

Česká zemědělská univerzita v Praze

**Fakulta agrobiologie, potravinových a přírodních
zdrojů**

Katedra veterinárních disciplín



**Detekce reziduálních histonů ve spermiích savců
Diplomová práce**

Autor práce: Andrea Zvěřinová

Vedoucí práce: Ing. Kristýna Hošková, Ph.D.

Konzultant: Ing. Jan Nevoral, Ph.D.

Čestné prohlášení

Prohlašuji, že svou diplomovou práci "Detekce reziduálních histonů ve spermích savců" 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 10. 4. 2017

Poděkování

Ráda bych touto cestou poděkovala Ing. Janu Nevoralovi, Ph.D., Mgr. Miriamě Štiavnické a Ing. Kristýně Hoškové, Ph.D. za odborné vedení, velkou trpělivost, přátelské jednání a spolupráci při vypracování diplomové práce. Dále bych ráda poděkovala své rodině a příteli za velkou podporu a porozumění.

Detekce reziduálních histonů ve spermích savců

Souhrn

Během spermatogeneze dochází ke změnám chromatinu, které jsou doprovázeny záměnou histonů za protaminy, neboli protaminací. Po protaminaci ve spermii detekujeme reziduální množství histonů, které je druhově specifické. Zatímco dříve byla přítomnost reziduálních histonů považována za nedostatečnost protaminace, v současné době je zjevné, že histony a jejich post-translační modifikace hrají důležitou roli ve struktuře spermie, v procesu oplození a v časném embryonálním vývoji. Souhrn post-translačních modifikací histonů, nejčastěji metylace, fosforylace, ubikvitinace a sumoylace je označován jako histonový kód.

Na základě dosavadního poznání histonového kódu byla stanovena hypotéza, že post-translační modifikace histonů ve spermích savců ovlivňují fyziologické funkce spermií, vyjádřené jejich životaschopností a motilitou. Pro experiment byly použity myší spermie od samců z kmene CD1 a lidské spermie odebrané od pacientů kliniky Genetika Plzeň s.r.o. Ejakulát byl zpracován a hodnocen na základě manuálu WHO. Spermie byly analyzovány metodou imunocytochemického barvení, průtokové cytometrie a western blotu. Byly analyzovány následující post-translační modifikace ve spermích myši a člověka: dimethylace histonu H3 na lysinu K4 (H3K4me2), fosforylace histonu H2AX na serinu 139 (gammaH2AX). Následně došlo ke korelaci těchto histonových modifikací v lidských spermích s jejich mitochondriálním stavem po barvení MitoTrackerem a motilitou. Z kvantifikací signálu pro vybrané histonové modifikace je patrné, že mezi jedinci je výrazná individuální variabilita. Výsledky experimentu ukázaly, že vzorky s nejvyšším zastoupením progresivně se pohybujících spermií zároveň vyjadřují jedny z nejvyšších hodnot intenzity fluorescence MitoTrackeru. Dále bylo zjištěno, že množství H3K4me2 je nepřímo úměrné motilitě spermií. Lze předpokládat, že H3K4me2 je histonovým kandidátem použitelným jako negativní marker motility spermií.

Klíčová slova: spermie, histon, histonový kód, oplození, průtoková cytometrie

Detection of residual histones in mammals sperm

Summary

During spermatogenesis there are changes in chromatin which are accompanied by histone-protamin replacement, called protamination. After protamination there is residual amount of histones, which species specific. In the past, the presence of residual histones was considered to be the insufficiency of protamination, on the other hand, histones and their post-translational modification plays an important role in sperm structures, the process of fertilization and in early embryonic development. The index of post-translational modifications of histones, such as methylation, phosphorylation, ubiquitination or SUMOylation, is called the histone code. Based on existing knowledge of the histone code, the hypothesis, that post-translational modifications of histones in mammalian sperm cells affect physiological functions expressed by their motility and sperm viability, has been established. In addition to sperm of mice CD1 strain was used for experiment, human sperm was collected from patients of Genetika Plzeň s.r.o. clinic. Semen was prepared and assessed in accordance with the WHO manual. Sperm cells were analyzed using immunocytochemical staining, western blot and flow cytometry. There were analyzed following post-translational modifications: dimethylation of histone H3 at lysine K4 (H3K4me₂), phosphorylation of histone H2AX on serine 139 (gammaH2AX). Consequently, there was a correlation of these histone modifications in human spermatozoa with their mitochondrial condition (after the MitoTracker staining) and their motility. For quantifying the signals for selected histone modification, there is obvious significant individual variability of individual sperm samples. The results of experiment show that the samples with the highest percentage of progressive motile sperm also have the highest intensity of fluorescence of MitoTracker. Furthermore, the quantity of H3K4me₂ shown that this histone modification is a candidate useful as a negative marker of sperm motility.

Keywords: histone, histone code, fertilization, flow cytometry

Obsah

1 Úvod	2
2 Hypotéza a cíl práce	3
3 Literární rešerše	4
3.1 Morfologie a fyziologie spermíí	4
3.1.1 Hormonální řízení spermatogeneze.....	4
3.1.2 Stavba spermie.....	5
3.1.3 Spermatogeneze	5
3.1.3.1 Spermacytogeneze.....	6
3.1.3.2 Spermioogeneze a záměna histonů za protaminy	6
3.1.4 Imprinting genů	9
3.2 Chromatin spermie a epigenetické změny	10
3.2.1 Metylace DNA.....	11
3.2.2 Nekódující RNA.....	12
3.2.3 Histonový kód	14
3.2.4 Post-translační modifikace histonů	15
3.2.5 Terapeutické perspektivy post-translačních modifikací histonů	19
4 Materiály a metodika	21
4.1 Hodnocení lidského ejakulátu	21
4.2 Izolace myších spermíí	21
4.3 Imunocytochemie spermíí a mikroskopická analýza	22
4.4 Western Blot	23
4.5 Průtoková cytometrie	23
4.6 Barvení mitochondrií.....	24
4.7 Statistika	24
5 Výsledky	26
5.1 Detekce reziduálních histonů ve spermíích myší a člověka	27
5.2 Kvantifikace vybraných reziduálních histonů v lidských spermíích....	31
5.3 Analýza reziduálních histonů ve vztahu ke kvalitě spermíí.....	37
6 Diskuze	42
7 Závěr	46
8 Seznam literatury	47

1 Úvod

Techniky asistované reprodukce (ART- Assisted Reproductive Technologies) představují v současné době klíčový nástroj léčby neplodnosti pro stále rostoucí počet párů s problémem přirozeného početí. Efektivita ART tak udává úspěšnost terapie a z těchto důvodů je pro umělé oplodnění zapotřebí kvalitní oocyt a oplození schopná spermie. Zatímco populace dostupných oocytů je omezená, populace spermií je mnohem vhodnější pro kvalifikovanou a intenzivní selekci s ohledem na jejich oplození schopnost.

Spermie vzniká při procesu zvaném spermatogeneze. Spermatogenezi je možno rozdělit na spermatocytogenezi, při které dochází k tvorbě haploidních spermatid, a spermiogenezi, při které spermatida podstupuje morfologické změny a stává se z ní zralá spermie. Během tohoto procesu dochází k výrazné remodelaci chromatinu. Z hlediska kondenzace nabývá chromatin dvou podob – transkripčně aktivní euchromatin a transkripčně inaktivní heterochromatin. Heterochromatin spermie představuje vysoce odolnou strukturu, jejíž stabilita je dána přítomností protaminů a reziduálních histonů včetně post-translačních modifikací, jako je metylace, acetylace, fosforylace či ubikvitinace. Post-translační modifikace histonů utvářejí histonový kód a představují jeden z nástrojů epigenetických regulací v organismu. Histonový kód předurčuje stabilitu genomu spermie, schopnost bezchybného oplození a úspěšnost embryonálního vývoje.

Zatímco existující postupy selekce jsou zaměřeny na morfologii spermií, jejich motilitu, popř. aktivitu akrozomálních enzymů či mitochondriální stav spermií, epigenetická kvalita spermií dosud není využívána. Právě epigenetická kvalita histonového kódu představuje v současné době pokročilý nástroj pro selekci spermií nejen s ohledem na oplození schopnost, ale také úspěšnost časného embryonálního vývoje. Z těchto důvodů by se histonový kód měl stát předmětem dalších studií, jelikož jeho využití pro selekci spermií představuje možnost jak zvýšit efektivitu ART.

2 Hypotéza a cíl práce

Byla stanovena hypotéza, že post-translační modifikace histonů ve spermiích savců ovlivňují jejich fyziologické funkce, vyjádřené jejich životaschopností a motilitou. Byly stanoveny následující cíle:

- 1) detekovat vybrané residuální histony a jejich post-translační modifikace ve spermiích myši a člověka;
- 2) kvantifikovat přítomnost vybraných residuálních histonů ve spermiích člověka;
- 3) vyjádřit vztah mezi reziduálními histony a kvalitou spermií člověka.

3 Literární rešerše

3.1 Morfologie a fyziologie spermii

Spermie jsou samčí pohlavní buňky. Tyto buňky vznikají v semenotvorných kanálcích varlat. Kanálky jsou složeny z fibrozního vaziva a složitého zárodečného neboli semenotvorného epitelu. Epitel je tvořen dvěma typy buněk – Sertolliho podpůrnými elementy a spermatogoniemi. Tyto buňky se opětovně dělí a nakonec se diferencují ve spermie. Tento děj se nazývá spermatogeneze (Carneiro *et al.*,1997).

3.1.1 Hormonální řízení spermatogeneze

Spermatogeneze závisí na účinku folikuly stimulujícího hormonu (follicle-stimulating hormone - FSH) a luteinizačního hormonu (LH, též ICSH – interstitial-cell stimulating hormone) (Carneiro *et al.*,1997). LH je pro spermatogenezi vyžadován nepřetržitě, zatímco FSH je nezbytný pro zahájení spermatogeneze v období puberty.

LH působí na Leydigovy buňky v intersticiu varlete a vyvolává tak produkci testosteronu, který je nezbytný pro normální vývoj spermii (Carneiro *et al.*,1997). Nízká hladina testosteronu stimuluje prostřednictvím pozitivní zpětné vazby sekreci LH v adenohipofýze. Zvýšení sekrece LH stimuluje Leydigovy buňky k další sekreci testosteronu. K dalším funkcím testosteronu patří vznik a udržení libida, sekreční aktivity přídatných pohlavních žláz a rozvoj samčích sekundárních pohlavních znaků.

Další hypofyzární gonadotropní hormon je FSH. FSH působí na Sertolliho buňky, ve kterých stimuluje adenylát cyklázu, čímž zvyšuje množství cyklin adenosin monofosfátu (cyclic adenosine monophosphate – cAMP), zároveň podporuje syntézu proteinu vázajícího androgenu (ABP – Androgen-binding protein). ABP se váže na testosteron a přepravuje jej do lumen semenotvorných kanálků (Carneiro *et al.*,1997). Stabilizuje tak jejich koncentrace a zajišťuje jejich přiměřené množství pro spermatogenezi. Zároveň se předpokládá, že FSH stimuluje sekreci estrogenu Sertolliho buňkami. Aktuální sekrece estrogenu se může zvyšovat intracelulární přeměnou testosteronu. Dalším hormonem, který vzniká v Sertolliho buňkách, je inhibin, který inhibuje sekreci FSH předním lalokem hypofýzy, čímž prostřednictvím negativní zpětné vazby snižuje hladinu estrogenů produkovaných těmito buňkami.

3.1.2 Stavba spermie

Spermie je terminálně diferenciovaná buňka dlouhá cca 60 μm skládající se z 3 oddílů: hlavičky, středního oddílu (také midpiece) a bičíku.

Hlavičku spermie tvoří jádro, které je oploštělé a obsahuje vysoce kondenzovaný chromatin. Dvě třetiny předního pólu pokrývá akrozom, což je zploštělý váček obsahující důležité hydrolytické enzymy.

Střední oddíl spermie se skládá z krčku a spojovacího oddílu. V krčku je uložen proximální centriol obklopený 9 příčně pruhovanými elektronově denzními provazci, které se distálně ztenčují a končí v počátečním úseku spojovacího oddílu. Tyto provazce se nazývají segmentované chordy. Ty probíhají spojovacím oddílem a celou hlavní částí bičíku. Obsahují myozin a aktin, takže je pravděpodobné, že se uplatňují při pohybu. V oblasti spojovacího oddílu je ještě vytvořena mitochondriální pochva složená z longitudinálně uspořádaných mitochondrií, které spirálovitě obtáčí axonému, pohybové centrum spermie, a hladké chordy. Důvodem nahromadění mitochondrií v této oblasti je to, že spojovací oddíl představuje energetické centrum spermie. Anulus, prstenec tvořený protaminy (Ward *et* Coey, 1989), poté tvoří hranici mezi středním oddílem a bičíkem.

Bičík lze rozdělit na 2 části – hlavní a koncovou a jeho funkce je zejména pohybová (Konrádová, 2000).

3.1.3 Spermatogeneze

Spermatogeneze je kontinuální a precizně kontrolovaný proces, zahrnující transformaci spermatogonií na spermie. Tento proces lze u savců rozdělit do několika fází: 1) první z nich je spermatocytogeneze, během níž se spermatogonie dělí a dávají vznik několika generacím buněk, přičemž poslední z generací buněk v této fázi se označuje jako generace spermatocytů. Následuje 2) fáze meiózy, během níž podstupuje spermatocyt dvojitě dělení, jehož výsledkem je snížení počtu chromozomů i množství DNA v buňce na polovinu. Taková buňka se již nazývá spermatida a vstupuje do poslední fáze 3) spermiogeneze, při níž spermatidy podléhají morfologickým změnám a prochází komplexním procesem zrání, na jehož konci je zralá spermie (Carneiro *et al.*, 1997).

3.1.3.1 Spermacytogeneze

Proces spermacytogeneze představuje postupnou přeměnu spermatogonií na spermatocyty. Spermatogonie jsou primitivní zárodečné buňky uložené při bazální membráně. Tyto buňky podstupují sérii mitotických dělení, po nichž mohou zůstat spermatogonie jako nediferencované kmenové buňky – spermatogonie typu A, nebo se diferencují na spermatogonie typu B (Oliva *et* Castillo, 2011). Spermatogonie typu B pak pronikají do luminální oblasti semenného epitelu, dále se mitoticky dělí a zvětšují se (Konrádová, 2000). Tyto buňky pak dávají vzniknout primárním spermatocytům (neboli spermatocytům I. řádu) obsahujícím u člověka $2n$ počet 46 chromozomů (Oliva *et* Castillo, 2011).

Spermatocyty I. řádu jsou uloženy ve vrstvě nad spermatogoniemi. Jsou to největší buňky, které se v semenném epitelu nacházejí (Konrádová, 2000). Tyto buňky pak podstupují profázi prvního meiotického dělení (Oliva *et* Castillo, 2011). Tato fáze je poměrně dlouhá, trvá 22 dnů, a proto jsou spermatocyty I. řádu v semenném epitelu hojně zastoupené (Konrádová, 2000). Výsledkem prvního (redukčního) meiotického dělení jsou menší buňky, tzv. sekundární spermatocyty (spermatocyty II. řádu), které obsahují haploidní sadu 23 chromozomů (Carneiro *et al.*, 1997). Sekundární spermatocyty rychle vstupují do druhého meiotického dělení, při kterém podstupují rozdělení, na jehož konci vznikají haploidní spermatidy. Spermatidy jsou morfologicky totožné se spermatocyty II. řádu a podstupují fázi spermiogeneze, která je nezbytná pro tvorbu oplození schopné spermie (Carneiro *et al.*, 1997).

3.1.3.2 Spermiogeneze a záměna histonů za protaminy

Spermiogeneze představuje složitý proces diferenciací spermatid vzniklých dělením spermatocytů II. řádu (Carneiro *et al.*, 1997). Spermatidy v post meiotické fázi mohou být rozděleny na rané spermatidy s kulovitým jádrem, přechodné spermatidy s prodlužujícím se jádrem (podléhajícím procesu elongace) a spermatidy s plně kondenzovaným jádrem (Dadoune, 2003). Spermiogeneze zahrnuje mimo elongace a kondenzace chromatinu také tvorbu akrozómu, vývoj bičíku a ztrátu většiny cytoplazmy.

Během většiny trvání spermacytogeneze je chromatin spermatogonií a spermatocytů organizovaný jako u většiny eukaryotických buněk, kdy je základní stavební jednou

chromatinu nukleozóm. Nukleozóm vzniká obtočením 146 párů bází DNA kolem histonového oktameru, což je komplex 8 histonů tvořený dvojicemi histonů H2A, H2B, H3 a H4 (McGhee *et Felsenfeld*, 1980). Histon H1 (také označovaný jako linker) přispívá k větší organizovanosti chromatinu (Kowalski *et Palyga*, 2012). Každý histon, kromě histonu H4, zahrnuje několik variant, které se liší v aminokyselinových sekvencích a jsou kódovány různými geny. Zatímco některé typy histonů jsou přítomny ve všech buňkách, některé typy jsou specifické. Govin *et al.* v roce 2007 objevili u myši 5 histonových variant, které jsou tvořeny zejména ve varlatech – H2AL1, H2AL2, H2AL3, H2BL1 a H2BL2. mRNA prvních čtyř zmíněných jsou obsaženy v kulatých a elongujících se spermatidách, zatímco mRNA H2BL2 je v postmeiotické fázi přítomen jen minimálně. Dalším specifikem těchto variant je, že koncentrace H2AL1/L2 a H2BL1 v kondenzujících se spermatidách je podobná jako koncentrace tranzitních proteinů a protaminů, což znamená, že se tyto varianty do jisté míry podílí na formaci heterochromatinu. Tyto histony jsou poté přítomny i ve zralých spermích, což bylo zjištěno ze spermíí izolovaných z nadvarlete (Govin *et al.*, 2007).

Z hlediska změn chromatinu lze spermiogenezi rozdělit do 2 fází: 1) první fáze je typická kulatým jádrem, které obsahuje histony jako hlavní jaderné proteiny a je stále transkripčně aktivní; 2) druhá fáze zahrnuje dramatické změny ve struktuře chromatinu, kdy histony začnou být postupně nahrazovány jinými proteiny, jako jsou tranzitní proteiny a nakonec protaminy. V důsledku těchto změn klesá transkripce a genová exprese na minimum (Kleene, 2003; Rousseaux *et al.*, 2005). V postmeiotické fázi dochází k transkripci pouze u několika málo genů (White-Cooper *et Bausek*, 2010).

