

Česká zemědělská univerzita v Praze

Fakulta agrobiologie, potravinových a přírodních zdrojů

Katedra veterinárních disciplín



**Aktivita SCF komplexu v průběhu preimplantačního
vývoje skotu**

Diplomová práce

Autor práce: Bc. Veronika Kinterová

**Vedoucí práce: prof. Ing. Mgr. Markéta Sedmíková, Ph.D.
Školitel specialista: RNDr. Kaňka Jiří, DrSc.**

© 2015 ČZU v Praze

Čestné prohlášení

Prohlašuji, že svou diplomovou práci "Aktivita SCF komplexu v průběhu preimplantačního vývoje skotu" 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 10.4.2015

Poděkování

Ráda bych touto cestou poděkovala prof. Ing. Mgr. Markétě Sedmíkové, Ph.D. a školiteli RNDr. Jiřímu Kaňkovi, DrSc. za odborné vedení mé diplomové práce. Dále bych chtěla poděkovat členům Laboratoře vývojové biologie za pomoc, cenné rady a připomínky, příjemné prostředí a možnost zde svou práci zpracovat. V neposlední řadě mé poděkování patří rodině za trpělivost a podporu při studiu.

Aktivita SCF komplexu v průběhu preimplantačního vývoje skotu

Souhrn

Časný embryonální vývoj je závislý na několika kritických událostech, mezi které patří i aktivace embryonálního genomu (EGA), kdy začíná syntéza embryonálních transkriptů. Maternální mRNA jsou z embrya odstraněny, ale degradace maternálních proteinů zůstává prozatím neobjasněna. Velké množství proteinů je odstraňováno pomocí ubikvitin – proteazomového systému, a proto je pravděpodobné, že i maternální proteiny podléhají této degradaci. Proteiny určené k odstranění musejí být označeny ubikvitinem procesem zvaným ubikvitinylace. Toho se účastní tři enzymové systémy a to: E1 (ubikvitin-aktivující), E2 (ubikvitin-konjugující) a E3 (ubikvitin-ligázy) enzymy. Předpokládáme, že alespoň část maternálních proteinů je degradovaná za účasti SCF komplexu, který patří mezi zástupce E3 enzymů. Proto bylo účelem této diplomové práce sledovat aktivitu SCF komplexu v průběhu preimplantačního vývoje. Cílem bylo potvrdit hypotézu, že jeho aktivita se po EGA zvyšuje a ve stádiu blastocysty narůstá v oblasti trofoektodermu.

Pro tento pokus byla vybrána bovinní embrya, u kterých byla provedena imunofluorescenční metoda a metoda In situ proximity ligation assay (PLA). Výsledky imunofluorescenční metody cílené na dílčí proteiny SCF komplexu (Cul1, Skp1 a Rbx1) dokazují, že všechny tyto proteiny jsou přítomny během celého preimplantačního vývoje. Dále byla provedena metoda PLA, která zprostředkovává interakci mezi dvěma proteiny a navíc i detekuje lokalizaci této interakce. V našem případě jsme pozorovali vazbu mezi Cul1 a Skp1, jejichž interakce je stěžejní pro aktivaci SCF komplexu. Ta prokázala přítomnost aktivního SCF komplexu u všech vývojových stádií embrya. U výsledných snímků byla měřena hodnota fluorescenčního signálu a výsledky byly podrobeny statistické analýze. Ta prokázala statisticky významné rozdíly mezi oocyty v MII fázi a 2 - 4buněčnými embryi. Mezi ostatními stádii se signifikantní rozdíl neprokázal, tudíž nelze potvrdit vzrůstající aktivitu po EGA. Ve stádiu blastocysty se projevila nerovnoměrná lokalizace Cul1 a Skp1 a následně i aktivita SCF komplexu, která byla ve vnitřní buněčné mase (ICM) znatelně nižší než v trofoektodermu (TE). To potvrzuje druhou část naší hypotézy, která říká, že aktivita SCF komplexu narůstá ve stádiu blastocysty v oblasti trofoektodermu.

Klíčová slova: SCF komplex, preimplantační vývoj, Cullin1, Skp1, bovinní embryo

Activity of SCF complex during preimplantation development of cattle

Summary

Early embryonic development is dependent on several critical events including embryonic genome activation (EGA). It is the event when synthesis of the embryonic transcripts starts. Maternal mRNA is removed from embryos, but degradation of maternal proteins remains unclear up to now. A large amount of proteins is removed by the ubiquitin – proteasome system, and therefore the maternal proteins are assumed to be degraded the same way. Proteins destined for degradation are tagged by ubiquitin in process called ubiquitination. This is attended by three enzymatic systems, namely: E1 (ubiquitin-activating enzyme), E2 (ubiquitin conjugating enzyme) and E3(ubiquitin ligase). We presumed that at least some of the maternal proteins are degraded by the participation of the SCF complex, which is one of the E3 enzymes. Therefore, the purpose of this thesis was to observe the activity of this SCF complex during preimplantation development. The aim of this thesis was to confirm the hypothesis that activity of the SCF complex increases after EGA and grows in trophoectoderm (TE) at the blastocyst stage.

Our model organism were bovine embryos and the main methods we used were an immunofluorescence and In situ proximity ligation assay (PLA). Results of immunofluorescence, which targeted proteins of SCF complex (Cul1, Skp1 and Rbx1), demonstrate that these proteins were present throughout whole preimplantation development. PLA method enables the detection of interaction between the two proteins and moreover the detection of its localization. We observed the interaction between Cul1 and Skp1, whose binding is crucial for the activation of SCF complex. The results showed the presence of active SCF complex at all stages of embryonic development. The value of fluorescence signal was measured and subjected to statistical analysis. The results showed statistically significant differences between the MII stage oocytes and 2 – 4c stage embryos. There were not any significant differences between the other stages and the growing activity after EGA cannot be confirmed. At the blastocyst stage there were showed irregular localizations of Cul1 and Skp1 and subsequently the activity of the SCF complex, which was in the inner cell mass (ICM) significantly lower than in TE. This confirmed the second part of our hypothesis, which says that the activity of SCF complex is increasing in TE in the blastocyst stage.

Keywords: SCF complex, preimplantation development, Cullin 1, Skp1, bovine embryo

Obsah

1. Úvod.....	1
2. Vědecká hypotéza a cíle práce	2
3. Přehled literatury	3
3.1. Preimplantační vývoj	3
3.1.1. Aktivace embryonálního genomu	6
3.2. Degradace proteinů	8
3.2.1. Ubikvitin – proteazomový systém	10
3.2.2. RING E3 ligázy	14
3.2.3. SCF komplex	15
3.2.3.1 Cul1 protein	16
3.2.3.2 Skp1 protein.....	18
3.2.3.3 Rbx1/Roc1 protein.....	18
3.2.3.4 F-box protein	19
3.2.4. Význam SCF komplexu.....	20
4. Materiály a metody	25
4.1. Získávání oocytů a jejich kultivace	25
4.2. In vitro oplození (IVF) a kultivace embryí	25
4.3. Fixace embryí	26
4.4. Imunofluorescence	26
4.5. In situ proximity ligation assay (PLA)	28
5. Výsledky	31
5.1. Lokalizace jednotlivých podjednotek SCF komplexu	31
5.1.1. Kolokalizace Cul1 a Skp1.....	35
5.2. Průkaz aktivity SCF komplexu.....	36

6. Diskuze	38
7. Závěr.....	41
8. Seznam citované literatury.....	42
9. Seznam zkratek	52
10. Seznam obrázků	54

1. Úvod

V posledních letech zažívá obor reprodukčních biotechnologií velký rozvoj. Objevují se stále nové a nové technologie a postupy, které si kladou za cíl, co nejvíce vylepšit úspěšnost tohoto odvětví. Hlavní součástí oboru je i *in vitro* fertilizace (IVF), která je, jakožto převrat v léčbě neplodnosti, nedílnou součástí asistované reprodukce. Pro zdokonalování technik IVF je však nezbytně nutné porozumět všem procesům spjatým s dozráváním oocytů a časným embryonálním vývojem. Protože je vývoj bovinního embrya velice podobný lidskému, stává se z něj vhodný model pro jeho hodnocení.

Embryonální vývoj savců je založen na přechodu inaktivního oocytu v totipotentní embryo umožňující diferenciaci různých buněčných tkání. Tento složitý proces zahrnuje několik důležitých milníků, mezi které patří aktivace embryonálního genomu (EGA), reprogramace jádra a jiné epigenetické modifikace, což vyžaduje přesnou expresi genů. Během oogeneze se ve vyvíjejícím se oocytu hromadí maternální mRNA a proteiny v množství, které dokáže zabezpečit časný vývoj do období EGA, které je druhově specifické. V tomto období přechází řízení vývoje na embryonální transkripty a dochází tak ke změně vzoru syntézy proteinů. U skotu dochází k EGA v pozdním 8buněčném stádiu a toto období je tedy pro další vývoj embrya klíčové. Maternální mRNA, které již více nejsou potřebné, musí být z embrya odstraněny. Ačkoliv degradace maternálních mRNA začíná být více objasněná, zatím není příliš jasné, jakým způsobem podléhají degradaci maternální proteiny a do jaké míry je tato degradace nezbytná. Předpokládá se však, že řada těchto proteinů musí být z embrya odstraněna a degradace většiny z nich je pravděpodobně zprostředkovaná ubikvitin – proteazomovým systémem.

Tato práce se soustřeďuje na roli SCF komplexu v průběhu preimplantačního vývoje skotu, tedy doby, než dojde k implantaci embrya do dělohy. SCF komplex je E3 ubikvitin-ligáza zabezpečující přenos ubikvitinu na cílový protein určený k degradaci procesem ubikvitinylace. Předpokládá se, že právě SCF komplex je účastníkem degradace některých maternálních proteinů.

2. Vědecká hypotéza a cíle práce

Diplomová práce je zaměřena na sledování aktivity Skp1 – Cullin1 – F box (SCF) komplexu během preimplantačního vývoje skotu. Cílem je potvrdit hypotézu, že po aktivaci embryonálního genomu dochází k nárůstu aktivity SCF komplexu a následně ve stádiu blastocysty ke zvýšené aktivitě v oblasti trofoektodermy.

3. Přehled literatury

3.1. Preimplantační vývoj

Preimplantační vývoj je počáteční úsek vývoje savců do doby, než se embryo implantuje do dělohy matky. Začíná v momentě oplození, kdy haploidní spermie pronikne do haploidního oocyty za vzniku diploidní zygoty (Li et al., 2013). K oplození dochází ve chvíli, kdy se vajíčko nachází v horní části vejcovodu, v úseku zvaném ampula (Ball and Peters, 2004). Vzniklá zygota dál putuje pohlavním traktem samice a neustále se rýhuje. Pro úspěšný vývoj je nutný jak matčin tak otcův genom (Li et al., 2013). Ball and Peters (2004) uvádí, že embryo skotu dorazí do dělohy přibližně 4 – 5 dní po ovulaci.

Jak již bylo uvedeno, vývoj všech savců začíná oplozením. Zralá spermie je transkripčně inaktivní a její DNA je navinuta na protaminy (Li et al., 2013). Aby byly spermie schopny oplodnit oocyt, musí nejprve podstoupit tzv. kapacitaci. K tomuto procesu dochází po průniku do samičích pohlavních cest. Další důležitý děj je akrozomální reakce. Ta nastává po kontaktu se *zona pellucida* (ZP) oocyty a zajišťuje průchod spermie k povrchu vajíčka. Oba tyto procesy trvají u skotu přibližně 6 hodin. Proto se v praxi běžně inseminuje ještě před ovulací (Ball and Peters, 2004). Oocyt zabraňuje vzniku polyspermie, zabezpečuje přestavbu otcovského a aktivaci embryonálního genomu (Li et al., 2013). Po proniknutí spermie do vajíčka dochází k několika procesům vedoucím ke znemožnění vzniku polyspermie, která by pro embryo byla letální. Tyto procesy jsou zprostředkovány jak málo objasněným mechanismem, zabezpečovaným plazmatickou membránou, tak ZP. U ZP dochází k modifikaci jejích glykoproteinů pomocí enzymů uvolněných z kortikálních granul (Ducibella, 1996). Tento proces se nazývá exocytóza kortikálních granul a zabraňuje navázání spermií na povrch vajíčka (Li et al., 2013). Zanedlouho po průniku spermie do vajíčka dochází ke znovuzahájení meiózy a vyloučení druhého pólóvé tělísko. Přibližně 2 – 4 hodiny po penetraci *in vivo* i *in vitro* se začíná synchronizovaně formovat samčí i samičí prvojádru (Barnes and Eyestone, 1990).

K prvnímu dělení dochází 23 – 31 hodin po oplození a první buněčný cyklus od vydělení druhého pólóvého tělísko tak trvá 20 – 24 hodin. Po 36 – 50 hodinách pak embryo dojde do 4buněčného stádia a druhý buněčný cyklus je dlouhý celkem 12 hodin (Barnes and Eyestone, 1990). Zatímco první dělení probíhá meridionálně, během druhého dělení se jedna blastomera rozdělí meridionálně a druhá ekvatoriálně. Tento druh dělení se nazývá rotační a je specifický pro savce (Gulyas, 1975). 8buněčné stádium se objevuje zhruba

50 – 90 hodin po oplození a cyklus trvá přibližně 14 hodin (Holm et al., 1998). 80 – 86 hodin po oplození můžeme pozorovat 16buněčné stádium po 21 – 30 hodin trvajícím čtvrtém buněčném cyklu. Rozdíly mezi vývojem *in vitro* a *in vivo* jsou patrné po dosažení 8buněčného stádia, protože další vývoj v 16buněčné embryo je velmi citlivý k okolním vlivům. Na rozdíl od dělení somatických buněk si můžeme v embryonálním buněčném cyklu všimnout několika zvláštností. G – fáze jsou velmi krátké nebo dokonce úplně chybí. Toto se objevuje například v druhém a třetím buněčném cyklu, kde G1 fáze vůbec nenastává. G2 fáze se v druhém cyklu objevuje na 0 – 2 hodiny a v třetím pak na 4 – 6 hodin (Barnes and Eyestone, 1990). Tento jev je způsoben tím, že dělicí se blastomery nerostou, dochází u nich jen k omezené syntéze proteinů a využívají látky syntetizované a uložené již při oogenezi. Vznikající blastomery jsou součástí útvaru o téměř stejné velikosti, jako byla původní zygota (Forgacs and Newman, 2005). V raných embryonálních buněčných cyklech tedy převládá S a M fáze, přičemž S fáze trvá 8 hodin a M fáze 2 hodiny (Barnes and Eyestone, 1990). Dělení savčích embryí může být asynchronní, a proto v určitém okamžiku může obsahovat lichý počet blastomer. U savců dochází k holoblastickému dělení typickému pro vajíčka s nízkým nebo žádným obsahem žloutku. Při tomto procesu se rozděluje celá zygota. Vznikající blastomery se ve velikosti mohou nepatrně lišit, což je zapříčiněno odlišným prostorovým uložením nahromaděných látek v cytoplazmě (Forgacs and Newman, 2005).

Po dalším dělení embryo dosahuje stádia moruly tvořeného minimálně šestnácti blastomerami, které je obtížnější od sebe rozeznat (Bó and Mapletoft, 2013). Buňky k sobě adherují tak, aby byly v maximálním kontaktu, a vytváří celistvou kouli. Tento proces se označuje kompaktace (Watson et al., 1999) a u bovinních embryí začíná 5 dní po ovulaci v 32buněčném stádiu (Van Soom et al., 1997). Tato kompaktní morula je stabilizovaná těsnými spoji (tight junctions) mezi vnějšími buňkami, které izolují buňky uvnitř (Watson et al., 1999). V prvním stádiu kompaktace se vytváří membránová polarizace, kdy různé komponenty migrují do určitých částí buňky. Protože je polarizace membrány ovlivněna interakcemi mezi buňkami, nevzniká, pokud blastomera není v kontaktu s alespoň jednou další buňkou. Z toho důvodu blastomera svou polarizaci ztratí, pokud je oddělena od zbytku embrya (Reeve and Ziomek, 1981). Na povrchu buněk je specifický glykoprotein E-kadherin, který je syntetizovaný již v 2buněčném stádiu a je pravidelně rozprostřený po celé membráně. Jakmile však nastane kompaktace, dochází i ke změně rozmístění E-kadherinu, který se posouvá do míst kontaktu s přilehlými blastomerami. E-kadherin je klíčová molekula celé kompaktace a v případě jeho degradace je embryo dekompaktováno. Pro kompaktaci je dále důležitá fosfatidylinositolová dráha. Při kultivaci 4buněčných embryí v médiu doplněném o

aktivátory proteinkinázy C (PKC) a diacylglyceridů, podléhají tato embrya předčasné kompaktaci (Winkel et al., 1990). Z toho vyplývá, že lokalizace E-kadherinu a následná kompaktace může být spuštěna aktivací PKC. Důležitou roli při kompaktaci hraje také reorganizace cytoskeletu. Buňky jsou vzájemně spojeny mikroklky prodlouženými aktinovými mikrofilamenty. V těchto místech E-kadherin pravděpodobně zprostředkovává přilnavost buněk (Fleming et al., 2001). V dalším vývoji dochází k rozdílnému umístění E-kadherinu v rámci blastocysty. V trofoektodermu (TE) je omezen na bazolaterální membrány buněk blastocysty, zatímco ve vnitřní buněčné mase (inner cell mass; ICM) zůstává jeho rozdělení nepolární (Barcroft et al., 1998).

