

Univerzita Karlova v Praze

Přírodovědecká fakulta

Vývojová a buněčná biologie



Mgr. Aleš Petelák

Vliv ubiquitinace spermií v rámci časného embryonálního vývoje prasete

Effect of sperm ubiquitination in early embryonic development
of porcine embryos

Dizertační práce

Vedoucí práce: doc. RNDr. Ing. Vladimír Krylov, Ph.D.

Praha 2019

Prohlášení:

Prohlašuji, že jsem závěrečnou práci zpracoval samostatně a že jsem řádně citoval a uvedl všechny použité informační zdroje. Současně prohlašuji, že tato práce nebyla použita k získání jiného nebo stejného akademického titulu.

Souhlasím s trvalým uložením elektronické verze mé práce v databázi systému projektu Theses.cz za účelem kontroly podobnosti kvalifikačních prací.

V Praze

Mgr. Aleš Petelák

.....

Poděkování

V první řadě chci velmi poděkovat mému školiteli doc. RNDr. Ing. Vladimíru Krylovovi, Ph.D., protože lepšího školitele jsem si nemohl přát. Děkuji mu za skvělé vedení, vstřícnost, trpělivost, neustálou ochotu pomoci, za mnoho cenných rad a za velkou pomoc při tvorbě publikací i této disertační práce. Dále bych chtěl poděkovat i všem současným a bývalým kolegům z laboratoře vývojové biologie a zvláště Kristýně Kroumanové. Velké díky patří také kolegům z Katedry veterinárních disciplín na ČZÚ a z VÚŽV v Uhříněvsi. Zejména pak děkuji panu prof. Ing. Jaroslavu Petrovi, CSc. a Ing. Janu Nevoralovi, Ph.D. za skvělou spolupráci během celého výzkumu.

Mnohokrát děkuji i celé Přírodovědecké fakultě Univerzity Karlovy a Katedře buněčné a vývojové biologie především za umožnění mého studia, na které budu vždy vzpomínat s radostí.

Rád bych také poděkoval své rodině a přátelům za podporu a pomoc během celého mého studia. Martině bych chtěl poděkovat za trpělivost a spoustu cenných rad nejen k vědecké práci ale do života vůbec.

Abstrakt

Dizertační práce se zabývá vlivem extracelulárního ubiquitinu na úspěšnost časného embryonálního vývoje a dále pak možnostmi, jak zlepšit podmínky pro umělé oplození pomocí inkubace oocytů s regulátory činnosti iontových kanálů.

Pro potřeby tohoto výzkumu byla zavedena zcela nová metodika na třídění spermií pomocí průtokové cytometrie a jejich následnou kryoprezervaci. Byly ustanoveny podmínky pro úspěšné třídění spermií na základě míry extracelulární ubiquitinace, které poskytují vysokou specifitu selekce a zároveň dostatečný počet viabilních spermií pro oplození metodou ICSI. Pro následnou kryoprezervaci poměrně velmi nízkého počtu spermií jsme dokázali optimalizovat již zavedené metody tak, aby bylo možné zamrazovat minimální objem spermiové suspenze i s malým počtem buněk.

Následný experiment prokázal přímou souvislost mezi mírou extracelulární ubiquitinace a schopností spermií vytvořit správně se vyvíjející embryo. Spermie, u kterých bylo detekováno velké množství extracelulárně vázaného ubiquitinu, byly signifikantně méně úspěšné z pohledu následného vývoje embrya do stádia blastocysty po ICSI než ty, které vykazovaly nízkou úroveň povrchové ubiquitinace (6,2 vs. 16,7 %, $P < 0,001$). Míra extracelulární ubiquitinace neměla vliv na úspěšnost rýhování embrya, ale souvisela s ní úspěšnost embryonálního vývoje po reaktivaci embryonálního genomu (vyšší než 4-buněčné stádium).

Hypotetická možnost existence selekčního mechanismu reagujícího na extracelulární ubiquitinaci spermie byla dále podpořena sledováním vlivu maskování ubiquitinu pomocí protilátky. Po inkubaci s protilátkou proti ubiquitinu se signifikantně zlepšila úspěšnost oplození i vývoje do stádia blastocysty.

Inkubací s regulátory iontových kanálů pro K^+ a Ca^{2+} bylo docíleno zpomalení stárnutí u oocytů v MII fázi, tento efekt byl již pozorován při použití gasotransmiterů NO a H_2S . Pomocí specifických regulátorů se podařilo tento protektivní vliv napodobit nebo naopak potlačit. Výsledky tak ukazují pravděpodobný způsob, kterým gasotransmitery na maturované oocyty působí.

Klíčová slova

Prase, spermie, oocyty, ICSI, ubiquitin, iontové kanály, gasotransmitery

Abstract

The PhD thesis is focused on the effect of porcine sperm cell extracellular ubiquitination on early embryonic development up to the blastocyst stage after ICSI. In addition, it also presents a potential improvement of the technique of *in vitro* fertilization using oocyte incubation with ion channels regulators.

To address these aims, we established an entirely novel methodology for sperm cell sorting using flow cytometry and subsequent cryopreservation. We determined the conditions for successful sperm cell sorting based on extracellular ubiquitination rate providing highly specific selection as well as sufficient numbers of viable sperms for fertilization using the ICSI method. Concerning the following cryopreservation, established methods were optimized to enable freezing of a minimal sperm cell suspension volume with low cell numbers.