Důležitým procesem protaminace je navázání přechodných tranzitních proteinů TP1 a TP2 na histony spermatidy (Balhorn, 2007). Tranzitní proteiny jsou makromolekuly, které vykazují helikázovou aktivitu, která mění DNA ve flexibilnější formu a tím pomáhají remodelovat a kondenzovat chromatin. V momentě mezi odstraněním histonů a jejich nahrazením protaminy se skládá 90% chromatinových komponentů právě z tranzitních proteinů. Tranzitní proteiny byly zjištěny u velkého množství druhů. Obsahují větší množství lyzinu a argininu než histony a jsou větší než typické protaminy. Strukturálně jsou tyto proteiny na pomezí histonů a protaminů a nesou tedy spoustu strukturálních podobností s oběma těmito skupinami (Meistrich *et al.*, 2003).

Po saturaci spermatidy tranzitními proteiny nastává jejich nahrazení samotnými protaminy PRM1 a PRM2 (Steger, 1999). Předtím, než protaminy nahradí tranzitní proteiny, musí dojít k fosforylaci protaminů, kdy je P1 fosforylován pomocí serin/arginin protein specifické kinázy 1 (serine/tyreonine-protein kinase 1 - SRPK 1) (Papoutsopoulou *et al.*, 1999) a P2 pomocí vápník/kalmodulin-dependent protein kinázy 4 (calcium/calmodulin-dependent protein kinase - CAMK 4) (Carrell *et al.*, 2007). Přiřazení protaminů k DNA podporuje hydrodynamický tvar hlavičky spermie a chrání paternální genom z fyzikálního i chemického hlediska, zatímco samotné protaminy hrají roli v důležitých epigenetických procesech (Rathke *et al.*, 2013). Fosforylované protaminy vytvoří v chromatinu toroidální strukturu, což je výhodné prostorové uspořádání ve tvaru kruhu, které zvýší kondenzaci chromatinu až šestkrát, než je tomu v somatické buňce (Balhorn, 2000). Po přeměně spermatidy na spermii v pozdní fázi kondenzace chromatinu pak dochází ke kompletní defosforylaci protaminů (Balhorn, 1982).

Protaminy jsou hlavní jaderné proteiny spermie (Wykes *et al.*, 2003). Jsou obaleny kolem DNA těsněji než histony a tvoří prstencovou strukturu, která chrání DNA. Jedná se o bílkoviny bohaté na arginin a cystein (Balhorn, 2007). Vysoká hladina argininu umožňuje silnou vazbu na DNA, zatímco cystein umožňuje tvorbu disulfidických můstků nezbytných pro formaci vysoce kondenzovaného chromatinu (Carrell *et al.*, 2007). Velmi zásadní je poměr protaminů P1 a P2, který se u zdravých lidských spermií pohybuje kolem 1:1 (Francis *et al.*, 2014), de Yebra *et al.*, (1993) uvádí poměr 0,8:1,2. Poměr se také liší u jednotlivých druhů (Corzett *et al.*, 2002). Jakékoliv snížení nebo zvýšení tohoto poměru je pak spojeno s problémy s reprodukcí až infertilitou (Francis *et al.*, 2014). Snížená plodnost byla detekována u jedinců, kteří měli abnormální poměr protaminů P1 a P2 (Carrel *et al.*, 2001) a infertilita byla pozorována u mužů, v jejichž spermiích nebyly protaminy P2 detekovatelné (de Yebra *et al.*, 1993). Abnormální poměr těchto protaminů je také spjat se změnou morfologie spermií, redukcí jejich počtu a sníženou motilitou. Menší poměr než 0,8 je poté spojován se zvýšeným výskytem DNA fragmentace (Aoki *et al.*, 2005).

Po protaminaci můžeme ve zralé spermii detekovat určité procento histonů, které je druhově specifické. V lidské spermii zůstává po protaminaci 10-15% reziduálních histonů (Brykczynska *et al.*, 2010; Gatewood *et al.*, 1987), v myši spermii zůstává reziduální pouhé 1%. (van der Heiden *et al.*, 2005). Tyto histony,

označované jako reziduální, zůstávají ve své původní nukleozomální struktuře, jsou nenáhodně rozmístěny kolem chromozomů a asociovány s jejich centromerami a telomerami (Vavouri *et* Lehner, 2011). Perzistence těchto histonů byla dříve považována za fyziologickou nedostatečnost v procesu protaminace. Současné poznání však poukazuje na významnou roli v globální funkci chromozomů spermie (Arpanahi *et al.*, 2009) a v časném embryonálním vývoji (Hammoud *et al.*, 2009). Úspěšný embryonální vývoj je mimo jiné determinován adekvátním genovým imprintingem, který ve spermii proběhl.

3.1.4 Imprinting genů

Jedním z dalších mechanismů regulace genové exprese během embryonálního vývoje je imprinting genů. Za normálních okolností mají mateřská i otcovská kopie (alela) téhož genu stejný potenciál být aktivní. Genový imprinting je však epigenetický mechanismus, který mění tento potenciál, protože omezuje expresi genu na 1 alelu (Barlow *et* Bartolomer, 2014). Imprintované geny se tak se liší od klasických, mendelovsky děděných genů tím, že jsou transkribovány pouze z jedné alely určitého rodičovského původu. Mezi otcovské imprintované geny patří například růstové stimulatory Igf2 (insuline-like growth factor 2), Peg1, Peg3, Rasgfr1 (Ras protein specific guanine nukleotide releasing factor 1) či Dlk1 (Delta Like non-canonical notch ligand 1), jejichž deficiencie způsobuje zpomalení růstu embrya. Většina těchto genů je lokalizována ve shlcích, které jsou regulovány prostřednictvím izolátorů nebo dlouhých nekódujících RNA. Genový imprinting závisí na epigenetickém systému, který je jím modifikován, čímž imprintuje jeden ze dvou rodičovských chromozomů. Tento „imprint“ je následně používán k odpuzení či přivolání transkripčních faktorů nebo mRNA, čímž se změní exprese imprintovaného genu. Nedávné studie ukázaly, že genový imprinting významně ovlivňuje růst placenty, embrya a novorozence (Barlow *et* Bartolomer, 2014).

Genový imprinting je výsledkem struktury chromatinu spermie včetně nezbytných epigenetických změn spermie.

3.2 Chromatin spermie a epigenetické změny

Spermie obsahují chromatin, který je tvořen DNA a asociovanými proteiny (Bungum *et al.*, 2007). Integrita DNA spermie je nezbytná pro správný přenos genetické informace a slouží také jako indikátor kvality spermatogeneze a plodnosti samce (Smith *et al.*, 2007). S tím úzce souvisí struktura chromatinu, která hraje důležitou regulační roli (Cheung *et al.*, 2000), je nezbytná pro funkčnost spermie a normální embryonální vývoj. Mezi časté defekty patří DNA fragmentace. Jedná se o narušení struktury chromatinu, které je charakteristické přítomností zlomů na vláknech DNA, což vede k formaci denaturovaných segmentů. DNA fragmentace může být způsobena například poruchou maturací spermatid, nesprávnou rekombinací (González-Marín *et al.*, 2012), špatným poměrem protaminů P1 a P2 (García-Peiró *et al.*, 2011) nebo například oxidativním stresem. Oxidativní stres vzniká nerovnováhou mezi tvorbou reaktivních forem kyslíku (reactive oxygen species - ROS), jinak též volných radikálů, a antioxidační kapacitou. Volné radikály vznikají jako vedlejší produkty při okysličování organismu a antioxidanty fungují jako látky, které jsou schopny molekuly volného reaktivního kyslíku zachytit (Evgeni *et al.*, 2014). Pokud ale vznikne nerovnováha mezi těmito procesy, dochází k narušení buněčných struktur, včetně DNA (Aitken *et al.*, 2011). ROS může vést ke vzniku jednovláknových (single-strand breaks – SSB) či dvouvláknových zlomů (Double-strand breaks – DSBs). Zatímco SSB jsou častější a lépe reparovatelné, DSBs se vyskytují méně často a k reparaci dochází jen velmi obtížně (Woodbine *et al.*, 2011). K narušení DNA může dojít ve varletech, nadvarletech či během ejakulace (Zini et Sigman, 2009). Existuje mnoho hypotéz vysvětlujících důvod narušení DNA zralé spermie u neplodného samce, jako jsou například abnormality v kondenzaci chromatinu, aneuploidie, chromozomové přestavby, apoptóza či oxidativní stres (Manicardi *et al.*, 1995; Barroso *et al.*, 2000; Souza *et al.*, 2010). Defekty spermie mohou způsobit různé embryonální poruchy nebo spontánní potraty (Cebesoy *et al.*, 2006). Na integritu chromatinu mohou mít vliv také biologické faktory, u člověka je často patrný dopad infekcí, pohlavně přenosných onemocnění, obezity, diabetu, věku anebo nezdravého životního stylu, zahrnujícího například kouření či nadměrný přísun alkoholu (Pacey, 2010).

Chromatin může z hlediska kondenzace nabývat dvou podob: a) euchromatin představuje pouze nukleozómy navinuté do formy solenoidu, jehož spiralizace dále

nepokračuje. Euchromatin má tedy rozvolněnou strukturu, umožňuje přepis genů prostřednictvím transkripce (Erenpreiss *et al.*, 2006) a je mnohem více přístupný transkripčním faktorům a enzymům transkripce než b) heterochromatin, který je již vysoce spiralizovaný do formy chromozómů. Heterochromatin se vyskytuje během dělení buňky a je velmi málo transkripčně aktivní. Integrita chromatinu je nezbytná pro přenos paternální genetické informace a jeho normální struktura je důležitá pro oplozovací schopnost spermie (Erenpreiss *et al.*, 2006). Heterochromatin spermie a tedy stabilita jejího genomu je zapříčiněna mimo univerzální struktury chromatinu také přítomností výše zmíněných specifických proteinů – protaminů. Tyto okolnosti činí z chromatinu spermie vysoce stabilní a odolnou strukturu (Dadoune, 2003). Na těchto vlastnostech se mimo protaminů podílí také reziduální histony, jejichž souhrn vytváří tzv. histonový kód, a další změny, které nepostihují primární strukturu chromatinu, ale rozhodují o jeho vlastnostech, popř. expresi. Souhrnně jsou tyto změny označovány jako epigenetické a zahrnují, mimo zmíněného histonového kódu, také metylaci DNA a přítomnost nekódujících RNA.

3.2.1 Metylace DNA

Jednou z důležitých epigenetických modifikací chromatinu je metylace DNA. Existují dva typy metylace – metylace DNA a metylace histonů. Rozeznáváme mnoho způsobů, jak je genová exprese u eukaryotických buněk řízena, ale metylace DNA je jedním z nejběžnějších epigenetických nástrojů, který buňky používají k vypnutí genů. DNA metylace je mimo jiné důležitá pro embryonální vývoj, genový imprinting, inaktivace X chromozómu či zachování stability chromozómu. Metylace DNA má obecně opačný efekt na strukturu chromatinu a expresi genů než acetylace. Existují 3 stupně metylace – mono- (me1), di- (me2) a tri- (me3) (Miao et Natarajan, 2005). Jedná se o vratný proces modifikace cytosinů, který je umožněn díky enzymu DNA methyltransferáze (DNA methyltransferase - DNMT) (La Salle *et al.*, 2004), přičemž udržovací funkci má v tomto procesu DNMT1 (Okano *et al.*, 1999). Metylová skupina, pocházející z S-adenosyl-metioninu, je přenášena na 5'uhlík cytosinu. Tento přenos se uskutečňuje zejména v oblastech cytosin-fosfát-guaninových dinukleotidů (CpG) (Jones, 2012), což jsou místa genomu s vysokým obsahem guaninu a cytosinu (Okano *et al.*, 1999). Metylace potlačuje genovou expresi, která může být opět aktivována prostřednictvím demetylace (Chen et Li, 2004).

3.2.2 Nekódující RNA

Termín nekódující RNA (non-coding RNA - ncRNA) je používán pro takové RNA, které nekódují žádný protein, ale zároveň obsahují určitou informaci či mají nějakou funkci. Dříve se předpokládalo, že většina genetické informace, která určuje biologickou formu a fenotyp, je vyjádřena prostřednictvím proteinů, které plní různé katalytické, strukturní a regulační funkce. Nedávné studie objevily, že většina genomu je ve skutečnosti transkribována do nekódujících RNA, které se poté různě sestřihávají a zpracovávají do menších produktů. Dříve byly tyto RNA považovány za akumulované evoluční nečistoty (Mattick *et Makunin*, 2006). ncRNA se se mohou rozdělovat dvěma různými způsoby. Z hlediska délky molekuly existují dlouhé ncRNA (long non-coding RNA - lncRNA) a krátké molekuly, snRNA (small non-coding RNA). Tyto malé molekuly poté zahrnují siRNA (small interfering RNA, miRNA (microRNA) a piRNA (piwi-interacting RNA) (Girard *et al.*, 2006). Další rozdělení ncRNA je na microRNA, snoRNA (small nucleolar RNA) a další třídy malých regulačních RNA, které ještě čekají na probádání. ncRNA jsou nositeli skrytých signálů, které kontrolují úroveň exprese genů, včetně struktury chromatinu, epigenetické paměti, transkripce, RNA sestřihu či translace. ncRNA determinují naše komplexní vlastnosti a podílí se na tvorbě konstituce či nemoci daného jedince (Mattick *et Makunin*, 2006). Rozdíl mezi druhy a mezi jednotlivými jedinci je velmi ovlivněn regulací ncRNA (Claverie, 2005). Poměr ncRNA a RNA kódujících proteiny koreluje s vývojovou složitostí (Mattick *et Makunin*, 2006).

Regulace genové exprese v těchto malých nekódujících molekulách RNA byla poprvé pozorována v roce 1993, kdy vědci objevily malou, dvouřetězcovou RNA, dsRNA (double-strand RNA), která doplňuje vlákna většího mRNA a váže se na jeho 3' netranslatovanou oblast, čímž inhibuje translaci (Lee *et al.*, 1993). Od této doby bylo objeveno mnoho různých mechanismů pro translační kontrolu.

Dalšími typy ncRNA jsou miRNA a siRNA. Jedná se o krátké molekuly jednovláknové RNA o délce přibližně 22 nukleotidů (Mattick *et Makunin*, 2005). Krátká délka molekuly dává větší šanci různým mutacím, které mohou měnit v rámci evoluce specifitu určitého druhu (Sethupathy *et al.*, 2007). miRNA a siRNA jsou odvozeny z dvouvláknové RNA prostřednictvím DICERU. Odhaduje se, že téměř jedna třetina genů kódujících proteiny je řízena prostřednictvím miRNA (Du

et Zamore, 2005). miRNA jsou generovány z primárních transkriptů (primary microRNA - pri-miRNA), které jsou syntetizovány RNA polymerázou II (Mattick *et Makunin, 2005*), malé procento miRNA nacházejících se v repetitivních oblastech, je transkribováno RNA polymerázou III (Borchert *et al., 2006*). Nedávno bylo také prokázáno, že miRNA mohou být odvozeny z různých transpozonů, což jsou sekvence DNA, které jsou schopny měnit svou pozici bez nutnosti replikace (Smalheiser *et Torvik, 2005*). To naznačuje, že transpozony hrají důležitou roli ve vývojových procesech a epigenetických variacích (Peaston *et al., 2004*). Některé miRNA mohou být odvozeny také z pseudogenů (Devor, 2006). Přibližně polovina všech miRNA je obsažena v intronech genů kódujících proteiny, zatímco zbývající jsou obsaženy v exonech netranslaovaných genů. Exprese miRNA je regulována a ukázalo se, že jsou zásadní pro širokou škálu vývojových procesů (Mattick *et Makunin, 2005*). miRNA slouží jako důležité regulátory genů a podílejí se na dělení buňky, adaptaci na prostředí či onkogenezi (Boyd, 2008). V současnosti je známo přes 500 různých druhů miRNA nacházejících se v lidském genomu (Berezikov *et al., 2006*). Některé z nich vykazují tkáňovou specifitu (Landgraf *et al., 2007*). Jedná se například o miRNA, které se vyskytují pouze v embryonální tkáni a hrají významnou roli v udržení pluripotence buněk (Houbaviy *et al., 2003*). Další jsou specifické pro oocyty, kde ovlivňují meiotické zrání (Murchison *et al., 2007*).

siRNA jsou malé, dvouřetězcové molekuly RNA, které vznikají při štěpení dsRNA pomocí enzymu diceru. Na každém svém 3'konci mají nukleotidové přesahy, na rozdíl od miRNA, které vznikají jako malé vlásenkové prekurzorní molekuly, které jsou sestříhány na určitý rozsah opět pomocí diceru

Nejnověji objevenou třídou nekódujících RNA jsou Piwi RNA (piRNA) nacházející se v zárodečných buňkách (Girard *et al., 2006*). Tyto RNA specificky interagují s proteiny z PIWI rodiny, MIWI, MIWI2 a MILI. Skládají se z 26 až 32 nukleotidů a jsou nezávislé na DICERU. Sekvence piRNA jsou mnohem více rozmanité než u ostatních RNA a tvoří největší třídu ncRNA (Iwasaki *et al., 2015*). Hlavní funkcí piRNA je regulace aktivity transpozomových elementů během gametogeneze, a to zejména jejich exprese a transpozice uvnitř genomu. Transpozice transpozomů může totiž způsobit nevratné poškození genomu, tudíž je regulace pomocí piRNA nezbytná a esenciální pro udržení normálního průběhu gametogeneze a reprodukce (Iwasaki *et al., 2015*). Mezi další funkce patří například udržování celistvosti DNA v zárodečných buňkách.

Dlouhé nekódující RNA byly dříve považovány za nadbytečné a nedůležité části ncRNA (Struhl *et al.*, 2007) se skládají z více než 200 párů bází a jsou významné pro regulaci spermatogeneze (Mercer *et al.*, 2009) a to tak, že zabraňují navázání transkripčních faktorů na specifická místa DNA a podporují metylaci DNA (Hung *et al.*, 2011). Dále také mohou sloužit jako zdroj diceru k produkci malých nekódujících RNA (Keniry *et al.*, 2012).

