lin, F., Qin, L., Wang, X. G., Meng T. G., Zhu, C. C., Schatten, H., Liu, H. L., Sun, Q. Y. 2015. The Dynamics and Regulatory Mechanism of Pronuclear H3k9me2 Asymmetry in Mouse Zygotes. *Scientific Reports*. 5. 1 – 9.

Maddox-Hyttel, P., Svarcova, O., Laurincik, J. 2007. Ribosomal RNA and nucleolar proteins from the oocyte are to some degree used for embryonic nucleolar formation in cattle and pig. *Theriogenology*. 68. S63 – S70.

Martínez-Redondo, P., Vaquero, A. 2013. The Diversity of Histone Versus Nonhistone Sirtuin Substrates. *Genes Cancer*. 4 (3 – 4). 148 – 163.

McCord, R. A., Michishita, E., Hong, T., Berber, E., Boxer, L. D., Kusumoto, R., Guan, S., Shi, X., Gozani, O., Burlingame, A. L., Bohr, V. A., Chua, K. F. 2009. SIRT6 stabilizes DNA-dependent protein kinase at chromatin for DNA double-strand break repair. *Aging*. 1 (1). 109 – 121.

Meinecke, B., Janas, U., Podhajsky, E., Meinecke-Tillmann, S. 2001. Histone H1 and MAP kinase activities in bovine oocytes following protein synthesis inhibition. *Reproduction in Domestic Animals*. 36 (3 – 4). 183 – 188.

Milner, J. 2009. Cellular regulation of SIRT1. *Current Pharmaceutical Design*. 15 (1). 39 – 44.

Moore, L. D., Le, T., Fan, G. 2013. DNA methylation and its basic function. *Neuropsychopharmacology*. 38 (1). 23 – 38.

Morgan, H. D., Santos, F., Green, K., Dean, W., Reik, W. 2005. Epigenetic reprogramming in mammals. *Human Molecular Genetics*. 14. 47 – 58.

Motlik, J., Fulka, J. 1976. Breakdown of the germinal vesicle in pig oocytes in vivo and in vitro. *Journal of Experimental Zoology*. 198 (2). 155 – 162.

Nakazawa, Y., Shimada, A., Noguchi, J., Domeki, I., Kaneko, H., Kikuchi, K. 2002. Replacement of nuclear protein by histone in pig sperm nuclei during in vitro fertilization. *Reproduction*. 124 (4). 565 – 572.

Nixon, V. L., Levasseur, M., McDougall, A., Jones, K. T. 2002. Ca⁽²⁺⁾ oscillations promote APC/C-dependent cyclin B1 degradation during metaphase arrest and completion of meiosis in fertilizing mouse eggs. *Current Biology*. 12 (9). 746 – 50.

Oestrup, O., Hall, V., Petkov, S. G., Wolf, X. A., Hyldig, S., Hyttel, P. 2009. From zygote to implantation: morphological and molecular dynamics during embryo development in the pig. *Reproduction in Domestic Animals*. 44. 39 – 49.

Oh, J. S., Han, S. J., Conti, M. 2010. Wee1B, Myt1, and Cdc25 function in distinct compartments of the mouse oocyte to control meiotic resumption. *Journal of Cell Biology*. 188 (2). 199 – 207.

Olmos, Y., Brosens, J. J., Lam, E. W. 2011. Interplay between SIRT proteins and tumour suppressor transcription factors in chemotherapeutic resistance of cancer. *Drug Resistance Updates*. 14 (1). 35 – 44.

Palacios, J. A., Herranz, D., De Bonis, M. L., Velasco, S., Serrano, M., Blasco, M. A. 2010. SIRT1 contributes to telomere maintenance and augments global homologous recombination. *The Journal of Cell Biology*. 191 (7). 1299 – 1313.

Paredes, S., Villanova, L., Chua, K. F. 2014. Molecular Pathways: Emerging Roles of Mammalian Sirtuin SIRT7 in Cancer. *Clinical Cancer Research*. 20 (7). 1741 – 1746.

Park, J. S., Jeong, Y. S., Shin, S. T., Lee, K. K., Kang, Y. K. 2007. Dynamic DNA methylation reprogramming: active demethylation and immediate remethylation in the male pronucleus of bovine zygotes. *Developmental Dynamics*. 236 (9). 2523 – 2533.

Pillai, V. B., Sundaresan, N. R., Gupta, M. P. 2014. Regulation of Akt signaling by sirtuins: its implication in cardiac hypertrophy and aging. *Circulation Research*. 114 (2). 368 – 378.

Plopper, G., Sharp, D., Sikorski, E. 2013. *Lewin's cells*. 3rd ed. Jones and Bartlett Publishers. p. 1056. ISBN: 9781284029390.