The performed experiments showed a direct relationship between the rate of extracellular ubiquitination and the capability of sperms to give rise to a properly developing embryo. Highly ubiquitinated sperm cells were less successful regarding the embryonic development to the blastocyst stage if compared with the lowly ubiquitinated group (6,2 % vs. 16,7 %, $P < 0,001$). Interestingly, the rate of extracellular ubiquitination showed no effect on the pronuclear formation and the first cleavages prior to embryonic genome activation.

We hypothesized that there may exist a negative selection mechanism responding to the extracellular sperm ubiquitination. This hypothesis was further supported by the monitoring of the impact of ubiquitin masking using a specific antibody. The success rate of both fertilization and development to the blastocyst stage was significantly improved after the sperm cell incubation with the anti-ubiquitin antibody.

Incubation with K^+ a Ca^{2+} ion channel regulators enabled the suppression of ageing in metaphase II oocytes. This effect was previously observed after the application of NO and H_2S gasotransmitters. Using specific regulators, we were able to inhibit or enhance this protective effect and describe the probable mechanism by which the gasotransmitters function in matured oocytes.

Keywords

Pig, sperms, oocytes, ICSI, ubiquitin, ion channels, gasotransmitters

Obsah

Seznam použitých zkratk	10
1 Úvod	12
2 Přehled problematiky dizertační práce	13
2.1 Ubiquitin-proteazomální systém (UPS)	13
2.1.1 Ubiquitin	13
2.1.2 Vazba Ub na substrát	15
2.1.3 Ubiquitin-proteazomální komplex (UPC)	17
2.1.3.1 20S proteazom	18
2.1.3.2 Regulační podjednotky 26S proteazomu	18
2.1.4 Rozpoznání ubiquitinovaných proteinů proteazomem	19
2.1.5 Ubiquitin-like proteiny (UBL)	20
2.1.6 Deubiquitinační enzymy (DUBs)	21
2.2 Vývoj a selekce spermií	22
2.2.1 Spermatogeneze	22
2.2.2 Maturace spermií	23
2.2.3 Selekcce spermií v nadvarletí	25
2.2.4 Hodnocení kvality spermií a SUTI (sperm ubiquitin tag immunoassay)	26
2.2.5 Kryoprezervace spermií	28
2.2.6 Třídění spermií	32
2.3 Maturace a stárnutí oocytů	35
2.3.1 Oogeneze a ovulace	35
2.3.1.1 Maturace jádra	37
2.3.1.2 Maturace cytoplazmy	38
2.3.2 Stárnutí oocyty (Ageing)	38
2.3.3 Potlačení stárnutí oocytů	41
2.3.4 Gasotransmitery	43

2.4	Oplození	46
2.4.1	Kapacitace spermií.....	46
2.4.2	Kumulární buňky	48
2.4.3	Akrozomální reakce (AR)	48
2.4.4	Penetrace <i>zony pellucidy</i>	49
2.4.5	Ubiquitinace ZP a vliv UPS.....	49
2.4.6	Fúze gamet.....	50
2.4.7	Aktivace oocyту	52
2.4.8	Degradace paternálních mitochondrií	52
3	Cíle a hypotéza dizertační práce.....	54
4	Materiál a přístroje.....	55
4.1	Chemikálie.....	55
4.2	Složení médií	57
4.3	Přístroje a vybavení	58
5	Metody	59
5.1	Izolace oocytů	59
5.2	Maturace oocytů.....	60
5.3	Odstranění kumulárních buněk	60
5.4	Kultivace stárnoucích maturovaných oocytů	60
5.5	Vyhodnocení stárnutí oocytů.....	60
5.6	Příprava čerstvých spermií	61
5.7	Zamrazení spermií	61
5.8	Rozmražení spermií před ICSI	62
5.9	Příprava spermií pro pokus s maskováním extracelulárního Ub	62
5.9.1	Centrifugace na gradientu Percollu	62
5.9.2	Inkubace s primární protilátkou	62
5.9.3	Kapacitace spermií.....	63

5.9.4	Inkubace se sekundární protilátkou	63
5.10	Příprava spermií pro pokus se sortovanými spermii	63
5.10.1	Centrifugace na gradientu Percollu	63
5.10.2	Inkubace s primární a sekundární protilátkou	63
5.10.3	FACS	64
5.10.4	Zamrazení spermií po FACS	64
5.11	Vyhodnocení viability spermií po FACS a po kryoprezervaci	64
5.12	ICSI	65
5.13	Kultivace po oplození	66
5.14	Fixace a barvení embryí	66
5.15	Imunofluorescenční značení spermií	66
5.16	Statistická analýza	67
6	Výsledky	68
6.1	Sorting a kryoprezervace kančích spermií	68
6.2	Vliv ubiquitinace na úspěšnost oplození a vývoj do stádia blastocysty	70
6.2.1	Porovnání úspěšnosti oplození při použití čerstvé inseminační dávky nebo F/T spermií	70
6.2.2	Porovnání úspěšnosti formování prvojadér po ICSI při použití tříděných spermií podle míry extracelulární ubiquitinace	71
6.2.3	Úspěšnost časného embryonálního vývoje do stádia blastocysty při použití tříděných spermií podle míry extracelulární ubiquitinace	72
6.2.4	Vliv inhibitoru proteazomu na úspěšnost oplození a embryonální vývoj do stádia blastocysty při použití tříděných a následně kryoprezervovaných spermií ...	73
6.2.5	Vliv koinkubace spermií s protilátkou proti Ub na úspěšnost oplození a embryonální vývoj do stádia blastocysty	74
6.3	Vliv napodobení protektivních účinků účinku sulfanu na oocyty v MII fázi	75
6.4	Vyrušení účinků H ₂ S na stárnutí oocytů	76
7	Diskuze	78

