

**Česká zemědělská univerzita v Praze**

**Fakulta agrobiologie, potravinových a přírodních zdrojů**

**Katedra veterinárních disciplín**



**Úloha sirtuinů během formace prvojader po *in vitro*  
oplození prasečích oocytů**

**Diplomová práce**

**Autor práce: Veronika Maryníková**

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

© 2016 ČZU v Praze

### **Čestné prohlášení**

Prohlašuji, že svou diplomovou práci "Úloha sirtuinů během formace prvojader po *in vitro* oplození prasečích oocytů" 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 neporušil autorská práva třetích osob.

V Praze dne 7. 4. 2016

---

### **Poděkování**

Ráda bych touto cestou poděkovala Ing. Janu Nevoralovi, Ph.D. a Ing. Kateřině Zámotné za ochotu, spolupráci, pomoc a dobrou náladu při tvorbě mé diplomové práce, a Ing. Tereze Žalmanové, Ph.D. za pomoc při dokončování práce.

# Úloha sirtuinů během formace prvojader po *in vitro* oplození prasečích oocytů

## Souhrn

Význam reprodukčních biotechnologií v posledních letech nezadržitelně stoupá. Umožňují dosáhnout vyšší užitkovosti hospodářských zvířat či zdokonalení léčebných postupů v humánní medicíně. Pro rozvoj reprodukčních biotechnologií je zapotřebí zajistit dostatečné množství vývojově kompetentních oocytů a následně zdravých životaschopných embryí pro kultivaci v *in vitro* podmínkách. Klíčovým momentem, který následuje krátce po oplození, je formace prvojader. Zajištění správného histonového kódu je nezbytné pro správný vývoj raného embrya. Při poruše histonového kódu může dojít k vývojovým defektům až k zániku embrya. Jedním z mechanismů účastnících se regulace histonového kódu, ke kterému se v posledních letech obrací pozornost, jsou  $\text{NAD}^+$ -dependentní histon deacetylázy, známé také jako sirtuiny. Tuto skupinu deacetyláz tvoří sedm izoforem, SIRT1-7, z nichž SIRT1 se zdá být klíčovým pro regulaci časného embryonálního vývoje.

Na základě dosavadních poznatků byla stanovena hypotéza, že SIRT1 je přítomen v prasečích zygotách a je zde zapojen do regulace formace prvojader. Pro experiment byly použity prasečí COCs, které byly vystaveny 44 hod. *in vitro* zrání. Po ukončení kultivace byly vybrány zralé oocyty a tyto byly dále použity pro *in vitro* oplození. Zygoty byly kultivovány spolu s inhibítorem sirtuinů, nikotinamidem, či se specifickým inhibítorem SIRT1, sirtinolem. Po 22 hod. kultivace *in vitro* byly zygoty podrobeny imunocytochemické lokalizaci acetylovaného a metylovaného histonu H3 na lysinu 9 (K9) a analýze obrazu.

Ze získaných výsledků je patrné, že SIRT1 je přítomný v prasečích zygotách, kde je jeho lokalizace směřována především do prvojader. Po inhibici SIRT1 byly patrné změny na hladině acetylace a metylace H3K9, kdy došlo k signifikantnímu nárůstu acetylovaného H3K9 a naopak poklesu metylovaného H3K9. Použití sirtinolu potvrdilo, že tyto změny histonového kódu způsobuje zejména SIRT1. Zapojení SIRT1 do regulace histonového kódu ve fázi formace prvojader prasat je však neuspokojivě probádaná oblast výzkumu, která vyžaduje podrobnější objasnění mechanismů účinků.

**Klíčová slova:** oocyt, *in vitro* oplození, zygota, prvojádru, sirtuin, SIRT1

# **Role of sirtuins in pronucleus formation *in vitro* fertilised porcine oocytes**

## **Summary**

Recently, the increasing importance of reproductive biotechnologies rises. They provide us to get higher performance of livestock or to improve treatment in human medicine. It is necessary to have a sufficient amount of developmentally competent oocytes and further healthy liveable embryos for *in vitro* culture to supply a progress of reproductive technologies. Immediately after fertilization, pronucleus formation is a key moment for further embryonic development. Male and female pronuclei have their own pattern of histone code. For development of early embryo, it is necessary to supply the correct pattern of histone code. NAD<sup>+</sup>-dependent histone deacetylases, sirtuins, are one of the mechanism which plays in regulation of histone code. These family contains seven isoforms, SIRT1-7.

Based on current research, we decided for hypothesis that sirtuins are present in porcine fertilized oocytes and regulate the pronucleus formation. In this thesis, porcine COCs were culture in modified culture medium and after 44 hr. maturation, only oocytes with extruded first polar body were chosen and used for further *in vitro* fertilization. Presumed ygoties were subsequently cultured with sirtuins inhibitors, nicotinamide or sirtinol. After 22 hr. of *in vitro* culture, zygotes were subjected by immunocytochemicaly localization of methylated and acetylated (on lysine K9) histone H3 and image analysis..

Our results show that SIRT1 is localized in porcine zygotes, especially in pronuclei. There are changes in acetylation and methylation H3K9 after sirtuin inhibition. Significant increase of H3K9 acetylation and decrease in H3K9 methylation are appeared. Sirtinol usage has confirmed that the changes are result of SIRT1 action. Role of SIRT1 in histone code regulation of pronucleus formation is still not enough described in porcine.

**Keywords:** oocyte, *in vitro* fertilization, zygote, pronucleus, sirtuin, SIRT1

# Obsah

<b>1 Úvod .....</b>	<b>7</b>
<b>2 Hypotéza a cíl práce.....</b>	<b>8</b>
<b>3 Literární rešerše.....</b>	<b>9</b>
3.1 Meiotické zrání.....	9
3.1.1 Regulátory meiotického zrání.....	9
3.2 Oplození .....	11
3.2.1 Kapacitace.....	11
3.2.2 Termotaxe, chemotaxe.....	12
3.2.3 Akrozomální reakce .....	12
3.2.4 Mechanismus aktivace oocyty .....	13
3.2.5 Prevence polyspermie .....	13
3.3 Časný embryonální vývoj .....	14
3.3.1 Reaktivace embryonálního genomu.....	14
3.3.2 Chromatin .....	15
3.3.3 Formace prvojader .....	16
3.3.4 Asymetrie prvojader .....	16
3.4 Post-translační modifikace histonů .....	17
3.5 Sirtuiny.....	19
3.5.1 Regulace aktivity sirtuinů .....	20
3.5.2 Vliv sirtuinů na zrající oocyty a preimplantační embrya.....	21
<b>4 Materiál a metody .....</b>	<b>23</b>
4.1 Izolace a zrání oocytů <i>in vitro</i> .....	23
4.2 Oplození oocytů <i>in vitro</i> (IVF) a kultivace zygot <i>in vitro</i> .....	23
4.3 Inhibitory sirtuinů.....	24
4.4 Imunofluorescence a analýza obrazu .....	24
4.5 Statistika.....	25
<b>5 Výsledky.....</b>	<b>26</b>
5.1 Lokalizace SIRT1 v zygotách prasat.....	26
5.2 Vliv nikotinamidu na acetylaci a metylaci H3K9 .....	28
5.3 Vliv sirtinolu na acetylaci a metylaci H3K9 .....	34
5.4 Vliv nikotinamidu či sirtinolu na <i>in vitro</i> oplození.....	38
<b>6 Diskuse .....</b>	<b>40</b>
<b>7 Závěr .....</b>	<b>43</b>
<b>8 Literární zdroje.....</b>	<b>44</b>

# 1 Úvod

Využití metod reprodukčních biotechnologií v praxi zvyšuje ekonomiku chovu hospodářských zvířat, neboť právě úspěšná reprodukce je předpokladem pro vysokou užitkovost. Reprodukční biotechnologie se neobejdou bez zisku kvalitních oocytů a jejich úspěšné kultivace v *in vitro* podmínkách. Pro dosažení optimálních podmínek při *in vitro* kultivaci je zapotřebí dostatečných znalostí mechanismů, které regulují správný vývoj oocytů a embryí.

Krátce po oplození se formují samčí a samičí prvojádru. Samčí prvojádru podléhá rychlé aktivní demetylace a stává se hyperacetylovaným, transkripčně aktivnějším, než je tomu u samičího prvojádru, které si po oplození zachovává vysoce metylovanou podobu. Acetylace i metylace jsou reverzibilní děje regulované příslušnými enzymy. Tyto změny dále předurčují zygotu k dalšímu embryonálnímu vývoji a stávají se tak prediktivním znakem pro úspěšnost tohoto vývoje.

Jedním z významných rodin enzymů, které se účastní regulace hladin acetylace a metylace histonů, jsou  $\text{NAD}^+$ -dependentní histon deacetylázy, z nichž pro embryonální vývoj má největší potenciál sirtuin SIRT1. Význam úlohy SIRT1 byl již popsán u somatických buněk. Z těchto výzkumů se dá předpokládat úloha SIRT1 také s ohledem na reprodukci a zvýšení kvality oocytů a embryí kultivovaných *in vitro*. SIRT1 je významným regulátorem ovlivňujícím odolnost vůči oxidativnímu stresu, který je v *in vitro* podmínkách pro kultivaci velkou hrozbou. Dalším významným hlediskem je ovlivnění epigenetických změn v expresi genů u pre-implantačních embryí, které jsou zprostředkovány post-translačními modifikacemi histonů. V této práci předpokládáme, že právě SIRT1 je klíčovým faktorem, který se účastní udržení správné epigenetické regulace v podobě tzv. histonového kódu. Konkrétně jsme se v této fázi zaměřili na fázi formace prvojader, která následuje krátce po oplození.

## **2 Hypotéza a cíl práce**

Byla stanovena hypotéza, že SIRT1, NAD<sup>+</sup>-dependentní histon deacetyláza, je přítomna zygotách, kde je zapojen do regulace formace prvojader. Cílem práce je potvrdit přítomnost SIRT1 v prasečích zygotách a zhodnotit účast na regulaci histonového kódu v prvojádrech.



## 3 Literární rešerše

### 3.1 Meiotické zrání

Pro meiózu jsou typická dvě po sobě jdoucí buněčná dělení. Před vstupem do prvního buněčného dělení musí dojít ke zdvojnásobení počtu chromozómů. U většiny savčích druhů probíhá již během prenatálního vývoje a zastavuje se v profázi prvního meiotického dělení, tzv. první meiotický blok, a v tomto stádiu přetrvávají až do puberty. V pubertě dochází vlivem působení gonadotropinů k růstu oocyty. Plně dorostlé oocyty se nacházejí v tzv. stádiu zárodečného váčku (GV, germinal vesicle). GV oocyty jsou schopné prolomit první meiotický blok, podléhají rozpadu jaderné membrány (GVBD, germinal vesicle breakdown) a pokračují dále v buněčném cyklu. Po dokončení prvního buněčného dělení je vydělena polovina dědičné informace oocyty v podobě prvního pólového tělíska. Před vstupem do druhého buněčného dělení již nedochází k replikaci chromozómů. Oocyt vstupuje do druhé meiózy a zastavuje se v metafázi II, ve které vyčkává na aktivační stimul. Tím může být průnik spermie nebo partenogenetická aktivace. V *in vitro* podmínkách dochází ke spontánnímu znovuzahájení meiózy v důsledku vyjmutí oocyty z prostředí folikulární tekutiny (Motlík *et* Fulka, 1976; Wassarman, 1988; Yanagimachi, 1988; Sun *et* Nagai, 2003; Liang *et al.*, 2007).

Období mezi profází prvního buněčného dělení a metafází druhého buněčného dělení se nazývá meiotické zrání. Plně meioticky kompetentní a tedy schopné kompletního meiotického zrání jsou prasečí oocyty o průměru 120  $\mu\text{m}$ . Menší, s průměrem okolo 110  $\mu\text{m}$ , jsou oocyty dosud rostoucí a tyto jsou meioticky kompetentní pouze částečně, tedy schopné GVBD a dosáhnout metafáze I, kde jejich vývoj končí. Zcela meioticky nekompetentní jsou oocyty menší než 100  $\mu\text{m}$  (Wassarman, 1988). Rostoucí, meioticky nekompetentní oocyty obsahují stejné množství MAPK a pre-MPF jako oocyty meioticky kompetentní, ale nejsou schopny je aktivovat (Kanayama *et al.*, 2002).

#### 3.1.1 Regulátory meiotického zrání

Klíčovými regulátory meiotického zrání jsou MPF a MAPK. M-fázi/zrání podporující faktor (MPF, M-phase/maturation promoting factor) je heterodimer složený ze dvou podjednotek: regulační jednotky cyklinu B a katalytické jednotky p34<sup>cdc2</sup> protein kinázy (Motlík *et al.*, 1997).

V buňce se před vstupem do M-fáze hromadí inaktivní forma pre-MPF, která obsahuje fosforylovanou kinázu p34<sup>cdc2</sup> a cyklin B. Inaktivní forma pre-MPF je udržována aktivními kinázami WEE1 a MYT1, které udržují kinázu p34<sup>cdc2</sup> fosforylovanou (Izumi *et Maller*, 1993). K aktivaci MPF je zapotřebí zvýšené hladiny fosfatázy CDC25, která způsobí defosforylaci p34<sup>cdc2</sup> na Thr14 a Tyr15 a fosforylaci cyklinu B (Fulka *et al.*, 1998; Palmer *et al.*, 1998).

Množství p34<sup>cdc2</sup> se v průběhu zrání oocyty nemění. Syntéza i celkové množství cyklinu B narůstá v metafázi I. Při přechodu z metafáze I do anafáze I je cyklin B ubikvitinován a výsledkem je snížení aktivity MPF. Aby nedošlo mezi meiotickými bloky ke vstupu do S-fáze, není degradován všechny cyklin (Macháty *et al.*, 1998). K přechodu do metafáze II a jejímu udržení je zapotřebí opětovné zvýšení hladiny MPF. Tato hladina je udržována až do aktivace oocyty, kdy je snížení hladiny MPF součástí znovuzahájení meiózy (Watanabe *et al.*, 1991).

MPF je klíčovým faktorem zodpovědným za vstup do M-fáze, kondenzaci chromozomů, rozpad jaderné membrány a celkovou komplexnost meiotického zrání prostřednictvím fosforylace proteinů zodpovědných za tyto jevy (Fissore *et al.*, 1996).

Mitogenem aktivované protein kinázy (MAPK, mitogen activated protein kinase) tvoří skupina serin/threonin kináz (Fissore *et al.*, 1996). Je aktivována prostřednictvím kaskády kináz, které zvyšují aktivitu MAPKK (MAP kinázy kináza, MEK), která fosforyluje tyrosin a threonin zbytek na MAPK (Kosako *et al.*, 1994).