Dalším vývojovým krokem je kavitace neboli tvorba blastocoelu. To umožňuje koordinovaná spolupráce akvaporinů, tight junctions a Na/K – ATPázy (Watson et al., 1999). Blastomery mezi sebou vytváří tzv. gap junctions, které umožňují průchod iontů a malých molekul (Eckert and Fleming, 2007). U *in vitro* embryí se gap junctions objevují až ve stádiu blastocysty (v ICM, mezi ICM a TE, ale nevyskytují se mezi buňkami TE), zatímco tight junctions již ve stádiu moruly. Hustota gap junctions se mezi blastomery ICM „hatchovaných“ blastocyst zvyšuje. U *in vivo* embryí se vzácně objevují gap junctions již ve stádiu moruly, více evidentní jsou zde však tight junctions. U *in vivo* blastocyst je pozorovatelná vysoká hustota gap junctions, přičemž je vyšší v ICM v porovnání s buňkami TE (Boni et al., 1999). Zatímco vnější buňky zůstávají polarizované, buňky uvnitř útvaru svou polaritu ztrácejí (Nishioka et al., 2008). Většina buněk po obvodu moruly později vytvoří trofoblast (trofoektoderm) a jejich další proliferací vzniká placenta, chorion a slouží především k poskytování potřebných živin pro vývoj embrya. Blastomery z vnitřní části moruly spolu s některými buňkami vzniklými přechodem do 32buněčného embrya formují ICM. Z těchto blastomer následně vznikne zárodek, amnion, allantois a žloutkový váček (Watson et al., 1999). Mezi těmito dvěma oblastmi je rozdíl především v expresi některých transkripčních faktorů. Vznik TE je regulován pomocí transkripčních faktorů Cdx2 a Eomesodermin (Eomes). Cdx2 je exprimován převážně ve vnějších blastomerech 8 – 16buněčného embrya (Strumpf et al., 2005), zatímco Eomes se objevuje již od 1buněčného stádia ve všech blastomerech (McConnell et al., 2005). Oba tyto proteiny později zanikají v průběhu implantace (Strumpf et al., 2005). Dalším důležitým transkripčním faktorem pro specifikaci a vývoj trofoektodermu je Tead4 (Nishioka et al., 2008). V ICM se exprimují Oct4, Nanog a Sox2, transkripční faktory, které jsou pro udržení pluripotence těchto blastomer nezbytné (Avilion et al., 2003). Je však prokázáno, že faktor Oct4 se pouze v ICM vyskytuje jen u myších embryí. V embryu prasete či skotu je Oct4 detekován v ICM i v TE,

z čehož vyplývá, že regulace Oct4 se mezidruhově liší a jeho exprese nemusí být omezena pouze na pluripotentní buňky (Kirchhof et al., 2000; Berg et al., 2011). Především Cdx2 a Oct4 hrají důležitou roli při diferenciaci ICM a TE (Niwa et al., 2005). Kavítace nastává ve chvíli, kdy buňky trofoblastu začínají produkovat tekutinu bohatou na sodíkové ionty a ta proudí sodíkovými pumpami (Na^+ , K^+ -ATPázy) do středu moruly. Hromadění těchto sodíkových iontů vyvolává zvýšené nasávání vody a tím se utváří blastocoel (Watson et al., 1999; Li et al., 2010). Následující vývojové stádium se nazývá blastocysta. Akvaporiny, které regulují průtok vody přes membránu TE tak zapříčiňují expanzi blastocysty (Strumpf et al., 2005). Blastocysta dramaticky zvyšuje svůj průměr a *zona pellucida* se zároveň ztenčuje přibližně na jednu třetinu své původní šířky (Bó and Mapletoft, 2013). Během průchodu vejcovodem brání ZP mimo jiné předčasnou implantaci embrya, dokud nedoputuje do dělohy. Po dosažení stádia blastocysty však musí ZP opustit, tzv. hatchovat (O'Sullivan et al., 2001). K hatchingu bovinních embryí dochází přibližně devátý den po ovulaci během 8. buněčného cyklu (Van Soom et al., 1997). V membránách buněk TE se nachází trypsin-like proteáza strypsin, která vytváří otvor na fibrilární matrixu zony (O'Sullivan et al., 2001). Tímto otvorem blastocysta ZP opouští a dostává se tak do přímého kontaktu s endometriem dělohy, ve kterém se nachází laminin, kolagen a fibronektin. Oproti tomu buňky TE obsahují integriny, kterými se na tyto látky mohou přichytit. TE začne syntetizovat další sadu proteáz, které naruší extracelulární matrix děložní tkáně, díky čemuž může dojít k implantaci embrya (Achache and Revel, 2006).

3.1.1. Aktivace embryonálního genomu

Vyvíjející se embryo musí prodělat několik důležitých kroků, které jsou stěžejní pro úspěšný vývoj. Nejdůležitějšími z nich jsou první buněčné dělení, aktivace embryonálního genomu, kompaktace a formování blastocysty. Tyto změny vyžadují dobře organizovanou expresi genomu (Wrenzycki et al., 2007; Lequarre et al., 2003).

Časný preimplantační vývoj savců je zcela závislý na proteinech a RNA syntetizovaných v oocyту v průběhu oogeneze. Z toho vyplývá, že jistá část vývoje je řízena RNA a proteiny zděděnými po matce a uloženými v buňce až do chvíle, dokud embryo nedokáže produkovat tyto látky vlastní (Memili and First, 2000). Maternální mRNA uložená v oocyту je stabilizována odstraněním poly(A) konce a je formovaná do ribonukleoproteinových komplexů. Aby mohla být využita k translaci, musí dojít

k prodloužení poly(A) konce, což spustí navázání poly(A) vazebného proteinu. Tento protein usnadňuje vazbu translačních iniciačních faktorů (Gilbert, 2009). Do určitého vývojového stádia je tedy embryo podporováno pouze maternálními proteiny a transkripty, aniž by vyžadovalo tvorbu vlastních (Minami et al., 2007) Následně však musí dojít k přechodu na tvorbu transkriptů podle embryonálního genomu, jinak není embryo schopné dalšího vývoje (Kanka, 2003). Proces, kdy začíná embryonální transkripce, se nazývá aktivace embryonálního genomu (EGA; embryonic genome activation) a celý tento děj lze také označit jako přechod kontroly vývoje z maternálního k embryonálnímu (MET; maternal to embryonic transition) (Memili and First, 2000). Při aktivaci embryonálního genomu dochází k reprogramování jádra, které je z velké části řízeno maternálními mRNA a proteiny. Dochází ke změně struktury chromatinu (Kanka, 2003; Vigneault et al., 2009), za což je odpovědný faktor představující chromatin BRG1 (chromatin – remodeling factor), protože při jeho vyčerpání se objevuje vývojová zástava a redukce transkripce exprimovaných genů (Bultman et al., 2006). Přechod z maternální k zygotické kontrole se skládá ze tří fází. První z nich je postupná degradace mateřských mRNA a proteinů, další je nahrazení maternálních transkriptů v oocyту embryonálními transkripty (například transkripty housekeeping genů). Poslední fází je tvorba nových transkriptů specifických pro embryo změnou vzoru genové exprese (Minami et al., 2007). Aktivace embryonálního genomu začíná v druhově specifickém čase po fertilizaci a doprovází ji tedy přeprogramování exprese genomu. Právě exprese embryonálního genomu je klíčová v dalším vývoji embrya (Memili and First, 2000). Cílem této změny je přechod z vysoce diferenciovaného oocyту v totipotentní blastomery, ze kterých je embryo v počátcích embryonálního vývoje složené (Kanka et al., 2012)

K hlavní vlně EGA u skotu dochází v pozdním 8buněčném stádiu (Frei et al., 1998). Nicméně již Barnes and Eystone (1990) poukazovali na změny ve struktuře proteinů skotu již ve fázi čtyř buněk. První detekované transkripty bovinních embryí se však objevují již v jednobuněčné zygotě a 2buněčném embryu, což naznačuje, že i tato vývojová stádia jsou částečně transkripčně a translačně aktivní. Tento proces se často označuje jako malá aktivace embryonálního genomu neboli minor EGA. Kromě toho hraje důležitou roli v časné aktivaci embryonálního genomu skotu i acetylace histonů (Memili and First, 1999). Jak je uvedeno výše, časování aktivace embryonálního genomu se liší mezi jednotlivými druhy živočichů. U skotu a stejně tak u koz a ovcí dochází k EGA tedy v 8 – 16buněčném stádiu, u prasete již ve 4buněčném (Telford et al., 1990), u člověka mezi 4 – 8buněčným (Braude et al., 1988) a u myši ve 2buněčném stádium (Telford et al., 1990).

V tomto období se mohou při *in vitro* kultivaci (IVC) embryí různých živočišných druhů objevit problémy. Dochází k zastavení vývinu a některá embrya mohou podlehnout tzv. embryonálnímu bloku. U bovinních embryí je kritické období právě během čtvrtého buněčného cyklu, případně mezi čtvrtým a pátým cyklem (Memili and First, 2000). U lidí je to například mezi třetím a čtvrtým a u myši ve druhém buněčném cyklu (Meirelles et al., 2004). Je to způsobeno dvěma hlavními mechanizmy a to: nezpůsobilost aktivace vývojově důležitých genů a neschopnost překonání represe chromatinu. Dalším důvodem může být poškození nevyhovujícími okolními podmínkami (např. oxidativní stres) (Betts and King, 2001). Následkem toho se při IVC do stádia blastocysty dostane pouze 30 – 40 % zralých oocytů. Pro úspěšný preimplantační a následný fetální vývoj je nutná exprese přibližně 10 000 genů. Je tedy důležité tyto geny správně identifikovat a použít tyto znalosti k zlepšení podmínek kultivace embryí (Niemann and Wrenzycki, 2000), jelikož právě kultivační podmínky ovlivňují expresi jednotlivých genů a syntézu proteinů vyvíjejících se embryí (Kues et al., 2008).

Pro tuto diplomovou práci byla vybrána bovinní embrya, protože jsou vhodnějším modelem k pochopení vývoje lidských a všeobecně savčích embryí, na rozdíl od např. dobře prostudovaných myších embryí. Jelikož je výzkum lidských embryí ve většině zemí omezen zákonem, údaje získané o vývoji embryí skotu mohou být využívány k odhalení embryonálních ztrát a vývojových aberací při IVC lidských embryí v asistované reprodukci (Kues et al., 2008).

3.2. Degradace proteinů

Degradace proteinů má klíčový význam v regulaci různých buněčných procesů a pro udržení homeostáze v důsledku soustavného odstraňování proteinů a jejich nahrazení proteiny novými. Narušení této rovnováhy by mohlo vyústit ve vznik závažných onemocnění, kdy se mohou poškozené či nefunkční proteiny hromadit (Lecker et al., 2006).

Degradace proteinů na jednotlivé aminokyseliny v eukaryotické buňce probíhá nejčastěji přímo v cytosolu ve specializovaných komplexech proteolytických enzymů nazývajících se proteazomy nebo v menší míře v jiných buněčných kompartmentech, například v lyzozomech, membráně nebo endoplazmatickém retikulu. Z degradovaných proteinů se aminokyseliny uvolňují dvěma kroky v závislosti na využití metabolické energie – první krok je závislý na ATP, a je uskutečňovaný pomocí 26S proteazomu. Následující krok jsou na ATP nezávislé procesy vykonávané endopeptidázami, karboxypeptidázami a

aminopeptidázami. Tímto procesem vznikají peptidy dlouhé přibližně 8 – 15 aminokyselin a jsou navázány na MHC I a předložené T lymfocytům nebo transportovány do endoplazmatického retikula. Navázání na MHC I peptidům zabezpečuje ochranu před degradací exopeptidázami (Nandi et al., 2006).

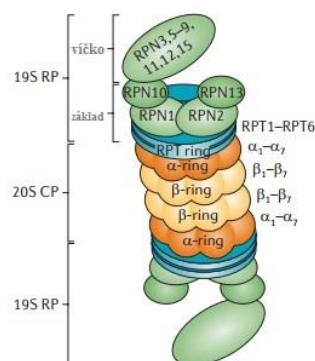
Proteazomy se vyskytují v cytoplazmě i v jádře a jejich distribuce je závislá na momentální fázi buněčného cyklu a také je odlišná v různých typech buněk. V jádře jsou přítomny v celé nukleoplazmě, ale v jadérku nejsou funkční (Wójcik and DeMartino, 2003). Skládají se z centrálního dutého válce tvořeného z více proteinových podjednotek zorganizovaných do téměř válcové struktury heptamerních kroužků. Aktivní místa proteáz některých podjednotek ční do středu válce. Každý válec je na obou stranách zakončen velkým proteinovým komplexem (víčko), který se skládá z šesti kroužků (Weissman et al., 2011).

26S proteazomy jsou tedy složené z 20S proteazomu nesoucího proteolytické jádro, který zastává funkci základní částice. Tento základní subjekt je vázán na 19S víčko známém také jako PA700 a mající regulační úlohu (Wolf and Hilt, 2004; Weissman et al., 2011). 19S jednotka je složená z 19 samostatných proteinů. 10 z nich (Rpt1 – Rpt6 jsou ATPázy a dále Rpn1, Rpn2, Rpn10 a Rpn13) vytváří základnu poutající vlastní víčko, složené ze zbývajících 9 proteinů (Rpn3, Rpn5 – Rpn9, Rpn11 – Rpn12), k základu proteazomu (Sharon et al., 2006). Jednotky Rpt2, Rpt3 a Rpt5 figurují v otevírání vstupu do 20S proteazomu, Rpn10 a Rpn13 slouží k navázání ubikvitinu a Rpn11, obsahující Zn^{2+} dependentní metaloproteázu, má aktivitu odbourávající ubikvitin (Nandi et al., 2006; Sharon et al., 2006).

Specifičnost 20S jádra je dána jeho unikátní stavbou. Jak již bylo uvedeno, skládá se ze čtyř heptamerních kruhů, přičemž dva vnější kruhy obsahují sedm α podjednotek a dva vnitřní kruhy jsou tvořeny sedmi β podjednotkami. Alfa podjednotky jsou inaktivní a aktivní místa se nachází pouze na β podjednotkách (Baugh et al., 2009). Za původem eukaryotických proteazomů pravděpodobně stojí Archea bakterie, jejichž proteazomy jsou tvořené z naprosto identických podjednotek. Figurují však jako prototyp pro všechny ostatní proteazomální podjednotky, které z nich vznikly laterálním přenosem nebo genovou duplikací (Nandi et al., 2006). Aktivní místa na β podjednotkách rozdělujeme na následující druhy. Jsou to aktivní místa na $\beta 1$ podjednotce s aktivitou podobnou kaspázám, která štěpí v místě řetězce po kyselých aminokyselině. Dále na $\beta 2$ podjednotce je trypsinu podobná aktivita, štěpící v sekvenci za bazickou aminokyselinou a na $\beta 5$ je chymotrypsin podobná aktivita, která štěpí po hydrofobních aminokyselinách (Jäger et al., 1999). Bakteriální proteazom je tvořený stejným typem α a stejným typem β podjednotek. Při evolučním vývoji eukaryotických buněk se sekvence α i β podjednotek postupně odlišovaly, až nastala situace, že se každá ze sedmi

podjednotek daného typu stala naprosto odlišná. Eukaryotní buňka obsahuje 14 příbuzných, ale přesto odlišných genů kódujících 7 podjednotek typu α a 7 podjednotek β (Heinemeyer et al., 1997). U savců je složitost 20S proteazomu zvýšena tím, že některé β podjednotky mohou být nahrazeny podjednotkami příbuznými. Rozlišujeme u nich tak tři další γ geny kódují β podjednotky, které indukují interferenci. Při začlenění těchto podjednotek na místa $\beta 1$, $\beta 2$ a $\beta 5$ vzniká immunoproteazom. Jde o podtyp proteozomu, který je odpovědný za tvorbu antigenů prezentovaných MHC komplexem třídy I odpovídající na zánětlivé podněty (Heinemeyer et al., 1997; Ciechanover, 1998; Wolf and Hilt, 2004).

Obr. 1 Struktura proteazomu s vyznačenými jednotlivými podjednotkami (Převzato a upraveno podle: Weissman et al., 2011)



Proces je řízený hydrolýzou ATP. Proteiny určené k degeneraci jsou rozeznány a vázány v proteazomovém víčku a vtaženy dovnitř proteazomu, kde jsou působením aktivních míst proteáz degradovány na krátké peptidy a uvolněné do cytoplazmy (Weissman et al., 2011). Tato proteolytická aktivní místa jsou umístěna v lumen válce, aby nedošlo k nespecifické degradaci buněčných proteinů (Nandi et al., 2006).

3.2.1. Ubikvitin – proteazomový systém

Proteiny určené k degradaci pomocí 26S proteazomu, touto velkou ATP- dependentní proteázou, jsou rozpoznány jedním z proteinů víčka podle toho, že je na nich kovalentně navázaný malý protein zvaný ubikvitin. Tento protein je složený ze 76 aminokyselin. Cesta degradace pomocí ubikvitinu hraje důležitou roli nejen při embryogenezi, ale i ve funkci nervového systému, odpovědi na stres a opravě DNA (Varshavsky, 1997). Dále substráty proteazomu zahrnují supresory tumorů, regulátory buněčného cyklu, transkripční faktory,

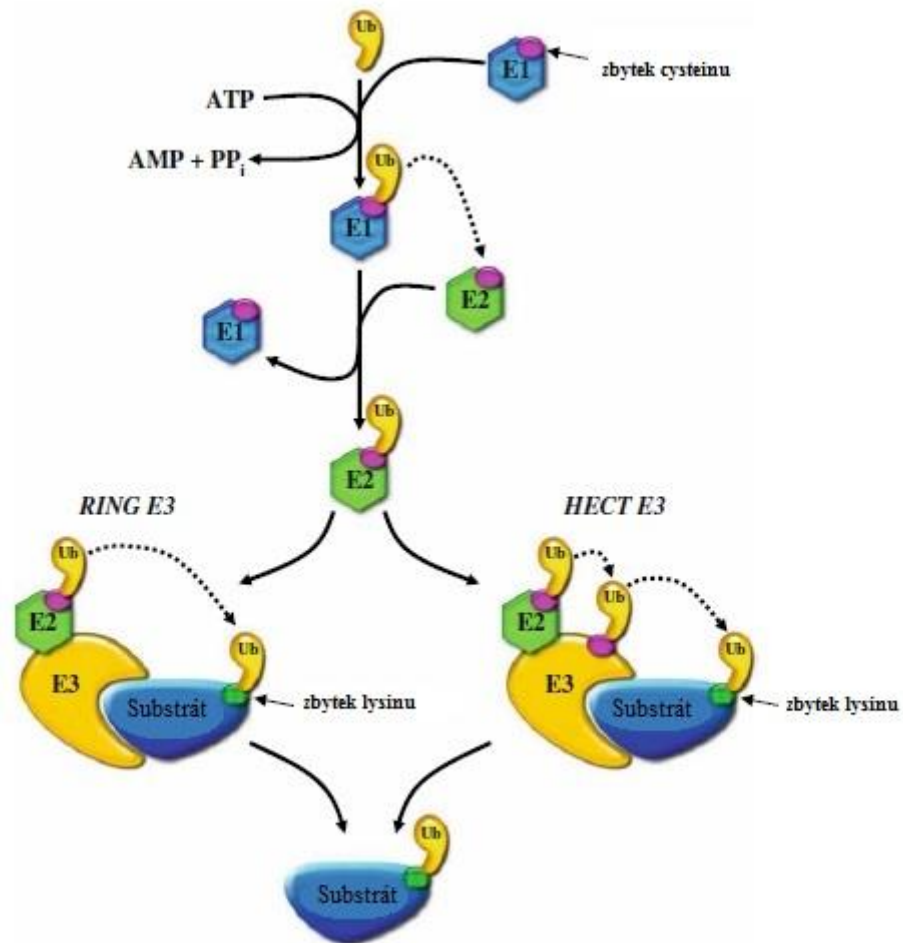
inhibitory, signální molekuly a anti – apoptické proteiny (Adams, 2003; Lecker et al., 2006). Mezi nemoci vznikající díky dysfunkci proteazomové degradace patří například i Alzheimerova, Huntingtonova nebo Parkinsonova choroba (Hol et al., 2005; Jung et al., 2009)

Degradace proteinů v proteazomu probíhá v několika krocích. Nejprve musí být cílové proteiny označeny ubikvitinem, přičemž v případě eukaryot dochází častěji k polyubikvitinaci (Nandi et al., 2006). Polyubikvitinace nejčastěji vzniká mezi ϵ -amino skupinou lysinu jednoho ubikvitinu a C-koncem ubikvitinu druhého. Vzniká tak řetězec vázaný isopeptidovou vazbou. Nejčastěji vzniká vazba na Lys48, případně na Lys29, což však není příliš prostudováno (Weissman, 2001). U molekul, které neobsahují lysin, dochází k vazbě na amimo konci (Glickman and Ciechanover, 2002). Proces ubikvitinace bude podrobně popsán níže. Thrower et al. (2000) uvádí, že minimální počet navázaných ubikvitinů, který by spustil signál pro začátek degradace proteinů, jsou čtyři. Pokud je navázán pouze jeden ubikvitin, může vyvolat funkčně odlišný signál, například pro endocytózu (Thrower et al., 2000). Takže přestože je hlavní funkcí ubikvitinu právě cílení proteinů k degradaci, existuje ještě několik dalších funkcí. Patří mezi ně například aktivace transkripčních faktorů a kináz, regulace translace a oprava DNA. Výsledná funkce není ovlivněna pouze počtem navázaných ubikvitinů, ale je ovlivněna dále i druhy enzymů přítomných při navazování ubikvitinu nebo rozpoznávání substrátů. Dalším faktorem pro ovlivnění konečného významu ubikvitinu je také druh lysinu, který je prostředníkem pro vznik polyubikvitinu. Při jeho vzniku vazbou na Lys63 může působit jako již zmíněný signál k opravě DNA nebo jako aktivátor transkripčních faktorů (Weissman, 2001).