7.1	Třídění kančích spermií a jejich následná kryoprezervace	78
7.2	Vliv ubiquitinace na úspěšnost oplození a vývoj do stádia blastocysty.....	80
7.2.1	Porovnání úspěšnosti oplození po ICSI při použití čerstvé inseminační dávky nebo F/T spermií	80
7.2.2	Porovnání úspěšnosti oplození a časného embryonálního vývoje po ICSI v závislosti na extracelulárním Ub	81
7.3	Vliv regulace iontových kanálů na stárnutí oocytů.....	84
8	Závěr	86
9	Seznam literatury	87
10	Seznam publikací autora.....	119
11	Přílohy.....	120

Seznam použitých zkratek

APC/C	anafázi podporující komplex (anaphase-promoting complex/cyclosome)
AR	akrozomální reakce
ART	metody asistované reprodukce (assisted reproductive technology)
ATP	adenosintrifosfát
CASA	počítačová analýza spermií
CDK1	cyklin-dependentní kináza 1
CO	oxid uhelnatý
COC	komplex oocyty a kumulárních buněk (
DUB	deubiquitinační enzymy
E1	ubiquitin-aktivující enzym
E2	ubiquitin-konjugační enzym
E3	ubiquitin ligáza
F/T spermie	zamrazené a rozmrazené spermie (frozen/thawed)
FACS	třídění buněk na základě fluorescence (fluorescence-activated cell sorting)
FITC	fluorescein iso-thiokyanát (fluorescein isothiocyanate)
FSH	folikuly stimulující hormon
GV	zárodečný váček (germinal vesicle)
GVBD	rozpad zárodečného váčku
hUb	vysoce extracelulárně ubiquitované spermie (highly ubiquitinated)
ICSI	intracytoplazmatická injekce spermie (intracytoplasmic sperm injection)
LH	luteinizační hormon

IUb	minimálně extracelulárně ubiquitinované spermie (lowly ubiquitinated)
MAPK	mitogeny aktivované proteinkinázy (mitogen activated protein kinase)
Mdm2	ubiquitin ligáza Mdm2 (mouse double minute 2)
MII	metafáze II. meiotického dělení
MPF	maturaci podporující faktor (m-phase promoting factor)
mtDNA	mitochondriální DNA
MTOC	centrum organizující mikrotubuly (microtubule organizing center)
NO	oxid dusnatý
NOS	syntáza oxidu dusnatého (nitric oxid synthase)
PB	pólové tělísko (polar body)
PKA	protein kináza A
ROS	volné radikály (reactive oxygen species)
SUMO	ubiquitinu podobné regulační proteiny (small ubiquitin-like modifiers)
SUTI	metoda imunofluorescenčního značení extracelulárního ubiquitinu spermíí (sperm-ubiquitin tag immunoassay)
TUNEL	metoda značení DNA zlomů (terminal deoxynucleotidyl transferase dUTP nick end labeling)
Ub	ubiquitin
UBL	ubiquitinu podobné proteiny (ubiquitin-like proteins)
UPC	ubiquitin-proteazomální komplex
UPS	ubiquitin-proteazomální systém
ZP	<i>zona pellucida</i>

1 Úvod

V rámci své dizertační práce jsem se zabýval výzkumem umělého oplození u prasete. Tento modelový organismus má v současné době velký potenciál v základním výzkumu i v aplikované praxi pro výzkum lidských nemocí. To se již na některých místech daří, jak dokládá například výzkum Huntingtonovy choroby na Ústavu živočišné fyziologie a genetiky AV ČR v Liběchově. Dalším krokem, na kterém se již pracuje, je rozsáhlá úprava genomu prasete, která by umožňovala omezit mezidruhové imunologické reakce a využít toto modelové zvíře pro xenotransplantace orgánů nebo jako bioreaktor pro růst orgánů lidských. Umělé oplození je pak jeden ze základních nástrojů, které tyto modifikace umožňují. Bohužel právě toto odvětví dosahuje stále velmi nízké úspěšnosti, a to i přes intenzivní snahu mnoha vědeckých týmů. Během mého výzkumu jsem se snažil nalézt způsoby, jak tento stav alespoň částečně vylepšit. To by se mohlo povést pomocí zlepšení maturace oocytů v práci zmiňovaným působením gasotransmitterů. Hlavní těžiště mého výzkumu pak bylo v nalezení pomocného klíče pro výběr spermií, které budou mít největší potenciál k oplození oocytů. V jeho rámci vznikla hypotéza, že by oocyt mohl disponovat mechanismem, který na základě extracelulární značky může rozpoznat méně kvalitní spermie a v některých případech nedovolit vznik nového embrya schopného dalšího vývoje. Touto extracelulární značkou by mohl být, z cytoplazmy již velmi důkladně prostudovaný, protein ubiquitin.