Kaskáda MAPK usnadňuje GVBD aktivováním pre-MPF (Kumagai *et Dunphy*, 1996). K aktivaci samotné MAPK dochází 2 hod. po GVBD (Verlhac *et al.*, 1994). Aktivní MAPK je v metafázi distribuována do pólů dělicího vřetenka a v anafázi se přesouvá do jeho středu. Během vydělování prvního pólového tělíska je MAPK přítomna v dělicím prstenci (Lee *et al.*, 2000; Hatch *et Capco*, 2001). Mezi meiotickými bloky nedochází k poklesu hladiny MAPK, čímž je zabráněno vstupu do interfáze buněčného cyklu (Dekel, 2005). K poklesu hladiny MAPK dochází v počátku formace prvojader (Watanabe *et al.*, 1991).

Prostřednictvím aktivní MAPK je udržována rozpadlá jaderná membrána mezi meiotickými bloky (Campbell *et al.*, 1996). Je nezbytná k udržení aktivního MPF a zabraňuje uvolnění zrajícího oocyty z druhého meiotického bloku (Winston *et Maro*, 1995). Je zapojena do regulace mikrotubulární organizace (Verlhac *et al.*, 1994).

K nabytí meiotické kompetence je celkově zapotřebí kromě jaderného i cytoplazmatické zrání, díky kterému je jaderné zrání uskutečnitelné. Během jaderného zrání dochází ke

změnám ve struktuře chromatinu. Změny v cytoplazmě jsou nejvíce patrné na mitochondriích, Golgiho aparátu a na zvýšeném počtu ribozomů. Od cytoplazmatického zrání se dále odvíjí GVBD (Fulka *et al.*, 1998; Zhang *et Liu*, 2015). Cytoplazmatické faktory ovlivňující cytoplazmatické zrání jsou regulovány prostřednictvím gap junction spojů, které zprostředkovávají komunikaci mezi oocytem a kumulárními buňkami (Mori *et al.*, 2000). Oocyt s dokončeným jaderným zráním může být oplodněn, avšak další vývoj nemusí být kompletní, jsou-li zde nedostatky v některých cytoplazmatických faktorech potřebných k plné cytoplazmatické zralosti (Sun *et Nagai*, 2003).

Výsledkem výše popsaných komplexních změn je dozrálý a oplození schopný oocyt. Zralým oocytem rozumíme takový, který má vydělené první pólové tělísko a je zastaven v MII. Jen takový oocyt je připraven pro penetraci oocytu spermií, aktivaci oocytu a následný časný embryonální vývoj (Sun *et Nagai*, 2003).

## 3.2 Oplození

Během oplození dochází ke splynutí dvou haploidních pohlavních buněk opačného pohlaví, které tím dávají vzniknout diploidní zygotě, ze které se dále vyvíjí nový jedinec. Aby mohlo dojít ke splynutí obou gamet, je zapotřebí změn, které probíhají jak na straně oocytu (růst, meiotické zrání), tak na straně spermií. Nezbytnou změnou, kterou spermie musí prodělat, je kapacitace.

### 3.2.1 Kapacitace

Ve chvíli ejakulace nejsou spermie schopné oplození. Při cestě samičím genitálním traktem musí spermie projít cervikálním hlenem, který slouží jako bariéra pro semennou plazmu a morfologicky abnormální spermie, a následně dochází v uterotubálním spoji k samotné aktivaci neboli kapacitaci. Během kapacitace se spermie připravují k úspěšnému splynutí s oocytem a oplození. Z membrány spermie je odnímán cholesterol, čímž dochází k odkrytí vazebných míst pro vazbu spermie se zonou pellucidou oocytu. Dále dochází ke změnám propustnosti membrán pro ionty  $\text{Ca}^{2+}$  a  $\text{HCO}_3^-$  a ke zvýšení enzymové aktivity, která spouští buněčnou signální kaskádu vedoucí k fúzi oocytu se spermií. Jen kapacitované spermie jsou schopné projít přes kumulární buňky obalující oocyt, spojit se s receptory pro

navázání spermie a podstoupit akrozomální reakci, která umožňuje penetraci spermie skrze *zonu pellucidu* a následné spojení se samotným oocytem. Kapacitaci dokončí v průměru 10 % z celkového počtu ejakulovaných spermií (Eisenbach *et* Giojalas, 2006; Tulsiani *et* Abou-Haila, 2012; Ickowicz *et al.*, 2012).

### 3.2.2 Termotaxe, chemotaxe

Klíčovými schopnosti kapacitovaných spermií je termotaxe a chemotaxe, které jsou zodpovědné za pohyb spermií vejcovodem. Termotaxe je orientovaný pohyb ve směru stoupajícího teplotního gradientu. Odpověď na rozdíl teplot mezi uterotubálním spojením a vejcovodem je zprostředkována prostřednictvím signální kaskády fosfolipázy C zéta (PLC $\zeta$ ). Ta spouští vyšší produkci inositoltrifosfátu (IP $_3$ ). V důsledku zvýšené hladiny IP $_3$  jsou otevřeny Ca $^{2+}$  kanály citlivé na IP $_3$  a dojde k uvolnění zásob Ca $^{2+}$  z intracelulárních zdrojů. Výsledkem je změna pohybu bičíku a následně i způsobu pohybu (Bahat *et al.*, 2012).

Zatímco termotaxe představuje správný pohyb spermií na delší vzdálenost vejcovodu, chemotaxe představuje přesnější orientovaný pohyb ve směru koncentračního gradientu samičího chemoatraktantu v čase (Eisenbach *et* Giojalas, 2006). Chemoatraktantem je pro spermie progesteron, který je produkovaný a sekretovaný kumulárními buňkami zovulovaného oocytu, v jehož okolí je koncentrace chemoatraktantu nejvyšší. Receptory pro progesteron se nachází na membráně spermie (Guidobaldi *et al.*, 2008).

Součástí chemotaxické odpovědi je hyperaktivace pohybu spermie. Dochází k ní ve chvíli, kdy koncentrace chemoatraktantu v čase dále nestoupá. V důsledku molekulárních změn v membráně bičíku se zvyšuje amplituda pohybu hlavičky i bičíku a pohyb je tzv. hyperaktivovaný. Hyperaktivace je pro oplození nezbytná, umožňuje nejen orientaci spermie, ale také uvolnění spermií z rezervoáru v epitelu isthmu. Hyperaktivní pohyb spermie není lineární a usnadňuje průnik viskózním prostředím vejcovodu a penetraci *zonou pellucidou* (Armon *et* Eisenbach, 2011; Tulsiani *et* Abou-Haila, 2012).

### 3.2.3 Akrozomální reakce

Akrozóm, modifikované endoplazmatické retikulum spermie, je velký sekreční váček překrývající jádro na apikálním konci hlavičky spermie. Pod plazmatickou membránou

spermie se nachází vnější akrozomální membrána. Vnitřní akrozomální membrána přiléhá na jádro. Během akrozomální reakce dochází k rozpadu cytoplazmatické membrány a vnější membrány akrozómu, čímž dochází uvolnění akrozinu a dalších enzymů z akrozómu. Tyto látky umožňují vstup spermie skrze *zonu pellucidu*.

Spermie, která prodělala akrozomální reakci, následně šikmo penetruje do perivitelinního prostoru mezi zónou pellucidou a plazmatickou membránou oocyty včetně svého bičíku (Wassarman, 1988).

### 3.2.4 Mechanismus aktivace oocyty

Penetrující spermie si s sebou přináší fosfolipázu C zéta (PLC $\zeta$ ), která je inkorporována do cytoplazmatické membrány oocyty, ve kterém dále spouští kaskádu jeho aktivace. Aktivací se rozumí pokles faktorů MPF a MAPK a dokončení druhého meiotického dělení (Stricker, 1999).

Vlivem přítomnosti PLC $\zeta$  je v oocyty stimulována produkce inositoltrifosfátu (IP $_3$ ) a diacylglycerolu (DAG). IP $_3$  se dále váže na receptory IP $_3$ -dependentních vápníkových kanálů v membránách intracelulárních zásobáren Ca $^{2+}$ , které se vlivem IP $_3$  otevřou a Ca $^{2+}$  je ve vlnách uvolňován do cytoplazmy oocyty. Tento fenomén je nazýván oscilace Ca $^{2+}$ . Ca $^{2+}$  se dále váže na kalmodulin a tento komplex aktivuje kalmodulin-dependentní protein kinázu II (CaMKII). Působením CaMKII dochází k poklesu hladiny MPF. Zvýšením koncentrace DAG a Ca $^{2+}$  je aktivována protein kináza C (PKC), která dále inhibuje MAPK. V důsledku těchto změn je oocyt uvolněn z meiotického bloku, dokončuje se meióza a je vyděleno druhé pólóvé tělísko. Tyto změny umožňují následnou tvorbu prvojader a vznik zygoty (Sun *et* Nagai, 2003; Fan *et* Sun, 2004; Nomikos *et al.*, 2013).

### 3.2.5 Prevence polyspermie

Polyspermie je u savců patologický fenomén. Při *in vitro* oplození (IVF) prasečích oocytů představuje jeden z největších problémů arteficiálního původu. Důležitou organelou oocyty, která zabraňuje polyspermii, jsou kortikální granula, která obsahují enzymy a glykokonjugáty bohaté na galaktosyl (Yoshida *et al.*, 1993). Kortikální granula podléhají ve zrajícím oocyty odstředivé migraci a vytváří souvislou vrstvu přiléhající na vnitřní

plazmatickou membránu. Aktivace již penetrovaného oocytu je následována kortikální reakcí, která je spuštěna zvýšenou hladinou intracelulárního  $\text{Ca}^{2+}$  a při níž jsou kortikální komponenty vytlačeny do perivitellinního prostoru. Enzymy kortikálních granul způsobí tzv. ztvrdnutí zony pellucidy, čímž se vytváří bariéra pro průnik dalších spermií (Hunter, 2000).

V *in vitro* podmínkách se u prasečího modelu setkáváme s vysokým procentem polyspermie. V některých laboratořích dosahuje hodnot nad 50 % (Gil *et al.*, 2010). Vysoký výskyt může být důsledkem pomalejší kortikální reakce (Hall *et al.*, 2013). Další příčinou je nedokonalé cytoplazmatické zrání v *in vitro* podmínkách. Polyspermická embrya se rýhují a dále vyvíjí do stádia blastocysty podobně jako zdravá embrya. Další vývoj polyspermních embryí v tomto stádiu selhává (Gil *et al.*, 2010).

### 3.3 Časný embryonální vývoj

Po penetraci spermie a následné aktivaci oocytu jsou genetické informace oocytu a spermie dekonzenzovány a vzniká samčí a samičí prvojádro, která později v jednobuněčné zygotě splývají. Stádium jednobuněčné zygoty následuje řada po sobě následujících mitotických dělení, tzv. rýhování. Buňky vzniklé během rýhování jsou nazývány blastomery. Zárodek je stále obklopen zónou pellucidou, a proto se se zvyšujícím se počtem blastomer zmenšuje jejich velikost. Útvar má podobu plodu moruše, odtud název morula. Blastomery v morule jsou totipotentní, každá by mohla dát vzniknout novému jedinci. Od osmibuněčného stádia se mezi jednotlivými blastomery vytváří těsné mezibuněčné spoje a morula nabývá na kompaktnosti. Dochází ke zvýšenému příjmu tekutiny zárodkem a vzniklý tlak dává vzniknout dutému prostoru. V této chvíli je zárodek nazýván blastocysta. Na jednom pólu se buněčná masa přeskupuje v tzv. embryoblast, který dává vzniknout samotnému zárodku, a na povrchu je jedna vrstva plochých buněk nazývaných trofoblast (Schatten *et al.*, 1998).

#### 3.3.1 Reaktivace embryonálního genomu

Embryonální vývoj je zpočátku primárně kontrolován vrozenými maternálními komponenty, které se nachází uvnitř oocytu v podobě molekul RNA a proteinů. Část RNA přispívající k ranému vývoji svojí regulační úlohou pochází ze spermie (Hall *et al.*, 2013). S postupným vyčerpáváním zásoby maternálních komponent se stává pokračující vývoj závislý na expresi genetické informace odvozené od embryonálního genomu. Kritický moment ve

vývoji prasečích embryí nastává při přechodu ze čtyřbuněčného na osmibuněčné stádium. V této chvíli je nedostatečný počet maternálních transkriptů a zároveň je aktivován embryonální genom a spouští se embryonální transkripce. Není-li dostatečná, vývoj v tento moment selhává (Telford *et al.*, 1990; Hajkova, 2010). Před samotnou aktivací embryonálního genomu musí být zbylé maternální komponenty degradovány (Wang *et al.*, 2014).

### 3.3.2 Chromatin

Chromatin je základní stavební jednotkou chromozomů. Základní podjednotkou chromatinu je nukleozóm, který je tvořen dvoušroubovicí DNA dlouhou 147 párů bází a obtáčející se dvěma otočkami kolem oktameru tvořeného z histonů H2A, H2B, H3 a H4. Celý komplex drží pohromadě molekula histonu H1 (Balhorn, 1982).

Histony jsou bazické proteiny bohaté na arginin, lysin a histidin. Histon H3.3 je varianta histonu H3, která označuje oblasti euchromatinu v genomu a přispívá k udržení jeho transkripční aktivity během vývoje (Goldberg *et al.*, 2010; Yuan *et al.*, 2011). Nahrazuje histony, které byly odstraněny během procesů narušujících strukturu nukleozómů. Zásoby maternálního H3.3 se účastní regenerace chromatinu paternálního prvojádra. Histon H2A se účastní především reparace DNA a regulace exprese genů (Loppin *et al.*, 2005). V chromatinu se dále nachází proteiny nehistonové povahy. Zahrnují všechny enzymy a proteiny komunikující s DNA a zúčastňující se replikace, RNA syntézy či regulace genetické aktivity (Balhorn, 1982).

Chromatin zralých spermií savců je vysoce kondenzovaný a transkripčně inaktivní. Není až na výjimky organizovaný v nukleozómech a namísto histonů se zde nachází protaminy (McLay *et al.*, 2003; Ward, 2010). Jedná se o proteiny o poloviční velikosti než histony a s velmi jednoduchou stavbou, neboť jsou z 55 - 70 % tvořeny argininem (Balhorn, 1987).

Dle kondenzace a transkripční aktivity rozlišujeme dva typy chromatinu. V aktivním euchromatinu je molekula DNA více rozvolněná, čímž je přístupnější transkripci. Naproti tomu heterochromatin je více kondenzovaný. Zaujímá oblasti telomer a centromer. V oblastech s heterochromatinem neprobíhá transkripce. Heterochromatin dále rozlišujeme na fakultativní a konstitutivní. Fakultativní heterochromatin obsahuje geny, které jsou vypínány a zapínány v průběhu vývoje či diferenciaci. Po dokončení vývoje se stávají inaktivními.

Konstitutivní heterochromatin zahrnuje trvale transkripčně inaktivní úseky genomu (Bannister *et Kouzarides*, 2011).