Ubikvitinace a následná degradace proteinu probíhá v několika krocích. Proces ubikvitinace ke správné funkci vyžaduje přítomnost tří enzymů: E1 (ubikvitin-aktivující enzym), E2 (ubikvitin-konjugující/přenesající enzym) a E3 (ubikvitin-ligáza). Nejprve musí dojít k aktivaci ubikvitinu pomocí E1 enzymu za přítomnosti ATP. Meziúspěšně tohoto kroku je vznik adenylovaného meziproductu ubikvitin-AMP. Tento meziproduct podléhá reakci s cysteinovým zbytkem aktivního centra E1 enzymu za vzniku finální sloučeniny ubikvitin-E1 thiolesteru. E1-ubikvitin thiolester je rozeznán různými E2 (ubikvitin-konjugujícími enzymy E2), na něž je ubikvitin přenesen a navázán další thiolesterovou vazbou svým C-koncovým glycinem 76. Nakonec dochází k navázání ubikvitinu na substrát pomocí enzymu ubikvitin-ligázy E3 (Weissman, 2001). Dojde ke vzniku vazby mezi lysinem proteinového substrátu a C-koncovým glycinem (G76) ubikvitinu za vzniku izopeptidové vazby (Ciechanover, 1998; Pickart and Fushman, 2004). E3 enzymy jsou zodpovědné za výběr cílového substrátu, díky čemuž odpovídají za specifčnost. Obecně platí, že existuje

malé množství E1 enzymů, větší E2 enzymů a největší množství E3 enzymů (Pickart and Eddins, 2004). Z toho vyplývá, že v každém kroku postupně roste potenciální počet využitých proteinů a zároveň tak stoupá i specifita vazby (Weissman, 2001).

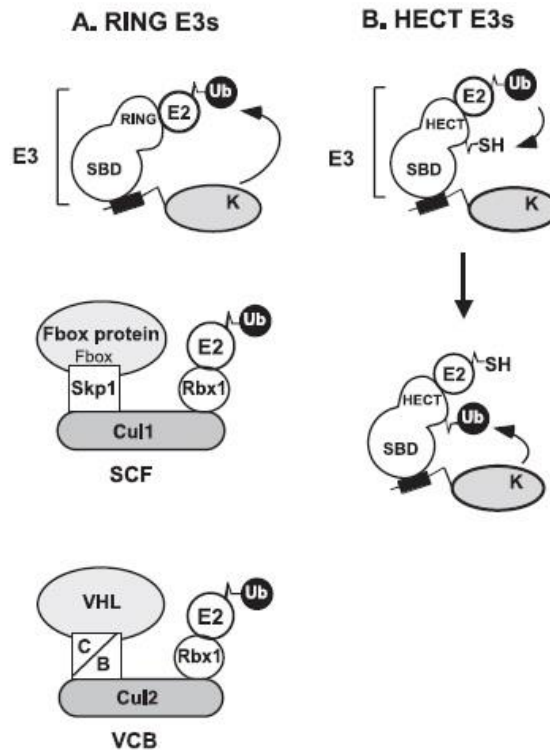
Obr. 2 Obecné schéma ubikvitinace



Na obrázku je zároveň uveden i proces navázání ubikvitinu u obou rodin E3 enzymových ligáz (Převzato a upraveno podle: Jung et al., 2009).

E3 patří do dvou odlišných rodin. První z nich je RING doména E3 enzymů, při které dochází k přímému přenosu ubikvitinu na substrát, druhá je HECT doména E3 enzymů, která se s ubikvitinem nejprve váže kovalentní vazbou a pak až jej předá na cílový substrát (Weissman, 2001; Jung et al., 2009). Aktivovaný ubikvitin je tak přenesen z E2 na vnitřní zbytek cysteinu E3 enzymu než dojde na navázání ubikvitinu na cílovou skupinu NH₂ substrátu. E3 zde funguje jako katalyzátor (Glickman and Ciechanover, 2001).

Obr. 3 Některé E3 enzymy



Obrázek uvádí některé E3 enzymy: A) RING domény, uprostřed SCF komplex, dole VCB komplex. B) HECT domény. SBD označuje substrát vázající doménu. K označuje zbytek lysinu (Převzato z: Pickart and Eddins, 2004).

Dále se v některých zdrojích můžeme dočíst ještě o existenci E4 enzymů, které tvoří podmnožinu E3 enzymů a zařazují se vedle HECT a RING domény. Tato rodina se nazývá U-box (Hindley et al., 2011). Slouží jako konstrukce k přenosu ubikvitinu z E2 na dříve konjugovanou ubikvitinovou skupinu, čímž dochází k prodlužování polyubikvitinového řetězce (Glickman and Ciechanover, 2001). Předpokládá se, že mají trojrozměrnou strukturu podobnou struktuře RING- finger. U-box hraje roli v systému kontroly kvality, který má základ v buněčné stresové odpovědi na hromadění vnitrobuněčných abnormálních proteinů (Hatakeyama and Nakayama, 2003).

Ubikvitin musí být z proteinu odstraněn, aby cílený protein vstoupil do proteazomu již samostatně. Tuto činnost mají na svědomí deubikvitinázy, mezi které patří např. ubikvitin C-terminální hydrolázy nebo ubikvitin specifické proteázy. Dále sem patří již zmiňovaná součást proteazomu zvaná Rpn11. Ubikvitin je uvolňován do cytosolu, kde je dále degradován (Nandi et al., 2006).

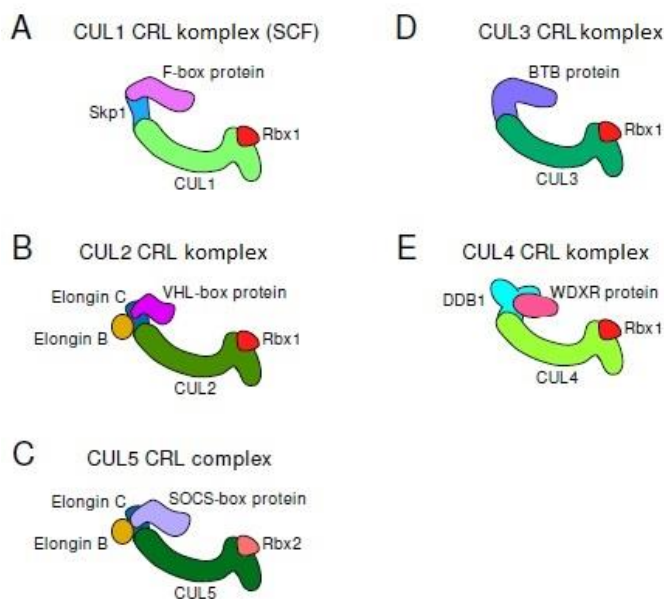
3.2.2. RING E3 ligázy

Mezi rodinu RING (really interesting new gene) E3 ligáz patří velké množství enzymů, které disponují největší různorodostí díky různým komponentům. Můžou být tvořeny pouze jedním jednoduchým proteinem až po složité komplexy tvořené několika podjednotkami. Jako příklad lze uvést Mdm2 nebo E3 α , které jsou monomery nebo homodimery a v jedné molekule mají jak RING finger doménu tak i substrát rozeznávající místo. Příkladem ligáz tvořených více podjednotkami jsou například APC, které odstraňují regulátory buněčného cyklu, dále C(VBV)-Cul2-RING finger komplex nebo SCF komplex (Glickman and Ciechanover, 2001; Jackson et al., 2000). Hlavním úkolem RING E3 ligáz je tedy vytvářet konstrukci, která zabezpečuje, že se E2 s navázaným ubikvitinem dostane do blízkosti požadovaného substrátu. Umožňuje tak přenos aktivovaného ubikvitinu z E2 na substrát (Glickman and Ciechanover, 2001). Pro tyto enzymy je charakteristická RING finger doména. Ta je definovaná, jako doména obsahující cysteiny a histidiny v následujícím motivu: CysX₂CysX₍₉₋₃₉₎CysX₍₁₋₃₎HisX₍₂₋₃₎HisX₂CysX₍₄₋₄₈₎CysX₂Cys (kde X představuje různé aminokyseliny), který je schopný vázat zinečnaté (Zn²⁺) kationty (Petroski and Deshaies, 2005).

Největší známou skupinou RING E3 ligáz jsou cullin-RING ubikvitin ligázy (CRLs, cullin-RING ubiquitin ligases). Jsou to velké komplexy, které se skládají z cullinu, jednotky rozeznávající substrát (SRS), RING H2 finger proteinu a (mimo CRL obsahující Cul3) upínající jednotky, která připojuje SRS ke komplexu (Bosu and Kipreos, 2008). Tyto komplexy jsou zodpovědné za regulaci rozličných procesů buňky, například různé aspekty transkripce, vývoje, replikace DNA a buněčného cyklu (Petroski and Deshaies, 2005). CRL jsou aktivovány pomocí ubikvitinu podobného proteinu Nedd8, který se na cullin naváže kovalentní vazbou. Tento proces se nazývá neddylace a považuje se za post-translační modifikaci proteinů (Rabut and Peter, 2008). Reakce probíhá v několika krocích. Nejprve musí dojít k navázání Nedd8 thiolesterovou vazbou na E1-aktivující enzym nazvaný APP-BP1/Uba3 pomocí jeho C-terminálního glycinu (Gly76). Nedd8 je dále propojen k cysteinu na Ubc12 E2 konjugujícím enzymu. Posledním krokem je vytvoření izopeptidové vazby mezi Gly76 C-koncem Nedd8 a ϵ -amino skupinou Lys na cullinu (Pan et al., 2004). Inhibice neddylace je prováděna navázáním proteinu CAND1 na cullin a odstranění Nedd8 je následně realizováno prostřednictvím izopeptidázové aktivity proteinového komplexu COP9 signalozomu (Cope and Deshaies, 2003; Bornstein et al., 2006; Denti et al., 2006).

Struktura CRL komplexů se rozlišuje hlavně podle přítomnosti jednotlivých cullinů (např. lidské buňky jsou schopné exprimovat sedm druhů cullinů: Cul1, 2, 3, 4a, 4b, 5 a 7) (Petroski and Deshaies, 2005). Cul1 je součástí komplexu, který se nazývá SCF komplex. Je dále tvořen 3 dalšími jednotkami: Skp1, F-box proteinem a Rbx1/Roc1 RING H2 finger proteinem. Cul2 obsahující CRL komplexy mají podobnou strukturu a jsou složeny z Cul2, Rbx1, adaptorového Elonginu C, Elonginu B a VHL-box proteinu. Obdobnou strukturu má CRL komplex tvořený Cul5, jen místo VHL-boxu obsahuje SOCS-box protein. Komplex obsahující Cul3 je mírně rozdílný, protože neobsahuje adaptor. Místo toho se SRS váže přímo na Cul3 pomocí BTB proteinu. A nakonec Cul4 je součástí komplexu, který stává z Rbx1a adaptorového proteinu DDB1, který se váže na SRS obsahující WD-opakování a nazývá se WDXR protein (Bosu and Kipreos, 2008). Struktura SCF komplexu v porovnání s ostatními CRL komplexy obsahujícími Cul2, Cul3, Cul4 a Cul5 je znázorněna na následujícím obrázku (Obr. 4).

Obr. 4 Struktura CRL komplexů



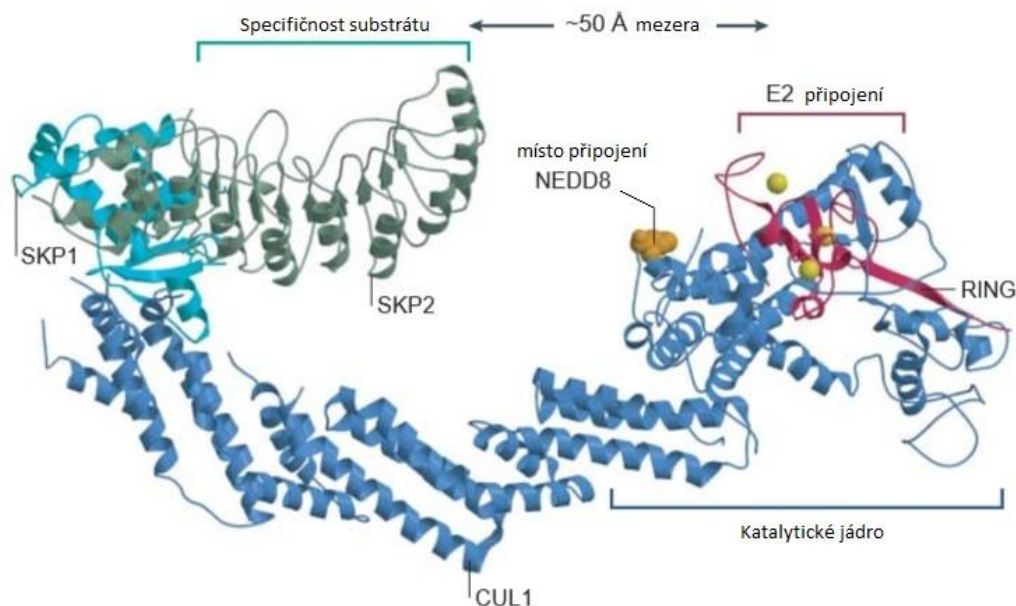
Struktura některých CRL komplexů: Cul1(A), Cul2(B), Cul5(C), Cul3(D) a Cul4(E) CRL komplexy s vyznačenými jednotlivými proteiny, ze kterých se skládají (Převzato a upraveno podle: Bosu and Kipreos, 2008).

3.2.3. SCF komplex

SCF komplex je tedy složený z Cul1, Rbx1, Skp1 a člena F-box proteinové rodiny. Katalytické jádro tvoří Rbx1 a Cul1, které společně zachytávají E2 enzym nesoucí ubikvitin.

Na F-box protein je potom navázán substrát a Skp1 figuruje jako adaptor spojující F-box k N-konci Cul1, díky čemuž je celý komplex uveden do chodu (Zheng et al., 2002). Na následujícím obrázku je pro přehlednost uvedena celá struktura SCF komplexu (Obr. 5).

Obr. 5 Struktura SCF^{Skp2} komplexu (Převzato a upraveno podle: Petroski and Deshaies, 2005)



3.2.3.1 Cul1 protein

Jak již bylo uvedeno, do rodiny cullinů patří několik zástupců a například u člověka můžeme rozlišit sedm druhů cullinů. Jaké komplexy tvoří ostatní druhy cullinů a co je jejich součástí, je uvedeno v následující tabulce (Tabulka 1).

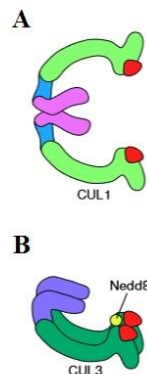
Tabulka 1 Tabulka uvádějící jednotlivé culliny, jména komplexů, které tvoří a ostatní jejich komponenty (Petroski and Deshaies, 2005)

Cullin	Podjednotky	Názvy komplexů
Cul1	F-box/Skp1/Cul1/RING	SCF, CDL1
Cul2	SOC/BC-box/elongin BC/CUL2/RING	VBC, CBC, ECS, SCF2, CDL2
Cul3	BTB-doména/CUL3/RING	BCR3, SCF3, CDL3
Cul4A	Receptor/DDB1/CUL4A/RING	VDC, DCX, SCF4, CDL4
Cul4B	? /CUL4B/RING	-
Cul5	SOCS/BC-box/elongin BC/CUL5/RING	SCF5, CDL5
Cul7	FBX/SKP1/CUL7/RING	SCF7, CDL7

Cullin je na C-konci navázán na Rbx1 protein a na jeho N-konec nasedá adaptorový Skp1 protein (Jia and Sun, 2009). N-terminální část, která je v kontaktu s Skp1, je mezi Cul1 velmi konzervovaná, ale není mezi jinými druhy cullinů, což dokazuje speciální strukturu, která váže specifické druhy substrátů (Petroski and Deshaies, 2005). N-terminální část je složena ze 415 aminokyselin, která je napojena na dlouhou strukturu podobnou stonku a váže na sebe Skp1-F-box komplex. C-terminální část je pak tvořena 36 aminokyselinami, je globulárního tvaru a váže Rbx1 (Zheng et al., 2002). C-terminální sekvence je také důležitá pro vazbu Nedd8 (Furukawa et al., 2000). Stavba Cul1 je zvláštní tím, že na N-konci se vyskytuje opakování složené ze dvou krátkých (A a B) a ze tří dlouhých šroubovic (C až E). Vyskytují se zde tři opakování, jejichž přesná aminokyselinová sekvence sice není známá, ale sdílí spolu podobný vzor hydrofobních zbytků. Na C-konci se pak vyskytuje struktura tvořená 4 šroubovicemi, které propojují C a N-konec a pět vláken β -struktury, do kterých se zapojuje N-terminální část Rbx1 (Zheng et al., 2002).

Chew et al. (2007) uvádí, že některé CRL komplexy tvoří funkční dimery. Například Cul1, Cul3 a Cul4 formují dimery nebo multimery, zatímco Cul2 a Cul5 se vyskytují pouze jako monomery (Chew et al., 2007). Mechanizace vzniků dimeru je buď zprostředkovaná SRS dimerizací, což je pozorované právě u SCF komplexů a druhou možností je vazba Nedd8 a cullinu (což funguje u komplexů tvořených Cul3). SRS dimery vznikají vazbou mezi F-box proteiny, respektive mezi D-doménou F-box proteinů vyskytující se na N-konci (Bosu and Kipreos, 2008). Příklady vzniku dimerů jsou uvedeny na následujícím obrázku (Obr. 6). Tvorba dimerů je vhodná pro účinnější ubikvitinaci díky výhodné vazbě jednoho substrátu na dva F-boxy, které pak mohou navzájem spolupracovat v prodlužování polyubikvitinového řetězce (Bosu and Kipreos, 2008; Merlet et al., 2009).