2 Přehled problematiky dizertační práce

2.1 Ubiquitin-proteazomální systém (UPS)

Ve všech eukaryotních buňkách se vyskytuje ATP-dependentní dráha sloužící primárně k proteolytické degradaci proteinů, která však může zastávat i mnoho jiných funkcí. Je založena na dvou klíčových složkách, molekule ubiquitinu (Ub) a proteazomálním komplexu. Ubiquitin-proteazomální systém je velmi konzervovanou drahou a sestává se z kaskády reakcí, které umožňují velmi precizní kontrolu a specifitu rozpoznání substrátu. Ubiquitin je malý, u eukaryot „všudypřítomný“ protein, jehož hlavní funkcí je posttranslační značení proteinů určených v buňce k degradaci. Tato degradace poté probíhá většinou v exekuční složce celého systému, v 26S proteazomu, případně může značení pomocí Ub vést i k transportu do lysozomu.

UPS je zapojen v mnoha buněčných dějích. Prostřednictvím specifického odbourávání určitých proteinů je naprosto esenciální pro regulaci buněčného cyklu a diferenciaci buněk, uplatňuje se v řízení odpovědí na extracelulární podněty, v prezentaci membránových receptorů a iontových kanálů. Je nezbytný pro regulaci transkripce, opravy DNA, umlčování genů a regulaci apoptózy. Mezi jeho cíle patří i proteiny na endoplazmatickém retikulu, cykliny a cyklin-dependentní kinázy i jaderné proteiny. UPS také degraduje poškozené a chybně složené proteiny.

Pod kontrolou tohoto systému je řada velmi důležitých signalizačních drah, UPS reguluje množství kaspáz, proteinů regulujících buněčnou smrt (Bcl-2), onkogenních a tumor supresorových proteinů (P53, c-Jun, c-Fos) nebo obecných transkripčních faktorů (NF- κ B, HIF-1), které jsou důkladně studovány pro možnosti léčby v klinické praxi.

UPS je navíc velmi těsně propojen s řadou analogických drah regulovaných proteiny jako jsou SUMO (small ubiquitin-like modifiers) a UBL (ubiquitin-like proteins). Zásadní roli hrají také deubiquitinační enzymy (DUB), které dále upravují zacílení tohoto systému. Regulační síť navázaná na UPS je tak srovnatelná se systémem řízení buněčných dějů pomocí posttranslačních fosforylací proteinů (Glickman a Ciechanover, 2002; Thompson et al., 2008). Za objev a popis funkce UPS získali v roce 2004 Nobelovu cenu Avram Hershko, Aaron Ciechanover a Irwin Rose.

2.1.1 Ubiquitin

Základem UPS je vazba Ub na substrát nebo na jinou molekulu Ub při tvorbě řetězce. Ub je malý protein (8,5 kDa) skládající se ze 76 aminokyselinových zbytků. Jeho struktura je

evolučně velmi konzervovaná a velmi důležitou roli hraje sedm lysinových zbytků (K6, K11, K27, K29, K33, K48, K63), které slouží k navázání na substrát a také k vazbě dalších molekul Ub a tvorbě velmi variabilních polyubiquitinových (polyUb) řetězců, jejichž podoba může také určovat další osud daného proteinu (Pickart, 2004). Vazba Ub je reverzibilní kovalentní vazbou mezi C-koncovým glycinovým zbytkem molekuly Ub a lysinovým zbytkem na cílovém proteinu nebo na předchozí molekule Ub v polyUb řetězci, v některých případech může být ale Ub vázán i přes rezidua serinu, threoninu nebo i cysteinu substrátu (Ciechanover a Stanhill, 2014). PolyUb řetězce mohou být homotypické (molekuly Ub se váží přes lysinové zbytky na stejném místě řetězce), nebo heterotypické (Ub se řetězí přes různé lysinové zbytky). Právě více molekulami Ub je modifikováno 80 % - 90 % ze všech proteinů určených v buňce k degradaci (Lee a Goldberg, 1998). Vlastní degradace intracelulárních proteinů může probíhat několika způsoby, nejčastěji pomocí 26S proteazomu, přičemž daný substrát je většinou značen pomocí čtyř molekul Ub vázaných na sebe přes K48 (Thrower et al., 2000). Další možností je směrování do lysozomu, kde je daný protein buď monoubiquitinován nebo je polyUb řetězec tvořen vazbami přes K63. Ubiquitinací některých membránových proteinů jsou také značeny maternální mitochondrie určené k degradaci v zygotě (Sutovsky, 2018).

Kromě role spojené s UPS má Ub i funkce, které nejsou přímo propojené s degradací. Jedná se o dlouhodobé ubiquitinace histonů bez následné proteolýzy, čímž dochází k regulaci transkripce, nebo o regulaci endocytózy (Conaway, 2002). Může také sloužit jako marker cytoplazmatické části membránových proteinů pro směrování do endozomu, resp. do MVD (multivesicular bodies), které ale nejsou určeny vždy k fúzi s lysozomem a mohou být i exocytovány do extracelulárního prostoru (Buschow et al., 2005).

Pomocí specifických váček je Ub i s dalšími komponenty UPS transportován do lumen epididymis. Tato sekrece probíhá z apikálních buněk epitelu nadvarlete pomocí epididymozomů a tzv. „apical blebs“ a to i s dalšími komponenty UPS (Baska et al., 2008). Transportem Ub do epididymální tekutiny se hlouběji zabývá kapitola 2.2.2.