### 3.3.3 Formace prvojader

Po penetraci spermie do oocyty jsou v chromatinu spermie redukovány disulfidické můstky protaminů. Zatímco oocyt přechází z metafáze II do telofáze II, je jaderná membrána spermie rozpuštěna a chromatin je částečně dekonzenzován. Během telofáze II je chromatin spermie zkondenzován zpět za vzniku nukleozómů. Po vzniku samičího prvojádra chromatin spermie opět dekonzenzuje a vytváří se samčí prvojádru (Adenot *et al.*, 1991). Chromatin oocyty je dekonzenzován po dokončení meiózy. Protaminy spermie jsou ještě před replikací DNA nahrazeny za histony a následně vzniká zároveň membrána samčího i samičího prvojádru. Výměna protaminů za histony je nezbytná k dalšímu vstupu buňky do S-fáze buněčného cyklu (Nonchev *et Tsanev*, 1990; Collas *et Poccia*, 1998).

Spermie s sebou do oocyty přináší centrozom. Tato organela má funkci mikrotubuly organizujícího centra (microtubule-organizing center, MTOC) a v oocyty vytváří z mikrotubulů kruh zvaný „sperm aster“ (Nakamura *et al.*, 2001). Mikrotubuly se následně prodlužují a zprostředkovávají přesun prvojader v rámci cytoplazmy. Samičí prvojádru je mikrotubuly přitahováno k samčímu, až se dotýkají membránami, a společně jsou prvojádru dále přesouvána do centra buňky (Reinsch *et Gönczy*, 1998). Z korové části do centra jsou přemisťovány také organely oocyty. Po jejich přesunu nabývají obě prvojádru na velikosti (Payne *et al.*, 1997). Během prvního buněčného cyklu vznikají z mikrotubulů „sperm aster“ póly dělicího vřeténka (Navara *et al.*, 1994).

### 3.3.4 Asymetrie prvojader

Zralé gamety mají vysoce metylovanou DNA. Krátce po fertilizaci je samčí chromatin rychle aktivně demetylován, zatímco samičí chromatin vykazuje další malý nárůst v metylaci DNA a demetylaci probíhá pasivně a pomalu až do stádia blastocysty. V samičím prvojádru je patrná dimetylaci a trimetylaci H3K9 a H3K27. Samčí chromatin vykazuje jen monometylaci H3K9 a H3K27. Naproti tomu vysoká hladina metylaci u samičího chromatinu je nejspíše obranou proti aktivní demetylaci postihující samčí chromatin. Tyto epigenetické



změny jsou zásadní pro následnou reaktivaci embryonálního genomu a znovunabytí totipotence (Santos *et al.*, 2005).

Metylace mění stabilitu genomu a reguluje expresi genů, ale není jediným regulačním nástrojem, nýbrž je zapotřebí interakcí s dalšími modifikacemi (Santos *et al.*, 2005). Samčí chromatin vykazuje vysokou acetylaci histonů H3 a H4. Acetylace částečně neutralizuje pozitivní náboj na lysinových koncích histonů a oslabuje tím interakce mezi DNA a nukleozómy i mezi nukleozómy vzájemně. Struktura chromatinu je tak mnohem rozvolněnější a přístupnější transkripci. Po vzniku prvojader částečně hladina acetylace klesá a tím je umožněn opětovné rozdělení chromatinu na euchromatin a heterochromatin (van der Heijden *et al.*, 2006).

### 3.4 Post-translační modifikace histonů

Z nukleozómu vyčnívají N-terminální konce histonů, které obsahují kladně nabitě aminokyseliny lysin a arginin (Turner, 2002). Post-translační modifikace ovlivňují interakce mezi proteiny (Zhang *et Reinberg*, 2015). Změna organizace chromatinu prostřednictvím kovalentní post-translační modifikace a remodelace proteinové struktury umožňuje transkripčním faktorům přístup ke genům (Nowak *et Corces*, 2004).

Mezi post-translační modifikace proteinů patří metylace, fosforylace, acetylace, ubikvitinace, ADP-ribosylace či isomerace (Dvořáková *et al.*, 2013).

Metylace histonů probíhá na lysinu a argininu. Dochází k přenosu metylové skupiny, který může mít několik podob: mono- až trimetylace lysinu a mono- či dimetylace argininu. Při metylaci nedochází ke změně náboje proteinu. Za samotný přenos metylu jsou odpovědné enzymy histon metyltransferázy (HMT), které patří spolu s kinázami mezi nejspecifičtější enzymy účastníci se post-translačních modifikací. Histon lysin metyltransferázy (HKMT) obvykle modifikují pouze jeden lysin na jednom histonu. Výsledný efekt metylace může být aktivace i represe transkripce (Lepikhov *et Walter*, 2004). Výsledek se odvíjí od pozice acetylovaného lysinu (K): v pozicích H3K9, H3K27 a H4K40 nastává represe, v pozicích H3K4, H3K36 a H3K79 dochází k aktivaci transkripce (Vakoc *et al.*, 2005).

Při formaci prvojader jsou histony nejdříve zařazeny do struktury nukleozómu a až následně dochází k jejich metylaci. Na pozici H3K9 je prvně patrná monometylace a až následně dochází k trimetylaci (Lepikhov *et Walter*, 2004).

Heterochromatin protein 1 (HP1) je protein nehistonové povahy, který se váže s dalšími proteiny a reguluje tak strukturu chromatinu a transkripci (Bártová, 2008). Má vysokou afinitu k trimetylovanému histonu H3K9, který se ve velké míře vyskytuje v chromatinu samičího prvojádra, a chrání jej proti působení metyláz, čímž významně ovlivňuje formaci heterochromatinu. V euchromatinu je zapojen do inaktivace specifických genů (Lachner *et al.*, 2001; Arney *et al.*, 2002; Zhang *et Reinberg*, 2015).

Během acetylace využívá enzym histon acetyltransferáza (HAT) acetyl CoA jako kofaktor a katalyzuje přenos acetylu na lysin. Výsledkem tohoto dynamického procesu je snížení kladného náboje lysinu, čímž jsou oslabeny elektrostatické síly mezi histony a fosfátem molekuly DNA (Parthun, 2007). Acetylace je spojována s aktivací transkripce, neboť chromatin je touto cestou postupně rozvolňován a DNA se stává přístupnější pro proteiny, především transkripčním faktorům a jejich kofaktorům (Kouzarides, 2007).

Acetylace histonu H3 a H4 nastává ještě před jejich zařazením do struktury nukleozómu (Lepikhov *et Walter*, 2004). Mohou být acetylovány také proteiny nehistonové povahy, jakými jsou např. transkripční faktory. Tento děj je katalyzován faktorovými acetyltransferázami a dochází ke změně jejich účinku na transkripci (Roth *et al.*, 2001).

Acetylace je reversibilní děj a jejím opakem je deacetylace. Dochází k obnovení pozitivního náboje na lysinu a k represi transkripce. Existují tři skupiny enzymů deacetyláz - histon deacetylázy (HDAC) třídy I a II se skládají z 390 aminokyselin a ke své funkci potřebují jako kofaktor kation zinku. Třída III, sirtuiny, jsou závislé na přítomnosti NAD<sup>+</sup> jako kofaktoru. Substrátem pro sirtuiny jsou také proteiny nehistonové povahy (Kouzarides, 2007).

Fosforylace histonů je velice dynamický proces. Zprostředkovávají ji kinázy a fosfatázy, které přenášejí fosfátovou skupinu z ATP na hydroxylovou skupinu aminokyseliny na N-terminálním konci histonu. K modifikaci dochází na serinu, threoninu a tyrosinu. Vlivem fosforylace získává histon záporný náboj. (Dawson *et al.*, 2009). Fosforylace je zásadní pro kondenzaci chromatinu a průběh buněčného cyklu během mitózy i meiózy, především během interfáze (Nowak *et Corces.*, 2004).

### 3.5 Sirtuiny

Sir proteiny (Silent information regulator proteins) byly poprvé popsány u kvasinek *Saccharomyces cerevisiae*. Jedná se o skupinu vysoce konzervovaných jaderných proteinů, které se uplatňují ve formaci heterochromatinu, ovlivňují stabilitu jeho struktury a potlačují transkripci a rekombinaci DNA. Celkem bylo u prokaryot popsáno pět homologů – Sir1 až Sir5 (Gross, 2001). Acetylace částečně neutralizuje pozitivní náboj na koncích histonů a oslabuje tím interakce v DNA, která se tak stává rozvolněnější a přístupnější transkripčním faktorům. Sirtuiny jsou  $\text{NAD}^+$ -dependentní deacetylázy histonů a proteinů nehistonové povahy. Jejich reakce je závislá na dostupnosti nikotinamidudinukleotidu ( $\text{NAD}^+$ ), který se skládá z ribózy a nikotinamidu (NAM). Během deacetylační reakce dochází při vazbě na substrát k hydrolyze vazby mezi  $\text{NAD}^+$  a ribózou. Uvolní se NAM a acetyl je navázán na ribózu. Výsledkem reakce je deacetylovaný substrát, NAM a acetylovaná ribóza (Chang *et al.*, 2002).

U eukaryot bylo popsáno sedm homologů odvozených od Sir2, sirtuiny SIRT1 až SIRT7. Každý má svou specifickou funkci a lokalizaci (Dryden *et al.*, 2003). SIRT1 je nejpodobnějším homologem Sir2 kvasinek. Shodují se v obou sekvencích aminokyselin i svým profilem enzymatické aktivity (Watroba *et Szukiewicz*, 2016). Je lokalizován v jádře a v cytoplazmě. Jako substrát slouží histony i proteiny nehistonové povahy (Vaquero *et al.*, 2004; Chang *et Guarente*, 2014). Deacetylací histonů je zapojen do kontroly stability genomu a regulace exprese genů, kdy v důsledku deacetylace dochází k utváření heterochromatinu a tedy umlčení genů (Vaquero *et al.*, 2007; Michan *et Sinclair*, 2007). Deacetylací proteinů nehistonové povahy se účastní regulace apoptózy a odpovědi na oxidativní stres (Poulose *et Raju*, 2015; Morris, 2012).

SIRT2 je prvním popsaným sirtuinem u eukaryot. Nachází se v jádře a v cytoplazmě. Vazbou na  $\alpha$ -tubulin mikrotubulů ovlivňuje vznik dělicího vřeténka během buněčného cyklu. Svou deacetylační aktivitou usnadňuje kondenzaci chromatinu před segregací chromozómů. Dále se podílí na regulaci genové exprese a je nezbytný k vystoupení z M-fáze buněčného cyklu (Dryden *et al.*, 2003; Li *et al.*, 2015; Morris, 2012; Feige *et Auwerx*, 2008).

SIRT3 je lokalizován na vnitřní mitochondriální membráně a zastává funkci hlavního mitochondriálního proteinu (Guan *et al.*, 2014). Během dýchacího řetězce v mitochondriích snižuje tvorbu volných kyslíkových radikálů (reactive oxygen species, ROS) a zvyšuje efektivnost jejich odbourávání, které je zapotřebí k ochraně DNA proti poškození a mutacím,

zatímco zvyšuje úroveň buněčného dýchání (Watroba *et Szukiewicz*, 2016). V mitochondriích určuje resistenci buňky proti apoptóze (Guan *et al.*, 2014).

SIRT4 je lokalizován v mitochondriální matrix. Jako jediný člen skupiny sirtuinů nemá funkci deacetylázy (Tatone *et al.*, 2014), ale namísto toho využívá  $\text{NAD}^+$  k ADP-ribosylaci. Hlavním aktivátorem SIRT4 je přítomnost poškozené DNA (Watroba *et Szukiewicz*, 2016).

SIRT5 je také lokalizován v mitochondriální matrix. Vykazuje demalonylázovou a desukcinylázovou aktivitu (Morris, 2012). Deacetyluje cytochrom C, prostřednictvím čehož se účastní regulace apoptózy a procesu buněčného dýchání a napomáhá zde snížení koncentrace ROS (Watroba *et Szukiewicz*, 2016).

SIRT6 je lokalizován v buněčném jádře, kde je vázán na chromatin, a v malém množství i v endoplazmatickém retikulu. V jádře má funkci deacetylázy a ADP-ribosyltransferázy. Účastní se ochrany telomer proti replikativnímu stresu, udržení homeostázy a stability genomu. Významnou roli hraje při reparaci DNA, kdy se váže na místa zlomů a přitahuje k nim DNA-reparační enzymy (Morris, 2012; Watroba *et Szukiewicz*, 2016).

SIRT7 je lokalizován v jadérku a má vysokou substrátovou specifitu k H3K18. Dále ovlivňuje RNA polymerázu I a reguluje tím transkripci ribozomálních genů (Morris, 2012).

### 3.5.1 Regulace aktivity sirtuinů

Aktivita SIRT1 je ovlivněna post-translačními modifikacemi. Pro SIRT1 jsou typické sumoylace a fosforylace, přičemž obě tyto modifikace zvyšují jeho expresi. Sumoylace SIRT1 je odpovědí na genotoxický stres a zvyšuje stabilitu genomu (Sasaki *et al.*, 2008; Yang *et al.*, 2007).

Nejdůležitějším regulátorem aktivity sirtuinů je hladina  $\text{NAD}^+$  (Imai, 2009). Je nezbytný pro průběh deacetylační reakce a nemůže být nahrazen NADH,  $\text{NAD}^+$  ani NADPH (Imai *et al.*, 2000). Ačkoli je aktivita sirtuinů inhibována vysokou hladinou NADH, větší roli pro funkci sirtuinů má vzájemný poměr mezi  $\text{NAD}^+$  a NADH (Lin *et al.*, 2004). Vysoká hladina  $\text{NAD}^+$  zvyšuje expresi SIRT1 až na dvojnásobek běžné aktivity, naopak snížení hladiny vede k opačnému efektu (Rodgers *et al.*, 2005).

Významný vliv na aktivitu SIRT1 má oxidativní stres. Vlivem oxidativního stresu dochází k hromadění volných kyslíkových radikálů (ROS) a následnému poškození DNA vedoucímu až k apoptóze buňky. Zvýšená koncentrace ROS podporuje aktivitu SIRT1, který

dále zvyšuje aktivitu rodiny FOXO proteinů, především FOXO3A, a tím podporuje reparaci DNA. Vyšší exprese SIRT1 dále vede k inhibici pro-apoptického faktoru p53, který reaguje na výskyt poškozené DNA. Oxidativní stres může aktivitu SIRT1 nejen zvyšovat, ale také snižovat. Zvýšená koncentrace ROS může mít za následek oxidaci SIRT1, přetrvávající vysokou aktivitu JNK1 či zvýšenou expresi mikroRNA, v důsledku kterých dochází ke snížení aktivity SIRT1 a ubikvitinaci (Michan *et al.*, 2007; Giannakou *et al.*, 2004; Salminen *et al.*, 2013).

Nejznámějším aktivátorem sirtuinů je resveratrol, jehož molekulární mechanismus je vysvětlen konformačními změnami molekuly sirtuinu (Cao *et al.*, 2015). Jeho aktivační účinek byl pozorován na SIRT1 a SIRT5, naopak u SIRT3 byla pozorována inhibice (Howitz *et al.*, 2003). Resveratrol svým působením zvyšuje hladinu deacetylase a tím ještě zvyšuje pozitivní efekt (Gertz *et al.*, 2012).