Pocar, P., Augustin, R., Fischer, B. 2004. Constitutive expression of CYP1A1 in bovine cumulus oocyte-complexes in vitro: mechanisms and biological implications. *Endocrinology*. 145 (4). 1594 – 1601.

Redon, C. E., Nakamura, A. J., Zhang, Y. W., Ji, J. J., Bonner, W. M., Kinders, R. J., Parchment, R. E., Doroshow, J. H., Pommier, Y. 2010. Histone gammaH2AX and poly(ADP-ribose) as clinical pharmacodynamic biomarkers. *Clinical Cancer Research*. 16 (18). 4532 – 4542.

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. *The Journal of Biological Chemistry*. 273 (10). 5858 – 5868.

Rothschild, M. F., Ruvinsky, A. 2011. *The Genetics of the Pig*. 2nd ed. CABI. p. 520. ISBN: 1845937562.

Sadler, T. W. 2010. *Langmanova lékařská embryologie*. Praha. Grada. 432 s. ISBN: 9788024726403.

Santos, F., Peters, A. H., Otte, A. P., Reik, W., Dean, W. 2005. Dynamic chromatin modifications characterise the first cell cycle in mouse embryos. *Developmental Biology*. 280 (1). 225 – 236.

Sato, D., Itami, N., Tasaki, H., Takeo, S., Kuwayama, T., Iwata, H. 2014. Relationship between mitochondrial DNA copy number and SIRT1 expression in porcine oocytes. *Plos One*. 9 (4). 1 – 8.

Sato, E. 2015. Intraovarian control of selective follicular growth and induction of oocyte maturation in mammals. *Proceedings of the Japan Academy, Series B, Physical and Biological Sciences*. 91 (3). 76 – 91.

Sauve, A. A. 2009. Pharmaceutical Strategies for Activating Sirtuins. *Current Pharmaceutical Design*. 15 (1). 45 – 56.

Shaw, P., Doonan, J. 2005. The nucleolus - Playing by different rules? *Cell Cycle*. 4 (1). 102 – 105.

Shi, L., Wu, J. 2009. *Reproductive Biology and Endocrinology*. Epigenetic regulation in mammalian preimplantation embryo development. 7. 1 – 11.

Shimada, A., Kikuchi, K., Noguchi, J., Akama, K., Nakano, M., Kaneko, H. 2000. Protamine dissociation before decondensation of sperm nuclei during in vitro fertilization of pig oocytes. *Journal of Reproduction and Fertility*. 120 (2). 247 – 256.

Schotta, G., Lachner, M., Sarma, K., Ebert, A., Sengupta, R., Reuter, G., Reinberg, D., Jenuwein, T. 2004. A silencing pathway to induce H3-K9 and H4-K20 trimethylation at constitutive heterochromatin. *Genes & Development*. 18 (11). 1251 – 1262.

Schultz, R. M. 2002. The molecular foundations of the maternal to zygotic transition in the preimplantation embryo. *Human Reproduction Update*. 8 (4). 323 – 331.

Soeda, S., Yamada, K., Ohsugi, M. 2013. Inactivation of mitogen-activated protein kinase is neither necessary nor sufficient for the onset of pronuclear formation in mouse oocytes. *Genes to Cells*. 18 (10). 850 – 858.

Stocco, C., Telleria, C., Gibori, G. 2007. The molecular control of corpus luteum formation, function, and regression. *Endocrine Reviews*. 28 (1). 117 – 49.

Stojkovic, M., Motlik, J., Kolle, S., Zakhartchenko, V., Alberio, R., Sinowatz, F., Wolf, E. 1999. Cell-cycle control and oocyte maturation: Review of literature. *Reproduction in Domestic Animals*. 34 (3 – 4). 335 – 342.

Stokes, P. J., Abeydeera, L. R., Leese, H. J. 2005. Development of porcine embryos in vivo and in vitro; evidence for embryo 'cross talk' in vitro. *Developmental Biology*. 284 (1). 62 – 71.

Sun, Q. Y., Nagai, T. 2003. Molecular mechanisms underlying pig oocyte maturation and fertilization. *Journal of Reproduction and Development*. 49 (5). 347 – 359.

Tachibana, M., Sugimoto, K., Nozaki, M., Ueda, J., Ohta, T., Ohki, M., Fukuda, M., Takeda, N., Niida, H., Kato, H., Shinkai, Y. 2002. G9a histone methyltransferase plays a dominant role in euchromatic histone H3 lysine 9 methylation and is essential for early embryogenesis. *Genes and Development*. 16 (14). 1779 – 1791.