Obr. 6 Modely dimerizace



Obrázek A znázorňuje vznik dimerů vazbou mezi SRS jednotkami. Na obrázku B je uveden dimer vzniklý spojením molekulou Nedd8 (Převzato a upraveno podle: Bosu and Kipreos, 2008).

3.2.3.2 Skp1 protein

Dalším členem SCF komplexu je Skp1 (S-phase kinase-associated protein 1), který se chová jako adaptor a spojuje k sobě F-box a Cullin1. Skp1 je tvořeno dvěma doménami. Jedna je velká 110 aminokyselin (hSkp1) a je situovaná na N-konci. Druhá doména je složená z 53 aminokyselin (ySkp1) a je na C-konci. N-konec obsahuje oblast vázající F-box (Deshaies, 1999).

U Skp1 proteinu byly identifikovány i některé funkce, které nejsou přímo spjaté s SCF komplexem (Galan et al., 2001; Jourdain et al., 2009). U kvasinek bylo prokázáno, že se účastní regulace buněčného dělení a cytokineze (Jourdain et al., 2009). Dále u nich zabezpečuje recyklaci některých internalizovaných proteinů, přičemž je v komplexu pouze s Rcy1p F-box proteinem a ostatní složky SCF komplexu nejsou vůbec přítomné. Tímto způsobem je odstraňován například protein plazmatické membrány Snc1p. To naznačuje, že Skp1, ale i některé F-box proteiny mohou fungovat jak v SCF komplexech, tak i mimo ně (Galan et al., 2001).

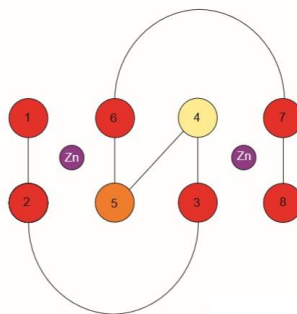
Skp1 se podílí i na vzniku Parkinsonovy choroby. Při tomto onemocnění je redukováno množství Skp1 (Zhou et al., 2013a). Umlčení Skp1 vede ke zvýšení citlivosti neuronů na poškození a zároveň tyto deficientní buňky nejsou schopné zastavit v G₀/G₁ fázi buněčného cyklu a konec buněčného cyklu se zpožďuje (Fishman-Jacob et al., 2009). Piva et al. (2002) uvádějí, že Skp1 má také klíčovou roli v segregaci chromozomů, díky čemuž dochází k udržení genomové stability – euploidie. Byl proveden pokus, kdy došlo k tvorbě transgenních myší s delecí Cull1, který dokáže Skp1 odstavit. U těchto mutantů se vytvářeli hypoplastické lymfatické orgány nereagující na mitogenní stimulaci. Při vynucení exprese Cull1 vznikaly mnohjaderné buňky, které měly porušené dělicí vřeténko, poruchu segregace chromozomů a jejich nestabilitu. Dále se u nich objevovaly nádorové změny s vysokou penetrací. Tyto výsledky dokazují, jak důležitý je Skp1 pro genetickou stabilitu (Piva et al., 2002).

3.2.3.3 Rbx1/Roc1 protein

Struktura Rbx1/Roc1 (RING box protein-1; Regulator of cullins) proteinu je tvořena z několika vláken a jádra. Jádro se skládá ze dvou velkých smyček označených Loop1 a Loop2. Tato molekula je dále tvořena třemi β-vláknem a α-vláknem (Zheng et al., 2002). Rbx1 se z jedné strany váže (C-koncem) na E2 enzym a druhou stranou (N-koncem) je napojený na C-

konec Cul1. Rbx1 a Cul1 katalyzují přenos ubikvitinu z E2 enzymu (Jia and Sun, 2009). Na β -vlákně Rbx1 je 16 zbytkový úsek, který se začleňuje do Cul1, díky čemuž se obě molekuly spojují (Zheng et al., 2002). Rbx1 dále ještě zprostředkovává neddylaci Cul1, díky čemuž začne celý komplex fungovat (Tan et al., 2009). Jak již bylo uvedeno výše, Rbx1 sestává z RING finger domény, přesněji tedy z RING-H2 finger domény (Jackson et al., 2000). Ta se vyznačuje tím, že obsahuje 6 cysteinů a 2 histidiny na pozicích 4 a 5, na rozdíl od domény RING-HC, která je složena ze sedmi cysteinů a jen jednoho histidinu na pozici 4 (Willems et al., 2004). Struktura proteinu je stabilizovaná zinečnatými ionty (Zheng et al., 2002), které se nachází na C-konci molekuly (Jia and Sun, 2009). Pro přehlednost je zjednodušená struktura RING finger domény vyobrazena na následujícím obrázku (Obr. 7).

Obr. 7 Schéma RING finger domény



Červeně jsou uvedeny cysteiny. Na pozici 4 a 5 se vyskytují histidiny (v případě RING-H2), případně se na pozici 5 může vyskytovat další cystein (u RING-HC domény) (Převzato z: Jackson et al., 2000).

Dosud byly identifikovány dva členy Rbx rodiny: Rbx1/Roc1 a Rbx2/Roc2. Zatímco Rbx1 je exprimován přirozeně, Rbx2 je indukován stresem (Tan et al., 2009).

3.2.3.4 F-box protein

Zatímco ostatní složky tohoto komplexu jsou neměnné, F-box proteinů existuje velké množství. Substrátová specifčnost SCF komplexu je daná právě F-box proteinem, který má dvoudílnou strukturu. Je složený z části vázající Skp1 protein a z jádra komplexu (Craig and Tyers, 1999). Množství F-box proteinů může být hodně široké. Dosud je u obratlovců známo přibližně 50 druhů různých F-box proteinů (Jackson et al., 2000). F-box proteiny mají spoustu různých forem, které společně sdílí asi 45 aminokyselin, ale jinak jsou od sebe velmi odlišné (Deshaies, 1999; Jackson et al., 2000). F-box je protein, který je schopný interakce proteinu k

proteinu, takže může spojit spoustu různých specifických adaptorů do společného komplexu. To je možné díky speciálním motivům, které umožňují vznik těchto interakcí. Mezi tyto motivy patří například několik WD-40 opakování (např. Cdc4), několik opakování bohatých na leucin (Skp2 nebo Grr1) nebo případně další struktury (Deshaies, 1999; Jackson et al., 2000). Podle jejich přítomnosti rozdělujeme F-box proteiny do několika tříd: Fbw proteiny obsahují WD40 opakování, Fbl třída obsahuje opakování bohatá na leucin a Fbx skupina pak obsahuje další jiné struktury (Jackson et al., 2000). Prolin předcházející leucin poblíž N-konce je nejvíce konzervovaná součást molekuly. Je důležitý pro navázání Cdc4 a Ctf13 k Skp1, avšak pro navázání Skp2 k Skp1 potřebný není (Bai et al., 1996). Tento dipeptid (Leu-Pro) u několika členů rodiny F-box proteinů úplně chybí a Deshaies (1999) uvádí, že není jasné, zda jsou tyto proteiny schopné vázat Skp1. U dobře prostudovaných F-box komplexů je prokázána nutnost fosforylace substrátů, aby mohlo vůbec dojít k ubikvitinaci. To bylo prokázáno například u SCF^{Cdc4} , SCF^{Grr1} , SCF^{Skp2} nebo $SCF^{\beta-TrCP}$ (Skowyra, 1997; Deshaies, 1999). Dalšími posttranslačními modifikacemi substrátů potřebnými k jejich navázání na F-box proteiny jsou acetylace, nitrace nebo glykosylace (Hindley et al., 2011). F-box protein nemusí být vázán pouze na proteiny určené k ubikvitinaci. Bylo prokázáno, že některé F-box proteiny tvoří funkční homo- a heterodimery a ukázalo se, že tvorba dimeru je nutná pro vazbu substrátu. Zatím však zůstává neobjasněno, zda je tvorba oligomerů F-box proteinů důležitá pro zvýšení katalýzy nebo rozpoznání substrátu (Jackson et al., 2000).

F-box proteiny mají krátkou životnost a právě SCF komplex je zodpovědný za jejich degradaci autoubikvitinylací. Díky tomu dochází k rychlému přepínání mezi jednotlivými SCF komplexy a buňky se tak mohou přizpůsobit měnícím se podmínkám (Galan and Peter, 1999).

3.2.4. Význam SCF komplexu

Jak již bylo několikrát uvedeno, degradace proteinů je klíčová k regulaci velkého množství procesů. Je důležitá pro buněčný cyklus, funkci transkripčních faktorů, degraduje onkogenní produkty a nádorové supresory a dále odbourává poškozené bílkoviny (Matějčíková a kol., 2013). V nádorových buňkách dochází ke zvýšení aktivity proteazomu, proto je degradace v proteazomu klíčem pro vývoj protinádorových léčiv (Silverman et al., 2012; Matějčíková a kol., 2013). Novější studie dále rozšiřují rozsah rolí ubikvitinu a bylo zjištěno, že hraje důležitou úlohu například i v opravě DNA. To je zajišťováno monoubikvitinací,

jelikož pouze jeden navázaný ubikvitin nestačí pro spuštění ubikvitin – proteazomové dráhy (Huang and D'Andrea, 2006).

Buněčný cyklus je závislý na odbourávání regulátorů, kterými je udržován v daných fázích. Proteolýza je tedy důležitá například pro přechod buňky mezi G1/S a M/G1 fázemi, které jsou řízeny vysokými nebo naopak nízkými koncentracemi Cdk (cyklin – dependentní kináza s nízkou hladinou v G1 a vysokou v S, G2 a M fázi). Mezi regulátory buněčného cyklu odstraňované ubikvitin – proteazomovým komplexem patří cyklin E nebo p27 (Tyers and Jorgensen, 2000). Myší embrya s inhibicí Cul1 nejsou životaschopná a dochází u nich k hromadění cyklinu E, který je cyklin pro G1 fázi (Dealy et al., 1999; Wang et al., 1999). Rbx1, jakožto stěžejní součást SCF komplexu, hraje důležitou roli i v preimplantačním vývoji, jelikož zabraňuje hromadění p27, což je také inhibitor Cdk. Při narušení funkce Rbx1 dochází k akumulaci p27, který se v časném embryonálním vývoji normálně nevyskytuje. Hromadění p27 způsobuje embryonální letalitu po 7,5 dni od počátku vývoje (E7,5, embryonic day), kvůli redukci proliferace (Tan et al., 2009; Jia and Sun, 2009). Jia and Sun (2009) dále uvádí, že prevence hromadění p27, nebo dokonce úplná delece p27 nemůže zcela zachránit Rbx1 deficitní embrya. Naznačuje to, že dochází ke kumulaci dalších Rbx1 substrátů, které jsou pro další embryonální vývoj nad E9,5 škodlivé. Bohužel však tyto substráty nejsou prozkoumané a jejich popsání by vedlo k lepšímu pochopení dalších funkcí Rbx1 (a potažmo celého SCF komplexu) ve vyšších vývojových stádiích (Jia and Sun, 2009).

Svou funkci zastává v buněčném cyklu, ale například i při cyklu centrozomů. Při něm dochází k replikaci centromer, hromadění tzv. PCM (pericentriolar material), ze kterého se později vyvíjí mikrotubuly, oddělení centriol, tvorbě mitotických vřetének na pólech buňky a následně k segregaci centrozomů do dceřiných buněk (Freed et al., 1999). Freed et al. (1999) uvádí, že minimálně jeden krok v cyklu duplikace centrozomů je řízen SCF ubikvitin – ligázovým komplexem, který je lokalizován na centrozomech. Toto tvrzení dokazují nutností přítomnosti Skp1, Cul1 a proteazomu při oddělování centriol u *Xenopus*. Blokování aktivity proteazomu je pro duplikaci centrozomů a oddělování centriol fatální (Freed et al., 1999). Dalšími substráty SCF komplexu jsou například: p21, p57, p53 cykliny A, D, Cdc25A/B, β -katenin, c-Jun a další (Jia and Sun, 2009).

Pro β -TrCP protein (jeden z F-box proteinů) je typická široká škála cílových substrátů, mezi které patří například CdcA a Wee1, díky kterým ovlivňuje funkci Cdk1. Jeho funkce není však omezena pouze na mitózu, nýbrž může cílit i na některé proteiny inhibující translaci, například PDCD4. Zároveň ovlivňuje i přežití buněk degradací pro-apoptického proteinu BimEL jako odpověď na mitogeny. Pokud tedy mitogenně stimulované buňky

vstoupí do buněčného cyklu, β -TrCP podporuje jeho postup pomocí aktivace Cdk1 (Wee1) a aktivací APC/C (Emi1). Zároveň však může buněčný cyklus i blokovat jako odpověď na genotoxický stres (Skaar and Pagano, 2009).

Mezi další funkce SCF komplexu patří kontrola meiotického zrání oocytů. Zhou et al. (2013b) uvádějí, že vyčerpáním Rbx1 dochází ke snížení rychlosti vyloučení prvního pólového tělíska, což je doprovázeno hromaděním Emi1. Většina oocytů zastavila svůj vývoj v metafázi I. Emi1 (Early mitotic inhibitor 1), který je důležitý při mitóze i meióze, inhibuje aktivitu APC/C E3 ligázy, která je požadovaná pro další meiotické zrání (Zhou et al., 2013b). Tento inhibitor podléhá degradaci SCF ^{β TrCP} komplexem, ke které dochází v pozdní profázi v mitotickém dělení (shrnutí v Karabinova et al., 2011) a v meióze ihned po GVBD (germinal vesicle breakdown), což je krok důležitý pro její pokračování (Zhou et al., 2013b). Stejně tak je pomocí SCF komplexu degradován Emi2, který je ovšem funkční pouze po GVBD, ale sehrává zde dvě klíčové role. První z nich je zabránění replikace DNA mezi meiózou I a meiózou II. To provádí tak, že inhibuje APC/C-Cdc20 po meióze I a umožňuje hromadění cyklinu B1 (Madgwick et al., 2006). Druhou funkci vykonává jakou součást cytostatického faktoru, jehož prostřednictvím udržuje vysoké hladiny MPF (M-phase promoting factor) i v situaci, kdy je APC/C-Cdc20 inhibován (Tunquist and Maller, 2003).

Jelikož SCF komplex kontroluje růst a kritické regulátory buněčného cyklu, narušení jeho dráhy je spojováno se vznikem rakoviny (Willems et al., 2004). V tomto případě je obzvlášť důležité správně určit jednotlivé substráty, které jsou daným komplexem degradovány (Matějčková a kol., 2013). Například p53, který patří mezi tumor supresory a je jedním ze substrátů SCF komplexu, hraje klíčovou roli v zastavení buněčného cyklu, apoptóze a opravě DNA je za normálních podmínek přítomný v pouze nízkých hladinách. Mutace p53 jsou spjaté s různými druhy lidské rakoviny (Nandi et al., 2006). Další SCF substrát c-Jun patří mezi onkogeny (Matějčková a kol., 2013). Jiné poznatky zase poukazují, že některé F-box proteiny se podílí na různých nemocech. Například svalová dystrofie i různá neurologická onemocnění jsou zprostředkována ubikvitinovým systémem (Willems et al., 2004).

Jak již bylo uvedeno v úvodu, během embryonálního vývoje dochází v druhově specifickém čase k přechodu z maternální k embryonální kontrole vývoje. Tento proces se skládá ze dvou částí. První z nich je odstranění maternálních RNA a proteinů a druhým krokem je transkripční aktivace embryonálního genomu (Walser and Lipshitz, 2011). U skotu dochází k aktivaci embryonálního genomu u 8 – 16buněčných embryí (Frei et al., 1998; Li et al., 2010). Do tohoto okamžiku embryo využívalo proteiny a RNA získané od matky a

uložené již v průběhu oogeneze. Nastává tedy okamžik, kdy již nepotřebné maternální RNA a proteiny musí být z embrya odstraněny a předpokládá se, že bez odstranění těchto nadbytečných maternálních RNA a proteinů nemůže dojít k aktivaci embryonálního vývoje (Li et al., 2010).

RNA je z embrya pravděpodobně odstraněno pomocí malých RNA, miRNA (microRNA) (Tang et al. 2007, Graf et al., 2014). MicroRNA se naváže na cílovou RNA, potlačuje její translaci a deadenylací ji činí náchylnější k následné degradaci pomocí nukleáz (Schier, 2007). Tyto miRNA jsou nejspíše zděděné maternálně (Tang et al, 2007). Přestože se nahromaděná maternální mRNA ve velmi malém množství začíná odstraňovat již během meiotického zrání, drtivá většina je odstraňována až během preimplantačního vývoje v období okolo EGA. Yokoi et al. (1993) uvádí, že počáteční množství maternální mRNA u myšího embrya ve stádiu dvou buněk klesá přibližně na 10 – 20 %. Nicméně určité druhy mRNA, které mají svoji specifickou funkci během meiózy a pro vývoj po oplodnění by mohly být škodlivé, jsou rychle degradovány ihned po fertilizaci. (Alizadeh et al., 2005).

Nadbytečné proteiny a organely mohou být odstraněny makroautofagií (Li et al., 2010), kdy vytvářejí objekty obalené dvojitou membránou (autofagozomy) a následně splývají s lysozomy za vzniku jedno membránových autofagolyzozomů, jejichž obsah následně podléhá degradaci (Boya et al., 2005). Dále mohou být proteiny odstraňovány právě ubiquitin – proteazomovým systémem (DeRenzo and Seydoux, 2004; Li et al., 2010). Jako příklad lze uvést degradaci MEI-1 prokázanou u *Caenorhabditis elegans*. MEI-1 a MEI-2 jsou proteiny přerušující mikrotubuly (Srayko et al., 2000). Během vývoje musí dojít k přechodu z meiózy k mitóze. Ač to tak nemusí na první pohled vypadat, liší se mezi sebou i meiotické a mitotické dělicí vřeténko. Mají odlišnou morfologii a chování, ale tvoří se pouze krátkou chvílí po sobě a navíc ve stejné cytoplazmě. Přechod z malého meiotického vřeténka v to velké, mitotické, je řízen mikrotubuly přerušujícím komplexem kataninem, kódovým geny mei-1 a mei-2. Proteiny MEI-1 a MEI-2 jsou speciální pouze pro meiózu, během které se hromadí na meiotickém dělicím vřeténku, a ihned po ní jsou odstraněny. Při narušení jejich degradace jsou nahromaděny i na mitotickém vřeténku a ovlivňují jeho rotaci a prodlužování. A právě tyto dva proteiny jsou degradovány pomocí ubiquitin – proteazomového komplexu za spolupráce E3 ubiquitin ligázy obsahující Cul3 (DeRenzo and Seydoux, 2004; Verlhac et al., 2010).

Protože je ubiquitin – proteazomový systém významný i pro výše popsanou kontrolu buněčného cyklu, bývá často obtížné rozlišit, které účinky postihují přímo embryonální vývoj, a které jsou nepřímo způsobené ovlivněním buněčného cyklu. Z tohoto důvodu je nutné určit

další regulátory vývoje, které by nám pomohly oba procesy snadněji odlišit jeden od druhého a zároveň lépe pochopit, jakým způsobem jsou propojené (DeRenzo and Seydoux, 2004). Pro tuto diplomovou práci byl vybrán právě SCF komplex, o kterém se předpokládá, že je, jakožto člen ubikvitin – proteazomového systému, jeden z účastníků degradace maternálních proteinů.