3.2.3 Histonový kód

Každý z histonů obsahuje strukturovanou globulární doménu, která je schopna interagovat s ostatními histony a DNA uvnitř nukleozómu, a flexibilní konce, které laterálně vyčnívají z histonového oktameru. Pozitivně nabitě histonové konce jsou schopny specificky interagovat s negativně nabitou DNA (Davey *et al.*, 2002). Na nukleozomální DNA se nacházejí místa, na kterých mohou histonová rezidua vytvořit s DNA kontakt prostřednictvím vodíkových můstků (Biswas *et al.*, 2011). Flexibilní konce slouží jako substráty pro mnoho enzymů, které slouží k řadě posttranslačních modifikací jako je acetylace, metylace, fosforylace a ubiquitinace. Jelikož různé posttranslační modifikace korelují se specifickými transkripčními stavy, byla vytvořena hypotéza histonového kódu (Fischle *et al.*, 2003). Histonový kód je koncepce, podle které tvoří modifikované histony platformu, na kterou se mohou vázat proteiny prostřednictvím specifických domén, zejména na aminoterminálních koncích, a tím regulují transkripci genů (Vyskot, 2010). Mezi proteiny, které jsou schopny rozeznat histonové modifikace, patří regulátory transkripce, komplexy remodelující chromatin a proteiny, které regulují důležité fyziologické procesy v buňce. Koncept histonového kódu naznačuje, že informace důležité pro genovou expresi byly vloženy do chromatinu prostřednictvím kovalentní modifikace (Sims *et al.*, 2003). Modifikace histonů lze rozdělit do dvou funkčních kategorií (Cosgrove *et al.*, 2004): a) první kategorie obsahuje všechny modifikace, které nepřímo regulují strukturu chromatinu (Cosgrove *et al.*, 2005). To zahrnuje většinu modifikací histonových konců, jako je fosforylace, ubiquitinace, hyperacetylace atd. (Kouzarides, 2002). Běžnou vlastností histonů je, že obsahují domény, konkrétně bromodomény a chromodomény, které jsou schopny rozeznat histonové modifikace na základě acetylovaných a metylovaných lyzinových zbytků (Jenuwein *et al.*, 2001) b) druhá kategorie zahrnuje modifikace, které regulují

interakce mezi histony a DNA a mezi histony navzájem (Cosgrove *et Wolberger*, 2005). Patří sem například acetylace a fosforylace, které podporují zvýšenou nukleozomální mobilitu (Cosgrove *et al.*, 2004). Acetylace histonů je zároveň klíčovým procesem záměny histonů za protaminy (Marcon *et Boissinneault*, 2004), a to především histonu H4 (Balhorn, 2007).

3.2.4 Posttranslační modifikace histonů

Spermie jsou velmi závislé na posttranslačních modifikacích, a to nejen histonů. Je tomu tak z toho důvodu, že zralá spermie není schopna si syntetizovat nové proteiny (Baker, 2015). Zatímco mitochondriální DNA spermatozoy je schopná transkripce, jaderná DNA nikoliv (Cummins, 1998). Proteosyntéza ustává ještě před formací hlavičky, proto je spermie závislá na modifikacích již existujících proteinů (Baker, 2015). Z genetického hlediska lze posttranslační modifikace definovat jako jakoukoliv změnu, která proběhla po syntéze primární polypeptidové sekvence do vzniku finálního, zcela funkčního proteinu. Post-translační modifikace jsou chemické změny ve struktuře proteinů, často katalyzovány specifickými enzymy, které regulují stabilitu, distribuci a funkci proteinu (Samanta *et al.*, 2015).

Specifické modifikace histonů umožňují regulovat transkripci, replikaci, sestřih a reparaci DNA (Polo *et Jackson*, 2011). Post-translační modifikace histonů jsou také schopny ovlivňovat embryonální vývoj a modifikace reziduálních histonů mohou také představovat epigenetickou předlohu (Emery *et Carrell*, 2006).

Metylace histonů postihuje aminokyseliny arginin a lysin. Metylace lysinu, častější a funkčně rozšířenější než metylace argininu, se týká zejména histonů H3 a H4 (Godmann, 2007). Zatímco metylace histonů H3K4, H3K26 a H3K79 jsou typické pro euchromatin a vedou k aktivaci transkripce, metylace H3K9, H3K27 a H4K20 jsou běžné v transkripčně utišeném heterochromatinu (Sims *et al.*, 2003; Vakoc *et al.*, 2005). H3K4me1, H3K4me3 a H3K27me2/3 se ve zvýšené míře vyskytují ve spermatogoniích a kulatých spermatidách, ale ne v elongujících se spermatidách, metylace H4K20 byla pozorována během celé spermatogeneze. Metylace histonu H4 je spojena s remodelací chromatinu. V určitý moment během elongace spermatidy je hladina H4K20 metylace nízká, zatímco H4 acetylace je vysoká, což dohromady umožňuje nahrazení histonů (Sonnack *et al.*, 2002).

Metylace histonů je v negativní korelaci s acylací téhož lyzinového rezidua. Acetylace histonů je děj, který vede k rozvolnění chromatinu, což je způsobeno

snížením afinity histonů k DNA (Shogren-Knaak *et al.*, 2006), a je spojen s aktivací transkripce (Rothhammer *et Bosserhoff*, 2007). Zároveň dochází k tomu, že se centromery uvnitř jádra orientují blíže k jaderné membráně, zatímco kódující oblasti jsou orientovány směrem do středu (Bártová *et al.*, 2005). Dochází k navázání acetylové skupiny na amino skupinu lyzinového zbytku na polypeptidovém řetězci (Allfrey *et al.*, 1964), což vede k neutralizaci kladného náboje na lyzinovém zbytku (Shogren-Knaak *et al.*, 2006). Tato změna umožňuje zpřístupnění DNA transkripčním faktorům, čímž je aktivována transkripce (Rothhammer *et Bosserhoff*, 2007). Acetylace je katalizována pomocí specifických enzymů, histonacetyltransferázy (HAT), která umožňuje přenos acetylové skupiny z acetyl koenzymu A na lyzinový zbytek, a histondeacetylázy, která acetylovou skupinu naopak odstraňuje (Kitabayashi *et al.*, 2001), jelikož tento děj je vratný (Pang *et Rennent*, 2014). Histon H3 je acetylován na lyzinových zbytcích K9, K18 a K23. Hyperacetylace histonů H3K9, H3K18 a H3K23 je nejvyšší ve stádiu spermatogonie a ranné elongace a v plně diferenciované spermii již není přítomna (Song *et al.*, 2011). Zejména acetylace H3K18 je spojena s aktivací transkripce (Bernsterin *et al.*, 2005). Histon H4 je hyperacetylován v prodlužující se spermatidě těsně před nahrazením histonů tranzitními proteiny (Grimes *et Henderson*, 1984). Studie v roce 2003 ukázaly, že acetylace H4 hraje klíčovou roli při nahrazování histonů (Pivot-Pajot *et al.*, 2003) a to tím, že slouží jako signál k navázání BRDT (Shang *et al.*, 2007). BRDT proteiny jsou schopné rozeznávat acetylované konce histonů (Owen *et al.*, 2000) a spolupracují při remodelaci chromatinu, která je nezbytná pro diferenciaci spermatid (Kim *et al.*, 2014).

Fosforylace je jedním z hlavních typů post-translačních modifikací, který ovlivňuje funkci spermií, epididymální zrání, motilitu, kapacitaci či akrozomální reakci (Sakkas *et al.*, 2003). Fosforylace upravuje strukturální konformaci proteinu zapojením kovalentně vázané fosfátové skupiny na určitou aminokyselinu nacházející se na polypeptidovém řetězci, zejména tyrozin, serin a threonin. Nabité a hydrofobní elementy jsou tak přidávány k R skupině modifikované aminokyseliny a zároveň je také ovlivňováno okolí této aminokyseliny a tyto interakce pak vedou k tomu, že dochází k inhibici či stimulaci aktivity tohoto proteinu (Samanta *et al.*, 2015). Katalizována je prostřednictvím kináz (Govin *et al.*, 2010).

Během tranzitu spermií do nadvarlete je fosforylace primární post-translační modifikací, která reguluje remodelaci chromatinu (Marushige *et al.*, 1978). Zatímco

fosforylace souvisí s kondenzací chromozomů, defosforylace s jejich dekondenzací. Fosforylace specifických histonových variant navíc chrání chromatin před proteolytickou degradací (Morin *et al.*, 1999). Jednou z nejvýznamnějších změn zprostředkovaných fosforylací proteinů je rozvoj motility, který začíná v průběhu epididymálního tranzitu a vrcholí po kapacitaci v samčím reprodukčním traktu.

Velmi významná je fosforylace histonové varianty H2AX. H2AX je člen rodiny histonů H2A. Fosforylací Ser-139 H2AX dojde k tvorbě fosforylovaného H2AX (γ H2AX), který vzniká jako buněčná odpověď na indukci zlomů na dvojládku DNA (Redon *et al.*, 2002). V somatických buňkách je γ H2AX nezbytný pro reparaci DNA (Rothkamm *et al.*, 2003). V samčích zárodečných buňkách funguje obdobně a může také pomoci při reparaci buňky po působení genotoxického stresu, který je vyvolán například radiací či chemoterapií a způsobuje již zmíněné DSBs (Li *et al.*, 2006). Přesto, že zralá spermie ztrácí schopnost efektivní reparační, γ H2AX ve zralé spermii obsažená si tuto schopnost ponechává (Li *et al.*, 2006).

Proteiny mohou být dále modifikovány například cukry, lipidy či kovalentně připojenými polypeptidy. Nejznámějším případem polypeptidového modifikátoru je ubikvitin. Jeho posttranslační modifikace hrají významnou roli při degradaci nepotřebných či poškozených proteinů prostřednictvím proteinového komplexu, proteazomu. Proteiny určené k degradaci jsou označeny ubikvitinem, což je katalyzováno pomocí ligáz. Vzniká tak polyubikvitinový řetězec, proteazom a daný protein následně podléhá degradaci. Nejznámějším příklady těchto reverzibilních modifikací jsou ubikvitinace a sumoylace. Oba tyto procesy musí být v určité rovnováze. Zatímco sumoylace je obvykle spojena s transkripční represí, ubikvitinace koreluje se zvýšenou transkripční aktivitou (Johnson, 2004).

Ubikvitinace je posttranslační modifikace, při které dochází ke kovalentnímu navázání chaperonů, malých proteinů, které napomáhají správnému prostorovému uspořádání bílkovin, a to konkrétně ubikvitinu, na lyzinová rezidua substrátových proteinů (Glickman *et al.*, 2002). Ubikvitin je malý protein spojen s ostatními proteiny pomocí izopeptidické vazby mezi glycinem na C-terminálním konci a aminoskupinou na postranním řetězci lyzinového rezidua (Hou *et al.*, 2013). Tento proces je závislý na energii ve formě ATP a je katalyzován prostřednictvím 3 enzymů – UBA1 (ubiquitin-like modifier activating enzyme 1), UBE2 (ubiquitin-conjugating enzymes E2) a UBE3 (ubiquitin ligase E3) (Glickman *et al.*, 2002). Ubikvitinace vede, jak již bylo napsáno, k degradaci

proteozomu a tvoří tak ubikvitino-proteozomální systém (ubiquitin-proteasome systém - UPS), který zprostředkovává modifikaci proteinů ve spermii, díky čemuž je zabráněno zbytečné akumulaci defektních a nežádoucích proteinů (Sin *et al.*, 2012). V rámci samčího reprodukčního systému se ubiquitinace účastní spermatogeneze (Da Silva *et al.*, 2016), kde prostřednictvím UPS plní dvě důležité funkce – modifikace histonů a zachování kvality ejakulátu prostřednictvím proteolytické eliminace abnormálních spermií (Sin *et al.*, 2012). Pomáhá také při meiotické inaktivaci pohlavního chromozómu (mestic sex chromosome inactivation - MSCI) (Mulugeta *et al.*, 2010).

Ubikvitinace histonu H2 je jednou z nejčastějších histonových ubikvitinací a je spojena s inaktivací chromozomu X (Gaucher *et al.*, 2010). Fernandez-Capitello *et al.* (2003) se domnívají, že MSCI je důležité pro dokončení meiotického procesu, jelikož narušení MSCI vede k zástavě zrání spermatocytů v pachytene meiotické profáze. Zatímco ubikvitinace obvykle probíhá intracelulárně, UPS působí i extracelulárně, kdy dochází k ubikvitinaci defektních a abnormálních spermií během jejich transportu do nadvarlete (Sutovsky *et al.*, 2002). Ubikvitin je vylučován hlavními buňkami epitelu nadvarlete do jejich lumenu (Fraile *et al.*, 1996) a stává se součástí semenné plazmy (Lippert *et al.*, 1993). Přesný mechanismus, jakým ubikvitin rozezná defektní spermie, není dosud znám (Samanta *et al.*, 2015), nicméně bylo zjištěno, že zvýšená ubikvitinace ve spermii nepřímo souvisí s počtem spermií, jejich motilitou a procentuálním zastoupením normálních spermií a přímo koreluje s procentem spermií s abnormálním chromatinem (Sutovsky *et al.*, 2004). V budoucnu tak může být ubikvitin použit jako biomarker pro hodnocení kvality spermií.

Další posttranslační modifikací je sumoylace, což je proces zahrnující připojení či odpojení (Samanta *et al.*, 2015) malých signálních proteinů (small ubiquitin-like modifier - SUMO), které vykazují podobnost s ubikvitinem, na lyzinový postranní řetězec cílového proteinu. Tento proces ovlivňuje například transkripci, DNA reparaci či strukturu chromatinu. Sumoylace je řízena prostřednictvím enzymatické kaskády, která je podobná té, která je zapojena do ubikvitinace. Na rozdíl od ubikvitinace, sumoylace nevede proteiny k degradaci. SUMO obsažené v lidské spermii jsou malé signální proteiny složené asi ze 101 aminokyselin. Rozeznáváme 3 hlavní izoformy – SUMO1, SUMO2 a SUMO3, který je z 95% podobný SUMO 2, takže jsou často souhrně označovány jako SUMO2/3 (Brown *et al.*, 2008; Vigodner *et al.*, 2013).

Jednou z hlavních funkčních vlastností sumoylace je regulace nehomologních chromozomových synapsí a tvorba XY formace. Mezi další důležité funkce patří inaktivace pohlavních chromozomů (Vigodner *et al.*, 2006) či organizace heterochromatinu v kulatých i prodlužujících se spermatidách (Brown *et al.*, 2008). SUMO 1 a SUMO 2/3 jsou také přítomny v ejakulovaném lidském spermatu (Vigodner *et al.*, 2013). Zatímco hlavička spermie obsahuje pouze SUMO 1 (Marchiani *et al.*, 2011), v oblasti krčku a bičíku se nachází obě tyto izoformy (Vigodner *et al.*, 2013).

Sumoylace lidských spermií je považována za známku špatné kvality ejakulátu. Procento sumoylizovaných spermií je nepřímo úměrné celkové a progresivní motilitě (Marchiani *et al.*, 2011). Tento proces je také často spojován se špatnou morfologií spermií (Vigodner *et al.*, 2013). Nepohyblivé, maloforované, mikrocefalické a acefalické spermie obsahují podstatně vyšší množství sumoylovaných proteinů než průměrné zdravé spermie (Samanta *et al.*, 2015). SUMO jsou také často zodpovědné za poškození DNA. Existuje pozitivní korelace mezi SUMO-1-ylací a fragmentací DNA spermií (sperm DNA fragmentation - SDF) (Marchiani *et al.*, 2014). Když byla SDF indukována stresujícími podmínkami, jako je zmražení a rozmražení či oxidační stres, úroveň SUMO-1-ylace byla zvýšena. Na základě těchto zjištění může být sumoylace užitečná při detekci defektních spermií (Samanta *et al.*, 2015).

Pro pochopení funkčního základu sumoylace je nutné charakterizovat cílové proteiny, na které se SUMO proteiny nejčastěji vážou. Jedním z nich je RanGap-1 (Ran GTPase activating protein 1), který je lokalizován v post-akrozomální oblasti hlavičky a také v krčku. Sumoylace tohoto proteinu hraje významnou roli v utichávání translace genů (Marchiani *et al.*, 2013). Dalším proteinem je například DRP1 (dynamamin related protein 1), jehož sumoylace způsobuje změny mitochondriální aktivity spermií (Marchiani *et al.*, 2014). Marchiani *et al.* (2013) předpokládají, že právě sumoylace tohoto proteinu je spojena se zhoršenou motilitou spermií.

3.2.5 Terapeutické perspektivy post-translačních modifikací histonů

Léčba neplodnosti člověka znamená účinnou selekci spermií pro oplození *in vitro*. Dříve byly vyvinuty a dodnes se v asistované reprodukci používají jako ukazatele kvality spermií, morfologie, DNA fragmentace nebo ROS. Tyto postupy

jsou ale dnes překonány, protože stále neposkytují kýžené výsledky. Na základě současného poznání není možné ignorovat epigenetickou kvalitu spermií. Z toho důvodu je vhodné zaměřit se na histonový kód, jehož charakterizace může pomoci odhalit příčinu neúspěšného embryonálního vývoje. Jeho využití pro selekci spermií představuje možnost, jak zvýšit efektivitu asistované reprodukce člověka.

Komplexní epigenetické změny vedoucí ke vzniku histonového kódu a heterochromatinu jsou regulovány celou řadou faktorů, jako jsou histonové deacetylázy, methyltransferázy, ncRNA či malé proteinové modifikátory ubikvitinu (Štiavnická *et al.*, 2016). V budoucnu by například mohl být ubikvitin použit jako biomarker pro hodnocení kvality spermií.

Využití těchto faktorů představuje další možnosti neinvazivní diagnostiky spermií založené na testování epigenetických markerů a může sloužit také jako prevence poruch epigenetického rázu dětí vzešlých z asistované reprodukce (Štiavnická *et al.*, 2016).

4 Materiály a metodika

4.1 Hodnocení lidského ejakulátu

Vzorky spermatu byly odebrány pacientům v prostorách laboratoří Genetika Plzeň s.r.o. Odběr lidského ejakulátu byl proveden v souladu s rozhodnutím Etické komise FN a LF UK v Plzni ze dne 5.11.2015 a pouze v případech informovaného souhlasu pacienta. Zpracování vzorků ejakulátu proběhlo v Laboratoři Reprodukční Medicíny Biomedicínského centra a LF UK striktně anonymně.

Odběr byl uskutečněn masturbací po 3-5 denní sexuální abstinenci do sterilních kontejnerů. Následně byli odběrové nádoby ponechané při teplotě 37°C po dobu 10 minut. Po 10 minutách bylo započato hodnocení základních parametrů spermatu na základě manuálu Světové zdravotnické organizace (WHO, 2010). Pro evaluaci koncentrace a motility byla použita Maklerova komůrka. Do komůrky bylo umístěno 10μl vzorku ejakulátu, ejakulát byl přikryt krycím sklíčkem a celá komůrka umístěna pod mikroskop na vyhřívanou destičku. Bylo napočítáno 100 spermií, které byly dle motility rozděleny do 3 skupin: typ B – progresivní pohyb za hlavičkou; typ C – pohyb nebyl progresivní, ale byla pozorovatelná určitá motilita; typ D – nepohyblivé spermie. Takto zhodnocené spermie byly následně použity k dalším analýzám.