### 3.5.2 Vliv sirtuinů na zrající oocyty a preimplantační embrya

Zásoba sirtuinů SIRT1 až SIRT7 se v oocytu vytváří během jeho zrání. Ve zralých oocytech další tvorba ustává a po fertilizaci musí zárodek vystačit s maternální zásobou vytvořenou během zrání oocyty. Expres sirtuinů po oplození postupně klesá po celou dobu preimplantačního vývoje. Množství studií dokazuje příznivý vliv sirtuinů na zrání oocyty a následný vývoj embrya (Kawamura *et al.*, 2010; Liu *et al.*, 2012; Kwak *et al.*, 2012a; 2012b; Di Emidio *et al.*, 2014; Tatone *et al.*, 2014).

V porovnání s *in vivo* podmínkami jsou za *in vitro* podmínek oocyty i embrya výrazně náchylnější na negativní dopady oxidativního stresu, a proto resistance vůči němu nabývá při *in vitro* kultivaci na významu. Vysoké hladiny ROS vedou k narušení embryonálního vývoje až rané embryonální odúmrti (Liu *et al.*, 2012; Kwak *et al.*, 2012a; Tatone *et al.*, 2014). U oocytů i embryí hraje významnou roli především SIRT1. Zúčastňuje se regulace správné segregace chromatinu, účastní se resistance vůči oxidativnímu stresu a zabraňuje postovulačnímu stárnutí oocyty. SIRT1 dále stimuluje proliferaci buněk granulózy prostřednictvím podpory hromadění cyklinu B a p34<sup>cdc2</sup> (Pavlova *et al.*, 2013). Embryonální vývoj je pozitivně regulován také histon metyltransferázou SUV39H1, proteinem zapojeným do formace chromatinu. Po deacetylaci histonu vlivem SIRT1 je umožněna trimetylace H3K9 působením SUV39H1. Vytváří se fakultativní heterochromatin obsahující umlčené geny a tato část genomu je stabilizována. SUV39H1 je ubikvitinován působením MDM2 E3 ubikvitin ligázy, jehož aktivita je tlumena aktivitou SIRT1 (Bosch-Presequé *et al.*, 2011).

SIRT1 dále zvyšuje odolnost embrya proti stresu stimulací faktoru K-70, který má protiapoptotické a DNA-reparační účinky. Faktor p53, první popsáný nehistonový cíl SIRT1, má na přežití embrya negativní vliv, jedná se významný faktor podporující apoptózu v důsledku poškození DNA. Deacetylací tohoto faktoru vlivem SIRT1 dochází k jeho inaktivaci a následné ubikvitinaci pomocí MDM2 E3 ubikvitin ligázy (Zhang *et Kraus*, 2010).

SIRT2 ovlivňuje tvorbu dělicího vřeténka a seřazení chromozomů do ekvatoriální roviny. SIRT3 se účastní podpory folikulogeneze, luteinizace, sekrece progesteronu a udržuje správnou funkci mitochondrií. V *in vitro* podmínkách má pozitivní vliv na odolnost vůči stresu (Kwak *et al.*, 2012b; Kawamura *et al.*, 2010). Při inhibici aktivity SIRT3 je narušena funkce mitochondrií. V důsledku této dysfunkce se při buněčném dýchání hromadí intracelulární ROS. Pokud není buňka schopná nadbytek ROS degradovat, dostává se do tzv. oxidativního stresu, který dále aktivuje pro-apoptotický faktor p53. Výsledkem je zpomalení až úplné zastavení buněčného cyklu a u některých buněk až spuštění apoptózy. Při nedostatečné aktivitě SIRT3 tak selhává preimplantační vývoj a může dojít až k rané embryonální odúmrti. Pro správný průběh vývoje jsou nezbytné maternální zásoby SIRT3, neboť při jejich deficitu není schopný zygoticky aktivovaný SIRT3 tento nedostatek vykompenzovat (Kawamura *et al.*, 2010). SIRT6 je vázán na chromatin. Je nezbytný pro správný vývoj a délku dělicího vřeténka. Jeho nedostatek má za následek hyperacetylaci H4K16, čímž dochází k chybné segregaci chromozomů a aneuploidii (Han *et al.*, 2015).

Z dosavadních poznatků je patrné, že SIRT1 se nachází ve zralých oocytech i v zygotách a je zde významným regulátorem. Jeho přítomnost je pro správný průběh vývoje velmi zásadní. Díky jeho regulaci několika buněčných mechanismů selhává při deficienci SIRT1 správný vývoj zárodku. V současné době není prostudován vliv SIRT1 na regulaci formace prvojadra, ačkoli se dá předpokládat, že tento významný člen deacetyláz nenechá prvojádra, místa s vysokou aktivitou post-translačních modifikací, bez povšimnutí.

## 4 Materiál a metody

### 4.1 Izolace a zrání oocytů *in vitro*

Oocyty byly izolovány z vaječníků dovážených z jatek (Jatky Plzeň, a. s., Plzeň, Česká Republika) od necyklujících prasniček (kříženci Landrace x Bílé ušlechtilé). Do laboratoře byly převáženy při teplotě 39 °C. Kumulo-oocytární komplexy (COCs) byly získávány z ovariálních folikulů o velikosti 2 - 5 mm pomocí stříhačky a jehly (20G). COCs byly zpracovány v HEPES-pufrovaném médiu Thyrodeho roztoku obsahujícího 0,01 % (w/v) polyvinyl alkohol (TL-HEPES-PVA). Pro další *in vitro* zrání byly použity pouze plně dorostlé oocyty s neporušenou cytoplazmou a obklopené kompaktní vrstvou kumulárních buněk.

Pro zrání COCs bylo použito modifikované médium mTCM (Gibco, Life Technologies, UK) obohacené o 0,1 % PVA, 3,05 mM D-glukózu, 0,91mM pyruvátu sodného, 0,57 L-cysteinu, 0,5 µg-mL<sup>-1</sup> LH (Sigma-Aldrich, USA), 0,5 µg-mL<sup>-1</sup> FSH (Sigma), 10 ng-mL<sup>-1</sup> epidermálního růstového faktoru (Sigma), 10 % prasečí folikulární tekutiny, 75 µg-mL<sup>-1</sup> penicilinu G a 50 µg-mL<sup>-1</sup> streptomycinu. Po 22 hodinách kultivace byly COCs kultivovány v TCM199 bez přídavku LH a FSH dalších 22 hodin. Kultivace probíhala ve 4-důlkových miskách (Nunc, Denmark) v 500 µL kultivačního média, překrytého minerálním olejem, při teplotě 39 °C ve směsi vzduchu obsahující 5 % CO<sub>2</sub> (Abeydeera *et al.*, 1998).

### 4.2 Oplození oocytů *in vitro* (IVF) a kultivace zygot *in vitro*

Po 44 hodinách zrání byly z oocytu odstraněny kumulární buňky působením pomocí 0,1 % hyaluronidázy v TL-HEPES-PVA. Pro IVF byly vyselektovány MII oocyty s vyděleným prvním pólovým tělískem. Oocyty byly třikrát promyty v modifikovaném Tris-pufrovaném médiu (mTBM; Abeydeera *et al.*, 1998) s 0,2 % bovinním sérovým albuminem (BSA; A7888; Sigma). Následně byly umístěny do 100 µL kapek média mTBM a překryty minerálním olejem na Petriho miskách o průměru 35 mm. Misky byly po dobu 30 minut ekvilibrovány při teplotě 39 °C ve směsi vzduchu obsahující 5 % CO<sub>2</sub>.

Spermie byly získány následujícím způsobem: z dovezené inseminační dávky byl odebrán objem, ve kterém se nacházelo 100 milionů spermií a tento objem byl následně centrifugován při 1500 rpm po dobu 5 minut. Spermie byly následně dvakrát promyty ve fosfátovém pufru (PBS) s přídavkem 0,1 % PVA (PBS-PVA). Následně byly spermie

naředěny médiem mTCM na koncentraci  $1 \times 10^7$  a dále byly přidány v objemu 5  $\mu$ l k oocytům na výslednou koncentraci  $5 \times 10^5$ . Oocyty byly společně se spermii inkubovány 6 hodin při teplotě 39 °C ve směsi vzduchu obsahující 5 % CO<sub>2</sub>. Po 6 hodinách byly oocyty promyty v médiu PZM3 (Yoshioka *et al.*, 2002) s přidavkem 0,4 % BSA (A6003; Sigma) a dále kultivovány po dobu 22 hodin.

### 4.3 Inhibitory sirtuinů

Inhibice aktivity SIRT1 byla provedena v PZM3 během *in vitro* kultivace (IVC) časných zygot. Byly použity tyto inhibitory: nikotinamid (2,5 mM, 5,0 mM, 7,5 mM, nescifický inhibitor sirtuinů, Abcam, ab120864) nebo sirtinol (10  $\mu$ M, specifický SIRT1 a SIRT2 inhibitor, Abcam, ab141263).

### 4.4 Imunofluorescence a analýza obrazu

Po 22 hodinách kultivace *in vitro* byly zygoty zbaveny zony *pellucidy* ošetřením 0,5 % pronázou. Dále byly provedeny další kroky popsané Yi *et al.* (2014). Směs myší monoklonální anti-histon H3 (di methyl K9, tri methyl K9) protilátky (me2/3H3K9; ab71604, Abcam, UK; 1:200) a králičí monoklonální anti-histon H3 (acetyl K9) protilátky (acH3K9; ab32129, Abcam, Cambridge, UK; 1:200) byla aplikována přes noc při teplotě 4 °C. Následně byly oocyty dvakrát promyty a následně inkubovány s fluorescein isothiocyanate (FITC) konjugovaným kozím anti-myším (GAM) IgG (62-6511; Invitrogen, Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, MA, USA; 1:200) a Cyanine Dye (Cy5) konjugovaným kozím anti-králičím (GAR) IgG (111-175-144; Jackson ImmunoResearch Laboratories Inc., West Grove, PA, USA) při pokojové teplotě po dobu 40 min. Následně byly oocyty dvakrát promyty a zamontovány do Vectashield s 4'6'-diamidino-2-phenylindolem (DAPI; Vector Laboratories Inc., Burlingame, CA, USA). Obrázky byly pořízeny pomocí mikroskopu Ti-U (Nikon Co., Tokyo, Japan), kamery Clara Interline CCD (Andor Technology PLC, Belfast, Sounthern Ireland) a programu NIS Elements Ar (Laboratory Imaging, Czech Republic). Negativní kontroly byly připraveny za stejných podmínek jako pozitivní vzorky s vynecháním specifických protilátek. Pozitivní vzorky byly vyhodnoceny a vztaženy k negativní kontrole



při srovnatelném nastavení optické dráhy. Intenzita signálu acH3K9 v prvojádrech byla vyjádřena poměrem k intenzitě signálu meH3K9, a naopak.

## **4.5 Statistika**

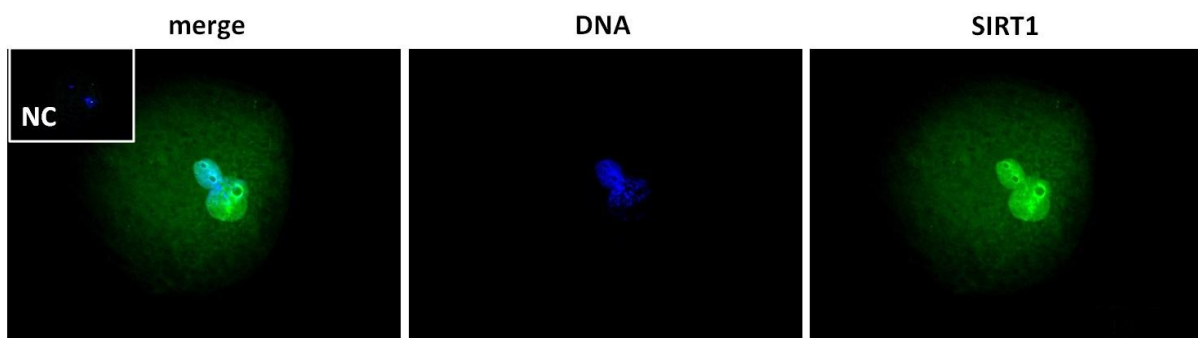
Každý experiment byl opakován minimálně pětkrát. Data ze všech experimentů byla analyzována prostřednictvím obecných lineárních modelů (General Linerar Model, GLM) v programu SAS (SAS Institute Inc., Cary, NC, USA). Pro stanovení významných rozdílů mezi jednotlivými skupinami byl použit t-test. Hladina významnosti byla stanovena s odchylkou  $P < 0,05$ .

## 5 Výsledky

Cílem experimentu bylo ověřit hypotézu, že NAD<sup>+</sup>-dependentní histon deacetyláza SIRT1 je přítomna v prasečích zygotách, kde jsou zapojeny do regulace formace prvojader a modifikace histonového kódu. Pro tento účel byly použity zygoty po 22 hod. kultivace po *in vitro* oplození (IVF) ošetřené 2,5 – 7,5  $\mu$ M nikotinamidem (nespecifického inhibitoru sirtuinů) nebo 10  $\mu$ M sirtinolem (specifického inhibitoru SIRT1).

### 5.1 Lokalizace SIRT1 v zygotách prasat

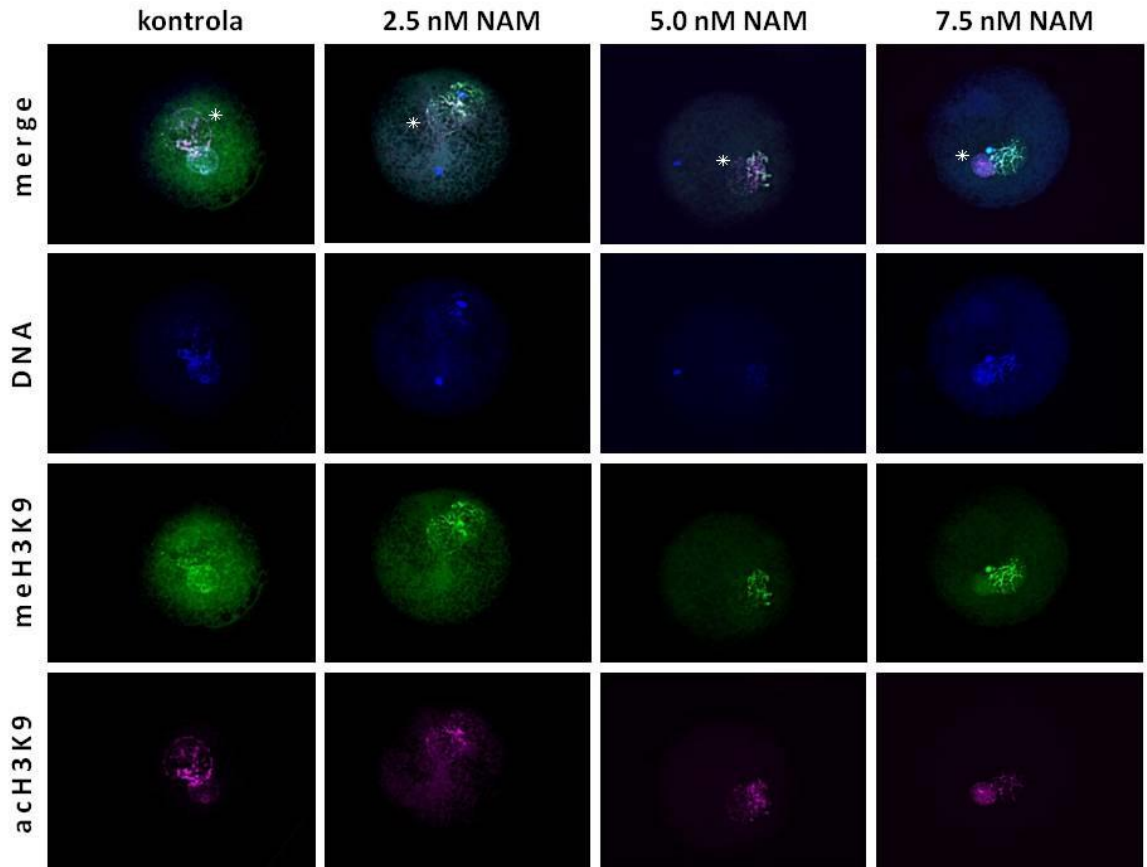
Pomocí imunocytochemické lokalizace SIRT1 byl pozorován jeho výskyt v zygotách prasat. V porovnání s negativní kontrolou je zřejmé, že SIRT1 je přítomný v cytoplazmě i v obou prvojádrech. V prvojádrech je intenzita signálu výrazně vyšší, než je tomu v cytoplazmě, viz obrázek 1.