V extracelulárním prostoru není funkce Ub tak podrobně prostudována jako jeho funkce v cytoplazmě. Je však detekovatelný prakticky ve všech tělních tekutinách (krevní plazma, mozkomíšní mok, seminální, epididymální a folikulární tekutina a bronchoalveolární mok) a jeho koncentrace se může zvyšovat i desetkrát až stokrát v souvislosti s některými onemocněními. Takto zvýšená koncentrace se ale dává do souvislosti spíše s množstvím poškozených buněk, jejichž obsah se do uvedených tělních tekutin dostane. Vyšší

koncentrace extracelulárního Ub ve folikulární a epididymální tekutině však svědčí o aktivní sekreci Ub (Majetschak, 2011).

2.1.2 Vazba Ub na substrát

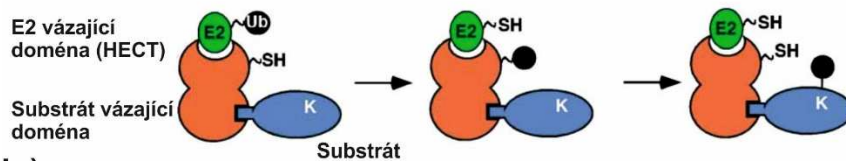
Pro navázání Ub je potřeba kaskáda tří reakcí, které v každém dalším kroku umožňují vyšší specifitu a selektivnost vazby. Nejprve je molekula Ub připojena přes její C-konec na ubiquitin – aktivující enzym (E1). K tomuto kroku je nezbytná energie z adenosintrifosfátu (ATP), která umožní vytvoření thioesterové vazby mezi enzymem a molekulou Ub. Poté se může Ub navázat na ubiquitin-konjugační enzym (E2). E2 je během tohoto navázání již většinou připojen k ubiquitin ligáze (E3), která zajišťuje vlastní přenos na aminoskupinu lysinového zbytku substrátu nebo předchozí molekulu Ub v polyubiquitinovém řetězci. Ub je vázán na substrát nejčastěji izopeptidovou vazbou, která vzniká mezi α -karboxylovou skupinou glycinu na C-konci ubiquitinu a ε -aminoskupinou postranního řetězce lysinu na cílovém proteinu (Hershko a Ciechanover, 1998).

Regulace kaskády vedoucí k navázání Ub na substrát je pyramidově hierarchická. V eukaryotických buňkách existuje jen několik E1 enzymů, často varianta jediná. Ubiquitin-konjugačních enzymů pak známe několik desítek, u člověka přes 40 a celkově do stovky. E2 enzymy pak nejsou pouhými přenašeči Ub a jejich centrální role umožňuje lepší kontrolu nad UPS. Zajímavá je například regulace pomocí nekovalentní vazby Ub na opačnou stranu povrchu enzymu, než je katalytická kapsa aktivního místa, u různých typů E2 může tato vazba ovlivňovat činnost jak pozitivně, tak negativně. Samozřejmě i E2 enzymy mohou být samy označeny klasickou vazbou Ub a určeny k degradaci v proteazomu. Může také docházet k ovlivnění pomocí kovalentní vazby některých malých molekul nebo efektorových proteinů některých patogenů a naopak velmi zřídka jsou regulovány pomocí fosforylace (Stewart et al., 2016)

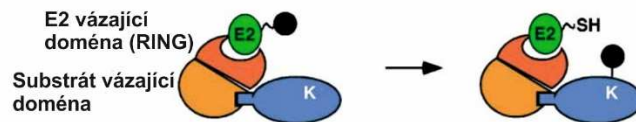
Hlavní podíl na řízení rozpoznání substrátu pomocí UPS mají specifické ubiquitin ligázy a jejich regulace. Těchto enzymů existuje v eukaryotických buňkách několik set a jejich činnost může záviset na širokém spektru interakcí a vazeb. Každý z těchto enzymů může rozpoznávat celou řadu různých substrátů a rovněž interaguje s více typy Ub-konjugačních enzymů. E3 se rovněž mohou vázat na E2 ještě před přenosem aktivovaného Ub na E2 a tato vazba pak ovlivňuje reaktivitu E2 s Ub (Gao a Karin, 2005; Stewart et al., 2016). E3 enzymy se podle způsobu přenosu Ub na substrát dělí do dvou skupin (Obr. 1). První skupina obsahuje enzymy tvořené jedním polypeptidem, který

obsahuje HECT (Homologous to E6AP C-Terminus) doménu v části enzymu, která váže E2-Ub. Na tuto velmi konzervovanou doménu se přenáší a kovalentně váže molekula Ub a teprve poté je přenesena na substrát, přičemž vazbu substrátu zajišťuje jiná doména téhož polypeptidu. Druhá skupina Ub ligáz se poté skládá ze dvou polypeptidických řetězců, kde jeden váže substrát a druhý E2-Ub pomocí RING (Really Interesting New Gene) domény. Přenos Ub na substrát se v tomto případě děje rovnou z E2 a E3 enzym pouze pomáhá vytvořit izopeptidovou vazbu mezi Ub a substrátem (Pickart, 2004).

a)



b)



Obrázek 1: Hlavní třídy ubiquitin ligáz. a) HECT doména váže daný ubiquitin-konjugační enzym (E2) a dočasně váže ubiquitin přes cysteinový zbytek. Jiná doména stejného proteinu zároveň váže substrát a ubiquitin se poté na substrát přenáší. b) ubiquitin ligáza se skládá ze dvou proteinů, první obsahuje RING doménu, druhý váže specifický substrát. Společně zajišťují přiblížení E2 s Ub a substrátu. Přenos zde probíhá přímo, bez dočasné vazby Ub na E3 (převzato Pickart, 2004, upraveno).