4.2 Izolace myších spermií

Myší spermie byly odebrány od samců z kmene CD1 (Velaz s.r.o., Praha). Byl připraven roztok Na-Pyruvátu [15mg/170μl], který byl následně napipetován do Whittenova média pro stabilizaci pH roztoku na 7,2-7,4. Z tohoto bylo následně připraveno kapacitační (CAP) a nekapacitační médium (NC). CAP bylo tvořeno 5ml Whittenova média s 5μl Na-Pyruvátu, HCO³⁻ [12,6mg/5ml] a BSA [10mg/ml]. Následně byla myší nadvarlata umístěna do zkumavky, která obsahovala 0,5mL NC média, a byla inkubována ve vodní lázni. Po inkubaci nadvarlat v NC médiu byly z nadvarlat izolovány spermie. Spermie byly umístěny do zkumavky a následně fixovány na sklíčku v roztoku 4% paraformaldehydu v PBS.

4.3 Imunocytochemie spermií a mikroskopická analýza

Byla připravena krycí sklíčka o rozměrech 18x18mm, na kterých byl proveden roztěr spermií, které se nechaly zaschnout po dobu 2 hodin. Fixace byla provedena aplikací 0,5% formaldehydu na sklíčka s roztěrem při pokojové teplotě po dobu 5 minut. Za účelem redukce sulfidických vazeb protaminů a dekonenzace hlaviček spermií byla sklíčka inkubována s 10mM roztokem DTT (4800 μ l PBS + 200 μ l heparinu + 7,7mg DTT) na ledu po dobu 30 minut. Dále byly spermie permeabilizovány, kdy bylo na sklíčka napipetováno 300 μ l 0,1% Triton X-100 v PBS- NaN_3 a ponecháno 40 minut permeabilizovat. Následovalo blokování a pokrytí sklíček se spermiemi roztokem 5% NGS s 0,1% Triton X-100 v PBS- NaN_3 . Blokovací roztok byl na sklíčku ponechán po dobu 1 hodiny. Poté byl aplikován koktejl primárních protilátek, rozředěných v poměru 1:200 v 1% NGS s 0,1% Triton X-100 v PBS- NaN_3 . Byly použity následující protilátky: anti-rabbit anti-histone H3 (dimethyl K27) [Abcam, ab194690]; anti-histone H3 (dimethyl K4) [Abcam, ab7766]; anti-gamma H2AX [Abcam, ab26350]. Současně byla připravena negativní kontrola, kde byla primární protilátka nahrazena králičím, resp. myším sérem, ředěného v poměru 1:1000 v 1% NGS s 0,1% Triton X-100 v PBS- NaN_3 . Inkubace s primární protilátkou, resp. s králičím/myším sérem u spermií negativní kontroly, proběhla přes noc při teplotě 4°C. Po inkubaci s primární protilátkou následoval oplach v 1% NGS s 0,1% TritonX-100 v PBS- NaN_3 , 2 x10-15 minut. Následovala aplikace koktejlů sekundárních protilátek, ředěných v poměru 1:200 v 1% NGS s 0,1% TritonX-100 v PBS- NaN_3 . Byly použity následující sekundární protilátky: goat anti-mouse Alexa Fluor 488; goat anti-rabbit Alexa Fluor 568. Inkubace se sekundární protilátkou probíhala 40 minut, následovaná 2x oplachem. Nakonec bylo na podložní sklíčka aplikováno 3 μ l Vectashield DAPI (H-1200, Vector Laboratories, USA) a krycí sklíčka s fixovanými a cytochemicky barvenými spermiemi montována. Takto připravené preparáty byly fixovány lakem a skladovány v 4°C do další analýzy.

Preparáty byly vizualizovány na konfokálním mikroskopu se spinning diskem (Olympus, Německo), za použití 100x imerzního objektivu a příslušné vlnové délky emise a excitace odpovídající použitým fluoresceinům. Podmínky snímání byly totožné pro reálné vzorky a negativní kontrolu. Obrázky byly analyzovány v programu ImageJ (NIH, USA) a intenzita signálu reálných vzorků byla redukována o bazální signál spermií negativní kontroly.

4.4 Western Blot

Suspenze spermií byla centrifugována po dobu 10 minut při 10 000 rpm pro získání pelety. Následně byl odstraněn supernatant a peleta byla precipitována v 1ml acetonu s 20mM DTT po dobu 30 minut při 4°C. Precipitovaná peleta byla lyzována v 100µl lyzačního pufru, lyzát byl následně povařen při 97°C po dobu 5 minut a skladován při -80°C do dalšího použití.

Vzorky lyzátů byly naředěny 4x koncentrovaným koncentrovaným Laemmli pufrům v poměru 1:3. Vzorky byly poté povařeny a aplikovány na polyakrylamidový gel s gradientem (Mini-Protean Precast Gels, Biorad, Francie). Elektroforetický separovaný proteiny spermií byly přeneseny v elektrickém poli na PVDF membránu pomocí Trans-Blot Turbo Transfer System (Biorad, Francie). Membrána byla blokována v 5% roztoku netučného mléka v TBS (tris-buffered solution) po dobu 1 hod. při laboratorní teplotě za neustálého kývání. Membrána byla následně inkubována s odpovídající primární protilátkou v poměru 1:1000 v TBS-T (0,1% Tween v TBS) po dobu 1 hodiny při laboratorní teplotě. Byly použity tyto primární protilátky: anti-GAPDH (Ab8245, Abcam, UK) a anti-beta-actin (Ab8227, Abcam, UK). Tyto protilátky byly použity pro detekci housekeeping proteinů s konstantní expresí. Po inkubaci proběhl 3x oplach v TBS-T, každý 5-10 minut. Následovala inkubace membrány se sekundární protilátkou v poměru 1:2000, v TBS-T. Byly použity anti-rabbit a anti-mouse sekundární protilátky konjugované s křenovou peroxidázou (HRP, horseradish peroxidase). Po inkubaci byl proveden 3x oplach v TBS, každý 5-10 min. Membrána s navázanou sekundární protilátkou byla dále inkubována po dobu 5 minut s roztokem peroxidu a luminolu v poměru 1:1 (GE HealthCare, USA). Vizualizace proteinů proběhla pomocí ChemiDoc Imaging System (Biorad, Francie). Kvantifikace probíhala pomocí densitometrie bandů proběhla v programu ImageLab (Biorad, Francie).

4.5 Průtoková cytometrie

Po zhodnocení motility a koncentrace byl každý individuální vzorek rozdělen do tří částí: pozitivní kontrola, negativní kontrola a reálný vzorek. Vzorky pro pozitivní

kontrolu byly inkubovány s 50 μ l 100mM H_2O_2 (495 μ l BWW-Biggers Whitten Whittingham + 5 μ l H_2O_2) po dobu 1 hodiny při teplotě 37°C a poté byly centrifugovány (3500 rpm po dobu 15 minut). Pro negativní kontrolu byl vzorek resuspendován s BWW médiem za absence H_2O_2 a rovněž centrifugován. Kontrolní a reálné vzorky byly fixovány 4% formaldehydem po dobu 15 min., následovala permeabilizace v PBS + 0,5% Triton X-100 po dobu 15 minut. Následně byly vzorky, vyjma negativní kontroly, inkubovány s 20 μ l primární protilátky H2AX a H3K4me (1:50 v PBS) po dobu 1 hodiny. Poté byly vzorky opláchnuty a inkubovány se sekundární protilátkou (1:200, Fisher Sci, USA) po dobu 30 minut, včetně negativní kontroly. Nakonec byly všechny vzorky podrobeny oplachu v PBS a resuspendovány s 300 μ l PBS pro analýzu na průtokovém cytometru (FACSVerse, Becton Dickinson). Pro histon gammaH2AX byl použit laser o vlnové délce 406nm a filtr 448/45BP, pro histon H3K4me byl použit laser s 488nm a filtr o velikosti 527/32BP.

4.6 Barvení mitochondrií

Pomocí průtokového cytometru (FACSVerse, Becton Dickinson) byla zhodnocena aktivita mitochondrií prostřednictvím membránového potenciálu (MMP) a mobilita spermií. Pro danou analýzu byl připraven roztok obsahující Mitotracker Deep Red FM (Thermo Fischer Scientific, M22426) a Yo-Pro1 (Vybrant, Apoptosis Assay Kit, Thermo Fischer Scientific, V13243) kdy do 2500 μ l mycího roztoku bylo napipetován 1 μ l Yo-Pro1 a 0,25 μ l Mitotrackeru. Do zkumavek bylo umístěno 300 μ l nově připraveného roztoku a 5 μ l suspenze spermií. Následně byly zkumavky umístěny do prostředí bez přístupu světla a inkubovány po dobu 30 minut v pokojové teplotě. Poté proběhla samotná analýza na průtokovém cytometru. Pro YoPro1 byl použit 488nm argon-ion laser (30/28BP filter) a pro MitoTracker Deep Red 633nm helium-neon laser (670/40BP filter). Počet buněk, na kterých byla analýza uskutečněna, činil 10 000 buněk.

4.7 Statistika

Data ze všech experimentů byla analyzována prostřednictvím programu Statistica (StatSoft ČR, s.r.o). Pro stanovení významných rozdílů mezi jednotlivými pacienty

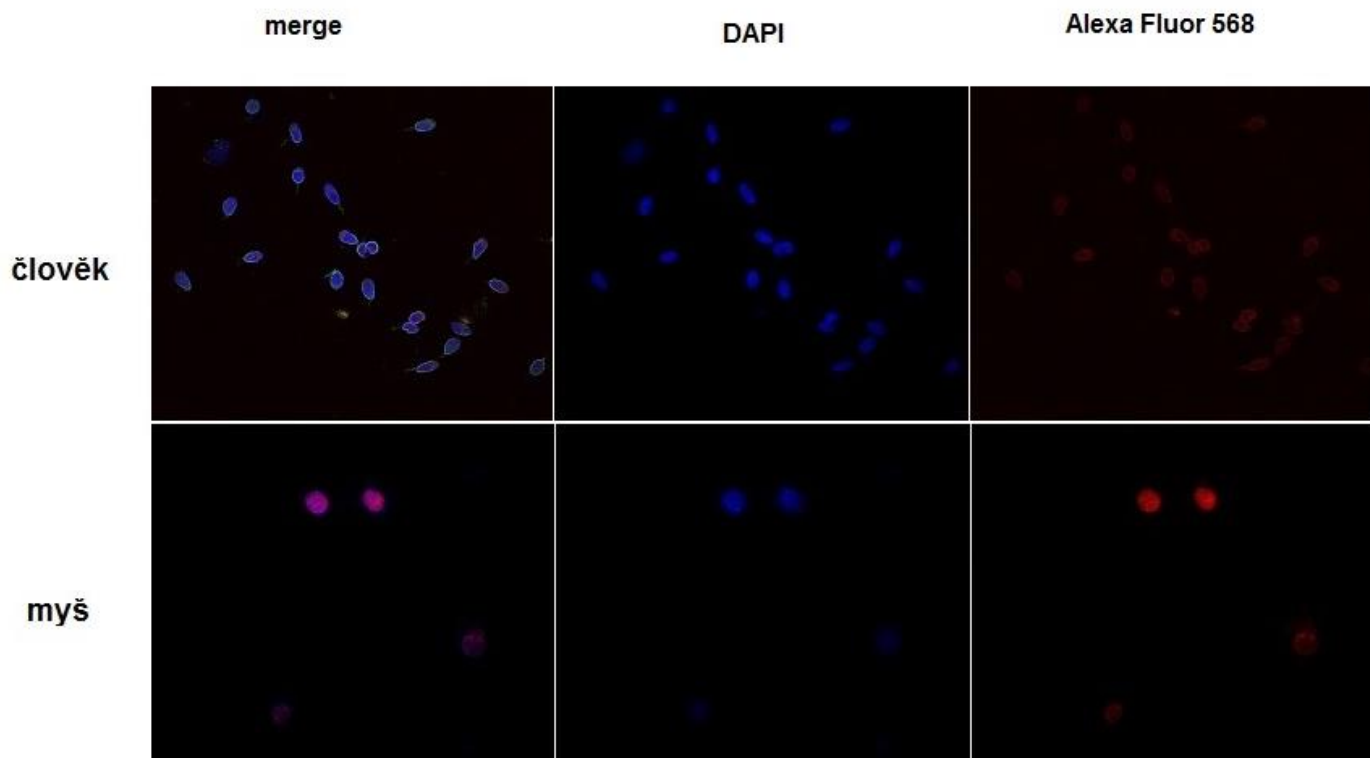
byla použita ANOVA. Hladina významnosti $p < 0,05$ byla považována za statisticky významnou. Western Blot byl uskutečněn na 5 vzorcích a průtoková cytometrie na 15, resp. 14 vzorcích.

5 Výsledky

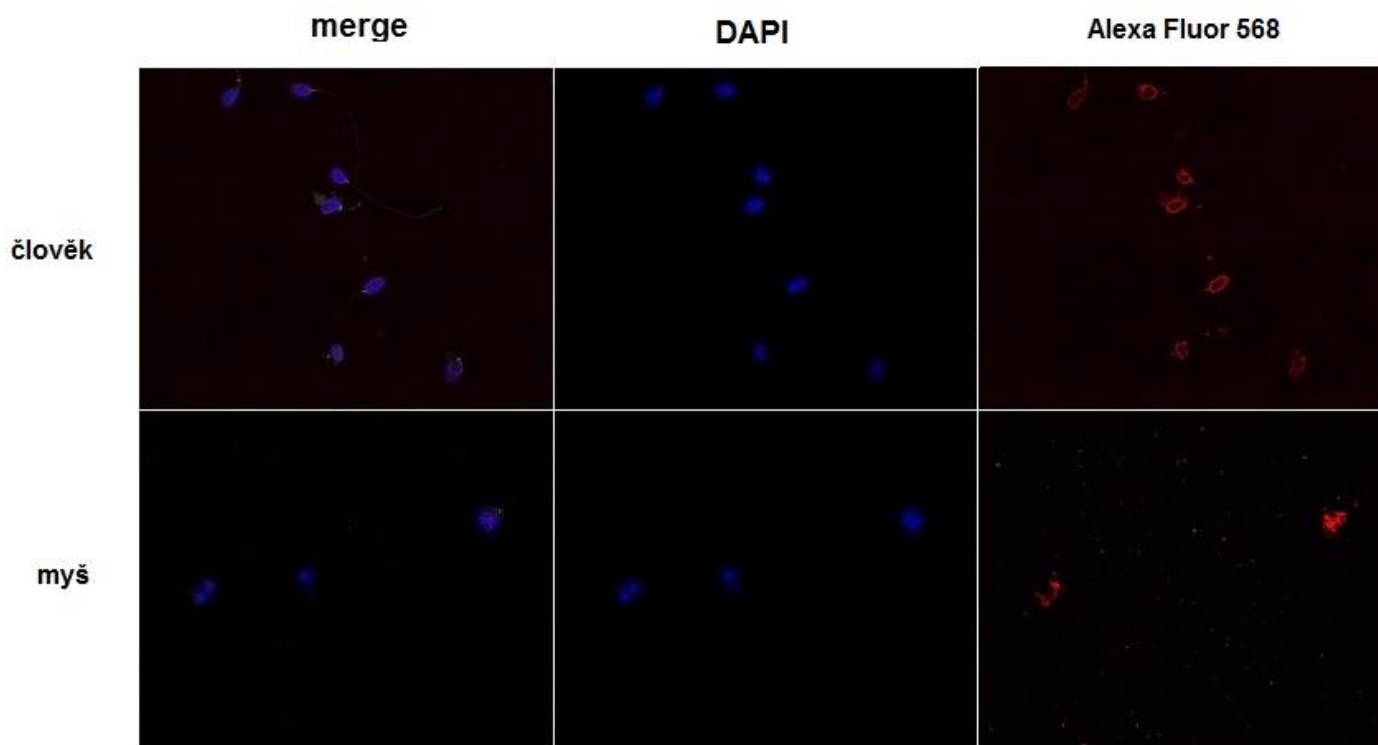
Cílem experimentů bylo ověřit hypotézu, že reziduální histony ve zralých spermích lze využít jako markery vitality a oplození schopnosti spermíí savců. Z tohoto důvodu byly lokalizovány a analyzovány vybrané reziduální histony ve spermích myši a člověka. Pro detekci spermíí bylo využito metod imunocytochemie, western blotu a průtokové cytometrie. Těmito metodami proběhla analýza následujících post-translačních modifikací histonů ve spermích myši a člověka: dimethylace histonu H3 na lysinu K4 (H3K4me2), dimethylace histonu H3 na lysinu K27 (H3K27me2) a fosforylace histonu H2AX na serinu 139 (gammaH2AX). Následně došlo ke korelaci těchto histonových modifikací v lidských spermích s jejich vitalitou a potencionální oplození schopností.

5.1 Detekce reziduálních histonů ve spermiích myši a člověka

Cílem experimentu bylo detekovat H3K4me2 a H3K27me2 ve zralých spermiích myši a člověka. Pro tento účel bylo použito metody imunocytochemického barvení a western blotu. Zjistili jsme přítomnost H3K4me2 a H3K27me2 ve spermiích myši a člověka (viz Obr. 1 a 2). Obrázky dokazují sub-celulární lokalizaci histonů v hlavičce spermií. Přítomnost H3K4me2 v lidských spermiích byla potvrzena metodou western blot (Obr. 3). Z výsledků je patrná individuální variabilita mezi jednotlivými pacienty, s ohledem na koncentraci proteinů ve vzorku (data zde nejsou zobrazena). Nejvyšší intenzita signálu u vzorku 5991 dokazuje nejvyšší četnost H3K4me2 z analyzovaných vzorků. Histon gammaH2AX patří mezi prověřené histony, a tak nebyla nutná jeho detekce prostřednictvím imunocytochemie a western blotu.



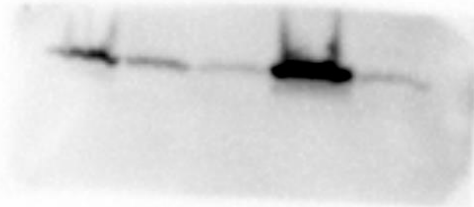
Obrázek 1: Dimethylace histonu H3 na lysinu K4 (H3K4me2) ve spermích člověka a myši. Zobrazení na konfokálním mikroskopu za použití 100x imerzního objektivu. DAPI: chromatin; Alexa Fluor 568: H3K4me2.



Obrázek 2: Dimethylace histonu H3 na lysinu K27 (H3K27me2) ve spermích člověka a myši. Zobrazení na konfokálním mikroskopu za použití 100x imerzního objektivu. DAPI: chromatin; Alexa Fluor 568: H3K27me2.