Obrázek 1. **Lokalizace SIRT1 v zygotách prasat.** V porovnání s negativní kontrolou je patrné, že SIRT1 se nachází v cytoplazmě i v obou prvojádrech zygot prasat. NC – negativní kontrola, merge – DNA + SIRT1.

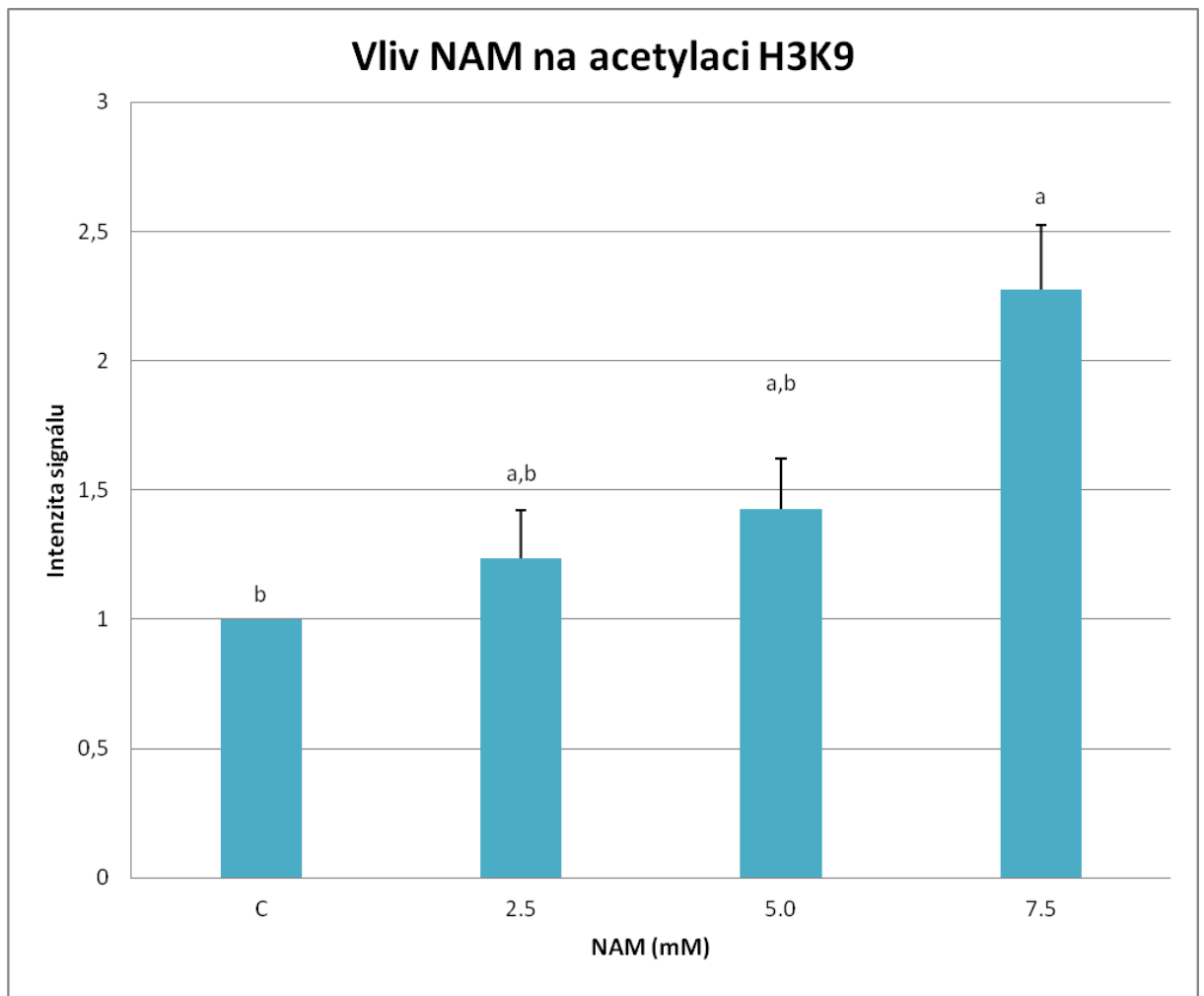
## **5.2 Vliv nikotinamidu na acetylaci a metylaci H3K9**

Vliv koncentrace nikotinamidu (NAM), nesespecifického inhibitoru sirtuinů, byl zjišťován na histonu H3 na lysinu K9 (acH3K9) za použití imunocytochemické lokalizace acH3K9 a analýzy obrazu. Ze získaných výsledků je patrné, že v porovnání s kontrolní skupinou se s rostoucí koncentrací NAM zvyšuje také intenzita signálu acetylace a zároveň se snižuje intenzita signálu metylace. Z výsledků je dále patrná asymetrie mezi modifikací samčího a samičího prvojádra. Samčí prvojádro vykazuje vyšší intenzitu signálu acetylace než metylace zatímco samičí prvojádro naopak vykazuje vyšší intenzitu signálu metylace než acetylace, viz obrázek 2.



Obrázek 2. **Vliv nikotinamidu na modifikaci H3K9 v prasečích prvojádrech.** Se zvyšující se koncentrací NAM, nescifického inhibitoru sirtuinů, se zvyšuje hladina acetylce a zároveň snižuje hladina metylace histonů. Dále je zjevná asymetrie v modifikaci samčího a samičího prvojádra. Samičí prvojádro vykazuje vyšší intenzitu signálu metylace, naopak samčí prvojádro (označeno hvězdičkou) vykazuje vyšší intenzitu signálu acetylce. H3K9 – histon H3 s lysinem na pozici 9, NAM – nikotinamid, merge – DNA + meH3K9 + acH3K9.

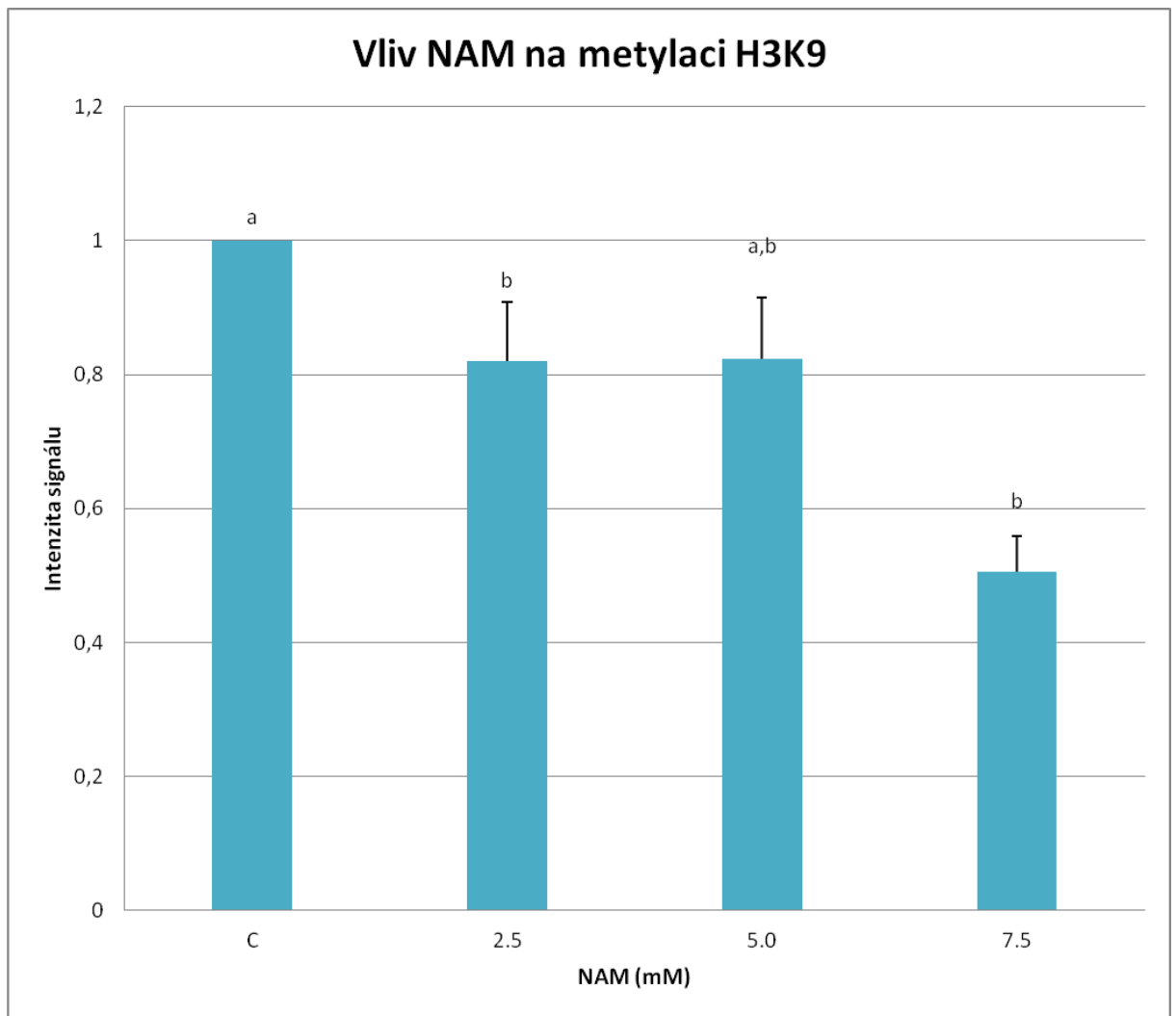
Vliv koncentrace nikotinamidu (NAM), nesespecifického inhibitoru sirtuinů, byl zjišťován na histonu H3 na lysinu K9 (acH3K9) za použití imunocytochemické lokalizace acH3K9 a analýzy obrazu. Ze získaných výsledků je patrné, že v porovnání s kontrolní skupinou se s rostoucí koncentrací NAM zvyšuje také hladina acetylace. Po ošetření 2,5 mM a 5,0 mM NAM jsme v porovnání s kontrolní skupinou nezjistili statisticky významný rozdíl ( $1,00 \pm 0,00$  versus  $1,24 \pm 0,19$  a  $1,43 \pm 0,19$ ). Po přidání 7,5 mM NAM jsme zjistili statisticky významné zvýšení intenzity signálu acH3K9. Tento rozdíl činil nárůst o 127 % ( $1,00 \pm 0,00$  versus  $2,27 \pm 0,25$ ) v porovnání s kontrolní skupinou, viz obrázek 3.



Obrázek 3. Vliv koncentrace nikotinamidu na množství acetylovaného H3K9. Se zvyšující se koncentrací NAM, nescifického inhibitoru sirtuinů, roste úroveň acetylace H3K9. a,b Statisticky významné rozdíly ( $P < 0,05$ ). NAM – nikotinamid, H3K9 – histon H3 s lysinem na pozici 9, C – kontrolní skupina.

Vliv koncentrace nikotinamidu (NAM), nesespecifického inhibitoru sirtuinů, byl také zjišťován na histonu H3 na lysinu K9 (meH3K9) za použití imunocytochemické lokalizace meH3K9 a analýzy obrazu. Ze získaných výsledků je patrné, že v porovnání s kontrolní skupinou se s rostoucí koncentrací NAM snižuje hladina metylace. Po ošetření 2,5 mM NAM jsme zjistili pokles intenzity signálu v porovnání s kontrolní skupinou o 18 % ( $0,82 \pm 0,09$ ). Podobně tomu bylo po přidání 5,0 mM, kdy úroveň metylace klesla o 17 % ( $0,83 \pm 0,09$ ). Statisticky významný rozdíl jsme pozorovali po přidání 7,5 mM NAM, při kterém byla intenzita signálu meH3K9 o 49 % nižší ( $1,00 \pm 0,00$  versus  $0,51 \pm 0,05$ ) v porovnání s kontrolní skupinou, viz obrázek 4.