4. Materiály a metody

Všechny použité kultivační plasty byly vyrobeny firmou Nunclon (Nunc, Roskilde, Dánsko).

4.1. Získávání oocytů a jejich kultivace

Oocyty byly získávány z vaječníků krav poražených na jatkách. Vaječníky byly do laboratoře dopraveny v termolahvích s fyziologickým roztokem za teploty okolo 33 °C. Z vaječníků byly pomocí jemných chirurgických nůžek vystřiženy folikuly o velikosti 4 – 10 mm. Oocyt – kumulární komplexy byly vypíchnuty z folikulů a selektovány na základě morfologie kumulu k další kultivaci. Vybrané oocyt - kumulární komplexy byly kultivovány ve 4 jamkových miskách v modifikovaném Parkrově mediu (MPM) (složení viz Pavlok et al., 1992) v atmosféře 5 % CO₂ při 39 °C po dobu 24 hod.

4.2. In vitro oplození (IVF) a kultivace embryí

Oocyt – kumulární komplexy byly čtyřikrát opláchnuty v PBS (Phosphate Buffered Saline; fosfátový pufr s chloridem sodným) a následně jednou ve fertilizačním mediu TALP (Tyrode's albumin lactate pyruvate), jehož složení uvádí Pavlok et al. (1992). Posléze byly přeneseny ve skupinkách po maximálně 30 do čtyřjamkových destiček, které obsahovaly 250 µl TALP média na jamku.

Pejety s býčím spermatem byly inkubovány 10 sekund ve vodní lázni o teplotě 37 °C. Spermie byly spočítány v Bürkerově komůrce a následně naředěny na výslednou koncentraci 1×10^6 spermií v 1 ml fertilizačního média. Čtyřjamkové misky byly kultivovány přibližně 20 hod při 39 °C v atmosféře 5 % CO₂ – 5 % O₂ – 90 % N₂. Předpokládané zygoty byly poté opatrným pipetováním zbaveny většiny kumulárních buněk a přeneseny do média Menezo B2 (Sevapharma, Praha, Česká republika). Embrya byla kultivována v atmosféře 5 % CO₂ – 5 % O₂ – 90 % N₂ při 39 °C v kapkách Menezo B2 pod minerálním olejem.

Embrya byla po 32, 44, 60, 92, 120, 156 a 180 hodinách od oplození fixována v požadovaných stádiích, tedy 2buněčném, 4buněčném, časném 8buněčném, pozdním 8buněčném, stádiu moruly a blastocysty, případně hatchované blastocysty. V případě, že byly použity oocyty v metafázi II (MII), jejich sbírání se provádělo 24 hod po izolaci z folikulu.

Cílem této diplomové práce byla analýza lokalizace proteinů a aktivity SCF komplexu u bovinních embryí, proto jsem osobně prováděla metody, které budou následovat.

4.3. Fixace embryí

Embrya byla promyta v PBS a následně fixována ve 4 % paraformaldehydu (PFA) po dobu 50 min při 4 °C. Poté byla embrya 3 x opláchnuta v PBS.

4.4. Imunofluorescence

Imunofluorescenci, jakožto metodu sloužící k prokázání přítomnosti určitého antigenu nebo protilátky ve vzorku, jsme využili k detekci výskytu daných proteinů v různých vývojových stádiích skotu. Byly použity dva způsoby této metody a to barvení jednou a barvení dvěma primárními protilátkami.

Barvení jednou primární protilátkou

1. DEN

1. Embrya byla fixována výše popsáním způsobem.
2. Dále byla membrána embrya permeabilizována 15 min 0,5 % Tritonem (Sigma-Aldrich, Steinheim, Německo) v PBS.
3. Byl připraven roztok PBS, ve kterém bylo 50 μ g/ml saponinu (Calbiochem) a 0,3 % BSA (bovine serum albumine, Sigma-Aldrich, Steinheim, Německo) (PBS/BSA/sap), ve kterém byla embrya 3x opláchnuta.
4. Poté byla embrya 1 hod blokována ve 2 % kozím séru na třepačce při pokojové teplotě (RT).
5. Embrya byla opláchnuta v PBS/BSA/sap 3x po 10 min.
6. Následně byla embrya inkubována přes noc v primární protilátce v ledničce při 4 °C.

Použité primární protilátky:

- a. Králičí monoklonální protilátka proti Cull1 (Abcam, Cambridge, Velká Británie) naředěné v poměru 1:100 v PBS/BSA/sap
- b. Myší monoklonální protilátka proti Skp1 (Abcam) naředěné v poměru 1:100 v PBS/BSA/sap
- c. Králičí polyklonální protilátka proti Rbx1 (Abcam) naředěné v poměru 1:200 v PBS/BSA/sap

2. DEN

1. Embrya jsme 12x během 1 hod oplachovali v roztoku PBS/BSA/sap.

2. Poté byla embrya inkubována v sekundární protilátce v poměru 1:350 v PBS/BSA/sap 1 hod na třepačce při RT. Sekundární protilátka byla vybrána vždy podle druhu jednotlivé primární protilátky. Od této chvíle byla embrya uchovávána ve tmě.
Použité sekundární protilátky:
 - a. Kozí anti – králičí IgG značená FITC (fluorescein-5-izothiokyanát; Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, USA)
 - b. Kozí anti – myší IgG konjugovaná Alexa Flour 594 (Invitrogen, Eugene, Oregon, USA)
3. Následně jsme embrya opět promývali 12x za 1 hod v PBS/BSA/sap.
4. Dalším krokem bylo barvení jader pomocí DAPI (4,6-diamidin-2-fenylindol; Life technologies, Eugene, Oregon, USA) naředěného v poměru 1:100 v PBS/BSA/sap, ve kterém byla embrya po dobu 5 min na třepačce.
5. Embrya byla opláchnuta v PBS a zamontována na podložní sklíčko pomocí ProLong Gold Antifade Reagent montovacího média (Life technologies, Eugene, Oregon, USA).

Barvení dvěma primárními protilátkami (double staining)

Tento způsob imunofluorescence byl použit k prokázání přítomnosti dvou proteinů, u nichž lze předpokládat kolokalizaci. V našem případě byly zvoleny proteiny Skp1 a Cull1, jelikož právě po spojení těchto dvou jednotek dochází k aktivaci celého SCF komplexu.

Postup byl shodný jako při barvení jednou protilátkou s tím rozdílem, že v tomto případě byly použity dvě primární protilátky najednou:

1. DEN

- a. Králičí monoklonální protilátka proti Cull1 (Abcam) naředěné v poměru 1:100 v PBS/BSA/sap
- b. Myší monoklonální protilátka proti Skp1 (Abcam) naředěné v poměru 1:100 v PBS/BSA/sap

2. DEN

- a. Kozí anti – králičí IgG značená FITC (fluorescein-5-izothiokyanát; Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, USA)
- a. Kozí anti – myší IgG konjugovaná Alexa Flour 594 (Invitrogen, Eugene, Oregon, USA)

Ostatní kroky byly totožné.

U obou způsobů byly zároveň vytvořeny i negativní kontroly, které spočívaly ve vynechání barvení primárními protilátkami. Při dvojitém barvení byly navíc vytvořeny kontroly, kdy byla přidána pouze jedna ze sekundárních protilátek. K vyhodnocení obarvených embryí byl použit konfokální mikroskop Leica SP5 (Leica Microsystems, Wetzlar, Německo). Obrázky byly zpracovány pomocí ImageJ softwaru (NIH, Bethesda, USA; <http://rsb.info.nih.gov/ij>).

4.5. In situ proximity ligation assay (PLA)

PLA je využívána k průkazu vazby dvou proteinů. Postup uvedené metody zajistí emisi fluorescenčního signálu pouze v případě, že sledované proteiny budou ve vzdálenosti maximálně 40 nm, tedy pokud interagují. V našem případě jsme sledovali interakci mezi Skp1 a Cull1, tedy aktivaci SCF komplexu. Princip této metody tkví v tom, že na oba proteiny, na které jsou navázány primární protilátky, dojde k navázání sekundárních protilátek s konjugovanými oligonukleotidy (PLUS a MINUS próby). V dalším kroku jsou embrya inkubována v ligačním roztoku, který obsahuje další oligonukleotidy a ligázu, která tyto oligonukleotidy napojí na dříve navázané próby. V případě, že jsou proteiny v dostatečné blízkosti, vytvoří se mezi PLA próbami uzavřený kruh. Posledním krokem je pak inkubace v polymeračním roztoku. Polymeráza využívá próby jako primery a oligonukleotidový kruh jako templát. Ke vzniklému produktu pak hybridizují fluorescenčně označené oligonukleotidy, díky čemuž je možné celou reakci dobře detekovat.

1. DEN

1. Embrya byla fixována a permeabilizována stejným způsobem, jako v předešlé metodě.
2. Byla provedena blokáce v 2 % oslím séru (Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, USA) 1 hod na třepačce při RT.
3. Následně byla embrya opláchnuta 3x v roztoku PBS/BSA/sap po 10 min.
4. Dalším krokem byla inkubace embryí s oběma primárními protilátkami přes noc naředěnými v poměru 1:100 v PBS/BSA/sap. Byly použity:
 - a. Králičí monoklonální protilátka proti Cull1 (Abgent, San Diego, USA)
 - b. Myší monoklonální protilátka proti Skp1 (Abcam)

2. DEN

Pokud není uvedeno jinak, všechny dále uváděné chemikálie byly součástí Duolink In Situ Detection Reagents Red kitu (Olink Bioscience, Uppsala, Švédsko).

1. Embrya byla omývána 12x během 1 hod v PBS/BSA/sap. Během oplachování byl připraven následující mix s próbami, který byl před přidáním k embryím ponechán 20 min při RT:
 - a. 8 μ l PLUS próby
 - b. 8 μ l MINUS próby
 - c. 24 μ l PBS/BSA/sap
2. Embrya byla inkubována v mixu s próbami 1 hod v termostatu s 37 °C.
3. Po inkubaci byla embrya omyta od nenavázaných prób 12x během 1 hod. Během těchto oplachů byla připravena ligační směs:
 - a. 8 μ l ligačního roztoku
 - b. 31 μ l RNase – free vody (Ambion, Austin, USA)
 - c. Těsně před přidáním k embryím byl přidán 1 μ l ligázy a směs byla důkladně propipetována.
4. Inkubace embryí 30 min při 37 °C.
5. Embrya byla opláchnuta 3x po 5 min ve WBA (wash buffer). Během oplachů jsem připravila polymerační směs o následujícím složení:
 - a. 8 μ l 5x amplifikačního roztoku
 - b. 31,5 μ l RNase – free vody
 - c. 0,5 μ l polymerázy, která byla do roztoku opět přidána až těsně před přidáním k embryím
6. Embrya byla inkubována v polymerační směsi 100 min v 37 °C a od této chvíle byla embrya uchována ve tmě.
7. Oplach 6x po 5min v 1x WBB a následně 1x oplach na 5 min v 0,01x WBB.
8. Poté byla embrya opláchnuta v čistém PBS.
9. Embrya byla zamontována pomocí Vectashield HardSet Mounting Medium with DAPI (Vector Laboratories, Peterborough, Velká Británie). Před použitím bylo nutné médium stočit při 10 000 otáček na 10 min při 4 °C.

Byly vytvořeny tři typy negativních kontrol. U první z nich byly vynechány primární protilátky, další byla inkubována pouze s PLUS próbou (za vynechání MINUS próby) a poslední skupina byla inkubována naopak jen s MINUS próbou při vynechané PLUS próbě. Vyhodnocení bylo provedeno opět pomocí konfokálního mikroskopu.

MII oocyty, 2 – 4buněčná, pozdní 8buněčná embrya a embrya ve stádiu moruly byla barvena a snímána na konfokálním mikroskopu po skupinách. Snímky byly podrobeny analýze intenzity signálu fluorescence pomocí ImageJ softwaru. U jednotlivých stádií byla určena relativní síla fluorescence, přičemž jako 100 % byla stanovena průměrná hodnota fluorescence morul v každé skupině. Statistická analýza výsledků byla provedena v programu STATISTICA, verze 12.0. Pro porovnání intenzity mezi jednotlivými stádii byl použit test ANOVA, podrobnější zhodnocení pomocí Scheffého testu. Nulová hypotéza byla zamítána na hladině významnosti $\alpha = 0,05$. Graf byl vytvořen v programu SigmaStat 3.0 (Jandel Scientific, San Rafael, USA).

5. Výsledky

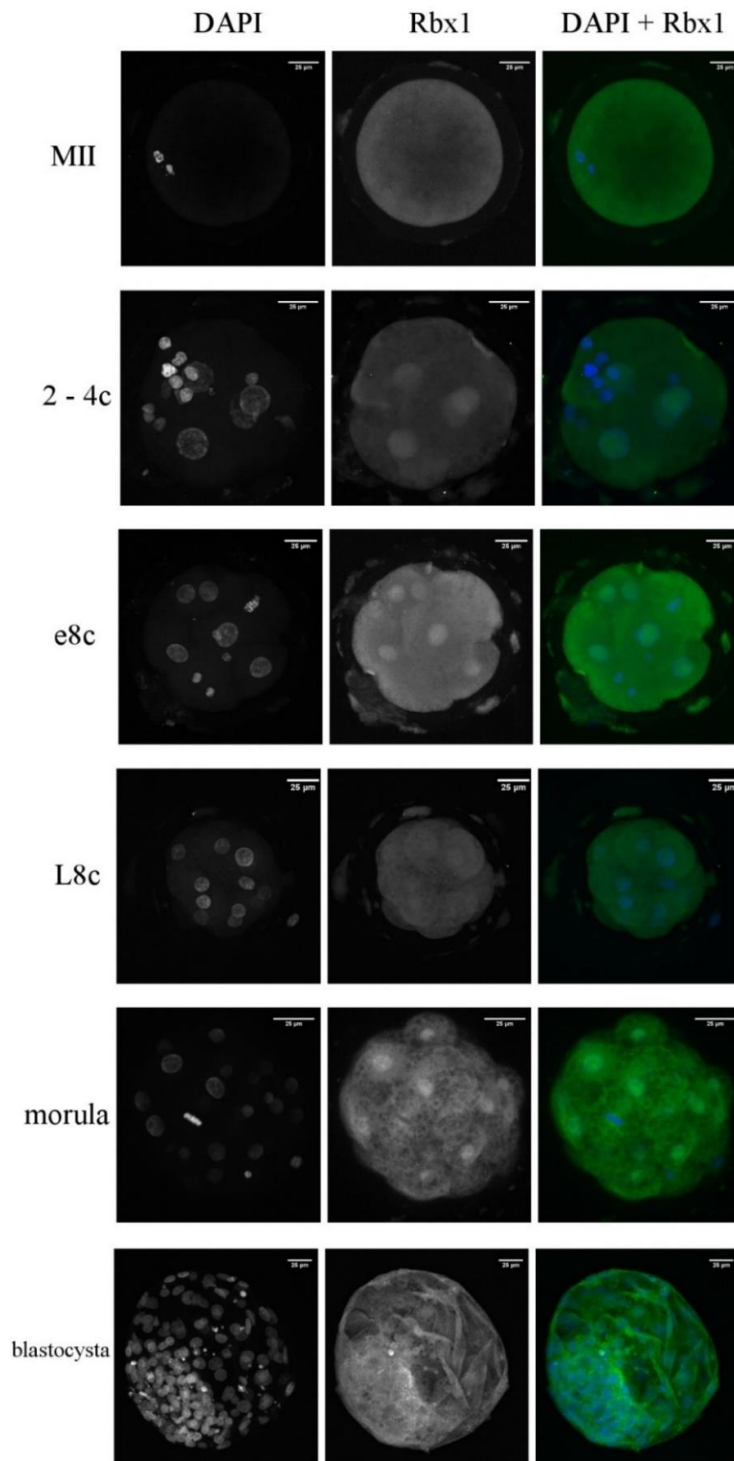
5.1. Lokalizace jednotlivých podjednotek SCF komplexu

Abychom mohli určit lokalizaci SCF komplexu během preimplantačního vývoje, bylo nutné detekovat jeho neměnné podjednotky a to: Rbx1, Skp1 a Cul1. K tomu byla použita imunofluorescenční metoda využívající vazbu protilátek proti jednotlivým proteinům a následně fluorescenčně označených sekundárních protilátek. Detekce byla prováděna u MII oocytů a od 2 – 4buněčných embryí až po embrya ve stádiu blastocysty. Lokalizace Cul1 pomocí imunofluorescenční metody po stádium moruly byla provedena a publikována již dřívější studií, proto je obrázek č. 10 pouze přejat z této publikace.

Ve všech pozorovaných stádiích bylo možné sledovat rovnoměrné rozmístění Rbx1 (Obr. 8), Skp1 (Obr. 9) a Cul1 (Obr. 10 a Obr. 11) proteinů s cytoplazmatickou lokalizací, což dokazuje, že jednotlivé komponenty SCF komplexu jsou přítomné po celý preimplantační vývoj.

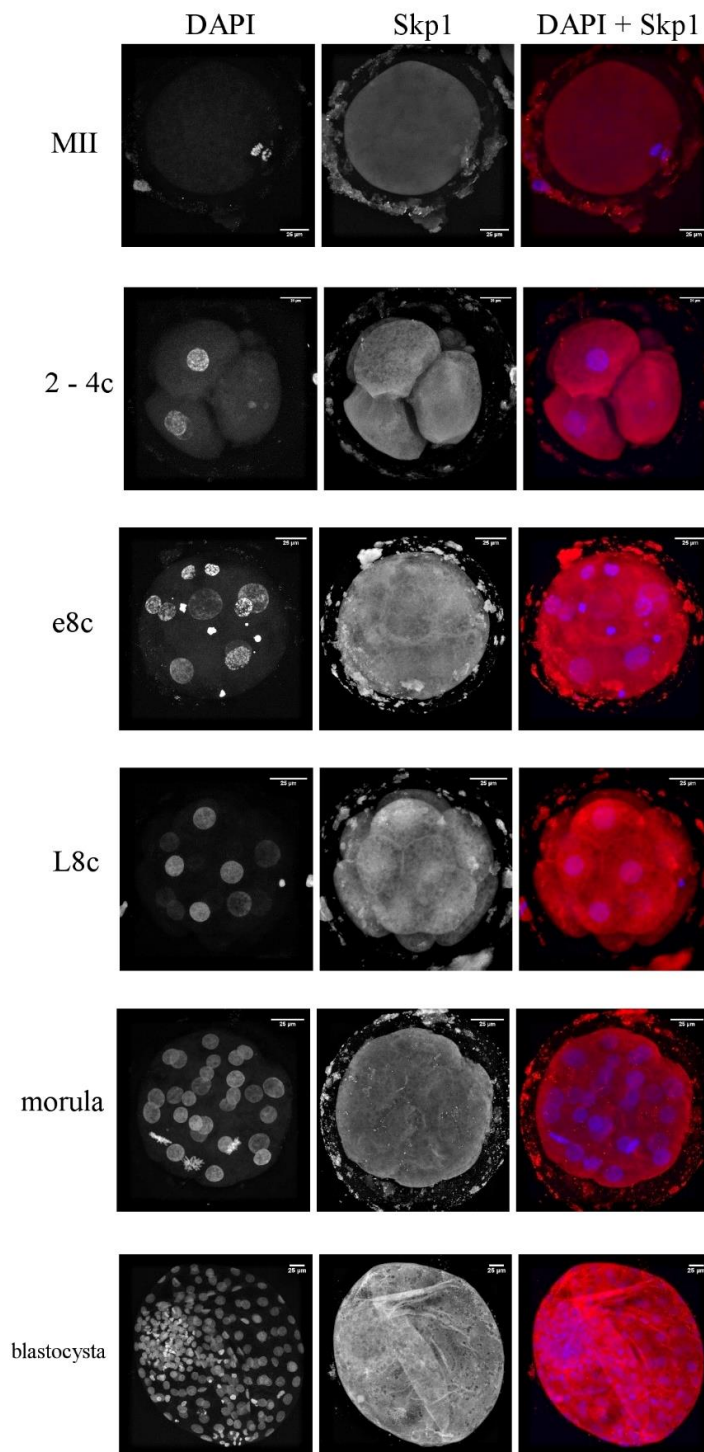
Rbx1 protein byl detekován v jádře již krátce po oplození, od 2 – 4buněčného stádia. Skp1 protein se objevuje v jádrech později, okolo pozdního 8buněčného stádia. Skp1 protein byl dále detekován také v *zona pellucida*. Rovněž Cul1 byl přítomný v jádrech později, u embryí ve stádiu blastocysty.