1. 5983
2. 5987
3. 5989
4. 5991
5. 6003

MM 1 2 3 4 5

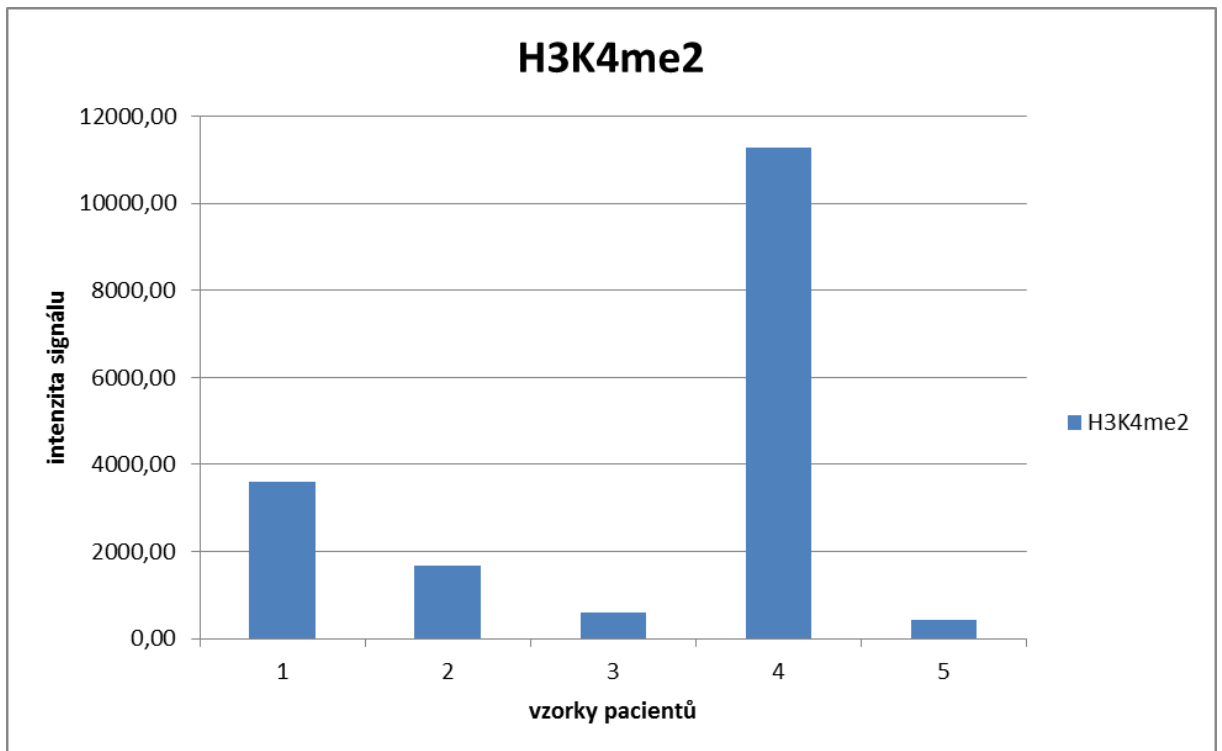


Obrázek 3: Detekce H3K4me2 ve spermích člověka. Přítomnost H3K4me2 byla potvrzena po ověření molekulové hmotnosti (H3K4me2 = 17 kDa) metodou Western Blot. MM: hmotnostní marker.

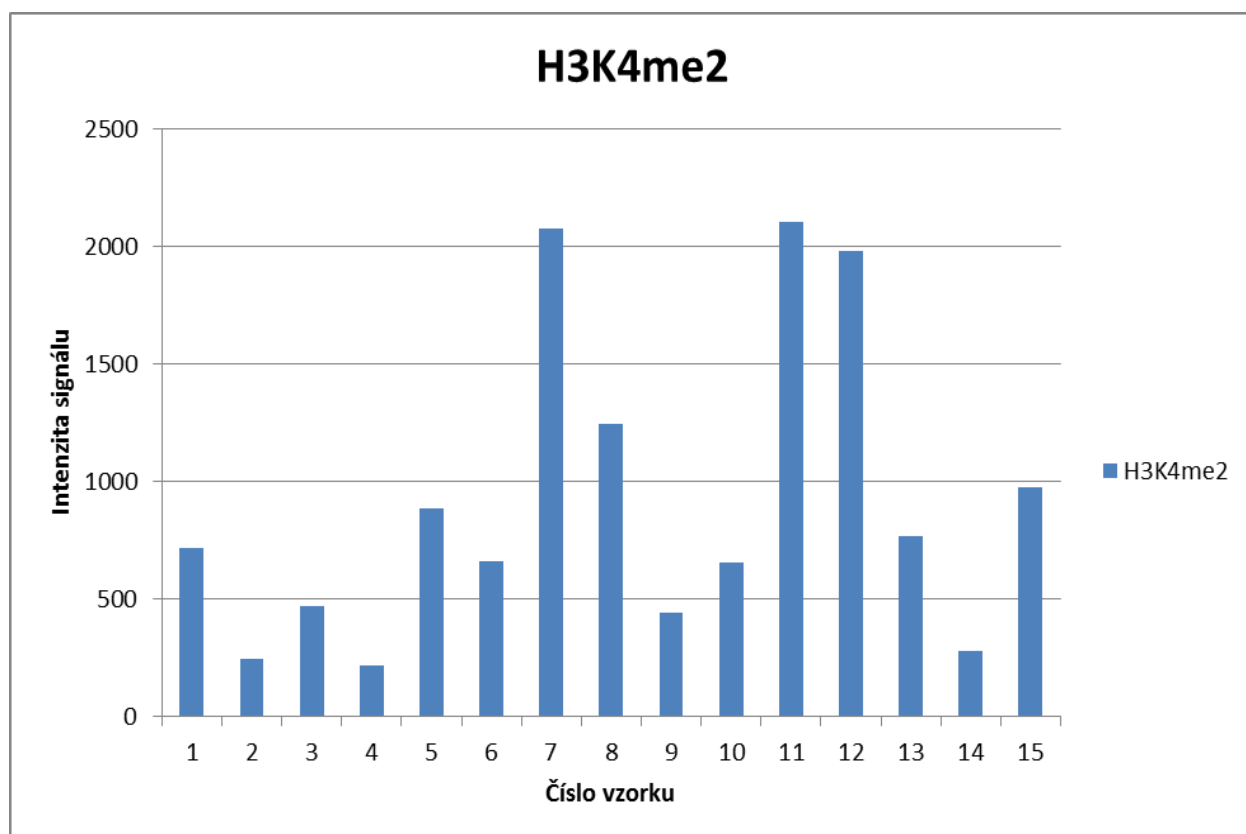
5.2 Kvantifikace vybraných reziduálních histonů v lidských spermích

Cílem experimentu bylo kvantifikovat vybrané reziduální histony ve zralých spermích člověka a vyjádřit jejich individuální biologickou variabilitu. Pro tento účel byla použita metoda western blotu a průtokové cytometrie.

V tomto experimentu byl pomocí western blotu detekován a následně kvantifikován H3K4me2 (Obr. 4). Byla ověřena specifita protilátek a individuální variabilita, analýza byla provedena na omezeném počtu vzorků. Dále proběhla kvantifikace H3K4me2 (Obr. 5) a gammaH2AX (Obr. 7) za použití průtokového cytometru. Za použití densitometrie jsme zjistili individuální rozdíly mezi jednotlivými pacienty (Obr. 5 a 7), kdy maximální rozdíly mezi pacienty činí 89% a 84% pro H3K4me2, resp. gammaH2AX. Rozdíly jsou patrné i na dot blot diagramech z průtokového cytometru, kdy byl pro analýzu použit vzorek s nejnižší a nejvyšší intenzitou signálu pro daný histon (Obr. 6 a 8).

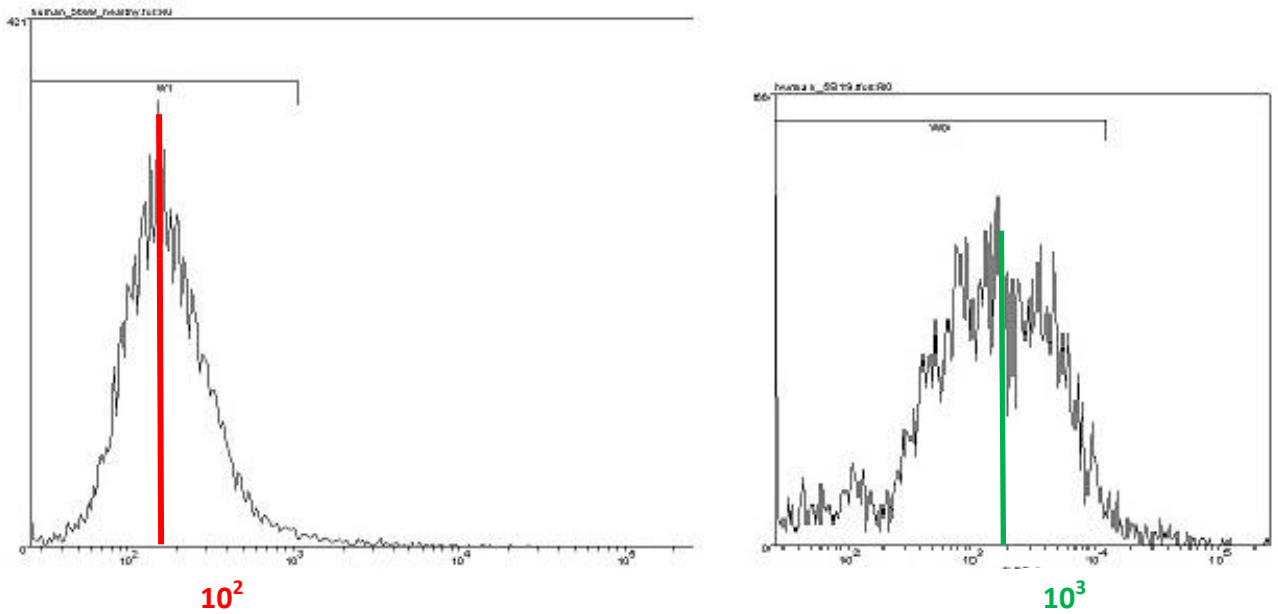


Obrázek 4: Kvantifikace intenzity signálu pro H3K4me2 ve spermích člověka po použití western blotu. Čísla označují individuální vzorky pacientů.

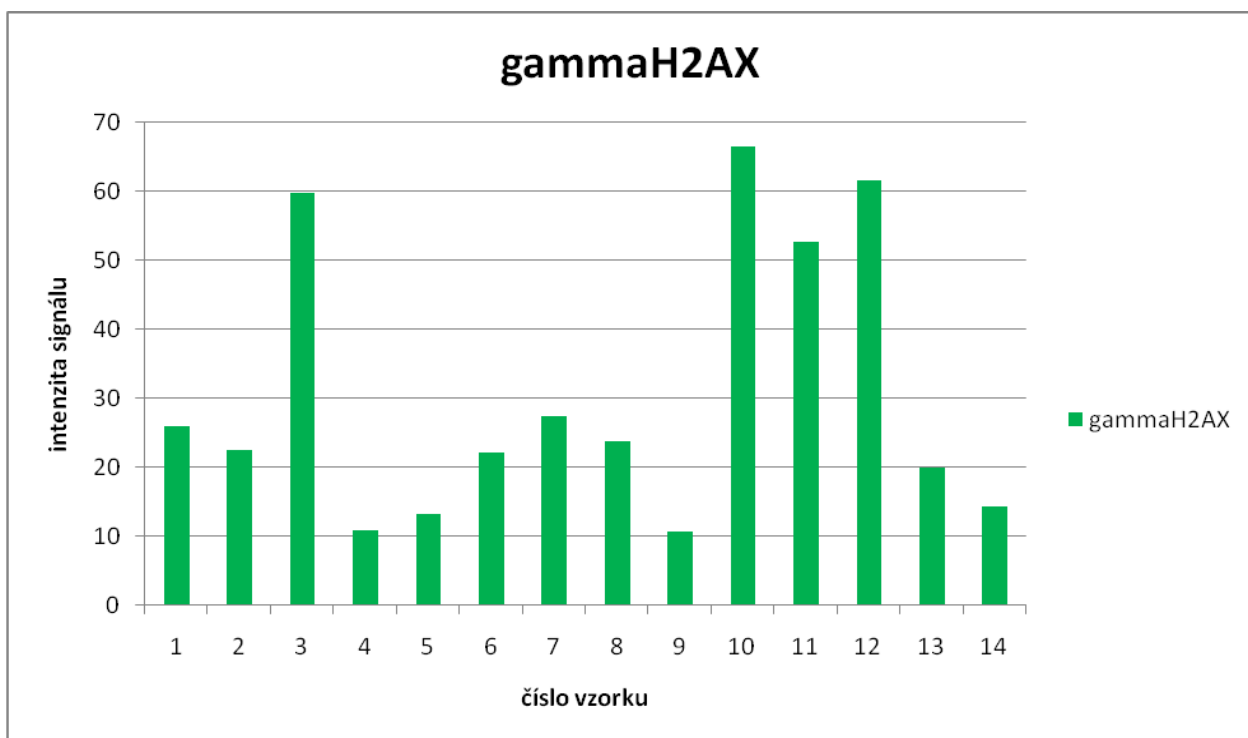


Obrázek 5: Kvantifikace intenzity signálu pro H3K4me2 ve spermích člověka po použití průtokového cytometru. Čísla označují individuální vzorky pacientů.

H3K4me2

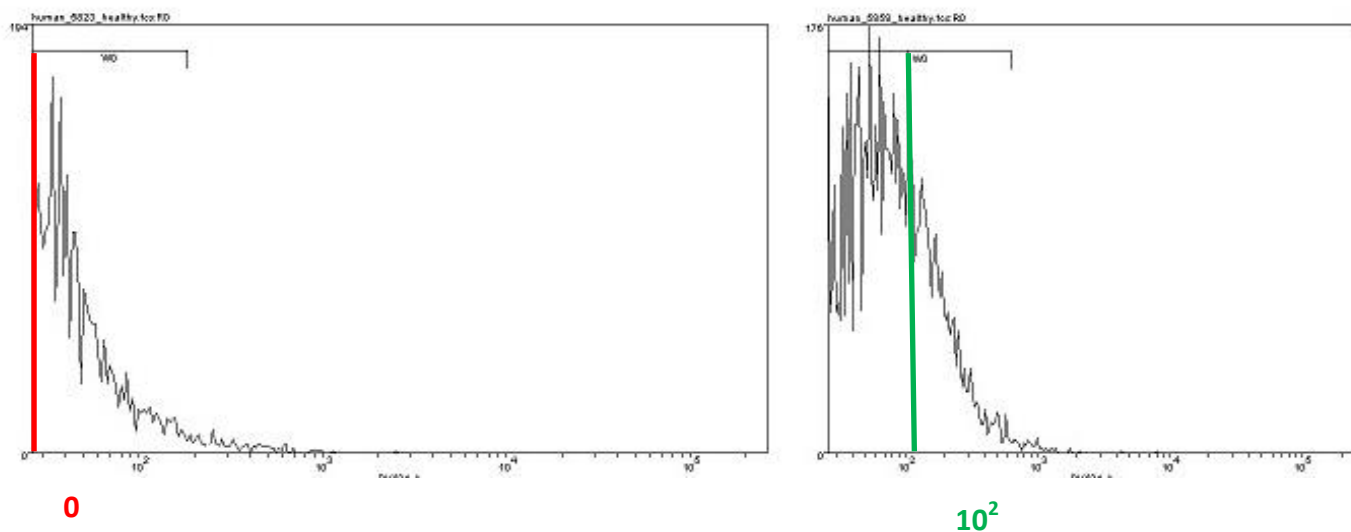


Obrázek 6: Dot blot diagram pro H3K4me2 v lidských spermích analyzované průtokovou cytometrií. Diagram vlevo znázorňuje vzorek s nejnižší intenzitou signálu a diagram vpravo s nejvyšší intenzitou signálu, kdy o kvalitě vzorku rozhoduje jeho posun doprava na ose X.



Obrázek 7: Kvantifikace intenzity signálu pro gammaH2AX ve spermích člověka po použití průtokového cytometru. Čísla označují individuální vzorky pacientů.