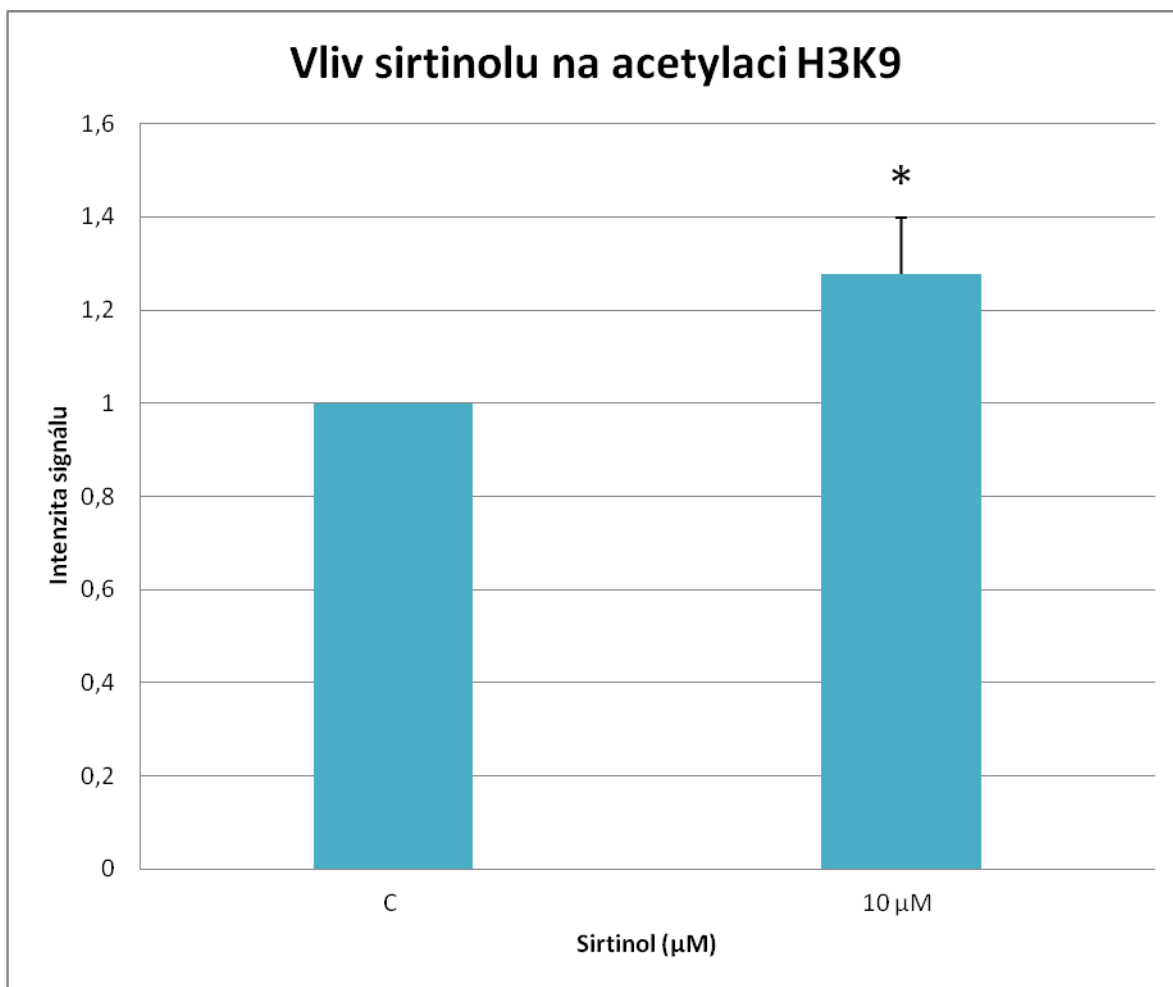




Obrázek 4. **Vliv koncentrace nikotinamidu na množství metylovaného H3K9.** Po přidání NAM, nespecifického inhibitoru sirtuinů, do kultivačního média dochází ke snížení úrovně metylace H3K9. a,b Statisticky významné rozdíly ( $P < 0,05$ ). NAM – nikotinamid, H3K9 – histon H3 s lysinem na pozici 9, C – kontrolní skupina.

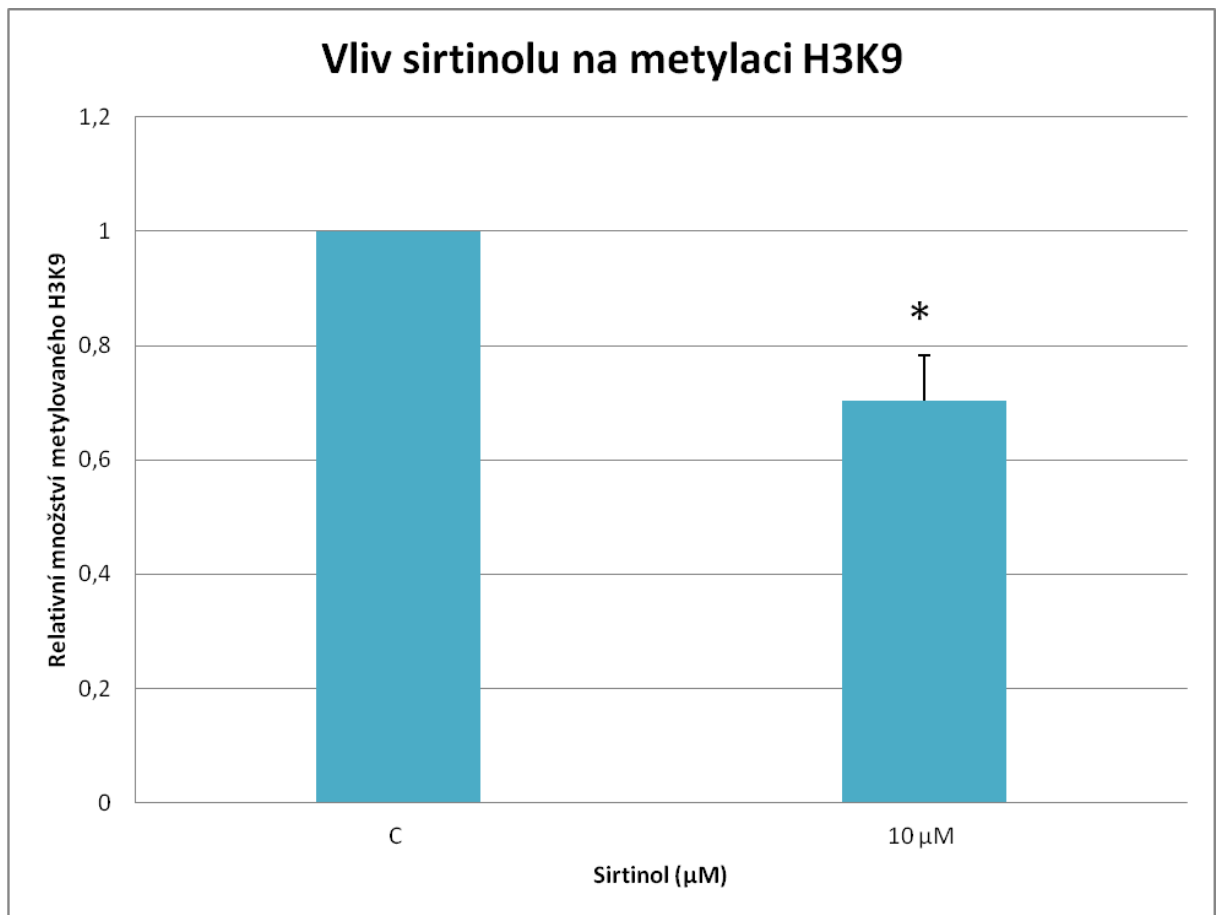
### **5.3 Vliv sirtinolu na acetylaci a metylaci H3K9**

Přidáním sirtinolu byl nezávisle ověřován výše pozorovaný biologický efekt NAM. Vliv sirtinolu, specifického SIRT1 inhibitoru, byl zjišťován na histonu H3 na lysinu K9 (acH3K9) za použití imunocytochemické lokalizace acH3K9 a analýzy obrazu. Ze získaných výsledků je patrné, že v porovnání s kontrolní skupinou došlo po přidání 10  $\mu$ M sirtinolu k pokusné skupině ke statisticky významnému nárůstu intenzity signálu acH3K9 o 28 % ( $1,00 \pm 0,00$  versus  $1,28 \pm 0,12$ ), viz obrázek 5.



Obrázek 5. **Vliv sirtinolu na acetylaci histonu H3K9.** Po přidání 10  $\mu\text{M}$  sirtinolu, specifického SIRT1 inhibitoru, došlo ke zvýšení hladiny acetylace histonu H3K9. \*Statisticky významné rozdíly ( $P < 0,05$ ). H3K9 – histon H3 s lysinem na pozici 9, C – kontrolní skupina, 10  $\mu\text{M}$  – pokusná skupina s 10  $\mu\text{M}$  sirtinolem.

Přidáním sirtinolu byl ověřován biologický efekt NAM. Vliv sirtinolu, specifického SIRT1 inhibitoru, byl zjišťován také na histonu H3 na lysinu K9 (meH3K9) za použití imunocytochemické lokalizace meH3K9 a analýzy obrazu. Ze získaných výsledků je patrné, že v porovnání s kontrolní skupinou došlo po přidání 10  $\mu$ M sirtinolu k pokusné skupině ke statisticky významnému poklesu intenzity signálu meH3K9 o 30 % ( $1,00 \pm 0,00$  versus  $0,70 \pm 0,08$ ), viz obrázek 6.



Obrázek 6. **Vliv sirtinolu na metylaci histonu H3K9.** Po přidání 10 µM sirtinolu, specifického SIRT1 inhibitoru, došlo ke snížení úrovně metylace histonu H3K9. \*Statisticky významné rozdíly ( $P < 0,05$ ). H3K9 – histon H3 s lysinem na pozici 9, C – kontrolní skupina, 10 µM – pokusná skupina s 10 µM sirtinolem.

#### **5.4 Vliv nikotinamidu či sirtinolu na *in vitro* oplození**

Z dat nashromážděných z námi uskutečněných *in vitro* oplození (IVF) jsme se zaměřili na hledisko, jakým způsobem ovlivňuje přidavek nikotinamidu či sirtinolu k oocytům výsledek IVF. Procento penetrovaných oocytů, polyspermního oplození i rýhujících se zygot nevykazovalo v porovnání s kontrolní skupinou statisticky významný rozdíl, viz. obrázek 7.

	PEN (%)	POL (%)	CL (%)
Kontrola	49,89 ± 4,60 <sup>a</sup>	24,81 ± 4,20 <sup>A</sup>	16,92 ± 2,41 <sup>1</sup>
NAM 5	68,51 ± 11,43 <sup>a</sup>	29,72 ± 10,86 <sup>A</sup>	16,33 ± 4,73 <sup>1</sup>
NAM 7,5	53,14 ± 1,64 <sup>a</sup>	8,88 ± 5,13 <sup>A</sup>	9,50 ± 3,45 <sup>1</sup>
Sirtinol	42,34 ± 8,69 <sup>a</sup>	13,03 ± 5,91 <sup>A</sup>	17,66 ± 9,05 <sup>1</sup>

Obrázek 7. **Vliv nikotinamidu a sirtinolu na *in vitro* oplození.** V porovnání s kontrolní skupinou jsme u pokusné skupiny nezaznamenali statisticky významné rozdíly ( $P < 0,05$ ) v úspěšnosti penetrace, výskytu polyspermního oplození ani v procentu dále se rýhujících zygot. NAM – nikotinamid, PEN (%) – procento penetrovaných oocytů, POL (%) – procento výskytu polyspermního oplození, CL (%) – procento rýhujících se zygot.

## 6 Diskuse

Epigenetika je vědní obor zabývající se změnami v expresi genů, které nejsou způsobeny změnami v sekvenci nukleotidů. Mezi epigenetickými nástroji figurují také post-translační modifikace, které regulují expresi genů na základě metylace či acetylace DNA, modifikace histonů a regulace nekódující RNA (Berger *et al.*, 2009). Úroveň metylace se promítá do transkripce genů – hypermetylace indukuje represi a hypometylace aktivaci transkripce (Reik *et al.*, 2001).

V post-translačních modifikacích histonů se uplatňuje působení sirtuinů, NAD<sup>+</sup>-dependentních histon deacetyláz. Sirtuiny jsou zapojeny do regulace exprese genů nejen v somatických buňkách dospělých jedinců, ale s nejvyšší pravděpodobností také v gametách a v embryu. Tuto myšlenku jsme ověřovali touto diplomovou prací, ve kterou jsme se zaměřili na lokalizaci SIRT1 v zygotách prasat a zaměřili jsme se následně na to, zda se zde účastní regulace post-translačních modifikací histonů, tzv. histonovém kódu, v prvojádrech.

Z našich pozorování lokalizace SIRT1 v zygotách prasat je patrné, že SIRT1 je přítomen především prvojádrech a částečně také v cytoplazmě. Větší intenzita signálu SIRT1 v prvojádrech v porovnání s cytoplazmou je patrné v důsledku vyšší afinity SIRT1 k histonům jakožto hlavním cílům deacetylační aktivity. Signál z cytoplazmy je zapříčiněn patrně tím, že SIRT1 má krom histonů za cíle také proteiny nehistonové povahy (Vaquero *et al.*, 2004). Naše pozorování SIRT1 v zygotách potvrdilo již dříve publikované výsledky na somatických buňkách (Kang *et al.*, 2009; Dryden *et al.*, 2003; Vaquero *et al.*, 2004; Wang *et al.*, 2012). Naše detekce SIRT1 v zygotách koreluje s nálezy, které publikoval Kwak *et al.* (2012b), který pozoroval expresi sirtuinů na oocytech a preimplantačních embryích prasat, u nichž popsal expresi všech sirtuinů SIRT1-7. Shodných výsledků dosáhl již dříve také Kawamura *et al.* (2010), který se zaměřil na lokalizaci SIRT1-7 u oocytů a preimplantačních embryí u myši.

Dále jsme se v této diplomové práci zaměřili na sledování asymetrie v modifikaci histonů mezi oběma prvojádry u prasečích zygot. Maternální prvojádro vykazovalo výraznou hypermetylací v porovnání se paternálním prvojádrem, které bylo naopak hyperacetylované. Ke shodným závěrům došli také autoři studií prováděných na myším modelu (Arney *et al.*, 2002; Reik *et al.*, 2003; Santos *et al.*, 2005; Feil, 2009; Torres-Padilla *et al.*, 2006; Ma *et al.*, 2015). Stejný fenomén byl pozorován také u zygot skotu, potkana, králíka a člověka (Beaujean *et al.*, 2004). Byly však publikovány také výsledky, které jsou v rozporu s našimi. Erhardt *et al.* (2003) detekoval u myši dimetylací H3K9 až za 3 - 6 hod. po oplození u obou prvojader. Santos *et al.* (2005) pozoroval dimetylací až po replikaci DNA.



Beaujean *et al.* (2004) se ve své studii zaměřil na změny v metylaci u zygot ovcí. Ovce se ukázaly jako model, u kterého nenastává aktivní demethylace paternálního genomu a tedy není nijak patrná asymetrie mezi prvojádry. Ke stejným výsledkům došel také Hou *et al.* (2008) ve svých pozorováních zygot u koz.

Z uvedených rozdílů je patrné, že asymetrie v modifikaci histonů v prvojádrech není jednotná napříč savčími druhy, nýbrž je druhově specifická, a tedy ke každému druhu bychom měli přistupovat jako k unikátu.

V dalších experimentech jsme pozorovali, jakým způsobem je SIRT1, jehož přítomnost v zygotách prasat jsme již potvrdili, zapojen do regulace úrovně acetylace a metylace. Při inhibici SIRT1 pomocí nikotinamidu (NAM) jsme pozorovali nárůst hladiny acetylace a zároveň pokles hladiny metylace histonu H3 na lysinu 9 (K9). Se zvyšující se koncentrací inhibitoru rostla hladina acetylace H3K9 a se snižující se koncentrací inhibitoru naopak klesala hladina metylace H3K9. Také po přidání sirtinolu jsme pozorovali stejný efekt jako po ošetření NAM. Tímto pokusem jsme ověřili, že změny v hladině acetylace a metylace nastalé po přidání NAM nastaly v důsledku inhibice SIRT1.

Pokles hladiny metylace H3K9 lze vysvětlit nutnou aktivitou metyltransferázy SUV39H1, která zajišťuje metylaci H3K9. SUV39H1 je za normálních podmínek aktivována deacetylací pomocí SIRT1. Při inhibici SIRT1 nedochází tedy k aktivaci SUV39H1 a úroveň metylace tím klesá (Vaquero *et al.*, 2007).