Činnost E3 může záviset na interakcích s jinými proteiny, které stejně jako u E2 mohou svou vazbou působit na E3 aktivačně nebo mohou být velmi dobrými inhibitory pro vazbu substrátu. Velmi dobře prostudovaným příkladem je E3 ligáza Mdm2 (Mouse double minute 2), která je specifickou ligázou pro tumor supresorový protein P53 a která podléhá velmi komplexní regulaci (Sane et al., 2017).

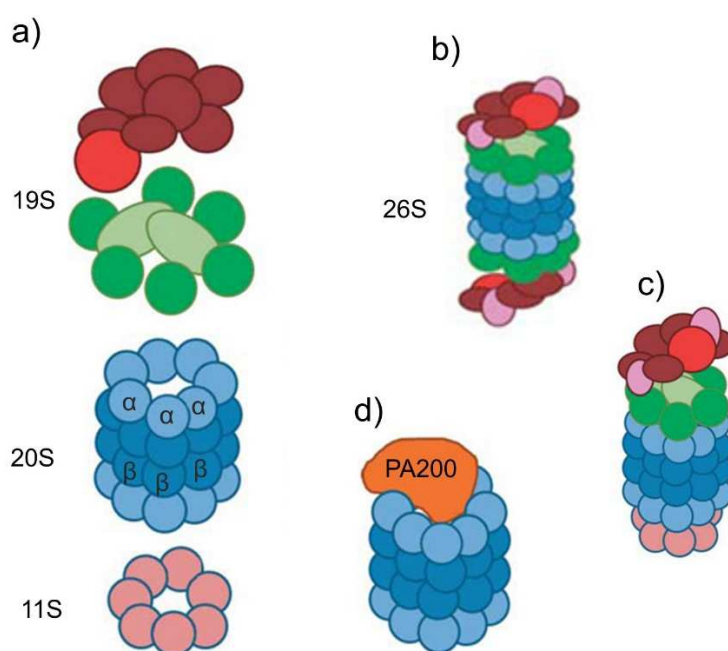
Ub ligázy mohou být také regulovány pomocí ubiquitinace nebo i autoubiquitinace. Vazba Ub na enzym pak může vyvolávat řadu odpovědí. E3 může být samozřejmě pomocí Ub označena k degradaci, ale podobně jako u E2 může mít vazba Ub jinou regulační funkci. U některých ligáz (např Ring1B) je dokonce monoubiquitinací podmíněna celá jejich funkce (Ben-Saadon et al., 2006).

Stejně jako naprostá většina dalších buněčných proteinů jsou i E3 regulovány specifickými fosforylacemi, což opět může vést ke změně funkčnosti i reaktivity, a to i v závislosti na fosforylaci substrátu (Gao a Karin, 2005).

Vazba Ub na substrát je tedy velmi specificky řízena a možnosti této posttranslační modifikace mohou dosahovat komplexity systému fosforylací proteinů. Narozdíl od fosforylace ale nemá ubiquitinace lehce rozpoznatelné a přesně dané místo nebo motiv pro vazbu v cílovém proteinu. V ojedinělých případech jsou tato místa v proteinu unikátní nebo alespoň vykazují jisté obecné podobnosti, ale Ub se většinou váže na nejrozličnější lysinové zbytky v polypeptidickém řetězci, případně někdy i na serin, cystein nebo threonin (Ciechanover a Stanhill, 2014).

2.1.3 Ubiquitin-proteazomální komplex (UPC)

Exekutivní složkou UPS je 26S proteazom skládající se z 20S jádra, které váže dva 19S (PA700) proteazomy. Mohou však vznikat i alternativní podoby, kdy 20S jádro váže dva 11S proteazomy (PA28) nebo PA200 podjednotky. Vyskytují se i hybridní podoby vzniklé jejich kombinacemi nebo samostatné 20S jádro (Obr. 2).



Obrázek 2: Znázornění jednotlivých částí a možných kombinací stavby proteazomu. (a) jednotlivé proteazomální podjednotky, 19S proteazom (base a lid), 20S katalytické jádro a alternativní regulační podjednotka 11S, (b) složený 26S proteazom, (c) hybridní proteazom s různými regulačními podjednotkami, (d) 20S katalytické jádro s regulační podjednotkou PA200 (převzato Sutovsky, 2011, upraveno)

2.1.3.1 20S proteazom

Toto jádro 26S proteazomu se skládá ze sedmi α podjednotek a stejného počtu β podjednotek, které jsou válcovitě uspořádány do čtyř kruhů kolem centrálního póru. Podjednotky α tvoří dva vnější kruhy, podjednotky β tvoří kruhy vnitřní, které zajišťují vlastní proteolytickou aktivitu. Ta je umožněna pomocí hydroxylové skupiny N-terminálního threoninu podjednotek $\beta 1$, $\beta 2$ a $\beta 5$, která umožňuje nukleofilní atak na řetězec degradovaného proteinu (Tanaka, 2009). Ke štěpení dochází uvnitř póru mezi prstenci z β podjednotek a vstup do něj je řízen prstenci z α podjednotek a navázanými regulačními podjednotkami, které nemusí být vždy přítomny.