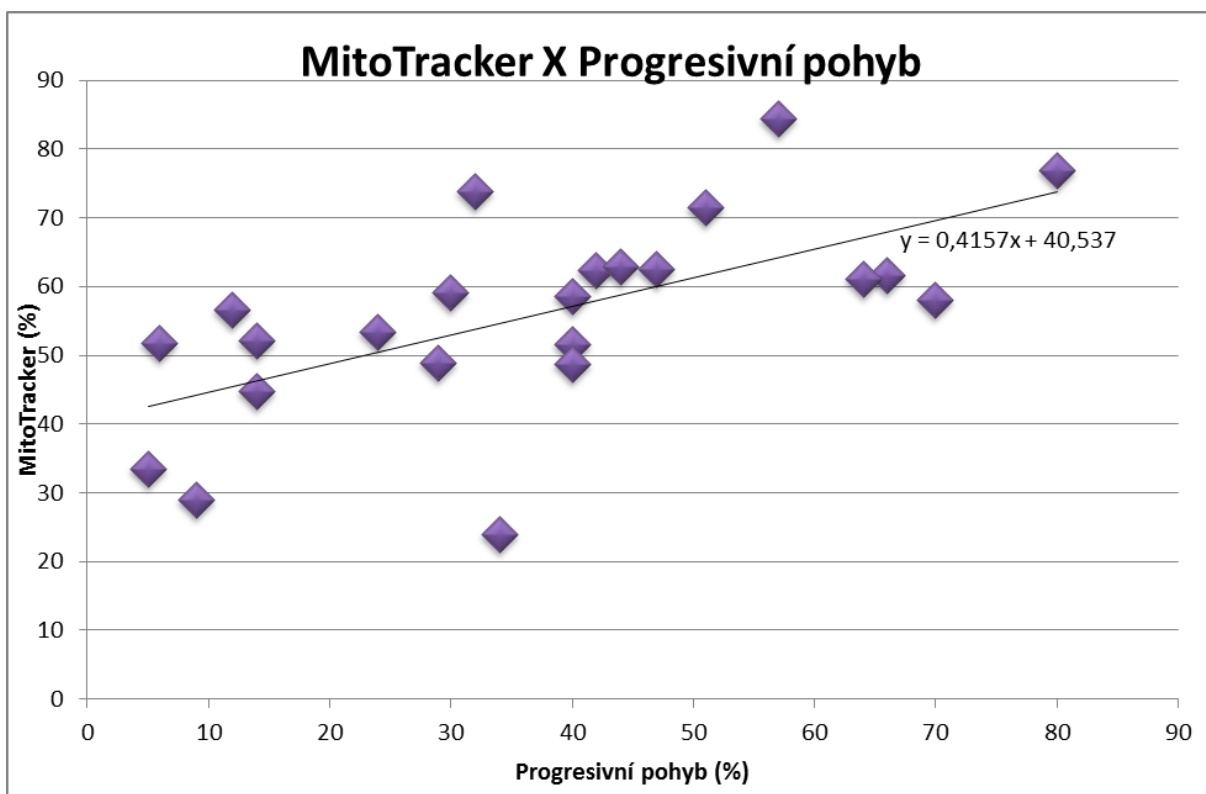
gammaH2AX



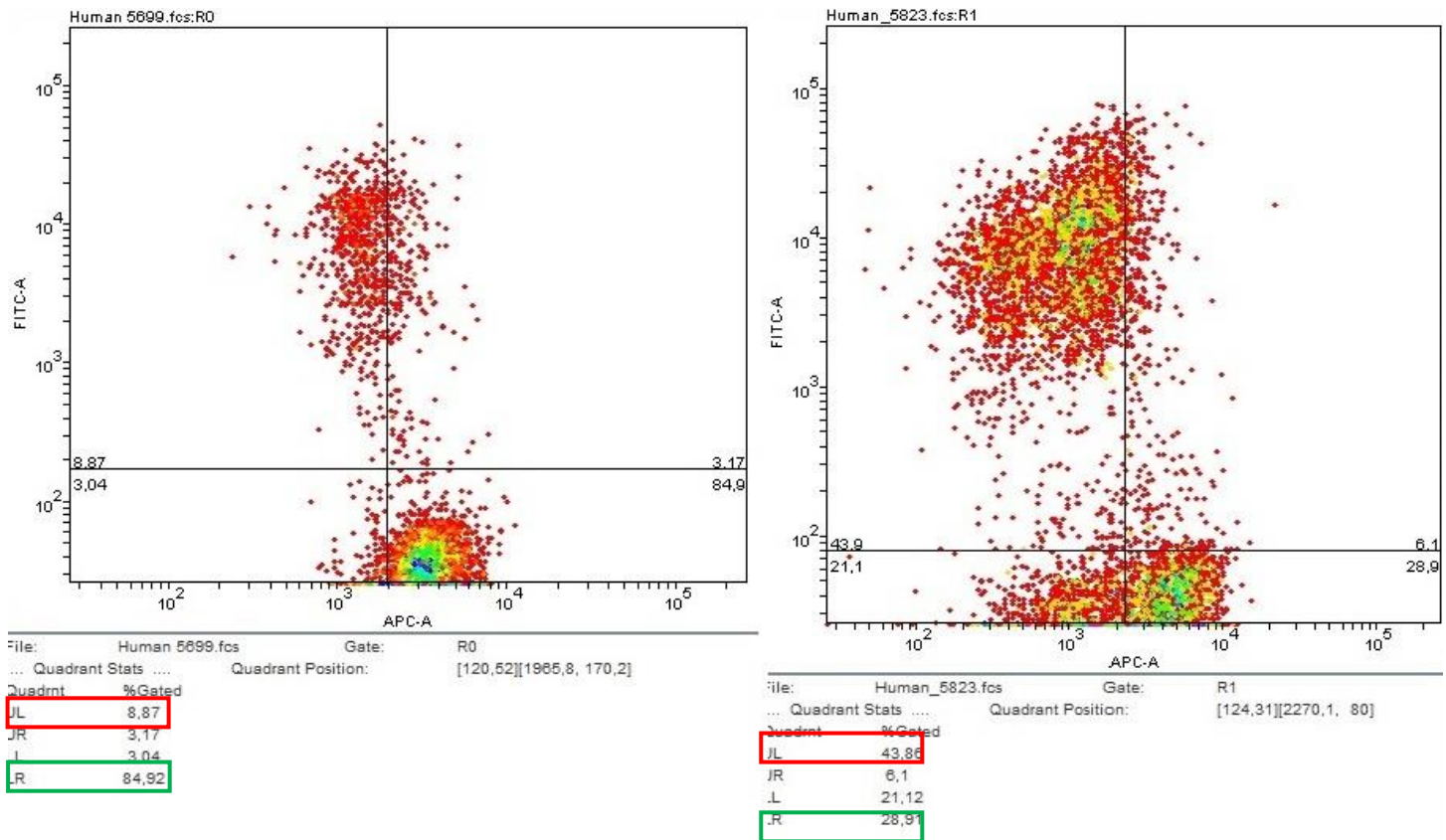
Obrázek 6: Dot blot diagram pro gammaH2AX v lidských spermích analyzované průtokovou cytometrií. Diagram vlevo znázorňuje vzorek s nejnižší intenzitou signálu a diagram vpravo s nejvyšší intenzitou signálu, kdy o kvalitě vzorku rozhoduje jeho posun doprava na ose X.

5.3 Analýza reziduálních histonů ve vztahu ke kvalitě spermií

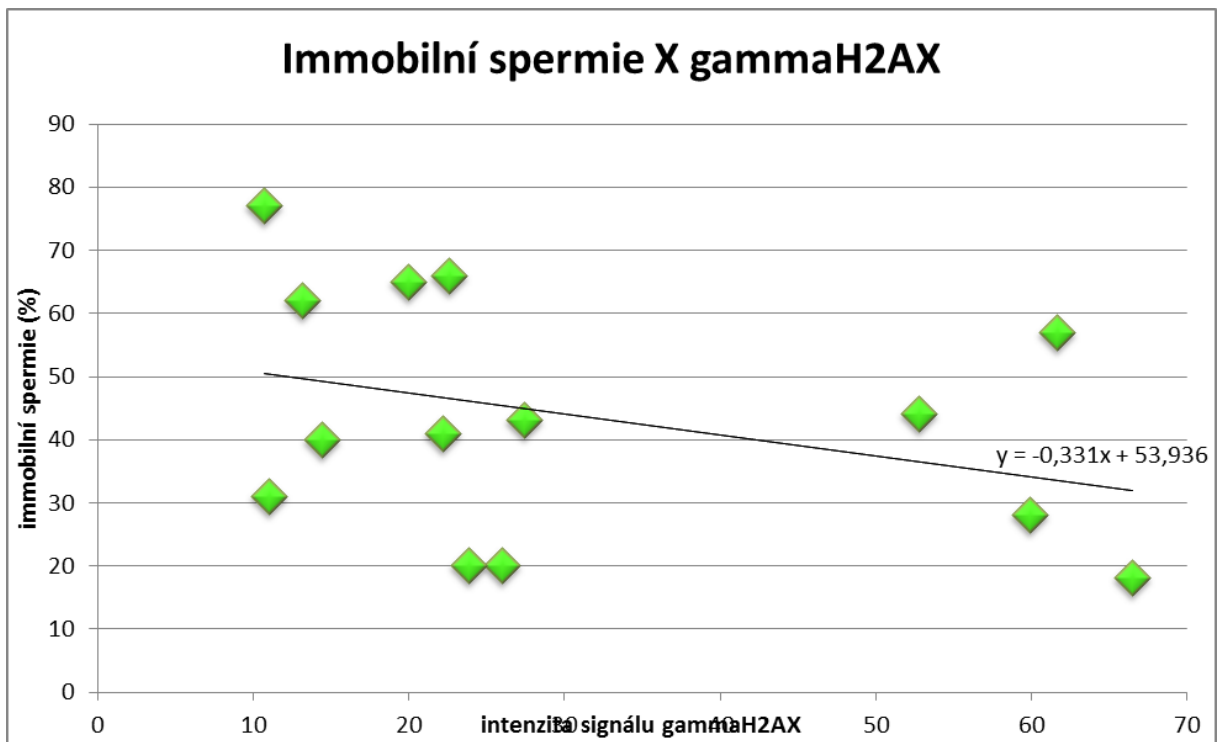
Cílem experimentu bylo analyzovat v předchozích experimentech detekované histony H3K4me2 a gammaH2AX a vyjádřit jejich množství ve vztahu k ukazatelům viability spermií a markery jejich oplození schopnosti – barvení YoPro a MitoTrackeru. Pro tento účel byla použita metoda průtokové cytometrie. Výsledky experimentu ukázaly, že intenzita fluorescence MitoTrackeru, která je dána hodnotou mitochondriálního membránového potenciálu, je přímo závislá na motilitě spermií (Obr. 9). Vzorky s nejvyšším zastoupením progresivně se pohybujících spermií zároveň vyjadřují jedny z nejvyšších hodnot intenzity fluorescence MitoTrackeru. Na základě korelační analýzy bylo zjištěno, že hodnota korelačního koeficientu činí 0,618, což představuje přímou pozitivní závislost ($p=0,048$; $p<0,05$). Na obrázku 10 je znázorněno procentuální zastoupení živých spermií s aktivními mitochondriemi a mrtvých spermií s neaktivními mitochondriemi, kdy u nejvitálnějšího vzorku (5699) tento podíl činil 84,92%, resp. 8,87% a naopak u nejméně vitálního vzorku (5823) činil 28,91%, resp. 43,86%. Dále bylo zjištěno, že množství gammaH2AX je nepřímo úměrné obsahu imobilních spermií v ejakulátu člověka (Obr. 11). Vzorky s nejvyšší intenzitou signálu pro gammaH2AX obsahují nejnižší procentuální zastoupení imobilních spermií. Na základě korelační analýzy bylo zjištěno, že mezi množstvím gammaH2AX a množstvím imobilních spermií existuje slabá nepřímá závislost, kdy hodnota korelačního koeficientu činí -0,2 ($p=0,055$; $p>0,05$). Histon gammaH2AX je tak markerem motility spermií. Posledním experimentem bylo zjištěno, že intenzita fluorescence MitoTrackeru je nepřímo závislá na množství H3K4me2 (Obr. 12), což dělá z H3K4me2 slabý marker motility při $R= -0,236$ (slabá závislost) a se spolehlivostí vyšší než 0,05.



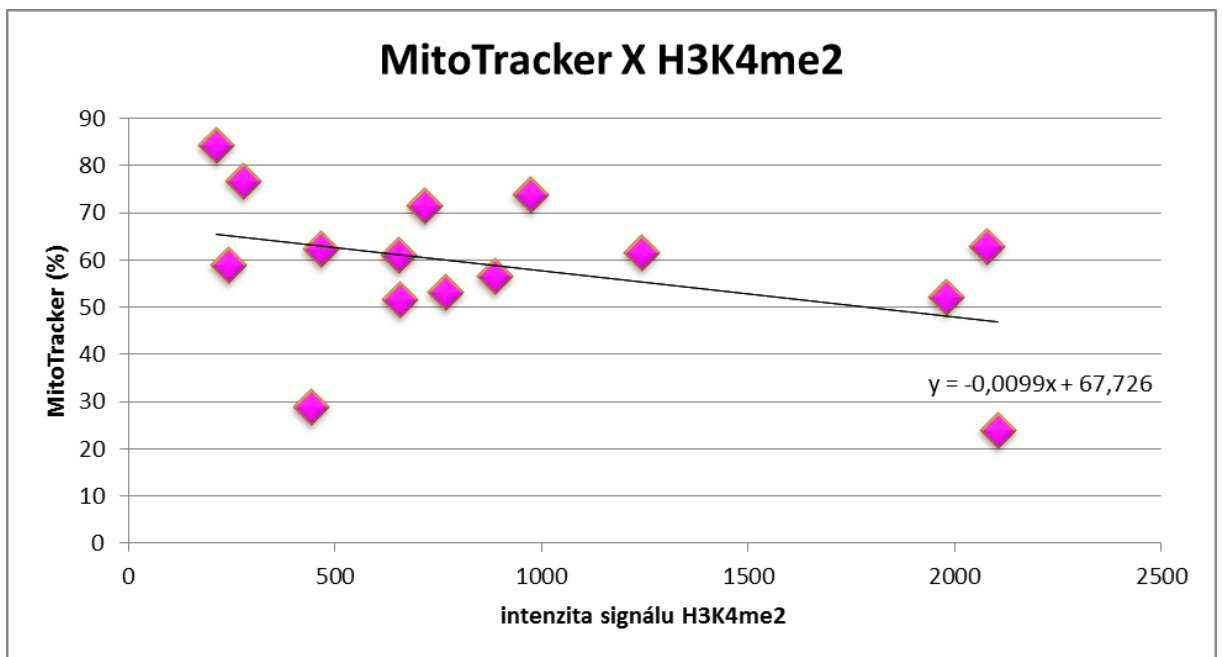
Obrázek 9: Pozitivní korelace mezi intenzitou fluorescence MitoTrackeru a procentuálním zastoupením progresivně se pohybujících spermií člověka. $R=0,618$ ($p=0,048$; $p<0,05$).



Obrázek 10: Dot blot diagram znázorňující poměr živých spermii s aktivními mitochondriemi (pravý dolní kvadrant) a spermii mrtvými s neaktivními mitochondriemi (levý horní kvadrant) pomocí průtokového cytometru. Diagram vlevo znázorňuje vzorek s nejvyšším počtem živých spermii s aktivními mitochondriemi a diagram vlevo vzorek s nejvyšším počtem mrtvých spermii s neaktivními mitochondriemi.



Obrázek 11: Negativní korelace mezi obsahem gammaH2AX a zastupením immobilních spermií v ejakulátu člověka. $R = -0,2$ ($p = 0,055$; $p > 0,05$).



Obrázek 12: Negativní korelace mezi obsahem H3K4me2 a intenzitou fluorescence MitoTrackeru. $R = -0,236$ ($p = 0,051$; $p > 0,05$)

6 Diskuze

Spermie jsou vysoce specializované buňky produkované během spermatogeneze, což je proces zahrnující rozsáhlé buněčné, epigenetické a chromatinové změny. Spermatogeneze začíná replikací a diferenciací spermatogonií na spermatocyty I. řádu, které se během genetické rekombinace v rámci meiózy vyvinou v haploidní spermatocyty II. řádu (Oliva *et Castillo*, 2011). Po procesu zrání se z kulovité spermatidy stane spermie. Během tohoto procesu dochází k hyperacetylaci histonu H4 a postupnému nahrazení histonů nejprve tranzitnímu proteiny, a poté protaminy PRM1 a PRM2 (Govin *et al.*, 2004). Po protaminaci však můžeme ve zralé spermii detekovat určité množství histonů, které je druhově specifické (Brykczunska *et al.*, 2010). Perzistence reziduálních histonů byla dříve považována za fyziologickou nedostatečnost, avšak nedávné studie potvrdily, že tyto histony hrají významnou roli v globální funkci chromozomů (Arpanahi *et al.*, 2009) a v časném embryonálním vývoji (Hammoud *et al.*, 2009). Spermie savců obsahuje velké množství post-translačních modifikací histonů, které tvoří tzv. histonový kód a jsou významnými nositeli epigenetických podkladů v rámci transgenerační dědičnosti (Brunner *et al.*, 2014).

Tato diplomová práce je zaměřena na možnost, že post-translační modifikace histonů ovlivňují fyziologický stav spermií savců. Mezi nejznámější histonové modifikace patří methylace, acetylace, fosforylace či ubikvitinace. Jedná se post-translační změny proteinů, často katalyzované specifickými enzymy, které regulují stabilitu, distribuci a funkci proteinu (Samanta *et al.*, 2015). Specifické modifikace histonů umožňují regulovat transkripci, replikaci, sestřih mRNA či reparaci DNA (Polo *et Jackson*, 2011).

Methylace čtvrtého amino-acidového zbytku na N-konci histonu H3 je jednou z nejstudovanějších histonových modifikací vůbec. H3K4me je spojen s promotory aktivačních genů (Barski *et al.*, 2007), kdy dochází k regulaci transkripce prostřednictvím podpory vazby pozitivních transkripčních faktorů a k blokování těch negativních (Flanagan *et al.*, 2005). Mezi touto modifikací a mírou transkripce existuje silná pozitivní korelace (Santos-Rosa *et al.*, 2002). To dělá z methylovaného histonu H3K4 důležitého regulátora vývoje organismu. H3K4

může nabývat mono-, di- a trimethylovaných forem, které se liší ve svých biologických funkcích (Barski *et al.*, 2007). H3.3 je spojen s transkripčně aktivním chromatinem, zatímco H3.2 s umlčením genů a transkripčně neaktivním heterochromatinem (Hake *et al.*, 2006).

V rámci řešení této diplomové práce bylo provedeno rozsáhlé měření a analýza H3K4me2 pomocí imunocytochemie, western blotu a průtokové cytometrie. Výsledky práce poukazují, že histon H3K4me2 je negativním markerem motility spermií. Toto tvrzení je v souladu s pozorováním spermií háďátek (Greer *et al.*, 2014) kdy byla ve shodě s naší studií prokázána snížená motilita a tedy i fertilita při současném zvýšeném obsahu H3K4me2. Podobných výsledků bylo dosaženo i ve studii Hammoud *et al.* (2011), který navíc objevil spojitost mezi lokalizací histonových modifikací H3K4me a H3K27me s infertilitou. 5 ze 7 neplodných mužů z jeho studie mělo pozměněnou lokalizaci H3K4me či H3K27me v gametách oproti fertilním mužům. Tato lokalizace může korelovat s retencí histonů, která u fertilního pacienta tvořila 3-5% v rámci genomu. Naopak u infertilních pacientů byl výskyt reziduálních histonů 5-32 %. To podporuje tvrzení, že větší retence histonů může být znakem infertility. K infertilitě až sterilitě může vést také nesprávná methylace histonů (Glaser *et al.*, 2009).

Další rozsáhlé měření a analýza pomocí imunocytochemie, western blotu a průtokové cytometrie proběhla na fosforylovaném histonu H2AX na serinu 139. Histon H2A zahrnuje největší množství variant včetně histonu H2AX, který je klíčovým faktorem v reparačních procesech poškozené DNA (Foster *et al.*, 2005). Nenachází se ve specifických částech DNA, naopak je náhodně začleněn do histonů v celém chromatinu. Pokud dojde k poškození DNA, H2AX je fosforylován na serinu 139 a stává se z něj gammaH2AX (Rogakou *et al.*, 1998). gammaH2AX vzniká v reakci na vznik DSBs (double-strand breaks), přičemž jeho funkce je stále diskutována. Díky této modifikaci se ale DNA stává méně kondenzovanou, pravděpodobně kvůli poskytnutí prostoru pro proteiny nezbytné pro proces reparace DSBs (Rossetto *et al.*, 2012).

Výsledkem experimentu v rámci této diplomové práce bylo zjištění existence negativní korelace mezi obsahem fosforylovaného histonu gammaH2AX a imobilních spermií. Zjištění je v souladu s publikovaným pozorováním, kdy je tato histonová modifikace nezbytná pro správný průběh spermatogeneze, kondenzaci

pohlavních chromozomů a inaktivaci transkripce během spermatogeneze (Fernandez-Capitello *et al.*, 2003). Zároveň však bylo prokázáno, že fosforylace H2AX může být vyvolána oxidativním stresem, který je typický zvýšenou přítomností SSBs (single-strand breaks) a DSBs. Klinické studie také prokázaly, že zvýšený výskyt ROS (reactive oxygen species), odpovědných za oxidativní stres a indukující výskyt DNA fragmentace, se vyskytuje ve vyšší míře u mužů trpících infertilitou. GammaH2AX by tak mohl být využíván jako negativní marker oplození schopnosti spermií (Zhongxiang *et al.*, 2006). K podobnému výsledku došel i Derijck *et al.* (2006) ve své studii zabývající se myšími spermii. Přestože naše výsledky poukazují na negativní korelaci gammaH2AX s imobilitou spermií, je třeba zmínit slabou korelaci těchto dvou znaků ($R = -0,2$). Mimoto, imobilita spermií je jen jedním z mnoha sledovatelných znaků ejakulátu, které vcelku nespolehlivě vypovídají o oplození schopnosti spermií (Erenpreiss, *et al.*, 2008).