Negativní dopad inhibice SIRT1 na úroveň metylace popsal také Pruitt *et al.* (2006) v experimentech se somatickými buňkami. Inhibice SIRT1 měla za následek pokles metylace promotorů u tumor supresorových genů, v důsledku čehož byly tyto geny reaktivovány. Změny na úrovni acetylace a metylace se odrážejí také v genové expresi embryí po reaktivaci jejich genomu. S našimi výsledky, kdy po inhibici SIRT1 došlo k těmto změnám v histonovém kódu, se doplňují výsledky z experimentů, které prováděl Kwak *et al.* (2012b), který se zaměřil právě na nalezení spojitostí mezi SIRT1 a genovou expresí. Výsledkem inhibice SIRT1 se ukázaly být změny v genové expresi až pozastavení vývoje pre-implantačních embryí prasat. Ke shodným výsledkům dospěl také Kawamura *et al.* (2010) u myší.

V průběhu jednotlivých cyklů IVF jsme zaznamenávali data o úspěšnosti penetrace, výskytu polyspermního oplození a výskytu zygot, které se dále rýhovaly. Tato data jsme sledovali nejen u kontrolní skupiny, ale také u skupiny obohacené o NAM či sirtinol. Po zhodnocení dat jsme nezaznamenali statisticky významný rozdíl mezi kontrolní a pokusnou skupinou. Je tedy zřejmé, že ačkoli na podobě histonového kódu se inhibice SIRT1 odrazila,

na morfologické projevy výsledku IVF jsme vliv nezpozorovali. Tento fakt můžeme vysvětlit tím, že dorostlý oocyt i časná zygota jsou útvary transkripčně inaktivní, které čerpají ze zásob uložených z předešlých fází vývoje, a proto se změny v podobě histonového kódu nemusí navenek prozatím projevit.

Vliv SIRT1 se odráží nejen na podobě modifikací histonů, ale účastní se také odpovědi buňky na oxidativní stres. Zvláště v *in vitro* podmínkách jsou buňky vystaveny velkému riziku oxidativního stresu. Jak uvádí například Milner (2009), při inhibici SIRT1 byl zvýšen výskyt apoptózy u kultivovaných buněk. Ověření protektivní úlohy SIRT1 během embryonálního vývoje a vysvětlení jeho molekulárního mechanismu regulace oxidativního stresu vyžaduje dalších experimentů.

Z dosavadních výsledků vyplývá nezbytnost účasti SIRT1 na regulaci podoby histonového kódu nejen u zrajících oocytů a pre-implantačních embryí, ale také v zygotě ve formujících se prvojádrech. Přesný dopad regulace pomocí SIRT1 v této fázi vývoje by mohl být vhodným předmětem dalších výzkumů zaměřených na tuto problematiku.

## 7 Závěr

Dobrá vývojová kompetence raných embryí je podmíněna mj. korektní podobou histonového kódu, která se v pozdějších fázích odráží na genové expresi. Ta je regulována několika mechanismy, mezi kterými jsou v posledních letech zmiňovány také sirtuiny. Sirtuiny deacetylují histony i transkripční faktory a z dřívějších výzkumů na somatických buňkách je zřejmé, že jejich působení se odráží v regulaci exprese genů. K jejich vlivu na regulaci exprese v raných embryích je soustředěna pozornost až v posledních letech. Doposud byly účinky popsány především u myši, ale u prasat, která jsou pro člověka bližším modelem, je výzkumů zatím nedostatek.

V této diplomové práci jsme se zaměřili na regulaci histonového kódu pomocí sirtuinů v zygotách prasat. Nejdříve jsme ověřili, zda se námi vybraný SIRT1 v zygotách nachází. Potvrdili jsme jeho vysokou afinitu k prvojádrům, ve kterých byl SIRT1 lokalizován nejintenzivněji, neboť prvojádra jsou krátce po oplození velmi aktivními místy. Dále jsme u prasete potvrdili asymetrii v epigenetické modifikaci prvojader, která byla popsána u jiných druhů savců. V dalších experimentech jsme po inhibici SIRT1 pozorovali změny v modifikacích histonů, z čehož je patrné zapojení SIRT1 na jejich regulaci v této fázi vývoje.

Důkladné objasnění procesů regulace genové exprese v raných fázích embryonálního vývoje je nezbytné pro získání kvalitních vývojově kompetentních embryí v *in vitro* podmínkách. Odhalení jednotlivých regulačních mechanismů je nezbytné pro pochopení raného vývoje jako celku. Pro další výzkumy by bylo zajímavé zaměřit se na úlohu sirtuinů v dalších fázích raného embryonálního vývoje u prasat i dalších druhů.

## 8 Literární zdroje

Abeydeera, L. R., Wang, W. H., Prather, R. S., Day, B. N. 1998. Maturation *in vitro* of pig oocytes in protein-free culture media: fertilization and subsequent embryo development *in vitro*. *Biology of Reproduction*. 58 (5). 1310-1320.

Adenot, P. G., Szöllösi, M. S., Geze, M., Renard, J. P., Debey, P. 1991. Dynamics of paternal chromatin changes in live one-cell mouse embryos after natural fertilization. *Molecular Reproduction Development*. 28 (1). 23-24.

Armon, L., Eisenbach, M. 2011. Behavioral Mechanism during human sperm chemotaxis: Involvement of hyperactivation. *Plos One*. 6 (12). 1-9.

Arney, K. L., Bao, S., Bannister, A. J., Kouzarides, T., Surani, M. A. 2002. Histone methylation defines epigenetic asymmetry in the mouse zygote. *The International Journal of Developmental Biology*. 46 (3). 317-320.

Bahat, A., Caplan, S. R., Eisenbach, M. 2012. Thermotaxis of human sperm cells in extraordinarily shallow temperature gradients over a wide range. *Plos One*. 7 (7). 1-9.

Balhorn, R. 1982. A model for the structure of chromatin in mammalian sperm. *The Journal of Cell Biology*. 93 (2). 298-305.

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

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

Berger, S. L., Kouzarides, T., Shiekhattar, R., Shilatifard, A. 2009. An operational definition of epigenetics. *Genes & Development*. 23 (7). 781-783.

Bosch-Presegué, L., Raurell-Vila, H., Marazuela-Duque, A., Kane-Goldsmith, N., Valle, A., Oliver, J., Serrano, L., Vaquero, A. 2011. Stabilization of Suv39H1 by SIRT1 is part of oxidative stress response and ensures genome protection. *Molecular Cell*. 42 (2). 210-223.

Campbell, K. H. S., Loi, P., Otaegui, P. J., Wilmut, I. 1996. Cell cycle co-ordination in embryo cloning by nuclear transfer. *Reviews of Reproduction*. 1 (1). 40-46.

Cao, D., Wang, M., Qiu, X., Liu, D., Jiang, G., Yang, N., Xu, R.-M. 2015. Structural basis for allosteric, substrate-dependent stimulation of SIRT1 activity by resveratrol. *Genes and Development*. 29. 1316-1325.

- Collas, P., Poccia, D. 1998. Remodeling the sperm nucleus into a male pronucleus at fertilization. *Theriogenology*. 49 (1). 67-81.
- Dawson, M. A., Bannister, A. J., Gottgens, B. 2009. JAK2 phosphorylates histone H3Y41 and excludes HP1alpha from chromatin. *Nature*. 461 (7265). 819-822.
- Dekel, N. 2005. Cellular, biochemical and molecular mechanism regulating oocyte maturation. *Molecular and Cellular Endocrinology*. 234 (1-2). 19-25.
- Di Emidio, G., Falone, S., Vitti, M., D'Alessandro, A. M., Vento, M., Di Pietro, C., Amicarelli, F., Tatone, C. 2014. SIRT1 signalling protects mouse oocytes against oxidative stress and is deregulated during aging. *Human Reproduction*. 29 (9). 2006-2017.
- Dryden, S. C., Nahhas, F. A., Nowak, J. E., Goustin, A. S., Tainsky, M. A. 2003. Role for human SIRT2 NAD-dependent deacetylase activity in control of mitotic exit in the cell cycle. *Molecular and Cellular Biology*. 23 (9). 3173-3185.
- Dvořáková, M., Příbylová, M., Vaněk, T. 2013. Sirtuiny – histonové deacetylasy ovlivňující transkripci genů. *Chemické listy*. 107. 537-544.
- Eisenach, M., Giojalas, L. 2006. Sperm Guyance in mammals – An unpaved road to the egg. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*. 7 (4). 276-285.
- Erhardt, S., Su, I. H., Schneider, R., Barton, S., Bannister, A. J., Perez-Burgos, L., Jenuwein, T., Kouzarides, T., Tarakhovsky, A., Surani, M. A. 2003. Consequences of the depletion of zygotic and embryonic enhancer of zeste 2 during preimplantation mouse development. *Development*. 130 (18). 4235-4248.
- Fan, H.-Y., Sun, Q.-Y. 2004. Involvement of mitogen-activated protein kinase cascade during oocyte maturation and fertilization in mammals. *Biology of Reproduction*. 70 (3). 535-547.
- Feige, J. N., Auwerx, J. 2008. Transcriptional targets of sirtuins in the coordination of mammalian physiology. *Current Opinion in Cell Biology*. 20 (3). 303-309.
- Feil, R. 2009. Epigenetic asymmetry in the zygote and mammalian development. *The international journal of developmental biology*. 53 (2-3). 191-201.
- Fissore, R. A., He, C. L., Vande Woude, G. F. 1996. Potential role of mitogen-activated protein kinase during meiosis resumption in bovine oocytes. *Biology of Reproduction*. 55 (6). 1261-1270.
- Fulka Jr, J., First, N. L., Moor, R. M. 1998. Nuclear and cytoplasmic determinants involved in the regulation of mammalian oocyte maturation. *Molecular Human Reproduction*. 4 (1). 41-49.

- Gertz, M., Nguyen, G. T. T., Fischer, F., Suenkel, B., Schlicker, C., Fränzel, B., Tomaschewski, J., Aladini, F., Becker, C., Wolters, D., Steegborn, C. 2012. A molecular mechanism for direct sirtuin activation by resveratrol. *Plos One*. 7 (11). 1-12.
- Giannakou, M. E., Partridge, L. 2004. The interaction between FOXO and SIRT1: tipping the balance towards survival. *Trends in Cell Biology*. 14 (8). 408-412.
- Gil, M. A., Cuello, C., Parrilla, I., Vazquez, J. M., Roca, J., Martinez, E. A. 2010. Advances in swine *in vitro* embryo production technologies. *Reproduction in Domestic Animals*. 45 (2). 40-48.
- Goldberg, A. D., Banaszynski, L. A., Noh, K. M., Lewis, P. W., Elsaesser, S. J., Stadler, S., Dewell, S., Law, M., Guo, X., Li, X. 2010. Distinct factors control histone variant H3.3 localization at specific genomic regions. *Cell*. 140 (5). 678-691.
- Gross, D. S. 2001. Sir proteins as transcriptional silencers. *Trends in Biochemical Science*. 26 (11). 685-686.
- Guan, X., Lin, P., Knoll, E., Chakrabarti, R. 2014. Mechanism of inhibition of the human sirtuin enzyme SIRT3 by nicotinamid: computational and experimental studies. *Plos One*. 9 (9). 1-18.
- Guidobaldi, H. A., Teves, M. E., Unates, D. F., Anastasia, A., Giojalas, L. C. 2008. Progesterone from the cumulus cell is the sperm chemoattractant secreted by the rabbit oocyte cumulus complex. *Plos One*. 3 (8). 1-6.
- Hajkova, P. 2010. Epigenetic reprogramming – taking a lesson from the embryo. *Current Opinion in Cell Biology*. 22 (3). 342-350.
- Hall, V., Hinrichs, K., Lazzari, G., Betts, D. H., Hyttel, P. 2013. Early embryonic development, assisted reproductive technologies and pluripotent stem cell biology in domestic mammals. *The Veterinary Journal*. 197 (2). 128-142.
- Han, L., Ge, J., Zhang, L., Ma, R., Hou, X., Li, B., Moley, K., Wang, Q. 2015. Sirt6 depletion causes spindle defects and chromosome misalignment during meiosis of mouse oocyte. *Scientific Reports*. 5. 1-10.
- Hatch, K. R., Capco, D. G. 2001. Colocalization of CaM KII and MAP kinase on architectural element of the mouse egg potentiation of MAP kinase activity by CaM KII. *Molecular Reproduction and Development*. 58 (1). 69-77.
- Heijden, van der G. W., Derijck, A. A. H. A., Ramos, L., Giele, M., Vlag, van der J., Boer, de P. 2006. Transmission of modified nucleosomes from the mouse male Germáne to the zygote and subsequent remodeling of paternal chromatin. *Developmental Biology*. 298 (2). 458-469.

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

Howitz, K. T., Bitterman, K. J., Cohen, H. Y., Lamming, D. W., Lavu, S., Wood, J. G., Zipkin, R. E., Chung, P., Kisielewski, A., Zhang, L. L., Scherer, B., Sinclair, D. A. 2003. Small molecule activators of sirtuins extend *Saccharomyces cerevisiae* lifespan. *Nature*. 425 (6954). 191-196.

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

Chang, J. H., Kim, H.-C., Hwang, K.-Y., Lee, J.-W., Jackson, S. P., Bell, S. D., Cho, Y. 2002. Structural basis for the NAD-dependent deacetylase mechanism of Sir2. *The Journal of Biological Chemistry*. 277 (37). 34489-34498.

Chang, H.-C., Guarente, L. 2014. SIRT1 and other sirtuins in metabolism. *Cell Press*. 25 (3). 138-145.

Ickowicz, D., Finkelstein, M., Breitbart, H. 2012. Mechanism of sperm capitation and the acrosome reaction: role of protein kinases. *Asian Journal of Andrology*. 14 (6). 816-821.

Imai, S., Armstrong, C. M., Kaerberlein, M., Guarente, L. 2000. Transcriptional silencing and longevity protein Sir2 is an NAD-dependent histone deacetylase. *Nature*. 403 (6771). 795-800.

Imai, S. 2009. The NAD world: a new systematic regulatory network for metabolism and aging – SIRT1, systemic NAD biosynthesis and their importance. *Cell Biochemistry and Biophysics*. 53 (2). 65-74.

Izumi, T., Maller, J. L. 1993. Elimination of cdc2 phosphorylation sites in the cdc25 phosphatase blocks initiation of M-phase. *Molecular Biology of the Cell*. 4 (12). 1337-1350.

Kanayama, N., Miyano, T., Lee, J. 2002. Acquisition of meiotic competence in growing pig oocytes correlates with their ability to activate CDC2 kinase and MAP kinase. *Cambridge University Press*. 10 (3). 261-270.

Kang, H., Jung, J.-W., Kim, M. K., Chung, J. H. 2009. CK2 is the regulator of SIRT1 substrate-binding affinity, deacetylase activity and cellular response to DNA-damage. *Plos One*. 4 (8).