Jsou také popsány další dvě izoformy 20S proteazomu, které mají úlohu v imunitním systému. Jsou jimi imunoproteazom a thymoproteazom, u kterých se liší právě proteolytické podjednotky vnitřních prstenců $\beta 1$, $\beta 2$ a $\beta 5$. Imunoproteazom se vytváří v reakci na interferon γ a účastní se na štěpení proteinů před vystavením antigenů na MHC-I. Jak název napovídá, thymoproteazom je vytvářen specificky v epiteliálních buňkách brzlíku a má klíčovou roli při tvorbě a selekci MHC-I v $CD8^+$ lymfocytech (Murata et al., 2018).

2.1.3.2 Regulační podjednotky 26S proteazomu

Ačkoli se 20S proteazomální katalytické jádro může vyskytovat i samostatně a být regulováno pomocí α podjednotek vnějších prstenců, většinou je vstup do centrálního póru regulován navázanými podjednotkami, které jej mohou blokovat nebo řídit vazbu proteinů s navázaným Ub nebo případně přenašečů, které interakci UPC a proteinu určeného k degradaci zajišťují.

Nejběžněji se 20S proteazom vyskytuje v kombinaci s dvěma 19S regulačními podjednotkami, které uzavírají oba konce centrálního póru. 19S proteazom je tvořen 19 podjednotkami, z nichž šest má vlastní ATPázovou aktivitu, která většinou souvisí s rozbalováním proteinů. Využití energie z ATP je však nezbytné i pro samotné složení a stabilizaci UPC. Hlavní funkcí 19S proteazomu je specifická vazba proteinu určeného k degradaci a translokace tohoto proteinu do póru 20S proteazomu. Některé z podjednotek mají deubiquitinační funkci a depolymerizují Ub řetězec štěpeného proteinu, aby tento mohl být znovu využit.

Regulační podjednotka 11S (nebo také PA28) se vyskytuje v několika izoformách (α , β , $\alpha\beta$, γ) a proteazomy regulované těmito podjednotkami se obecně neúčastní štěpení

celých proteinů degradovaných v 20S póru. Spíše má stimulační efekt na peptidázovou aktivitu 20S jádra a na štěpení intermediátů, které vznikly po štěpení v 26S proteazomu, se kterým může takto tvořený proteazom fungovat kooperálně (Glickman a Ciechanover, 2002).

Podobný efekt má i PA200 regulační podjednotka, jejíž vazba na 20S proteazom vede ke stimulaci hydrolyzy krátkých peptidů. Také má důležitou roli v degradaci acetylovaných histonů během oprav DNA v průběhu spermatogeneze a je nezbytná pro její správný průběh (Khor et al., 2006).

2.1.4 Rozpoznání ubiquitovaných proteinů proteazomem

Ubiquitované proteiny jsou proteazomálním komplexem rozpoznávány pomocí třech typů receptorů. Hlavní třídou jsou podjednotky regulační části 19S proteazomu, které nemají ATP-ázovou aktivitu a obsahují krátkou helikální část nazvanou UIM (ubiquitin interacting motif). Druhou skupinou jsou kyvadlové přenašeče obsahující UBL doménu, které dokáží vázat zároveň ubiquitovaný substrát a 26S proteazom a zprostředkovávat jejich interakci. Poslední třídu lze definovat jako komplexy založené na Cdc48, ty jsou zapojeny především při rozpoznání proteinu proteazomálním komplexem asociovaným s endoplazmatickým retikulem, ale mohou interagovat i s 26S proteazomem volně v cytoplazmě.

Standardní signál pro degradaci je právě homotypický polyUb řetězec 4 molekul Ub vznikající připojováním nové molekuly Ub přes lysin na pozici 48 ke glycinu na C-konci předchozího Ub. Tento řetězec je tedy založen na pouze jediném větvení a v rámci každé molekuly Ub a je homotypický, takže všechny molekuly Ub se váží přes lysinový zbytek na předchozí molekule. Mohou však vznikat i heterotypické řetězce s vícenásobným větvením. Různé typy řetězců nebo i monoubiquitinací se také mohou kombinovat a doplňovat (Ciechanover a Stanhill, 2014). Celý systém pak může nabývat ještě vyšší complexity při zapojení různých UBL.

K rozpoznání proteinu určeného k degradaci proteazomem je tedy většinou zapotřebí značení pomocí polyUb řetězce. Není to však jediná možnost. Zvláště pro vývoj a diferenciaci buněk je důležité i směřování proteinů k degradaci v proteazomu pomocí vazby pouze jedné molekuly Ub (Boutet et al., 2007; Carvallo et al., 2010) nebo několika molekul Ub, které ovšem nejsou vázány do polyUb řetězce (Dimova et al., 2012). Podrobné studie ukázaly, že pomocí monoubiquitinace mohou být degradovány pouze

proteiny, jejichž délka je mezi 20-150 aminokyselinovými zbytky. Délka alespoň 20 zbytků se zdá být nezbytná pro překonání vzdálenosti mezi vazebným místem pro Ub proteolytickým jádrem 20S póru (Shabek et al., 2012). Se vzrůstající velikostí degradovaného proteinu roste i čas potřebný pro jeho degradaci. V tom případě již pouhá monoubiquitinace nemusí poskytovat dostatečně stabilní vazbu, která by umožnila efektivní štěpení proteinu. Některé substráty přibližující se délce 150 aminokyselinových zbytků (např. cyklin B1, p50) jsou pro větší stabilizaci značeny množstvím jednotlivých Ub namísto tvorby polyUb řetězce (Ciechanover a Stanhill, 2014), kratší peptidy jsou pak štěpeny pomocí oligopeptidáz (Saric et al., 2004).