V rámci řešení této diplomové práce byla analyzována souvislost mezi životaschopností spermií (intenzita fluorescence MitoTrackeru, která je dána hodnotou membránového potenciálu mitochondrií - MMP), a motilitou spermií člověka. Mezi těmito veličinami byla prokázána přímá závislost ($R = 0,618$). Toto zjištění je v souladu s pozorováním mitochondrií v lidských spermii (Amaral *et al.*, 2013), kdy byla ve shodě s naší studií prokázána souvislost hodnoty MMP s motilitou spermií. Stejných výsledků bylo dosaženo u pacientů ve studii Paoli *et al.* (2011), kteří prokázali závislost motility spermií člověka na funkční integritě mitochondrií. Dle jejich výsledků, motilita která je nezbytná pro úspěšnou reprodukci, závisí na adekvátní produkci metabolické energie aerobní a anaerobní cestou. Mitochondrie jsou také podstatné pro oplodnění, kdy je jejich nezbytnost během fertilizačního procesu zřejmá (Sousa *et al.*, 2011), přestože ihned po penetraci spermie do oocyty dochází k efektivní destrukci mitochondrií spermií (Sutovsky *et al.*, 1999). Tyto výsledky jsou ve shodě i s dalšími studiemi zaměřenými na analýzu závislosti motility spermií na hodnotě MMP (Condorelli *et al.*, 2012; Marchetti *et al.*, 2004; Wang *et al.*, 2012). Hodnota MMP by tedy mohla být využita jako marker motility spermií při jejich selekci v rámci ART.

Z dosavadních výsledků práce vyplývá, že pro zefektivnění ART je nezbytné přistoupit k selekci spermií na základě více kritérií, než je tomu doposud. Analýza

post-translačních modifikací, jakožto nositelů epigenetické dědičnosti, by mohla být klíčem k úspěšné selekci progresivně se pohybujících, vitálních a oplození schopných spermií.

7 Závěr

Histonový kód představuje souhrn post-translačních modifikací histonů. Cílem práce bylo potvrdit hypotézu, že post-translační modifikace histonů ve spermiích savců ovlivňují fyziologické funkce spermií, vyjádřené jejich životaschopností (intenzita fluorescence MitoTrackeru) a motilitou. Předložená diplomová práce tuto hypotézu potvrdila.

Z výsledků práce vyplynulo, že intenzita fluorescence MitoTrackeru, která je ukazatelem na hodnoty mitochondriálního membránového potenciálu, je přímo závislá na motilitě spermií. Vzorky s nejvyšším zastoupením progresivně se pohybujících spermií zároveň vyjadřují jedny z nejvyšších hodnot intenzity fluorescence MitoTrackeru. Dále byla prokázána negativní korelace mezi intenzitou signálu histonu gammaH2AX a procentuálním zastoupením imobilních spermií. Negativní korelace byla také zjištěna mezi intenzitou signálu histonu H3K4me2 a procentuálním zastoupením progresivně se pohybujících spermií. H3K4me2 byl tak stanoven negativním markerem motility spermií.

V současné době je diagnóza mužské infertility založená na mikroskopickém vyšetření a analýzách koncentrace spermií, jejich motility a morfologie. Tradiční analýzy avšak přinášejí pouze limitované množství informací. Je nezbytné vyvinout a zařadit do běžné praxe testy, které budou analyzovat funkčnost spermií, včetně integrity DNA. Analýza post-translačních modifikací histonů, jakožto nositelů epigenetické dědičnosti, by se proto mohla stát jednou z rutinních vyšetření ejakulátu pro získání oplození schopných spermií.

8 Seznam literatury

Aitken, R. J. Koppers, A. J. 2011. Apoptosis and DNA damage in human spermatozoa. *Asian Journal of Andrology*.

Allfrey, V. G. Faulkner, R. Mirsky, A. E. 1964. Acetylation and methylation of histones and their possible role in the regulation of RNA synthesis. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 51 (5).786-794.

Amaral, A. Castillo, J. Estanyol, J. M. Ballesca, J. L. Ramalho-Santos, J. Oliva, R. 2013. Human sperm tail proteome suggests new endogenous metabolic pathways. *Mol Cell Proteomics*. 12. 330-342.

Aoki, V. W. Motkovtsev, S. I. Willis, J. Liu, L. Mullen, J. B. M. Carrel, D. T. 2005. DNA integrity is compromised in protamine-deficient human sperm. *Journal of Andrology*. 26 (6).741-748.

Arpanahi, A. M. Brinkworth, D. Iles, S.A. Krawetz, A. Paradowska, A.E. Platts, M. Saida, K. Steger, P. Tedder, D. Miller, D. 2009. Endonuclease-sensitive regions of human spermatozoal chromatin are highly enriched in promoter and CTCF binding sequences. *Genome Research*. 19. 1338-1349.

Baker, M. A. Weinbeir, A. Hetherington, L. Villaverde, A. I. Velkov, T. Baell, J. Gordon, C. P. 2015. Defining the mechanisms by which the reactive oxygen species by-product, 4-hydroxynonenal, affects human sperm cell function. *Biol Reprod*. 92 (4).108-114.

Balhorn, R. 1982. A model for the structure of chromatin in mammalian sperm. *J Cell Biol*. 93. 298–305.

Balhorn, R. 2007. The protamine family of sperm nuclear proteins. *Genome Biology*. 8. 227.

Balhorn, R. Brewer, L. Corzett, M. 2000. DNA condensation by protamine and arginine-rich peptides: analysis of toroid stability using single DNA molecules. *Mol Reprod Dev.* 56. 230–234.

Barlow, D. P. Bartolome, M. S. 2014. Genomic imprinting in mammals. *Cold Spring Harb Perspect Biol.* 6 (2).

Barroso, G. Morshedi, M. Oehninger, S. 2000. Analysis of DNA fragmentation, plasma membrane translocation of phosphatidylserine and oxidative stress in human spermatozoa. *Hum Reprod.* 15. 1338-1344.

Barski, A. Cuddapah, S. Cui, K. Roh, T.Y. Schones, D.E. Wang, Z. Wei, G. Chepelev, I. and Zhao, K. (2007). High-resolution profiling of histone methylations in the human genome. *Cell.* 129. 823-837.

Bártová, E. Pacherník, J. Harnicarová, A. Kovarik, A. Kovariková, M. Hofmanová, J. Skalníková, M. Kozubek, M. Kozubek, S. 2005. Nuclear levels and patterns of histone H3 modifications and H1 proteins after inhibition of histone deacetylases. *J Cell Sci.* 118 (21). 5035-5046.

Berezikov, E. van Tetering, G. Verheul, M. van de Belt, J. van Laake, L. et al. 2006. Many novel mammalian microRNA candidate identified by extensive cloning and RAKE analysis. *Genome Res.* 16 (10).1289-1298.

Bernsterin, B. E. Kamal, M. Lindblad-Toh, K. Bekirnov, S. Bailey, D. K. Huebert, D. J. McMahon, S. Karlsson, E. K. Kulbokas, E. J. 3rd. Gingeras, T. R. Schreiber, S. L. Lander, E. S. 2005. Genomic maps and comparative analysis of histone modifications in human and mouse. *Cell.* 120 (2).169-181.

Biswas, M. Voltz, K. Smith, J. C. Langowski, J. 2011. Role of histone tails in structural stability of the nucleosome. *Nucleic Acids Res.* 39 (12).

Borchert, G. M. Lanier, W. Davidson, B. L. 2006. RNA polymerase III transcribes human microRNAs. *Nat Struct Mol Biol.* 13 (12).1097-1101.

Boyd, S. D. 2008. Everything you wanted to know about small RNA but were afraid to ask. *Lab Invest.* 88 (6).569-578.

Brown, P. W. Hwang, K. Schlegel, P. N. Morris, P. L. 2008. Small ubiquitin-related modifier (SUMO)-1, SUMO-2/3 and SUMOylation are involved with centromeric heterochromatin of chromosomes 9 and 1 and proteins of the synaptonemal complex during meiosis in men. *Hum Reprod.* 23. 2850-2857.

Brunner, A. M. Nanni, P. Mansuy, I. M. 2014. Epigenetic marking of sperm by post-translational modification of histones and protamines. *Epigenetics and Chromatin.* 7:2.

Brykczynska, U. Hisano, M. Erkek, S. Ramos, L. Oakeley, E. J. Roloff, T. C. Beisel, C. Schubeler, D. Stadler, M. B. Peters, A. H. 2010. Repressive and active histone methylation mark distinct promoters in human and mouse spermatozoa. *Nature Structural and Molecular Biology.* 17. 679–687.

Bungum, M. Humaidan, P., Axmon, A. Spano, M. Bungum, L. Erenpreiss, J. Giwercman, A. 2007. Sperm DNA integrity assessment in prediction of assisted reproduction technology outcome. *Hum Reprod.* 22 (1).174-179.

Cambi, M. Marchiani, S. Tamburrino, L. Olivito, B. Azzari, C. Forti, G. Muratori, M. Baldi, E. 2013. Development of a specific method to evaluate 8-hydroxy, 2-deoxyguanosine in sperm nuclei: relationship with semen quality in a cohort of 94 subjects. *Reprod.* 145(3). 227-235.

Carrell, D. T. Aoki, V. W. 2007. The genetics of abnormal protamine expression. *The Genetics of Male Infertility.* 11. 291-301.

Carrell, D. T. Emery, B. R. Hammoud, S. 2007. Altered protamine expression and diminished spermatogenesis: what is the link?. *Hum Reprod Update.* 13 (3).313-327.

- Carrell, D. T. Liu, L. 2001. Altered protamine 2 expression is uncommon in donors of known fertility, but common among men with poor fertilizing capacity, and may reflect other abnormalities of spermiogenesis. *J Androl.* 22. 604–610.
- Cebesoy, F. B. Aydos, K. Unlu, C. 2006. Effect of sperm chromatin damage on fertilization ratio and embryo quality post-ICSI. *Arch Androl.* 52 (5).397-402.
- Chen, T. Li, E. 2004. Structure and function of eukaryotic DNA methyltransferases. *Curr Top Dev Biol.* 60.55-89.
- Cheung, P. Allis, C. D. Sassone-Corsi, P. 2000. Signaling to chromatin through histone modifications. *Cell.* 103 (2).263-271.
- Claverie, J. M. 2005. Fewer genes, more noncoding RNA. *Science.* 309. 1529–1530.
- Condorelli, R. A. La Vignera, S. Bellanca, S. Vicari, E. Calogero, A. E. 2012. Myoinositol: does it improve sperm mitochondrial function and sperm motility? *Urology.* 79 (6). 1290-1295.
- Corzett, M. Mazrimas, J. Balhorn, R. 2002. Protamine 1: protamine 2 stoichiometry in the sperm of eutherian mammals. *Mol Reprod Dev.* 61. 519–527.
- Cosgrove, M. S. Boeke, J. D. Wolberger, C. 2004. Regulated nucleosome mobility and the histone code. *Nat Struct Mol Biol.* 11 (1).1037-1043.
- Cosgrove, M. S. Wolberger, C. 2005. How does the histone code work? *Biochem Cell Biol.* 83 (4).468-476.
- Cummins, J.M., Jequier, A.M., Martin, R. Mehmet, D. Goldblatt, J. 1998. Semen levels of mitochondrial DNA deletions in men attending an infertility clinic do not correlate with phenotype. *Int J Androl.* 21.47–52.

- Da Silva, N. Barton C. 2016. Macrophages and dendritic cells in the post-testicular environment. *Cell Tissue Res.* 363. 97-104.
- Dadoune, J. P. 2003. Expression of mammalian spermatozoal nucleoproteins. *Microsc Res Tech.* 61 (1).56-75.
- Davey, C. A. Sargent, D. F. Luger, K. Maeder A. W. Richmond, T. J. 2002. Solvent mediated interactions in the structure of the nucleosome core particle at 1.9 a resolution. *J Mol Biol.* 319 (5).1097-1113.
- de Yebra, L. Balleca, J. L. Vanrell, J. A. Bassas, L. Oliva, R. 1993. Complete selective absence of protamine p2 in humans. *J Biol Chem.* 268.10553–10557.
- Deerijck, A. H. A. van der Heijden, G. W. Giele, M. Philippens, M. E. P. van Bavel, C. A. W. de Boer, P. 2006. gammaH2AX signalling during sperm chromatin remodelling in the mouse zygote. *Science Direct.* 5. 959-971.
- Devor, E. J. 2006. Primate MicroRNAs miR-220 and miR-492 Lie within Processed Pseudogenes. *J Hered.* 97 (2).186-190.
- Du, T. Zamore, P. D. 2005. microPrimes: the biogenesis and function of microRNA. *Development.* 132 (21). 4645-4652.
- Emery, B. R. Carrell, D. T. 2006. The effect of epigenetic sperm abnormalities on early embryogenesis. *Asian J Androl.* 8 (2).131-142.
- Erenpreiss, J. Bungum, M. Spano, M. Elzanaty, S. Orbidans, J. Giwercman, A. 2006. Intra-individual variation in sperm chromatin structure Assay parameters in men from infertile couples: clinical implications. *Hum Reprod.* 21. 2061-2064.
- Erenpreiss, J. Elzanaty, S. Giwercman, A. 2008. Sperm DNA damage in men from infertile couples. *Asian J Androl.* 10(5).

Evgeni, E. Charalabopoulos, K. Asimakopoulos, B. 2014. Human sperm DNA fragmentation and its correlation with conventional semen parameters. *J Reprod Infertil*. 5 (1). 2-14.

Fernandez, J. L. Miruiel, L. Rivero, M. T. Goyanes, V. Vasquez, R. Alvarez, J. G. 2003. The sperm chromatin dispersion test: a simple method for the determination of sperm DNA fragmentation. *J Androl*. 24(1). 59-66.

Fernandez-Capitello, O. Nussenzweig, C. A. Nussenzweig, A. 2003. Focusing on loci: H2AX and the recruitment of DNA damage response factors. *Cell Cycle*. 2. 426-427.

Fischle, W. Wand, Y. Allis, C. D. 2003. Histones and chromatin cross-talk. *Curr Opin Cell Biol*. 15. 172-183.

Flanagan, J.F. Mi, L.Z. Chruszcz, M. Cymborowski, M. Clines, K.L. Kim, Y. Minor, W., Rastinejad, F. Khorasanizadeh, S. (2005). Double chromodomains cooperate to recognize the methylated histone H3 tail. *Nature*. 438. 1181-1185.

Foster, E. R. Downs, J. A. 2005. Histone H2A phosphorylation in DNA double-strand break repair. *FEBS*. 272. 3231-3240.

Fraile, B. Martin, R. De Miguel, M. P. Arenas, M.I. Bethencourt, F. R. Peinado, F. Paniagua, R. Santamaria, L. 1996. Light and electron microscopic immunohistochemical localization of protein gene product 9.5 and ubiquitin immunoreactivities in the human epididymis and vas deferens. *Biol Reprod*. 55. 291-297.

Francis, S. Yelimalai, S. Jones C. Coward, K. 2014. Aberrant protamine content in sperm and consequential implications for infertility treatment. *Hum Fertil (Camr)*. 17 (2). 80-89.

Garcia-Peiró, A. Oliver-Bonet, M. Navarro, J. Abad, C. Guitart, M. Amengual, M. J. et al. 2011. Dynamics of sperm DNA fragmentation in patients carrying structurally rearranged chromosomes. *Int J Androl.* 34. 546–553.

Gatewood, J. M. Cook, G. R. Balhorn, R. Bradbury, E. M. Schmid, C. W. 1987 Sequence-specific packaging of DNA in human sperm chromatin. *Science.* 236. 962–964.

Gaucher, J. Reynoird, N. Montellier, E. Boussouar, F. Rousseaux, S. Khochbin, S. 2010. From meiosis to postmeiotic events: the secret of histone disappearance. *FEBS J.* 277(3). 599-604.

Girard, A. Sachidanandam, R. Hannon, G. J. Carmell, M. A. 2006. A Germáne-specific class of small RNAs binds mammalian Piwi proteins. *Nature.*442 (7099).199-202.

Glaser, S. Lubitz, S. Loveland, K. L. Ohbo, K, Robb, L. Schwenk, F. Seibler, J. Roelling, D. Kranz, A. Anastassiadis, K. Stewart, A. F. 2009. The histone 3 lysine 4 methyltransferase, MII2, is only required briefly in development and spermatogenesis. *Epigenetics Chromatin.* 2 (1).

Glickman, M. H. Ciechanover, A. 2002. The ubiquitin-proteasome pathway: destruction for the sake of construction. *Physiol Rev.* 82(2). 373-428.

Godmann, M. Auger, V. Ferraroni-Aguiar, V. Di Sauro, A. Sette, C. Behr, R. Kimmins, S. 2007. Dynamic regulation of histone H3 methylation at lysine 4 in mammalian spermatogenesis. *Biology of Reproduction.* 77.

González-Marín, C. Gosálvez, J. Roy, R. 2012. Types, Causes, Detection and Repair of DNA Fragmentation in Animal and Human Sperm Cells. *International Journal of Molecular Sciences.*13 (12).14026-14052.

Govin, J. Caron, C. Lestrat, C. Rousseaux, S. Khochbin, S. 2004. The role of histones in chromatin remodelling during mammalian spermiogenesis. *The Febs Journal*. 271 (17). 3459-3469.

Govin, J. Dorsey, J. Gaucher, J. Rousseaux, S. Knochbin, S. Berger, S. L. 2010. Systematic green reverses new functional dynamics of histones H3 and H4 during gametogenesis. *Genes Dev*. 24 (16). 1772-1786.

Govin, J. Escoffier, E. Rousseaux, S. Kuhn, L. Ferro, M. Thévenon, J. Catena, R. Davidson, I. Garin, J. Khochbin, S. et al. 2007. Pericentric heterochromatin reprogramming by new histone variants during mouse spermiogenesis. *Journal of Cell Biology*. 176. 283–294.

Greer, E. L. Beese-Sims, S. E. Brookes, E. Spadafora, R. Zhu, Y. Rothbart, S. B. Aristizabal-Corrales, D. Chen, S. Badeaux, A. I. jin, Q. Wang, W. Strahl, B. D. Colaiacovo, M. P. Shi, Y. 2014. A histone methylation network regulates transgenerational epigenetic memory in *C. elegans*. *Cell Rep*. 7 (1). 113-126.