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

- Kosako, H., Gotoh, Y., Nishida, E. 1994. Requirement for the MAP kinase kinase / MAP kinase cascade in *Xenopus* oocyte maturation. *The EMBO journal*. 13 (9). 2131-2138.
- Kouzarides, T. 2007. Chromatin modifications and their function. *Cell*. 128 (4). 691-702.
- Kumagai, A., Dunphy, W. G. 1996. Purification and molecular cloning of PLX1, a CDC25 regulatory kinase from *Xenopus* egg extracts. *Science*. 273 (5280). 1377-1380.
- Kwak, S. S., Cheong, S. A., Jeon, Y., Lee, E., Choi, K. C., Jeung, E. B., Hyun, S. H. 2012a. The effects of resveratrol on porcine oocyte *in vitro* maturation and subsequent embryonic development after parthenogenetic activation and *in vitro* fertilization. *Theriogenology*. 78 (1). 86-101.
- Kwak, S. S., Cheong, S. A., Yoon, J. D., Jeon, Y., Hyun, S. H. 2012b. Expression patterns of sirtuin genes in porcine preimplantation embryos and effects of sirtuin inhibitor on *in vitro* embryonic development after parthenogenetic activation and *in vitro* fertilization. *Theriogenology*. 78 (7). 1597-1610.
- Lachner, M., O'Carroll, D., Rea, S., Mechtler, K., Jenuwein, T. 2001. Methylation of histone H3 lysine 9 creates a binding site for HP1 proteins. *Nature*. 410 (6824). 116-120.
- Lee, J. C., Kumar, S., Griswold, D. E., Underwood, D. C. 2000. Inhibition of p38 MAP kinase as a therapeutic strategy. *Immunopharmacology*. 47 (2-3). 185-201.
- Lepikhov, K., Walter, J. 2004. Differential dynamics of histone H3 methylation at position K4 and K9 in the mouse zygote. *BioMed Central Developmental Biology*. 4 (12). 1-5.
- Liang, Ch.-G., Su, Y.-Q., Fan, H.-Y., Schatten, H., Sun, Q.-Y. 2007. Mechanism regulating oocyte meiotic resumption: roles of mitogen-activated protein kinase. *Molecular Endocrinology*. 21 (9). 2037-2055.
- Li, J., Flick, F., Verheugd, P., Carloni, P., Bernhard, L., Rossetti, G. 2015. Insight into the mechanism of intramolecular inhibition of the catalytic activity of sirtuin 2 (SIRT2). *Plos One*. 10 (9). 1-19.
- Lin, S. J., Ford, E., Haigis, M., Liszt, G., Guarente, L. 2004. Caloric restriction extends yeast life span by lowering the level of NADH. *Genes Development*. 18 (1). 12-16.
- Liu, J., Liu, M., Ye, X., Liu, K., Huang, J., Wang, L., Ji, G., Liu, N., Tang, X., Baltz, J. M., Keefe, D. L., Liu, L. 2012. Delay in oocyte aging in mice by the antioxidant N-acetyl-L-cysteine (NAC). *Human Reproduction*. 27 (5). 1411-1420.



- Loppin, B., Bonnefoy, E., Anselme, C., Laurencon, A., Karr, T. L., Couble, P. 2005. The histone H3.3 chaperone HIRA is essential for chromatin assembly in the male pronucleus. *Nature*. 437 (7063). 1386-1390.
- Ma, X.-S., Chao, S.-B., Huang, X.-J., Lin, F., Qin, L., Wang, X.-G., Meng, T.-G., Zhu, C.-C., Schatten, H., Liu, H.-L., Sun, Q.-Y. 2015. The dynamics and regulatory mechanism of pronuclear H3K9me2 asymmetry in mouse zygotes. *Scientific Reports*. 5.
- Macháty, Z., Day, B. N., Prather, R. S. 1998. Development of early porcine embryos *in vitro* and *in vivo*. *Biology of Reproduction*. 59 (2). 451-455.
- McLay, D. W., Clarke, H. J. 2003. Remodelling in the paternal chromatin at fertilization in mammals. *Reproduction*. 125 (5). 625-633.
- Michan, S., Sinclair, D. 2007. Sirtuins in mammals: insights into their biological functions. *The Biochemical Journal*. 404 (1). 1-13.
- Milner, J. 2009. Cellular regulation of SIRT1. *Current Pharmaceutical Design*. 15 (1). 39-44.
- Motlík, J., Fulka, J. 1976. Breakdown of the germinal vesicle in pig oocytes *in vivo* and *in vitro*. *Journal of Experimental Zoology*. 198 (2). 155-162.
- Motlík, J., Pavlok, A., Kubelka, M., Kalous, J., Kalab, P. 1997. Interplay between <sup>cdc2</sup> kinase and MAP kinase pathway during maturation of mammalian oocytes. *Theriogenology*. 49 (2). 461-469.
- Mori, T., Amano, T., Shimizu, H. 2000. Roles of gap junctional communication of cumulus cells in cytoplasmic maturation of porcine oocytes cultured *in vitro*. *Biology of Reproduction*. 62 (4). 913-919.
- Morris, B. J. 2012. Seven sirtuins for seven deadly diseases of aging. *Free Radical Biology and Medicine*. 56. 133-171.
- Nakamura, S. I., Terada, Y., Horiuchi, T., Emuta, Ch., Murakami, T., Yaegashi, N., Okamura, K. 2001. Human sperm aster formation and pronuclear decondensation in bovine eggs following intracytoplasmic sperm injection using a piezo-driven pipette: A novel assay for human sperm centrosomal function. *Biology of Reproduction*. 65 (5). 1359-1363.
- Navara, C. S., First, N. L., Schatten, G. 1994. Microtubule organization in the cow during fertilization, polyspermy, parthenogenesis and nuclear transfer: the role of the sperm aster. *Developmental Biology*. 162 (1). 29-40.
- Nomikos, M., Yu, Y., Elhmati, K., Theodoridou, M., Campbell, K., Vassilakopoulou, V., Zikos, C., Livaniou, E., Amso, N., Nounesis, G., Swann, K., Lai, A. 2013. Phospholipase

C zeta rescues failed oocyte activation in a prototype of male factor infertility. *Fertility and Sterility*. 99 (1). 76-85.

Nonchev, S., Tsanev, R. 1990. Protamine-histone replacement and DNA replication in the male mouse pronucleus. *Molecular Reproduction and Development*. 25 (1). 72-76.

Nowak, S. J., Corces, V. G. 2004. Phosphorylation of histone H3: a balancing act between chromosome condensation and transcriptional activation. *Trends in Genetics*. 20 (4). 214-220.

Palmer, A., Gavin, A.-C., Nebreda, A. R. 1998. A link between MAP kinase and p34<sup>cdc2</sup>/cyclin B during oocyte maturation: p90rsk phosphorylates and inactivates the p34<sup>cdc2</sup> inhibitory kinase Myt1. *The European Molecular Biology Organization Journal*. 17 (17). 5037-5047.

Parthun, M. R. 2007. Hat1: the emergencing cellular role of a type B histone acetyltransferase. *Oncogene*. 26 (37). 5319-5328.

Pavlova, S., Klucska, K., Vašíček, D., Ryban, L., Harrath, A. H., Alwasel, S. H., Sirotkin, A. V. 2013. The involvement of SIRT1 and transcription factor NF- $\kappa$ B (p50/p65) in regulation of porcine ovarian cell function. *Animal Reproduction Science*. 140 (3-4). 180-188.

Payne, D., Flaherty, S. P., Barry, M. F., Matthews, C. D. 1997. Preliminary observations on polar body extrusion and pronuclear formation in human oocytes using time-lapse video cinematography. *Human Reproduction*. 12 (3). 532-541.

Poulose, N., Raju, R. 2015. Sirtuin regulation in aging and injury. *Biochimica et Biophysica Acta*. 1852 (11). 2442-2455.

Pruitt, K., Zinn, R. L., Ohm, J. E., McGarvey, K. M., Kang, S. H., Watkins, D. N., Herman, J. G., Baylin, S. B. 2006. Inhibition of SIRT1 reactivates silenced cancer genes without loss of promoter DNA hypermethylation. *Plos Genetics*. 2 (3).

Reik, W., Dean, W., Walter, J. 2001. Epigenetic reprogramming in mammalian development. *Science*. 293 (5532). 1089-1093.

Reinsch, S., Gönczy, P. 1998. Mechanism of nuclear positioning. *Journal of Cell Science*. 111 (16). 2283-2295.

Rodgers, J. T., Lerin, C., Haas, W., Gygi, S. P., Spiegelman, B. M., Puigserver, P. 2005. Nutrient control of glucose homeostasis through a complex of PGC-1 $\alpha$  and SIRT1. *Nature*. 434 (7029). 113-118.

Roth, S. Y., Denu, J. M., Allis, C. D. 2001. Histone acetyltransferases. *Annual Review of Biochemistry*. 70. 81-120.

Sagata, N. 1996. Meiotic metaphase arrest in animal oocytes: its mechanisms and biological significance. *Cell Biology*. 6 (1). 22-28.

Salminen, A., Kaarniranta, K., Kauppinen, A. 2013. Crosstalk between oxidative stress and SIRT1: impact on the aging process. *International journal of cell biology*. 14 (2). 3834-3859.

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

Sasaki, T., Maier, B., Koclega, K. D., Chruszcz, M., Gluba, W., Stukenberg, P. T., Minor, W., Scrable, H. 2008. Phosphorylation regulates SIRT1 function. *Plos One*. 3 (12).

Scott, L., Alvero, R., Leondires, M., Miller, B. 2000. The morphology of human pronuclear embryo is positively related to blastocyst development and implantation. *Human Reproduction*. 15 (11). 2394-2403.

Schatten, G., Hewitson, L., Simerly, C., Sutovsky, P., Huszar, G. 1998. Cell and molecular biological challenges of ICSI: ART before science? *The Journal of Law, Medicine and Ethics*. 26 (1). 29-37.

Smith, B. C., Hallows, W. C., Denu, J. M. 2008. Mechanisms and molecular probes of sirtuins. *Chemistry and Biology*. 15 (10). 1002-1003.

Stricker, A. S. 1999. Comparative biology of calcium signaling during fertilization and egg activation in animals. *Developmental Biology*. 211 (2). 157-176.

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

Tatone, C., Di Emidio, G., Vitti, M., Di Carlo, M., Santini Jr., S., D'Alessandro, A. M., Falone, S., Amicarelli, A. 2014. Sirtuin functions in female fertility: Possible role in oxidative stress and aging. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*. 1-12.

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 (1). 90-100.

Torres-Padilla, M.-E., Bannister, A. J., Hurd, P. J., Kouzarides, T., Zernicka-Gdetz, M. 2006. Dynamic distribution of the replacement histone variant H3.3 in mouse oocyte and preimplantation embryos. *The international journal of developmental biology*. 50 (5). 455-461.

Tulsiani, D. R. P., Abou-Haila, A. 2012. Biological processes that prepare mammalian spermatozoa to interact with an egg and fertilize it. *Scientifica*. 2012. 1-12.

- Turner, B. M. 2002. Cellular memory and the histone code. *Cell*. 111 (3). 285-291.
- Vaquero, A., Scher, M., Lee, D., Erdjument-Bromage, H., Tempst, P., Reinberg, D. 2004. Human SirT1 interacts with histone H1 and promotes formation of facultative heterochromatin. *Molecular Cell*. 16 (1). 93-105.
- Vaquero, A., Scher, M., Erdjument-Bromage, H., Tempst, P., Serrano, L., Reinberg, D. 2007. SIRT1 regulates the histone methyl-transferase SUV39H1 during heterochromatin formation. *Nature*. 450 (7168). 440-444.
- Vakoc, C. R., Mandat, S. A., Olenchok, B. A., Blobel, G. A. 2005. Histone H3 lysine 9 methylation and HP1 $\gamma$  are associated with transcription elongation through mammalian chromatin. *Molecular Cell*. 19 (3). 381-391.
- Verlhac, M. H., Kubiak, J. Z., Clarke, H. J., Maro, B. 1994. Microtubule and chromatin behavior follow MAP kinase activity but not MPF activity during meiosis in mouse oocytes. *Development*. 120 (4). 1017-1025.
- Wang, J., Kim, T. H., Ahn, M. Y., Lee, J., Jung, J. H., Choi, W. S., Lee, B. M., Yoon, K. S., Yoon, S., Kim, H. S. 2012. Sirtinol, a class III HDAC inhibitor, induces apoptotic and autophagic cell death in MCF-7 human breast cancer cells. *International Journal of Oncology*. 41 (3). 1101-1109.
- Wang, J., Garrey, J., Davis, R. E. 2014. Transition in pronuclei and one- to four-cell embryos drives early development in a Nematode. *Current Biology*. 24 (2). 124-133.
- Ward, W. S. 2010. Function of sperm chromatin structural elements in fertilization and development. *Basic science of reproductive medicine*. 16 (1). 30-36.
- Wassarman, P. M. 1988. The mammalian ovum. In Knobil E., Neil J. *The physiology of reproduction*. New York. Raven Press. 70 –102.
- Watanabe, N., Hunt, T., Ikawa, Y., Sagata, N. 1991. Independent inactivation of PMF and cytotostatic factor (Mos) upon fertilization of *Xenopus* egg. *Nature*. 352 (6332). 247-248.
- Watroba, M., Szukiewicz, D. 2016. The role of sirtuins in aging and age-related diseases. *Advances in Medical Sciences*. 61 (1). 52-62.
- Winston, N. J., Maro, B. 1995. Calmodulin-dependent protein kinase II is activated transiently in ethanol-stimulated mouse oocytes. *Developmental Biology*. 170 (2). 350-352.
- Yanagimachi, R. 1988. Sperm-egg fusion. *Current top membrane transport*. 32. 3-43.
- Yang, Y., Fu, W., Chen, J., Olashaw, N., Zhang, X., Nicosia, S. V., Bhalla, K., Bai, W. 2007. SIRT1 sumoylation regulates its deacetylase activity and cellular response to genotoxic stress. *Nature Cell Biology*. 9 (11). 1253-1262.

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

Yoshida, M., Cran, D. G., Pursel, V. G. 1993. Confocal and fluorescence microscopic study using lectins of the distribution of cortical granules during the maturation and fertilization of pig oocytes. *Molecular Reproduction and Development*. 36 (4). 462-468.

Yoshioka, K., Suzuki, C., Tanaka, A., Anas, I. M. K., Iwamura, S. 2002. Birth of piglets derived from porcine zygotes cultured in a chemically defined medium. *Biology of Reproduction*. 66 (1). 112-119.

Yuan, G., Zhu, B. 2011. Histone variants and epigenetic inheritance. *Biochimica et Biophysica Acta*. 1819 (3-4). 222-229.

Zhang, T., Kraus, W. L. 2010. SIRT1-dependent regulation of chromatin and transcription: linking NAD<sup>+</sup> metabolism and signaling to the control of cellular functions. *Biochim Biophys Acta*. 1804 (8). 1666-1675.

Zhang, J., Liu, H. 2015. Cytoplasm replacement following germinal vesicle transfer restores meiotic maturation and spindle assembly in meiotically arrested oocytes. *Reproductive BioMedicine Online*. 31 (1).71-78.

Zhang, J., Reinberg, D. 2015. Transcription regulation by histone methylation: interplay between different covalent modifications of the core histone tail. *Genes and Development*. 15 (18). 2343-2360.