Talbot, P. 1984. Hyaluronidase dissolves a component in the hamster zona pellucida. *The Journal of Experimental Zoology*. 229 (2). 309 – 316.

Tateno, H., Krapf, D., Hino, T., Sanchez-Cardenas, C., Darszon, A., Yanagimachi, R., Visconti, P. E. 2013. Ca²⁺ ionophore A23187 can make mouse spermatozoa capable of fertilizing in vitro without activation of cAMP-dependent phosphorylation pathways. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 110 (46). 18543 – 18548.

Thiagalingam, S., Cheng, K. H., Lee, H. J., Mineva, N., Thiagalingam, A., Ponte, J. F. 2003. Histone deacetylases: Unique players in shaping the epigenetic histone code. *Annals of the New York Academy of Sciences*. 983. 84 – 100.

Tollini, L. A., Jin, A., Park, J., Zhang, Y. 2014. Regulation of p53 by Mdm2 E3 ligase function is dispensable in embryogenesis and development, but essential in response to DNA damage. *Cancer Cell*. 26 (2). 235 – 247.

Tosti, E., Boni, R., Gallo, A., Silvestre, F. 2013. Ion currents modulating oocyte maturation in animals. *Systems Biology in Reproductive Medicine*. 59 (2). 61 – 68.

Trojer, P., Reinberg, D. 2007. Facultative heterochromatin: is there a distinctive molecular signature? *Molecular Cell*. 28 (1). 1 – 13.

Tulsiani, D. R. P. 2012. Mechanisms of Mammalian Sperm-Egg Interaction Leading to Fertilization. *Gynecology and Obstetrics*. 2 (5). 1 – 4.

Vaissière, T., Sawan, C., Herceg, Z. 2008. Epigenetic interplay between histone modifications and DNA methylation in gene silencing. *Mutation Research-Reviews in Mutation Research*. 659 (1 – 2). 40 – 48.

Van der Heijden, G. W., Dieker, J. W., Derijck, A. A., Muller, S., Berden, J. H., Braat, D. D., van der Vlag, J., de Boer, P. 2005. Asymmetry in histone H3 variants and lysine

methylation between paternal and maternal chromatin of the early mouse zygote. *Mechanisms of Development*. 122 (9). 1008 – 1022.

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.

Villalba J. M.; Alcaín F. J. 2012. Sirtuin activators and inhibitors. *BioFactors*. 38 (5). 349 – 359.

Voronina, E., Wessel, G. M. 2003. The regulation of oocyte maturation. *Current Topics in Developmental Biology*. 58. 53 – 110.

Wang, F., Tian, X., Zhang, L., He, C., Ji, P., Li, Y., Tan, D., Liu, G. 2014. Beneficial effect of resveratrol on bovine oocyte maturation and subsequent embryonic development after in vitro fertilization. *Fertility and Sterility*. 101 (2). 577 – 586.

Ward, W. S. 2010. Function of sperm chromatin structural elements in fertilization and development. *Molecular Human Reproduction*. 16 (1). 30 – 36.

Wassarman, P. M. 1999. Mammalian fertilization: Molecular aspects of gamete adhesion, exocytosis, and fusion. *Cell*. 96 (2). 175 – 183.

Wassarman, P. M., Jovine, L., Litscher, E. S. 2001. A profile of fertilization in mammals. *Nature Cell Biology*. 3 (2). E59 – E64.

Wilking, M. J., Ahmad, N. 2015. The role of SIRT1 in cancer: the saga continues. *American Journal of Pathology*. 185 (1). 26 – 28.

Wu, D., Chen, L., Sun, Q., Wu, X., Jia, S., Meng, A. 2014. Uracil-DNA glycosylase is involved in DNA demethylation and required for embryonic development in the zebrafish embryo. *The Journal of Biological Chemistry*. 289 (22). 15463 – 15473.

Xu, W. S., Parmigiani, R. B., Marks, P. A. 2007. Histone deacetylase inhibitors: molecular mechanisms of action. *Oncogene*. 26 (37). 5541 – 5552.

Ye, J., Flint, A. P., Luck, M. R., Campbell, K. H. 2003. Independent activation of MAP kinase and MPF during the initiation of meiotic maturation in pig oocytes. *Reproduction*. 125 (5). 645 – 656.

Yi, Y. J., Sutovsky, M., Song, W. H., Sutovsky, P. 2014. Protein deubiquitination during oocyte maturation influences sperm function during fertilisation, antipolyspermy defense and embryo development. *Reproduction Fertility and Development*. 27 (8). 1154 – 1167.