Grimes, S. Henderson, N. 1984. Hyperacetylation of histone H4 in rat testis spermatids. *Experimental Cell Research*. 152.

Hake, S. B. Garcia, B. A. Duncan, E. M. Kauer, M. Dellaire, G. Shabanowitz, J. Bazzett-Jones, D. P. Allis, C. D. Hunt, D. F. 2006. Expression patterns and post-translational modifications associated with mammalian histone H3 variants. *The Journal of Biol Chem*. 281. 559-568.

Hammoud, S. S. Nix, D. A. Zhang, H. Purwar, J. Carrel, D. T. Cairns, B. R. 2009. Distinctive chromatin in human sperm packages genes for embryo development. *Nature*. 460. 473-478.

Hammoud, S. S. Nix, A. D. Hammoud, A. O. Gibson, M. Cairns, B. R. Carrell, D. T. 2011. Genome-wide analysis identifies changes in histone retention and epigenetic modifications at developmental and imprinted gene loci in the sperm of infertile men. *Hum Reprod*. 26 (9). 2558-2569.

Hou, J. Yang, X. Han, Z. Wang, Y. Hao, C. Wei, L. Shi, Y. 2013. One cell, multiples roles: contribution of mesenchymal stem cells to tumor development in tumor microenvironment. *Cell Biosci.*3 (1).

Houbaviy, H. B. Murray, M. F. Sharp, P. A. 2003. Embryonic stem cell-specific MicroRNAs. *Dev Cell.* 5 (2).351-358.

Hung, T. Wang, Y. Lin, M. F. Koegel A. K. Kotake, Y. et al. 2011. Extensive and coordinated transcription of noncoding RNAs within cell-cycle promoters. *Nat Genet.* 43 (7).621-629.

Iwasaki, Y. W. Siomi, M. C. Siomi, H. 2015. PIWI-Interacting RNA: Its biogenesis and functions. *Annu Rev Biochem.* 84. 405-433.

Jenuwein, T. Allis, C. D. 2001. Translating the histone code. *Science.*293 (5532).1074-1080.

Johnson, E. S. 2004. Protein modification by SUMO. *Annu Rev Biochem.* 73. 355-382.

Jones, K. T. Aitken, R. J. Robertson. S. A. 2012. Reactive oxygen species and sperm function in sickness and in health. *J Androl.*33 (6).1096-1106.

Junqueira, L. C. Carneiro, J. Kelley, R. O. 1997. *Základy histologie.* H & H. Jinočany. 502 s. ISBN: 80-85787-37-7.

Keniry, A. Oxley, D. Monnier, P. Kyba, M. Dandolo, L. Smits, G. Reik, W. 2012. The H19 lincRNA is a developmental reservoir of miR-675 that suppresses growth and Igf1r. *Nature Cell Biology.* 14. 659-665.

Kim, S. Kim, D. Cho, S. W. Kim, J. Kim, J. S. 2014. Highly efficient RNA-guided genome editing in human cells via delivery of purified Cas9 ribonucleoproteins. *Genome Res.* 24 (6).1012-1019.

Kitabayashi, I. Aikawa, Y. Nguyen, L. A. Yokoyama, A. Ohki, M. 2001. Activation of AML-1 mediated transcription by MOZ and inhibition by the MOZ-CBP fusion protein. *20* (24). 7184-7196.

Kleene, K. C. 2003. Patterns, mechanism and functions of translation regulation in mammalian spermatogenic cells. *Cytogenic and Genome research*. 103. 217-224.

Konrádová, V. Uhlík, J. Vajner, L. 2000. *Funkční histologie*. Jinočany. HH. 291 s. ISBN: 80-86022-80-3.

Kouzarides, T. 2002. Histone methylation in transcriptional control. *Curr Opin Genet Dev*. 12 (2).198-209.

Kowalski, A. Palyga, J. 2012. Linker histone subtypes and their allelic variants. *Cell Biol*. 36. 981-996.

La Salle, S. Oakes, C. C. Neaga, O. R. Burchis, D. Bestor, T. H. Trasler, J. M. 2007. Loss of spermatogonia and wide-spread DNA methylation defects in newborn male mice deficient in DNMT3M. *BMC Dev Biol*. 7.

Landgraf, P. Rusu, M. Sheridan, R, Sewer, A. et al. 2007. A mammalian microRNA expressions atlas based on small RNA library sequencing. *Cell*.129 (7).1401-1414.

Lee, R. C. Feinbam, R. L. Ambros, V. 1993. The *C. elegans* heterochronic gene *lin-4* encodes small RNAs with antisense complementarity to *lin-14*. *Cell*. 75 (5) 843-854.

Lippert, T. Seeger, H. Schieferstein, G. et al. 1993. Immunoreactive ubiquitin in human seminal plasma. *J Androl*. 14. 130-131.

Manicardi, G. C. Bianchi, P. G. Pantano, S. Azzoni, P. Bizzaro, D. Bianchi, U. Sakkas, D. 1995. Presence of endogenous nicks in DNA of ejaculated human spermatozoa and its relationship to chromomycin a3 accessibility. *Biol Reprod*. 52. 864-867.

- Marchetti, C. Obert, G. Deffosez, A. Formstecher, P. Marchetti, P. 2002. Study of mitochondrial membrane potential, reactive oxygen species, DNA fragmentation and cell viability by flow cytometry in human sperm. *Hum Reprod.* 17. 1257-1265.
- Marchiani, S. Tamburrino, L. Montoya, M. Marino, F. E. Natali, I. Cambi, M. Forti, G. Baldi, E. Muratori, M. 2011. Mechanisms and clinical correlates of sperm DNA damage. *Asian J Androl.* 14(1).24-31.
- Marchiani, S. Tamburrino, L. Ricci, B. Nosi, D. Cambi, M. Piomboni, P, Forti, G. Muratori, M. Baldi, E. 2014. SUMO1 in human sperm: new targets, role in motility and morphology and relationship with DNA damage. *Reprod.* 148(5). 453-467.
- Marion, L. Boissonneault, G. 2004. Transient DNA strand breaks during mouse and human spermiogenesis: new insights in stage specificity and link to chromatin remodeling. *Biol. Reprod.* 70. 910-918.
- Mattick, J. S. Makunin, I. V. 2006. Non-coding RNA. *Hum Mol Genet.* 15 (1). 17-29.
- Mattick, J. S. Makunin, I. V. 2005. Small regulatory RNAs in mammals. *Hum Mol Genet.* 14 (1). 121-132.
- McGhee, J. D. Felsenfeld, G. 1980. Nucleosome structure. *Annu Rev Biochem.* 49.1115-1156.
- Meistrich, M.L. Mohapatra, B. Shirley, C. R. Zhao, M. 2003. Roles of transition nuclear proteins in spermiogenesis. *Chromosoma.* 111 (8). 483-488.
- Mercer, T. R. Dinger, M. E. Mattick, J. S. 2009. Long non-coding RNAs: insights into functions. *Nat Rev Genet.* 10(3). 155-159.
- Miao, F. Natarajan, R. 2005. Mapping global histone methylation patterns in the coding regions of human genes. *Mol Cell Biol.* 25. 4650-4661.

Morin, V. Acuna, P. Díaz, F. Inostroza, D. Martinez, J. et al. 1999. Phosphorylation protects sperm-specific histones H1 and H2B from proteolysis after fertilization. *J Cell Biochem.* 76.173-180.

Mulugeta Achame, E. Wassenaar, E. Hoogerbrugge, J.W. Sleddens-Linkles, E. Ooms, M. Sun, Z. W. van IJcken, W. F. Grootegoued, J. A. Baarends, W. M. 2010. The ubiquitin-conjugating enzyme HR6B is required for maintenance of X chromosome silencing in mouse spermatocytes and spermatids. *BMC Genomics.* 11. 367.

Murchison, E.P. Stein, P. Xuan, Z. Pan, H. Zhang, M. Q. Schultz, R. M. Hannon, G. J. 2007. Critical roles for Dicer in the female Germline. *Genes Dev.* 21(6). 682-693

Okano, M.A. Bell, D. W. Haber, D. A. Li. E. 1999. DNA methyltransferases Dnmt3a and Dnmt3b are essential for de novo methylation and mammalian development. *Cell.* 99(3). 247-257.

Oliva, R. Castillo, J. 2011. Proteomics and the genetics of sperm chromatin condensation. *Asian J Androl.* 13 (1). 24-30.

Oliva, R. Castillo, J. Simon, L. Lewis, S. E. 2011. Relationship between human sperm protamines, DNA damage and assisted reproduction outcomes. *Reprod Biomed Online.* 23(6). 724-734.

Owen, D. H. Katz, D. F. 2005. A review of the physical and chemical properties of human semen and the formulation of a semen simulant. *Journal of Andrology.* 26(4).

Pacey, A. A. 2010. Environmental and lifestyle factors associated with sperm DNA damage. *Hum Fertil Camb.* 13(4). 189-193.

Paoli, D. Gallo, M. Rizzo, F. Baldi, E. Francavilla, S. Lenzi, A. Lombardo, F. Grandini, L. 2011. Mitochondrial membrane potential profile and its correlation with increasing sperm motility. 2011. *Fertil Steril.* 2315-2319.

- Papoutsopoulou, S. et al.1999. SRPK1 and LBR protein kinases show identical substrate specificities. *Biochem Res Commun.* 255(3). 602-607.
- Peaston, A. E. Evsikov, A. V. Graber, J. H. de Vries, W. N. Holbrook, A. E. Solter, D. Knowles, B. B. 2004. Retrotransposons regulate host genes in mouse oocytes and preimplantation embryos. *Dev Cell.* 7(4). 597-606.
- Pivot-Pajot, C. Caron, C. Govin, J. Vion, A. Rousseaux, S. Khochbin, S. 2003. Acetylation-dependent chromatin reorganization by BRDT, a testis - specific bromodomain-containing protein. *Mol Cell Biol.* 23(15). 5354-5365.
- Polo, S. E. Jackson, S.P. 2011. Dynamics of DNA damage response proteins at DNA breaks: a focus on protein modifications. *Genes Dev.* 25(6). 409-433.
- Rather, C. Baarends, W. M. Awe, S. Renkawitz-Pohl, R. 2014. Chromatin dynamics during spermiogenesis. *Biochem Biophys Acta.* 1839. 155-168.
- Redon, C. Pitch, D. Rogakou, E. Sedelnikova, O. Newrock, K. Bonner, W.B. 2002. Histone H2A variants H2AX and H2AZ. *Curr Opin Genet Dev.* 12. 162-169.
- Rogakou, E. P. Pilch, D. R. Orr, A. H. Ivanova, B. S. Bonner, W. M. 1998. DNA DSBs induce histone H2AX phosphorylation on serine 139. *J Biol Chem.* 273. 5858-5868.
- Rossetto, D. Awakumov, N. Cote, J. 2012. Histone phosphorylation: a chromatin modification involved in diverse nuclear events. *Epigenetics.* 7(10). 1098-1108.
- Rothhammer, T. Bosserhoff, S. K. 2007. Epigenetic events in malignant melanoma. *Pigment Cell Res.* 20(2). 92-111.
- Rothkamm, K. Lobrich, M. 2003. Evidence for a lack of DNA double-strand break repair in human cells exposed to very low x-ray doses. *Proc Natl Acad Sci USA.* 100. 5057-5062.

- Rousseaux, S. Caron, C. Govin, J. Lestrat, C. Faure, A. K. Khochbin, S. 2005. Establishment of male-specific epigenetic information. *Gene*. 345. 139-153.
- Sakkas, D. Manicardi, G. C. Bizzaro, D. 2003. Sperm nuclear DNA damage in the human. *Adv Exp Med Biol*. 518. 73-84.
- Samanta, L. Swain, N. Ayaz, A. Venagupol, V. Agarwal, A. 2015. Post-translational modifications in sperm proteome: the chemistry of proteome diversifications in the pathophysiology of male factor infertility. *BBA-general subjects*.
- Santos-Rosa, H. Schneider, R. Bannister, A. J. Sherriff, J. Bernstein, B. E. Emre, N. C. Scheiber, S. L. Mellor, J. Kouzarides, T. 2002. Active genes are tri-methylated at K4 of histone H3. *Nature*. 419. 407-411.
- Sethupathy, P. Furry, T. S. 2013. Genetics driving epigenetics. *Science*. 342. 705-706.
- Shang, E. Wang, X. Wen, D. Wang, X. 2007. The first bromodomain of BRDT, a testis-specific member of the Bet sub-family of doublebromodomain-containing proteins, is essential for male germ cell differentiation. *Dev Cam*. 134. 3507-3515.
- Shogren-Knaak, M. Ishii, H. Sun, J. M. Pazin, M. J. Davie, J.R. Peterson, C.L. 2006. Histone H4K16 acetylation controls chromatin structure and protein interactions. *Science*. 311. 844-847.
- Sims, R. J. 3rd. Nishioka, K. Reinberg, D. 2003. Histone lysine methylation : a signature for chromatin function. *Trends Genet*. 19(11). 629-639.
- Sin, H-S. Barski, A. Zhang, F. et al. 2012. RNF8 regulates active epigenetic modifications and escape gene activation from inactive sex chromosomes in post-meiotic spermatids. *Division of Reproductive Sciences*. 27(1). 116.
- Smalheiser, N. R. Torvik, V. I. 2005. Mammalian microRNAs derived from genomic repeats. *Trends Genet*. 21. 322-326.

- Smith, R. Kaune, H. Parodi, D. Madariaga, M. Morales, I. Rios, R. Castro, A. 2007. Extent of sperm DNA damage in spermatozoa from men examined for fertility. Relationship with oxidative stress. *Revista Medica DE Chile*. 135(2). 279-286.
- Song, Q. Molaro, A. Hodges, E. Fang, F. McCombie, W. R. Hannon, G. J. Smith, A. D. 2011. Sperm methylation profiles reveal features of epigenetic inheritance and evolution in primates. *Cell*. 146(6). 1029-1041.
- Sonnack, V. Falling, K. Bergmann, M. Steger, K. 2002. Expression of hyperacetylated histone H4 during normal and impaired human spermatogenesis. *Andrologia*. 34(6). 384-390.
- Sousa, A. P. Amaral, A. Baptista., M. Tavares, R. Caballero, C. P. Caballero, P. P. Freitas, A. Paiva, A. Almeida-Santos, T. Ramalho-Santos, J. 2011. Not all sperm are equal: functional mitochondria characterize a subpopulation of human sperm with better fertilization potential. *Plos One*. 6.
- Souza, C. A. E. Rego, J. P. Noquiera, F. C. Oliveira, J. T. A. Domont, G. B. Santos, D. O. Moura, A. A. 2010. Identification of the major proteins of ram seminal plasma using a proteomic approach. *Andrology*. 63.
- Steger, D.J. Workman, J. L. 1999. Transcriptional analysis of purified histone acetyltransferase complexes. *Methods*. 19(3). 410-416.
- Štiavnická, M. Álvarez, O. G. Nevoral, J. Králíčková, M. Sutovsky, P. 2016. Key features of genomic imprinting during mammalian spermatogenesis: Perspectives for human assisted reproductive therapy: a review. *Anat Physiol*. 236 (6).
- Struhl, K. 2007. Transcriptional noise and the fidelity of initiation by RNA polymerase II. *Nat Struct Mol Biol*. 14(2). 103-105.

Stuppia, L. Franzago, M. Ballerini, P. Gatta, V. Antonucci, I. 2015. Epigenetics and male reproduction: the consequences of paternal lifestyle on fertility, embryo development, and children lifetime health. *Clinical Epigenetics*. 7:120.

Sutovsky, P. Moreno, R. D. Ramalho-Santos, J. Dominko, T. Simerly, C. Schatten, G. 1999. Ubiquitin tag for sperm mitochondria. *Nature*. 402 (6760). 371-372.

Sutovsky, P. Hauser, R. Sutovsky, M. 2004. Increased levels of sperm ubiquitin correlate with semen quality in men from an andrology laboratory clinic population. *Hum Reprod*. 19. 628-638.

Sutovsky, P. Neuber, E. Schatten, G. 2002. Ubiquitin-dependent sperm quality control mechanism recognizes spermatozoa with DANN defects as revealed by dual ubiquitin-TUNEL assay. *Mol Reprod Dev*. 61(3). 406-413.

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. *Mol Cell*. 19(3). 381-391.

van der Heiden, G. W. Dieker, J. W. Derijck, A. A. 2005. Asymmetry in histone H3 variants and lysine methylation between paternal and maternal chromatin of the early mouse zygote. *Mech Dev*. 122.1008-1022.

Vavouri, T. Lehner, B. 2011. Chromatin organization in sperm may be the major functional consequence of base composition variation in the human genome. *PLoS Genet*. 7(4).

Vigodner, M. Ishikawa, T. Schlegel, P. N. Morris, P. L. 2006. SUMO-1, human male germ cell development, and the androgen receptor in the testis of men with normal and abnormal spermatogenesis. *Am J Physiol Endocrinol Metab*. 290(5). 1022-1033.

Vigodner, M. Schristava. V. Gutstein, L. E. Schneider, J. Nieves, E. Goldstein, M. Fliciano, M. Callaway, M. 2013. Localization and identification of sumoylated proteins

in human sperm: excessive sumoylation is a marker of defective spermatozoa. *Hum Reprod.* 28 (1). 210-223.

Vyskot, B. 2010. *EpiGenetika*. Univerzita Palackeho v Olomouci. ISBN: 978-80-244-2534-4.

Wang, M. J. Ou, J. X. Chen, G. W. Wu, J. P. Shi, H. J. O, W. S. Martin-DeLeon, P. A. Chen, H. 2012. Does prohibition expression regulate sperm mitochondrial membrane potential, sperm motility and male fertility? *Antioxid Redox Signal.* 17. 513-519.

Ward, W. S. Partin, A. W. Coffey, D. S. 1989. DNA loop domains in mammalian spermatozoa. *Chromosoma.* 98. 153-159.

White-Cooper, H. Bausek, N. 2010. Evolution and spermatogenesis. *Philosophical Transactions of the Royal Society of London. Biological Sciences.* 365. 1465-1480.

Woodbine, L. Brunton, H. Goodarzi, A. A. Shibata, A. Jeggo, P. A. 2011. Endogenously induced DNA double strand breaks arise in heterochromatic DNA regions and require ataxia telangiectasia mutated and Artemis for their repair. *Nucleic Acids Research.* 39(16).

Wykes, S. M. Krawetz, S. A. 2003. The structural organization of sperm chromatin. *J Biol Chem.* 278(32). 29471-29477.

Zhongxiang, L. Yang, J. Huang, H. 2006. Oxidative stress induces H2AX phosphorylation in human spermatozoa. *FEBS Letters.* 580. 6161-6168.

Zini, A. Sigman, M. 2009. Are tests of sperm DNA damage clinically useful? Pros and cons. *J Androl.* 30(3) 219-229.