Obr. 8 Lokalizace Rbx1 proteinu během preimplantačního vývoje



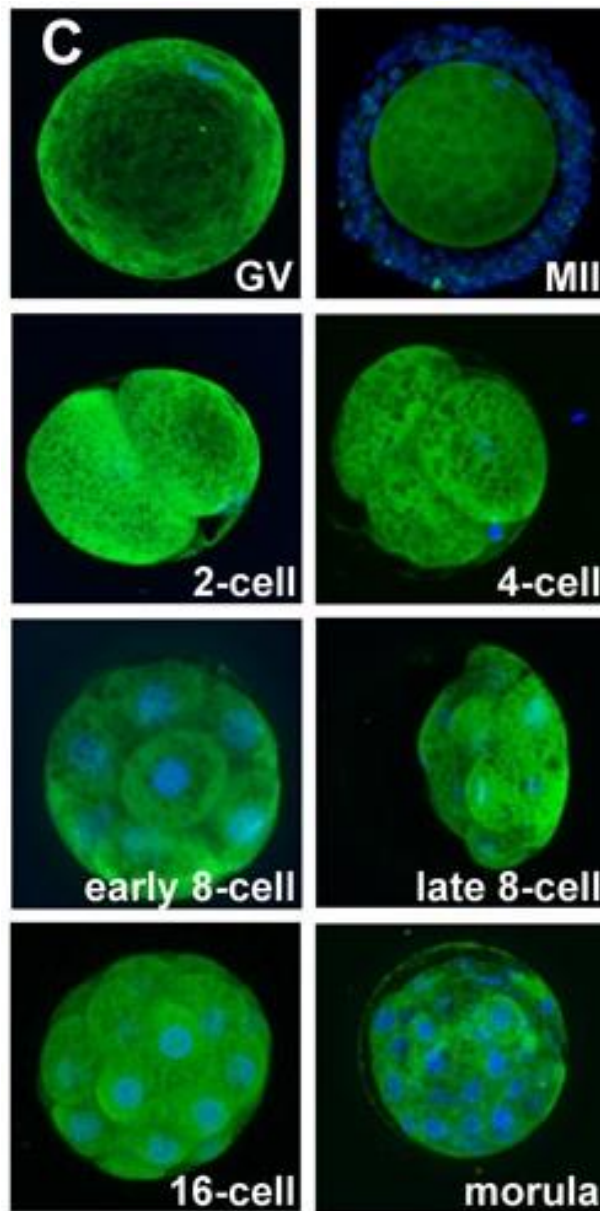
Snímky z konfokálního mikroskopu zobrazující zralý oocyt v metafázi II (MII), 2 – 4buněčné embryo (2 – 4c), časné 8buněčné embryo (e8c), pozdní 8buněčné embryo (L8c) po EGA, embryo ve stádiu moruly a blastocysty. První sloupec: barvení jader, druhý: lokalizace Rbx1 a třetí: jádra i Rbx1 dohromady. Embrya byla inkubovaná králičí polyklonální anti-Rbx1 protilátkou a následně sekundární kozí anti-králičí protilátkou značenou FITC (zelená). Jádra jsou barvená pomocí DAPI (modrá). Měřítka odpovídá 25 µm.

Obr. 9 Lokalizace Skp1 proteinu během preimplantačního vývoje



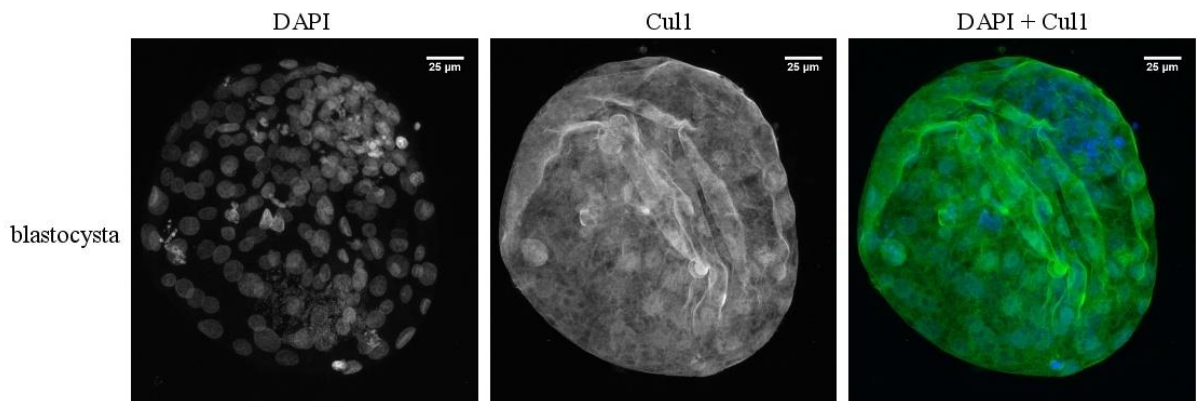
Snímky z konfokálního mikroskopu zobrazující zralý oocyt v metafázi II (MII), 2 – 4buněčné embryo (2 – 4c), časné 8buněčné embryo (e8c), pozdní 8buněčné embryo (L8c) po EGA, embryo ve stádiu moruly a blastocysty. První sloupec: barvení jader, druhý: lokalizace Skp1 a třetí: jádra i Skp1 dohromady. Embrya byla inkubovaná myší monoklonální anti-Skp1 protilátkou a následně sekundární kozí anti-myší protilátkou značenou Alexa Flour 594 (červená). Jádra jsou barvená pomocí DAPI (modrá). Měřítka odpovídá 25 μ m.

Obr. 10 Imunofluorescenční barvení zobrazující přítomnost proteinu Cul1 v průběhu preimplantačního vývoje



Uvedená stádia: stádium zárodečného vaku (GV), zralý oocyt v metafázi II (MII) s kumulárnimi buňkami, 2buněčné embryo (2 – cell), 4buněčné embryo (4 – cell), časně 8buněčné embryo (early 8 – cell), pozdní 8buněčné embryo (late 8 – cell), 16buněčné embryo (16 – cell) a embryo ve stádiu moruly. Embrya byla inkubovaná králičí polyklonální anti-Cul1 protilátkou a následně sekundární kozí anti-králičí protilátkou značenou FITC (zelená). Jádra barvená DAPI (modře) (Převzato z: Vodickova Kepkova et al., 2010).

Obr. 11 Lokalizace Cul1 u embrya ve stádiu blastocysty

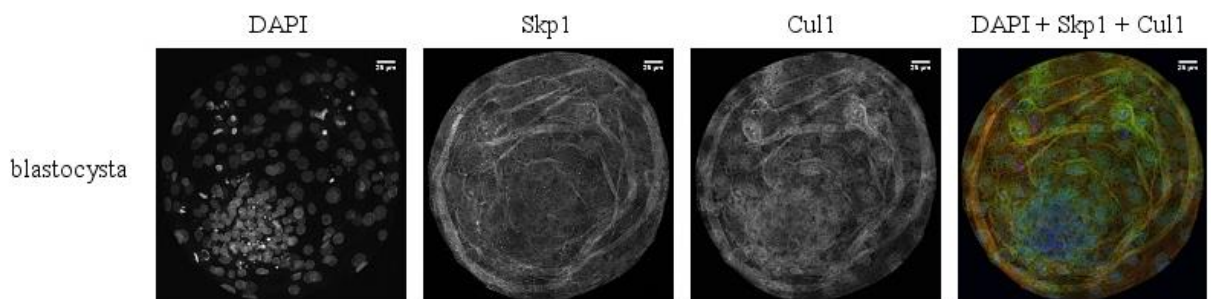


Snímky z konfokálního mikroskopu zobrazující v prvním sloupci barvení jader, v druhém sloupci je lokalizován Cul1 a ve třetím sloupci jádra i Cul1 dohromady. Embrya byla inkubovaná králičí polyklonální anti-Cul1 protilátkou a následně sekundární kozí anti-králičí protilátkou značenou FITC (zelená). Jádra jsou barvená pomocí DAPI (modrá). Měřítka odpovídá 25 μm .

5.1.1. Kolokalizace Cul1 a Skp1

Dále bylo provedeno barvení dvěma protilátkami, které mělo za úkol detekovat očekávanou kolokalizaci Cul1 a Skp1, jenž je předpokladem pro aktivaci SCF komplexu. Při použití vícenásobného značení byl detekován barevný posun, což znamená, že červený signál značící přítomnost Skp1 a zelený signál lokalizující Cul1 byl na místech kolokalizace přeměněn na žlutý odstín (Obr. 12). Výsledky ukazují, že ke kolokalizaci Skp1 a Cul1 dochází v prakticky celém embryu s výjimkou ICM.

Obr. 12 Kolokalizace Cul1 a Skp1



Jádra (DAPI) – modře, Skp1 – červeně, Cul1 – zeleně. Žluté struktury jsou výsledkem společné kolokalitace těchto proteinů. Měřítka odpovídá 25 μm .

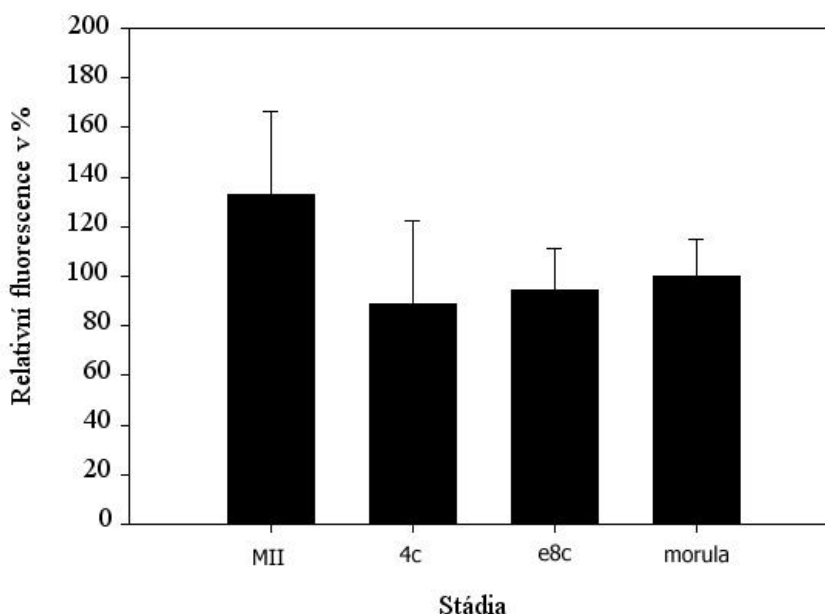
5.2. Průkaz aktivity SCF komplexu

K prokázání aktivity SCF komplexu v průběhu preimplantačního vývoje byla použita metoda PLA. Pro funkčnost SCF komplexu je klíčová vazba Cull1 a Skp1, která zajišťuje jeho aktivaci, a proto byla provedena detekce právě těchto dvou proteinů. Pomocí PLA lze prokázat nejen, zda dochází k vzájemné vazbě proteinů, ale zároveň získat informaci o přesné poloze této interakce.

Analýza prokázala aktivitu SCF komplexu rovnoměrně rozloženou v cytoplazmě u oocytů v MII fázi, dále u 2 – 4buněčného stádia, v časném 8buněčném stádiu a u embrya ve stádiu moruly (Obr. 14). Ve stádiu blastocysty není aktivita rozložena rovnoměrně jako u předcházejících stádií. Objevuje se značný nepoměr mezi aktivitou v ICM a TE. Aktivita SCF komplexu je v ICM zřetelně nižší oproti signálu vyskytující se v TE.

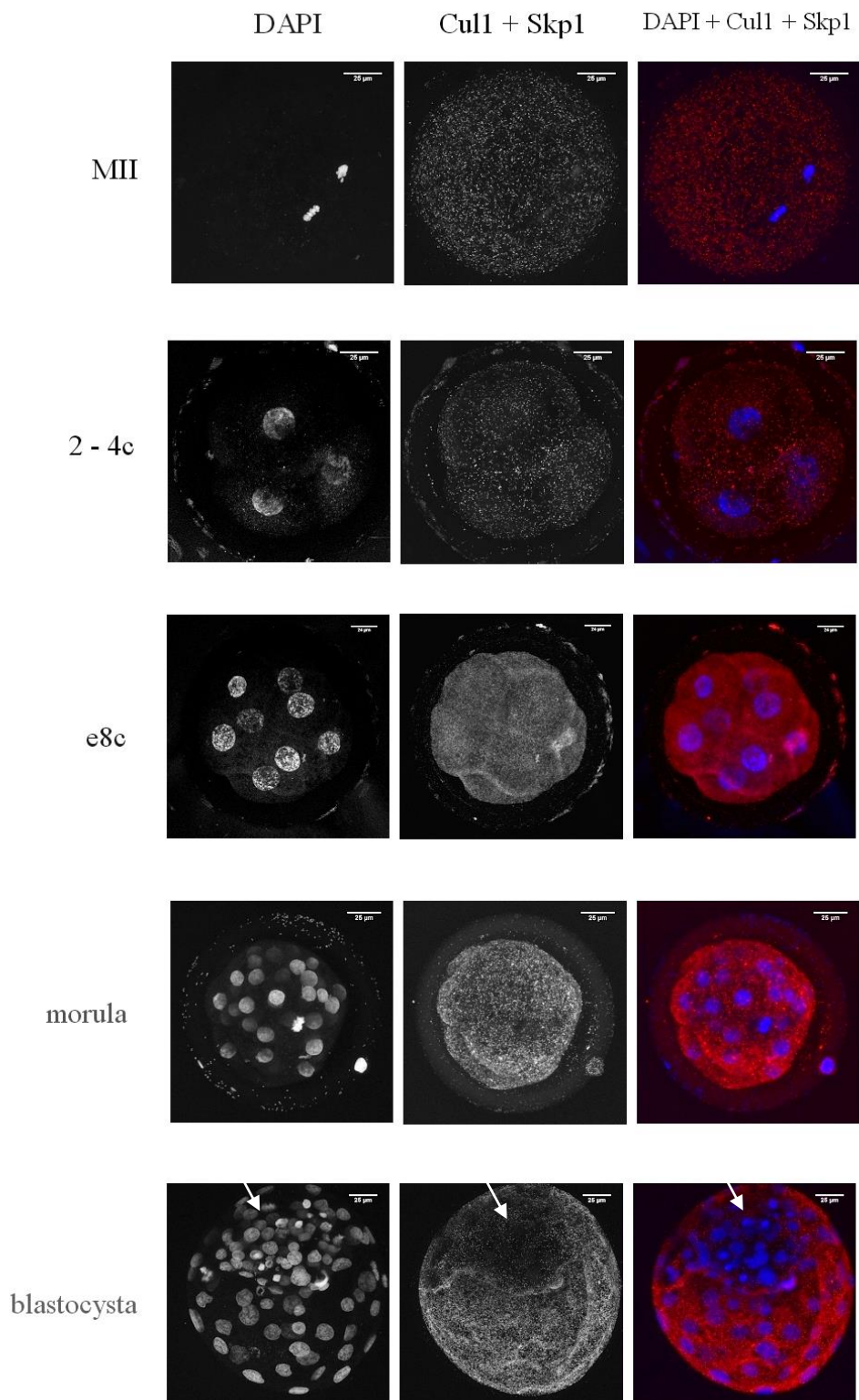
Při analýze signálu byla zjištěna nejvyšší relativní hodnota u oocytu v MII fázi. Statistická analýza prokázala statisticky významný rozdíl mezi MII oocyty a embryi v 4buněčném stádiu, na rozdíl od ostatních stádií, kde se žádný statisticky významný rozdíl neprokázal. Aktivita SCF komplexu byla v průběhu preimplantačního vývoje konstantní. Výsledky byly zaneseny do následujícího grafu (Obr. 13).

Obr. 13 Míra relativní fluorescence



Statisticky patrný rozdíl byl zjištěn mezi skupinami MII a 4c. Graf znázorňuje průměr ± směrodatnou odchylku. MII oocyty, 2 – 4buněčná, pozdní 8buněčná embrya a embrya ve stádiu moruly byla snímána po skupinách a jako 100 % byl brán průměr hodnoty fluorescence morul v každé skupině.

Obr. 14 Výsledky PLA metody



První sloupec zobrazuje barvení jader (DAPI), v druhém sloupci je PLA signál vyznačující lokalizaci interakcí mezi Cul1 a Skp1. Jádra jsou označena modře (DAPI), interakce proteinů červeně (Alexa Fluor 594). U embryí ve stádiu blastocysty šipka označuje místo formace ICM, kde je zřetelně viditelný úbytek signálu interagujících proteinů. Měřítka odpovídá 25 μ m.

6. Diskuze

Pro tuto práci byl zvolen bovinní model z důvodu větší podobnosti lidskému preimplantačnímu vývoji, oproti často využívanému myšínmu modelu. Lidský a bovinní vývoj je podobný v načasování epigenetické reprogramace a aktivace embryonálního genomu, proto se předpokládá, že výsledky studií na bovinních embryích mohou být cenné i pro hodnocení lidských s cílem vylepšování technologií při asistované reprodukce (Kues et al., 2008).

V průběhu preimplantačního vývoje se objevuje několik kritických bodů, které jsou klíčové pro pozdější úspěšný vývoj a vznik kvalitního embrya. Mezi tyto události patří mimo jiné i aktivace embryonálního genomu, při které embryo začíná produkovat své vlastní transkripty. Tento proces je složen z několika fází, mezi které patří i degradace maternálních transkriptů. Přestože informace o degradaci maternálních mRNA začínají být jasnější, o degradaci maternálních proteinů toho prozatím ještě není příliš známo. I když je jasné, že pro úspěšnou EGA je nutné odstranění maternální mRNA, nutnost degradace maternálních proteinů prozatím nebyla potvrzena.