Yu, H., Ye, W., Wu, J., Meng, X., Liu, R. Y., Ying, X., Zhou, Y., Wang, H., Pan, C., Huang, W. 2014. Overexpression of sirt7 exhibits oncogenic property and serves as a prognostic factor in colorectal cancer. *Clinical Cancer Research*. 20 (13). 3434 – 3445.

Yuan, G., Zhu, B. 2012. Histone variants and epigenetic inheritance. *Biochimica et Biophysica Acta-Proteins and Proteomics*. 1819 (3 – 4). 222 – 229.

Zhang, T., Kraus, W. L. 2010. SIRT1-dependent regulation of chromatin and transcription: Linking NAD⁽⁺⁾ metabolism and signaling to the control of cellular functions. *Biochimica et Biophysica Acta-Proteins and Proteomics*. 1804 (8). 1666 – 1675.

Zou, X. Q., Ma, W., Solov'yov, I. A., Chipot, C., Schulten, K. 2011. Recognition of methylated DNA through methyl-CpG binding domain proteins. *Nucleic Acids Research*. 40 (6). 2747 – 2758.

9. Seznam použitých zkratek

ADP	Adenosine diphosphate	Adenosindifosfát
APC/C	Anaphase promoting complex/cyclosome	Anafázi podporující komplex/cyklozóm
ATP	Adenosine triphosphate	Adenosintrifosfát
Ca²⁺	Calcium ions	Vápenaté ionty
cAMP	Cyclic adenosine monophosphate	Cyklický adenosin monofosfát
CDK1	Cyclin dependent kinase 1	Cyklin dependentní kináza 1
cGMP	Cyclic guanosine monophosphate	Cyklický guanosin monofosfát
CL	Corpus luteum	Žluté tělísko
COC	Cumulus-oocyte complex	Komplex kumulárních buněk a oocytu
CSF	Cytostatic factor	Cytostatický faktor
DNMT1	DNA methyltransferase 1	DNA methyltransferáza 1
EGA	Embryonic genome activation	Embryonální genomová aktivace
FOXO	Forkhead box O	Transkripční faktor
GV	Germinal vesicle	Zárodečný váček
GVBD	Germinal vesicle breakdown	Rozpad zárodečného váčku
HAT	Histone acetyltransferase	Histonacetyltransferáza
HDAC	Histone deacetylase	Histondeacetyláza
HDM	Histone demethylase	Histondemethyláza
HMT	Histone methyltransferase	Histonmethyltransferáza
HP1	Heterochromatin associated protein 1	Heterochromatin protein 1
LH	Luteinizing hormone	Luteinizační hormon
MAPK	Mitogen activated protein kinase	Mitogenem aktivovaná proteinkináza
MAPKK	Mitogen activated protein kinase kinase	Kináza mitogenem aktivované proteinkinázy
MAPKKK	Mitogen activated protein kinase kinase kinase	Kináza kinázy mitogenem aktivované proteinkinázy
MBD	Methyl-CpG binding domain	Doména vázající metylovanou DNA
MBP	Methyl-CpG binding proteins	Proteiny vázající metylované CpG ostrůvky
MDM2	Mouse double minute 2 homolog	Ubikvitin ligáza
MeCP1	Methyl CpG binding protein 2	Protein vázající metylované CpG ostrůvky
MeCP2	Methyl CpG binding protein 2	Protein vázající metylované CpG ostrůvky
MII	Metaphase II	Druhá meiotická metafáze
MPF	M-phase promoting factor	M-fázi podporující faktor
MZT	Maternal to Zygotic Transition	Přechod z maternálního genomu na embryonální

NAD⁺	Nicotinamide adenine dinucleotide	Nikotinamidadenindinukleotid
NAM	Nicotinamide	Nikotinamid
NOR	Nucleolus organiser region	Organizátor jádérka
NPB	Nucleolus precursor bodies	Nukleolární prekurzorová tělíska
p53	Tumor protein p53	Nádorový supresor protein p53
PARP	Poly-ADP-ribose-polymerase	Poly-ADP-ribóza-polymeráza
PKA	Protein kinase A	cAMP-dependentní kináza
ROS	Reactive oxygen species	Volné kyslíkaté radikály
RSV	Resveratrol	Resveratrol
SIR	Silent information regulators	Sirtuiny
SUMO	Small ubiquitin-related modifier	Malý protein podobný ubikvitinu
SUV39H1	Su(var)3-9 homolog 1	Histonová methyltransferáza
TSA	Trichostatin A	Trichostatin A
Zn²⁺	Zinc ions	Zinečnaté ionty
ZP3	Zona pellucida glycoprotein 3	Zonální glykoprotein 3
γH2AX	Fosforylated H2AX	Fosforylace histonu H2AX