Jelikož se na degradaci velkého množství proteinů v buňce podílí ubikvitin – proteazomový systém, do kterého jsou proteiny cíleny ve významné míře díky SCF komplexu, předpokládali jsme, že právě tento komplex se účastní i degradace maternálních proteinů.

Doposud nebylo zkoumáno, jakým způsobem se mění aktivita SCF komplexu v průběhu preimplantačního vývoje. Existují však studie, které se zabývají jednotlivými komponenty SCF komplexu a zjišťují jejich význam při vývoji embrya.

Pomocí imunofluorescence jsme sledovali výskyt Cul1, Skp1 a Rbx1, jakožto neměnných složek SCF komplexu. Výsledky imunofluorescenční metody naznačují, že všechny dílčí proteiny SCF komplexu můžeme detekovat u všech stádií vyvíjejícího se embrya. U embryí ve stádiu blastocysty nebyl viditelný žádný markantní rozdíl v rozmístění Rbx1 proteinu. V případě Cul1 a Skp1 se objevil nepatrný rozdíl mezi ICM a TE, kdy je možné sledovat mírné snížení intenzity signálu. Po použití metody PLA, která měla za úkol detekovat interakci mezi Cul1 a Skp1, se projevil značný rozdíl mezi ICM a TE. V buňkách ICM byl PLA signál výrazně méně viditelný než v TE. Buňky TE podléhají rychlému dělení, protože je jejich úkolem vybudování extraembryonální tkáně tvořící placentu. Jelikož naše výsledky dokazují takto nerovnoměrné rozložení interagujících proteinů, naznačují důležitou roli SCF komplexu při formování placenty. Sutovsky et al. (2001) prokázali, že se v TE objevuje velké množství proteolýzy závislé na ubikvitinu, avšak ne v ICM, což naznačuje

kritickou úlohu proteolýzy ve vývoji extraembryonální tkáně. Toto tvrzení potvrzují i výsledky našeho výzkumu prokazující sníženou aktivitu SCF komplexu v ICM na rozdíl od TE.

Imunofluorescenční detekce proteinu Rbx1 prokazuje jeho rovnoměrné rozmístění po celém embryu, což potvrzuje i Tan et al. (2009), který uvádí, že při narušení exprese Rbx1 u myši nastává embryonální letalita jako následek porušení proliferace. V této chvíli pak dochází k hromadění cyklin dependentní kinázy p27, která za normálních okolností v embryu není přítomná. Rbx1 má tedy nezastupitelnou roli při zajišťování proliferace buněk tím, že brání hromadění p27 a proto je jeho přítomnost v embryonálním vývoji nezbytná (Tan et al., 2009). Rbx1 byl také detekován v jádře a to hned v počátcích vývoje od 2 – 4buněčného stádia.

Skp1 protein byl rovnoměrně rozmístěn po celém embryu v průběhu časného vývoje. Dále byl také lokalizován ve velkém množství i v *zona pellucida*, kde byla jeho přítomnost potvrzena metodou western-blot (provedenou Mgr. Toralovou). V pozdním 8buněčném stádiu se Skp1 začíná objevovat také v jádře buněk.

Vodickova Kepkova et al. (2010) prokázali, že v průběhu preimplantačního vývoje skotu dochází k výskytu dvou členů cullinové rodiny. Do stádia časného 8buněčného embrya byl detekován cullin 1-like, transkript varianty 1, zatímco od tohoto stádia se objevuje cullin 1 transkripční varianty 3 (Vodickova Kepkova et al., 2010). Jedná se o dva různé geny umístěné v různých oblastech chromozomu 4. Autoři přisuzují tuto záměnu faktu, že cullin 1-like představuje s největší pravděpodobností maternální transkript vytvořený v průběhu oogeneze a po fertilizaci nastává jeho degradace a nahrazování transkriptem cullin 1 v období EGA. Transkripce cullin 1 je aktivována již v 4buněčném stádiu (v přípravě k publikaci), což naznačuje, že se jedná o transkript potřebný pro vstup embrya do EGA. Cullin 1 se vyskytuje také u somatických buněk, zatímco cullin 1-like byl doposud nalezen pouze u oocytů a časných preimplantačních embryí. Z této studie byly také přejety výsledky imunofluorescence Cull1 prováděné u oocytů a u embryí do stádia blastocysty. Vodickova Kepkova et al. (2010) uvádí, že nebyly detekované žádné změny v množství Cull1 proteinu v průběhu tohoto sledovaného období, i přesto, že dochází k přechodu mezi dvěma uvedenými transkripty. Nezbytnost Cull1 v průběhu celého preimplantačního vývoje dokazuje i Wang et al. (1999) a Dealy et al. (1999), kteří zjistili, že při delecí Cull1 dochází k embryonální letalitě a také zaznamenali hromadění cyklinu E u myši. Cull1 se ve vyšších vývojových stádiích rovněž objevuje i v jádře embryí.

Analýza intenzity PLA signálu prokázala, že nejvyšší úroveň signálu se objevuje u oocyty v MII fázi. Mezi tímto stádiem a embryem ve 2 – 4buněčném stádiu byl prokázán statisticky významný rozdíl, který u ostatních stádií nebyl zaznamenán.

Všeobecně můžeme říci, že lokalizace Cul1, Rbx1 a Skp1 se v průběhu preimplantačního vývoje významně nemění. Ve stádiu blastocysty byla detekována mírná změna v lokalizaci Cul1 a Skp1, která byla potvrzena PLA metodou určující interakci mezi Cul1 a Skp1. Aktivita SCF komplexu je v tomto vývojovém stádiu nerovnoměrná. K zjištění, do jaké míry je SCF komplex nezbytný pro EGA a další embryonální vývoj je nutné ještě další analýzy. Proto lze naše výsledky považovat jako podklady k dalšímu výzkumu.

7. Závěr

Cílem této práce bylo potvrzení hypotézy, že aktivita SCF komplexu stoupá po EGA bovinního embrya a následně dochází ve stádiu blastocysty ke zvýšené aktivitě v oblasti trofoektodermu. Tato hypotéza byla ověřována pomocí imunofluorescenční metody a metody PLA u oocytů v MII fázi, 2 – 4buněčných, časných 8buněčných embryí, embryí ve stádiu moruly a blastocysty.

Podářilo se prokázat, že dílčí proteiny SCF komplexu jsou přítomny v každé fázi časného embryonálního vývoje. Naše hypotéza o vzrůstající aktivitě SCF komplexu po EGA nebyla potvrzena z toho důvodu, že statistická analýza neprokázala statisticky významné rozdíly ve velikosti signálů u vyvíjejících se embryí. Naopak bylo zjiřtěno, že míra aktivity SCF komplexu během časné embryogeneze je poměrně stabilní a nejvyšší aktivitu má v MII oocytech. To naznačuje, že k degradaci proteinů pomocí SCF komplexu dochází během celého preimplantačního vývoje a není specificky navýřena v době okolo EGA. Povedlo se však potvrdit hypotézu o zvýšené aktivitě tohoto komplexu v trofoektodermu blastocyst. Nerovnoměrné rozložení, jehož následkem SCF komplex převládá u TE, je s největří pravděpodobností zapříčiněno zvýřenou proteolýzou závislou na ubikvitinu v proliferujících buňkách vznikající extraembryonální tkáně.

K podrobnějšimu objasnění všech funkcí SCF komplexu v průběhu preimplantačního vývoje skotu je však nutný další výzkum.

8. Seznam citované literatury

- Adams, J. 2003. The proteasome: structure, function, and role in the cell. *Cancer Treatment Reviews*. 29. 3-9.
- Achache, H., Revel, A. 2006. Endometrial receptivity markers, the journey to successful embryo implantation. *Human Reproduction Update*. 12 (6). 731-746.
- Alizadeh, Z., Kageyama, S., Aoki, F. 2005. Degradation of Maternal mRNA in Mouse Embryos: Selective Degradation of Specific mRNAs After Fertilization. *Molecular Reproduction and Development*. 72 (3). 281-290.
- Avilion, A. A., Nicolis, S. K., Pevny, L. H., Perez, L., Vivian, N., Lovell-Badge, R. 2002. Multipotent cell lineages in early mouse development depend on SOX2 function. *Genes & Development*. 17. 126-140.
- Bai, C., Sen, P., Hofmann, K., Ma, L., Goebel, M., Harper, J. W., Elledge, S. J. 1996. SKP1 connects cell cycle regulators to the ubiquitin proteolysis machinery through a novel motif, the F-box. *Cell*. 86 (2). 263-274.
- Ball, P. J. H., Peters, A. R. 2004. *Reproduction in Cattle* Third edition. Blackwell Publishing. Oxford. p. 252. ISBN: 1405115459.
- Barcroft, L. C., Hay-Schmidt, A., Caveney, A., Gilfoyle, E., Overstrom, E. W., Hyttel, P., Watson, A. J. 1998. Trophectoderm differentiation in the bovine embryo: characterization of a polarized epithelium. *Journal of Reproduction and Fertility*. 114. 327-339.
- Barnes, F. L., Eyestone, W. H. 1990. Early cleavage and the maternal zygotic transition in bovine embryos. *Theriogenology*. 33 (1). 141-152.
- Baugh, J. M., Viktorova, E. G., Pilipenko, E. V. 2009. Proteasomes Can Degrade a Significant Proportion of Cellular Proteins Independent of Ubiquitination. *Journal of Molecular Biology*. 386 (3). 814-827.
- Berg, D. K., Smith, C. S., Pearton, D. J., Wells, D. N., Broadhurst, R., Donnison, M., Pfeffer, P. L. 2011. Trophectoderm lineage determination in cattle. *Developmental Cell*. 20. 244-255.
- Betts, D. H., King, W. A. 2001. Genetic regulation of embryo death and senescence. *Theriogenology*. 55 (1). 171-191.
- Bó, G. A., Mapletoft, R. J. 2013. Evaluation and classification of bovine embryos. *Animal Reproduction*. 10 (3). 344-348.

- Boni, R., Tosti, E., Roviello, S., Dale, B. 1999. Intercellular communication in in vivo- and in vitro-produced bovine embryos. *Biology of Reproduction*. 61. 1050-1055.
- Bornstein, G., Ganoth, D., Hershko, A. 2006. Regulation of neddylation and deneddylation of cullin1 in SCFSkp2 ubiquitin ligase by F-box protein and substrate. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 103 (31). 11515-11520.
- Bosu, D. R., Kipreos, E. T. 2008. Cullin-RING ubiquitin ligases: global regulation and activation cycles. *Cell Division*. 3.
- Boya, P., Gonzalez-Polo, R. A., Casares, N., Perfettini, J. L., Dessen P., Larochette, N., Metivier, D., Meley, D., Souquere, S., Yoshimori, T., Pierron, G., Codogno, P., Kroemer, G. 2005. Inhibition of Macroautophagy Triggers Apoptosis. *Molecular and Cellular Biology*. 25 (3). 1025-1040.
- Braude, P., Bolton, V., Moore, S. 1988. Human gene expression first occurs between the four- and eight-cell stages of preimplantation development. *Nature*. 332. 459-461.
- Bultman, S. J., Gebuhr, T. C., Pan, H., Svoboda, P., Schultz, R. M., Magnuson, T. 2006. Maternal BRG1 regulates zygotic genome activation in the mouse. *Genes & Development*. 20. 1744-1754.
- Ciechanover, A. 1998. The ubiquitin–proteasome pathway: on protein death and cell life. *The EMBO Journal*. 17 (24). 7151-7160.
- Cope, G. A., Deshaies, R. J. 2003. COP9 Signalosome: A Multifunctional Regulator of SCF and Other Cullin-Based Ubiquitin Ligases. *Cell*. 114. 663-671.
- Craig, K. L., Tyers, M. 1999. The F-box: a new motif for ubiquitin dependent proteolysis in cell cycle regulation and signal transduction. *Progress in Biophysics & Molecular Biology*. 72. 299-328.
- Dealy, M. J., Nguyen, K. V. T., Lo, J., Gstaiger, M., Krek, W., Elson, D., Arbeit, J., Kipreos, E. T., Johnson, R. S. 1999. Loss of Cull1 results in early embryonic lethality and dysregulation of cyclin E. *Nature Genetics*. 23 (2). 245-248.
- Denti, S., Fernandez-Sanchez, M. E., Rogge, L., Bianchi, E. 2006. The COP9 Signalosome Regulates Skp2 Levels and Proliferation of Human Cells. *The Journal of Biological Chemistry*. 281 (43). 32188-32196.
- DeRenzo, C., Seydoux, G. 2004. A clean start: degradation of maternal proteins at the oocyte-to-embryo transition. *Trends in Cell Biology*. 14 (8). 420-426.
- Deshaies, R. J. 1999. SCF and Cullin/RING H2-based ubiquitin ligases. *Annual Review of Cell and Developmental Biology*. 15. 435-467.

- Ducibella, T. 1996. The cortical reaction and development of activation competence in mammalian oocytes. *Human Reproduction Update*. 2 (1). 29-42.
- Eckert, J. J., Fleming, T. P. 2008. Tight junction biogenesis during early development. *Biochimica et Biophysica Acta-Biomembranes*. 1778 (3). 717-728.
- Fishman-Jacob, T., Reznichenko, L., Youdim, M. B. H., Mandel, S. A. 2009. A Sporadic Parkinson Disease Model via Silencing of the Ubiquitin-Proteasome/E3 Ligase Component SKP1A. *The Journal of Biological Chemistry*. 284 (47). 32835–32845.
- Fleming, T. P., Sheth, B., Fesenko, I. 2001. Cell adhesion in the preimplantation mammalian embryo and its role in trophectoderm differentiation and blastocyst morphogenesis. *Frontiers in Bioscience*. 6. d1000-1007.
- Forgacs, G., Newman, S. A. 2005. *Biological physics of the developing embryo*. Cambridge University Press. p. 27. ISBN: 9780521783378.
- Freed, E., Lacey, K. R., Huie, P., Lyapina, S. A., Deshaies, R. J., Stearns, T., Jackson, P. K. 1999. Components of an SCF ubiquitin ligase localize to the centrosome and regulate the centrosome duplication cycle. *Genes & development*. 13. 2242-2257.
- Frei, R. E., Schultz, G. A., Church, R. B. 1989. Qualitative and quantitative changes in protein synthesis occur at the 8-16-cell stage of embryogenesis in the cow. *Journal of Reproduction and Fertility*. 86. 637-641.
- Furukawa, M., Zhang, Y., McCarville, J., Ohta, T., Xiong, Y. 2000. The CUL-1 C-Terminal Sequence and ROC1 Are Required for Efficient Nuclear Accumulation, NEDD8 Modification and Ubiquitin Ligase Activity of CUL1. *Molecular and cellular biology*. 20 (21). 8185-8197.
- Galan, J. M., Peter, M. 1999. Ubiquitin-dependent degradation of multiple F-box proteins by an autocatalytic mechanism. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 96 (16). 9124-9129.
- Galan, J. M., Wiederkehr, A., Seol, J. H., Haguenaer-Tsapis, R., Deshaies, R. J., Riezman, H., Peter, M. 2001. Skp1p and the F-Box Protein Rcy1p Form a Non-SCF Complex Involved in Recycling of the SNARE Snc1p in Yeast. *Molecular and Cellular Biology*. 21 (9). 3105-3117.
- Gilbert, I., Scantland S., Sylvestre, E. L., Gravel, C., Laflamme, I., Sirard M. A., Robert., C. 2009. The Dynamics of Gene Products Fluctuation During Bovine Pre-Hatching Development. *Molecular Reproduction and Development*. 76. 762-772.
- Glickman, M., Ciechanoer, A. 2002. The Ubiquitin-Proteasome Proteolytic Pathway: Destruction for the Sake of Construction. *Physiological Reviews*. 82. 373-428.

- Graf, A., Krebs, S., Heininen-Brown, M., Zakhartchenko, V., Blum, H., Wolf, E. 2014. Genome activation in bovine embryos: Review of the literature and new insights from RNA sequencing experiments. *Animal Reproduction Science*. 149. 46-58.
- Gulyas, B. J. 1975. A reexamination of cleavage patterns in eutherian mammalian eggs: rotation of blastomere pairs during second cleavage in the rabbit. *Journal of Experimental Zoology*. 193 (2). 235-48.
- Hatakeyama, S., Nakayama, K. I. 2003. U-box proteins as a new family of ubiquitin ligases. *Biochemical and Biophysical Research Communications*. 302. 635-645.
- Heinemeyer, W., Fischer, M., Krimmer, T., Stachon, U., Wolf, D. H. 1997. The Active Sites of the Eukaryotic 20 S Proteasome and Their Involvement in Subunit Precursor Processing. *The Journal of Biological Chemistry*. 272 (40). 25200-25209.
- Hindley, C. J., McDowell, G. S., Wise, H., Philpott, A. 2011. Regulation of cell fate determination by Skp1-Cullin1-F-box (SCF) E3 ubiquitin ligases. *International Journal of Developmental Biology*. 55. 249-260.
- Hol, E. M., van Leeuwen, F. W., Fischer, D. F. 2005. The proteasome and Alzheimer's disease and Parkinson's disease : lessons from ubiquitin B+1. *Trends in Molecular Medicine*. 11 (11). 488-495.
- Holm, P., Shukri, N. N., Vajta, G., Booth, P., Bendixen, C., Callesen, H. 1998. Developmental kinetics of the first cell cycles of bovine in vitro produced embryos in relation to their in vitro viability and sex. *Theriogenology*. 50 (8). 1285-1299.
- Huang, T. T., D'Andrea, A. D. 2006. Regulation of DNA repair by ubiquitylation. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*. 7 (5). 323-334.
- Chew, E. H., Poobalasingam, T., Hawkey, C. J., Hagen, T. 2007. Characterization of cullin-based E3 ubiquitin ligases in intact mammalian cells - Evidence for cullin dimerization. *Cellular Signalling*. 19 (5). 1071-1080.
- Jackson, P. K., Eldridge, A. G., Freed, E., Furstenthal, L., Hsu, J. Y., Kaiser, B. K., Reimann, J. D. R. 2000. The lore of the RINGs: substrate recognition and catalysis by ubiquitin ligases. *Trends in Cell Biology*. 10 (10). 429-439.
- Jäger, S., Groll, M., Huber, R., Wolf, D. H., Heinemeyer, W. 1999. Proteasome beta-type subunits: Unequal roles of propeptides in core particle maturation and a hierarchy of active site function. *Journal of Molecular Biology*. 291. 997-1013.
- Jia, L., Sun, Y. 2009. RBX1/ROC1-SCF E3 ubiquitin ligase is required for mouse embryogenesis and cancer cell survival. *Cell Division*. 4.

- Jourdain, I., Spielewoy, N., Thompson, J., Dhut, S., Yates, J. R., Toda, T. 2009. Identification of a conserved F-box protein 6 interactor essential for endocytosis and cytokinesis in fission yeast. *Biochemical Journal*. 420. 169-177.
- Jung, T., Catalgol, B., Grune, T. 2009. The proteasomal system. *Molecular Aspects of Medicine*. 30. 191-296.
- Kanka, J. 2003. Gene expression and chromatin structure in the pre-implantation embryo. *Theriogenology*. 59. 3-19.
- Kanka, J., Nemcova, L., Toralova, T., Vodickova-Kepkova, K., Vodicka, P., Jeseta, M., Machatkova, M. 2012. Association of the transcription profile of bovine oocytes and embryos with developmental potential. *Animal Reproduction Science*. 134. 29-35.
- Karabinova, P., Kubelka, M., Susor, A. 2011. Proteasomal degradation of ubiquitinated proteins in oocyte meiosis and fertilization in mammals. *Cell and Tissue Research*. 346 (1). 1-9.
- Kirchhof, N., Carnwath, J. W., Lemme, E., Anastassiadis, K., Schöler, H., Niemann, H. 2000. Expression pattern of oct-4 in preimplantation embryos of different species. *Biology of Reproduction*. 63. 1698-1705.
- Kues, W. A., Sudheer, S., Herrmann, D., Carnwath, J. W., Havlicek, V., Besenfelder, U., Lehrach, H., Adjaye, J., Niemann, H. 2008. Genome-wide expression profiling reveals distinct clusters of transcriptional regulation during bovine preimplantation development in vivo. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 105. 19768-19773.
- Lecker, S. H., Goldberg, A. L., Mitch, W. E. 2006. Protein Degradation by the Ubiquitin-Proteasome Pathway in Normal and Disease States. *Journal of the American Society of Nephrology*. 17. 1807-1819.
- Lequarre, A. S., Marchandise, J., Moreau, B., Massip, A., Donnay, I. 2003. Cell cycle duration at the time of maternal zygotic transition for in vitro produced bovine embryos: effect of oxygen tension and transcription inhibition. *Biology of Reproduction*. 69 (5). 1707-1713.
- Li, L., Lu, X., Dean, J. 2013. The maternal to zygotic transition in mammals. *Molecular Aspects of Medicine*. 34. 918-938.
- Li, Y., Hao, B. 2010. Structural Basis of Dimerization-dependent Ubiquitination by the SCFFbx4 Ubiquitin Ligase. *The journal of biological chemistry*. 285 (18). 13896-13906.

- Madgwick, S., Hansen, D. V., Levasseur, M., Jackson, P. K., Jones, K. T. 2006. Mouse Emi2 is required to enter meiosis II by reestablishing cyclin B1 during interkinesis. *The Journal of Cell Biology*. 174 (6). 791–801.
- Matějková, J., Kubiczková, L., Sedlaříková, L., Potáčová, A., Hájek, R., Ševčíková, S. 2013. Degradace proteinů ubikvitin-proteazomovou dráhou. *Klinická onkologie*. 26 (4). 251-256.
- McConnell, J., Petrie, L., Stennard, F., Ryan, K., Nichols, J. 2005. Eomesodermin is expressed in mouse oocytes and pre-implantation embryos. *Molecular Reproduction and Development*. 71. 399-404.
- Meirelles F. V., Caetano, A. R., Watanabe, Y. F., Ripamonte, P., Carambula, S. F., Merighe, G. K., Garcia, S. M. 2004. Genome activation and developmental block in bovine embryos. *Animal Reproduction Science*. 82-83. 13-20.
- Memili E., First N. L. 1999. Control of gene expression at the onset of bovine embryonic development. *Biology of Reproduction*. 61 (5). 1198-1207.
- Memili, E., First, N. L. 2000. Zygotic and embryonic gene expression in cow: a review of timing and mechanisms of early gene expression as compared with other species. *Zygote*. 8. 87-96.
- Merlet, J., Burger, J., Gomes, J. E., Pintard, L. 2009. Regulation of cullin-RING E3 ubiquitin-ligases by neddylation and dimerization. *Cellular and Molecular Life Sciences*. 66 (11-12). 1924-1938.
- Minami, N., Suzuki, T., Tsukamoto, S. 2007. Zygotic gene activation and maternal factors in mammals. *Journal of Reproduction and Development*. 53 (4). 707-715.
- Nandi, D., Tahiliani, P., Kumar, A., Chandu, D. 2006. The ubiquitin-proteasome system. *Journal of Biosciences*. 31. 137-155.
- Niemann, H., Wrenzycki, C. 2000. Alterations of expression of developmentally important genes in preimplantation bovine embryos by in vitro culture conditions: implications for subsequent development. *Theriogenology*. 53 (1). 21-34.
- Nishioka, N., Yamamoto, S., Kiyonari, H., Sato, H., Sawada, A., Ota, M., Nakao, K., Sasaki, H. 2008. *Mechanisms of Development*. 125 (3-4). 270-283.
- Niwa, H., Toyooka, Y., Shimosato, D., Strumpf, D., Takahashi, K., Yagi, R., Rossant, J. 2005. Interaction between Oct3/4 and Cdx2 determines trophoblast differentiation. *Cell*. 123. 917-929.
- O'Sullivan, C. M., Rancourt, S. L., Liu S. Y., Rancourt, D. E. 2001. Anovel murine tryptase involved in blastocyst hatching and outgrowth. *Reproduction*. 122. 61-71.

- Pan, Z. Q., Kentsis, A., Dias, D. C., Yamoah, K., Wu, K. 2004. Nedd8 on cullin: building an expressway to protein destruction. *Oncogene*. 23. 1985-1997.
- Pavlok A., Lucas-Hahn A., Niemann H. 1992. Fertilization and developmental competence of bovine oocytes derived from different categories of antral follicles. *Molecular Reproduction and Development*. 31. 63-67.
- Petroski, M. D., Deshaies, R. J. 2005. Function and Regulation of Cullin – Ring Ubiquitin Ligases. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*. 6 (1). 9-20.
- Pickart, C. M., Eddins, M. J. 2004. Ubiquitin: structures, functions, mechanisms. *Biochimica et Biophysica Acta*. 1695. 55-72.
- Pickart, C. M., Fushman, D. 2004. Polyubiquitin chains: polymeric protein signals. *Current Opinion in Chemical Biology*. 8. 610-616.
- Piva, R., Liu, J., Chiarle, R., Podda, A., Pagano, M., Inghirami, G. 2002. In Vivo Interference with Skp1 Function Leads to Genetic Instability and Neoplastic Transformation. *Molecular and cellular biology*. 22 (23). 8375-8387.
- Rabut, G., Peter, M. 2008. Function and regulation of protein neddylation - 'Protein Modifications: Beyond the Usual Suspects' review series. *EMBO REPORTS*. 9 (10). 969-976.
- Reeve, W. J. D., Ziomek, C. A. 1981. Distribution of microvilli on dissociated blastomeres from mouse embryos: evidence for surface polarization at compaction. *Journal of Embryology and Experimental Morphology*. 62. 339-350.
- Sharon, M., Taverner, T., Ambroggio, X. I., Deshaies, R. J., Robinson, C. V. 2006. Structural Organization of the 19S Proteasome Lid: Insights from MS of Intact Complexes. *Plos Biology*. 4 (8). 1314-1323.
- Schier, A. F. 2007. The maternal-zygotic transition: death and birth of RNAs. *Science*. 316. 406-407.
- Skaar, J. R., Pagano, M. 2009. Control of cell growth by the SCF and APC/C ubiquitin ligases. *Current Opinion in Cell Biology*. 21 (6). 816-824.
- Skowyra, D., Craig, K. L., Tyers, M., Elledge, S., Harper, J. W. 1997. F-Box Proteins Are Receptors that Recruit Phosphorylated Substrates to the SCF Ubiquitin-Ligase Complex. *Cell*. 91. 209-219.
- Srayko, M., Buster, D. W., Bazirgan, O. A., McNally, F. J., Mains, P. E. 2000. MEI-1/MEI-2 katanin-like microtubule severing activity is required for *Caenorhabditis elegans* meiosis. *Genes & Development*. 14 (9). 1072-1084.

- Strumpf, D., Mao, C. A., Yamanaka, Y., Ralston, A., Chawengsaksophak, K., Beck, F., Rossant, J. 2005. Cdx2 is required for correct cell fate specification and differentiation of trophectoderm in the mouse blastocyst. *Development*. 132. 2093-2102.
- Sutovsky, P., Motlik, J., Neuber, E., Pavlok, A., Schatten, G., Palecek, J., Hyttel, P., Adebayo, O. T., Adwan, K., Alberio, R., Bagis, H., Bataineh, Z., Bjerregaard, B., Bodo, S., Bryja, V., Carrington, M., Couf, M., de la Fuente, R., Diblik, J., Esner, M., Forejt, J., Fulka, J. Jr., Geussova, G., Gjorret, J. O., Libik, M., Hampl, A., Hassane, M. S., Houshmand, M., Hozak, P., Jezova, M., Kania, G., Kanka, J., Kandil, O. M., Kishimoto, T., Klima, J., Kohoutek, J., Kopska, T., Kubelka, M., Lapathitis, G., Laurincik, J., Lefevre, B., Mihalik, J., Novakova, M., Oko, R., Omelka, R., Owiny, D., Pachernik, J., Pacholikova, J., Peknicova, J., Pesty, A., Ponya, Z., Preclikova, H., Sloskova, A., Svoboda, P., Strejcek, F., Toth, S., Tepla, O., Valdivia, M., Vodicka, P., Zudova, D. 2001. Accumulation of the proteolytic marker peptide ubiquitin in the trophoblast of mammalian blastocysts. *Cloning Stem Cells*. 3 (3). 157-161.
- Tan, M., Davis, S. W., Saunders, T. L., Zhu, Y., Sun, Y. 2009. RBX1/ROC1 disruption results in early embryonic lethality due to proliferation failure, partially rescued by simultaneous loss of p27. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 106 (15). 6203-6208.
- Tang, F., Kaneda, M., O'Carroll, D., Hajkova, P., Barton, S. C., Sun, Y. A., Lee, C., Tarakhovsky, A., Lao, K. Q., Surani, M. A. 2007. Maternal microRNAs are essential for mouse zygotic development. *Genes & Development*. 21 (6). 644-648.
- Telford, N. A., Watson, A. J., Schultz, G. A. 1990. Transition from maternal to embryonic control in early mammalian development: a comparison of several species. *Molecular Reproduction and Development*. 26. 90-100.
- Thrower, J. S., Hoffman, L., Rechsteiner, M., Pickart, C. M. 2000. Recognition of the polyubiquitin proteolytic signal. *The EMBO Journal*. 19 (1). 94-102.
- Tunquist, B. J., Maller, J. L. 2003. Under arrest: cytostatic factor (CSF) mediated metaphase arrest in vertebrate eggs. *Genes & Development*. 17. 683-710.
- Tyers, M., Jorgensen, P. 2000. Proteolysis and the cell cycle: with this RING I do thee destroy. *Current Opinion in Genetics & Development*. 10 (1). 54-64.
- Van Soom, A., Boerjan, M. L., Bols, P. E., Vanroose, G., Lein, A., Coryn, M., de Kruif, A. 1997. Timing of compaction and inner cell allocation in bovine embryos produced in vivo after superovulation. *Biology of Reproduction*. 57 (5). 1041-1049.

- Varshavsky, A. 1997. The ubiquitin system. *Trends in Biochemical Sciences*. 22 (10). 383-387.
- Verlhac, M. H., Terret, M. E., Pintard, L. 2010. Control of the oocyte-to-embryo transition by the ubiquitin-proteolytic system in mouse and *C. elegans*. *Current Opinion in Cell Biology*. 22. 758-763.
- Vigneault, C., Gravel, C., Vallée, M., McGraw, S., Sirard, M. A. 2009. Unveiling the bovine embryo transcriptome during the maternal-to-embryonic transition. *Reproduction*. 137 (2). 245-257.
- Vodickova Kepkova, K., Vodicka, P., Toralova, T., Lopatarova, M., Cech, S., Dolezel, R., Havlicek, V., Besenfelder, U., Kuzmany, A., Sirard, M. A., Laurincik, J., Kanka, J. 2010. Transcriptomic analysis of in vivo and in vitro produced bovine embryos revealed a developmental change in cullin 1 expression during maternal-to-embryonic transition. *Theriogenology*. 75. 1582-1595.
- Walser, C. B., Lipshitz, H. D. 2011. Transcript clearance during the maternal-to-zygotic transition. *Current Opinion in Genetics & Development*. 21 (4). 431-443.
- Wang, Y., Penfold, S., Tang, X., Hattori, N., Riley, P., Harper, J. W., Cross, J. C., Tyers, M. 1999. Deletion of the Cull1 gene in mice causes arrest in early embryogenesis and accumulation of cyclin E. *Current Biology*. 9. 1191-1194.
- Watson, A. J., Westhusin, M. E., De Sousa, P. A., Betts, D. H., Barcroft, L. C. 1999. Gene expression regulating blastocyst formation. *Theriogenology*. 51. 117-133.
- Weissman, A. M. 2001. Themes and Variations on Ubiquitylation. *Molecular cell biology*. 2. 169-178.
- Weissman, A. M., Shabek, N., Ciechanover, A. 2011. The predator becomes the prey: regulating the ubiquitin system by ubiquitylation and degradation. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*. 12 (9). 605-620.
- Willems, A. R., Schwab, M., Tyers, M. 2004. A hitchhiker's guide to the cullin ubiquitin ligases: SCF and its kin. *Biochimica et Biophysica Acta-Molecular Cell Research*. 1695 (1-3). 133-170.
- Winkel, G. K., Ferguson, J. E., Takeichi, M. and Nuccitelli, R. 1990. Activation of protein kinase C triggers premature compaction in the 4-cell stage mouse embryo. *Developmental Biology*. 138 (1). 1-15.
- Wójcik, C., DeMartino, G. N. 2003. Intracellular localization of proteasomes. *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology*. 35. 579-589.

- Wolf, D. H., Hilt, W. 2004. The proteasome: a proteolytic nanomachine of cell regulation and waste disposal. *Biochimica et Biophysica Acta*. 1695. 19-31.
- Wrenzycki, C., Herrmann, D., Niemann, H. 2007. Messenger RNA in oocytes and embryos in relation to embryo viability. *Theriogenology*. 68. 77-83.
- Yokoi, H., Natsuyama, S., Iwai, M., Noda, Y., Mori, T., Mori, K. J., Fujita, K., Nakayama, H., Fujita, J. 1993. Non-radioisotopic quantitative RT-PCR to detect changes in mRNA levels during early mouse embryo development. *Biochemical and Biophysical Research Communications*. 195 (2). 769-775.
- Zheng, N., Schulman, B. A., Song, L., Miller, J. J., Jeffrey, P. D., Wang, P., Chu, C., Koepp, D. M., Elledge, S. J., Pagano, M., Conaway, R. C., Coaway, J. W., Harper, J. W., Pavletich, N. P. 2002. Structure of the Cul1-Rbx1-Skp1-F box^{Skp2} SCF ubiquitin ligase komplex. *Nature*. 416. 703-709.
- Zhou, L., Yang, Y., Zhang, J., Guo, X., Bi, Y., Li, X., Zhang, P., Zhang, J., Lin, M., Zhou, Z., Shen, R., Guo, X., Huo, R., Ling, X., Sha, J. 2013b. The Role of RING Box Protein 1 in Mouse Oocyte Meiotic Maturation. *PLOS ONE*. 8 (7).
- Zhou, W. H., Wei, W., Sun, Y. 2013a. Genetically engineered mouse models for functional studies of SKP1-CUL1-F-box-protein (SCF) E3 ubiquitin ligases. *Cell Research*. 23 (5). 599-619.

9. Seznam zkratek

- APC/C – anafázi podporující komplex/cyklozom (anaphase-promoting complex or cyclosome)
- ATP – adenosin trifosfát
- BRG1 – faktor představující chromatin (chromatin – remodeling factor)
- BSA – bovinní sérový albumin (bovine serum albumine)
- CAND1 – Cullin-associated and neddylation dissociated protein 1
- Cdc20 – protein 20 buněčného cyklu (cell-division cycle protein 20)
- Cdk – kináza závislá na cyklinu (cyclin dependent kinase)
- Cdk1 – cyklin-dependentní kináza 1
- CdkA – cyklin-dependentní kináza A
- COP9 signalozom – Constitutive photomorphogenesis 9 signalosome
- CRLs – cullin-RING ubikvitin ligázy (cullin-RING ubiquitin ligases)
- Cul – cullin
- E – embryonic day
- E1 – ubikvitin-aktivující enzym
- E2 – ubikvitin-přenášející enzym
- E3 – ubikvitin-ligáza
- EGA – aktivace embryonálního genomu (embryonic genome activation)
- Emi1,2 – časný inhibitor mitózy 1,2 (early mitotic inhibitor 1,2)
- FITC – fluorescein-5-izothiokyanát
- G1 fáze – růstová fáze 1 (gap phase 1)
- G2 fáze – růstová fáze 2 (gap phase 2)
- GVBD – zánik zárodečného váčku (germinal vesicle breakdown)
- HECT doména – Homologous to the E6-AP Carboxyl Terminus
- ICM – vnitřní buněčná masa (inner cell mass)
- IVC – *in vitro* kultivace
- M fáze – mitotická fáze (mitosis phase)
- MET – přechod z maternální kontroly na embryonální (maternal to embryonic transition)
- MHC I – hlavní histokompatibilní komplex 1. třídy (major histocompatibility complex)
- MII – metafáze II
- miRNA – microRNA
- MPF – faktor podporující metafázi (metaphase promoting factor)

mRNA – messengerová ribonukleová kyselina
Na/K – ATPáza – sodno – draselná ATPázová pumpa
PBS – fosfátový pufr s chloridem sodným (phosphate buffered saline)
PCM – pericentriolar material
PDCD4 – protein 4 programované buněčné smrti (Programmed cell death protein 4)
PFA – paraformaldehyd
PKC – proteinkináza C
PLA – in situ proximity ligation assay
Rbx1 – RING box protein-1
RING – really interesting new gene
Roc1 – Regulator of cullins
RT – pokojová teplota
S fáze – syntetická fáze (synthesis phase)
SCF komplex – komplex obsahující Skp1, Cullin1, F-box a Rbx1 proteiny
TE – trofoektoderm
 β TrCP - F-box/WD repeat-containing protein
ZP – zona pellucida

10. Seznam obrázků

Obr. 1 Struktura proteazomu s vyznačenými jednotlivými podjednotkami.	10
Obr. 2 Obecné schéma ubikvitinace	12
Obr. 3 Některé E3 enzymy.	13
Obr. 4 Struktura CRL komplexů.....	15
Obr. 5 Struktura SCF ^{Skp2} komplexu.....	16
Obr. 6 Modely dimerizace	17
Obr. 7 Schéma RING finger domény	19
Obr. 8 Lokalizace Rbx1 proteinu během preimplantačního vývoje	32
Obr. 9 Lokalizace Skp1 proteinu během preimplantačního vývoje.....	33
Obr. 10 Imunofluorescenční barvení zobrazující přítomnost proteinu Cul1 v průběhu preimplantačního vývoje.....	34
Obr. 11 Lokalizace Cul1 u embrya ve stádiu blastocysty.....	35
Obr. 12 Kolokalizace Cul1 a Skp1.....	35
Obr. 13 Míra relativní fluorescence	36
Obr. 14 Výsledky PLA metody	37