2.1.5 Ubiquitin-like proteiny (UBL)

Podobně jako pomocí Ub mohou být některé proteiny postranlačně modifikovány připojením UBL. Dvěma nejlépe prostudovaným zástupcům patří SUMO a Nedd8 (neural precursor cell expressed developmentally downregulated-8), které vykazují velmi podobnou prostorovou strukturu jako Ub, přestože sekvenčně si jsou podobné poměrně málo, např. Sumo1 je s Ub sekvenčně homologní v 18 %, naproti tomu Nedd8 je v rámci sekvence podobný Ub z 80 %.

Stejně jako Ub se také váží většinou přes lysinový zbytek substrátového proteinu a u některých (Sumo2/3) je možné detekovat i tvorbu řetězců. Nejen svým prostorovým uspořádáním jsou podobné Ub, ale i jejich aktivační a konjugační enzymy vykazují značnou podobnost s enzymy E1a E2 (Thompson et al., 2008).

Jejich působení však může být někdy synergické a jindy naopak naprosto protichůdné, např. při regulaci proteinu p53 vede jeho ubiquitinace k degradaci, kdežto sumoylace vede k jeho stabilizaci a aktivaci. Navíc stejný mechanismus platí i pro Mdm2, což je ovšem ubiquitin ligáza, která modifikuje p53, ale sama je aktivována vlivem SUMO (Herrmann et al., 2007).

V poslední době se zkoumá vliv sumoylace na vývoj spermií a výsledky ukazují, že tato modifikace proteinů je zapojena i do regulace mnoha procesů v rámci spermatogeneze. Proteiny SUMO byly detekovány v jádře spermatogonií a předpokládá se jejich účast na regulaci meiózy, umlčování genů či asociace s DNA poškozením. Případně by mohly být také použity jako negativní marker kvality spermií (Vigodner et al., 2013).

2.1.6 Deubiquitinační enzymy (DUBs)

Odstranění Ub signálu z degradované proteinu zajišťuje hlavně deubiquitinační enzym, který je přímo součástí podjednotky Rpn11 v 19S proteazomu. K odštěpení Ub dochází ještě před degradací a uvolněný Ub může být znovu použit pro značení jiného substrátu (Thompson et al., 2008; Saeki, 2017). Paleta možného působení DUBs je však mnohem pestřejší a není pevně spjata s proteazomálním komplexem a degradací proteinů. U člověka bylo již identifikováno přes 100 různých DUBs a lze je rozčlenit do šesti různých tříd, z nichž některé jsou specifické pro UBL proteiny. Mohou odštěpovat celé polyUb řetězce od substrátu nebo postupně uvolňovat jednotlivé molekuly Ub (Mevisse a Komander, 2017). Spektrum DUBs umožňuje ještě komplexnější řízení celého systému.

2.2 Vývoj a selekce spermií

2.2.1 Spermatogeneze

Vznik samčích pohlavních buněk se odehrává v kanálcích varlete po dosažení pohlavní dospělosti daného jedince a skládá se ze třech fází. Během první, proliferační, se nediferenciované kmenové spermatogoniální buňky, které jsou trvale usazeny mezi Sertoliho a Leydigovými buňkami u stěny kanálku, kontinuálně mitoticky dělí a vytvářejí populaci dceřiných buněk, které již nejsou navázány na Sertoliho buňky a stávají se z nich diferencující spermatogonie typu A. Ty dále projdou několika dalšími cykly mitotického dělení. Počty takto nově vznikajících buněk jsou vskutku pozoruhodné, a to zvláště u kanců, kde průměrná denní produkce činí 7×10^6 na každý gram tkáně varlete, což celkově vede ke vzniku průměrně $1,7 \times 10^9$ spermií (Almeida et al., 2006). Během těchto dělení zůstávají vznikající buňky stále propojeny pomocí relativně slabých cytoplazmatických můstků. V průběhu těchto cyklů se změní jejich citlivost k SCF (stem cell factor) a stávají se z nich spermatogonie typu B, které představují poslední buňky dělící se mitoticky a dávají vzniknout spermatocytům prvního řádu. Druhou fází je meiotické dělení, kdy se tvoří haploidní spermatické buňky. Primární spermatocyty projdou prvním meiotickým dělením a vznikají tak sekundární spermatocyty. Nastává druhé meiotické dělení a tvoří se spermatidy, které jsou stále propojeny cytoplazmatickými můstky. Geneticky jsou spermatidy haploidní, ale mRNA a některé proteiny mohou mezi jednotlivými spermatidami přecházet a díky tomu fungují spíše jako kdyby byly diploidní. Během těchto dělení se buňky postupně vzdalují od populace kmenových spermatogonií uhnížděných mezi Sertoliho buňkami a dostávají se k lumen kanálku varlete.

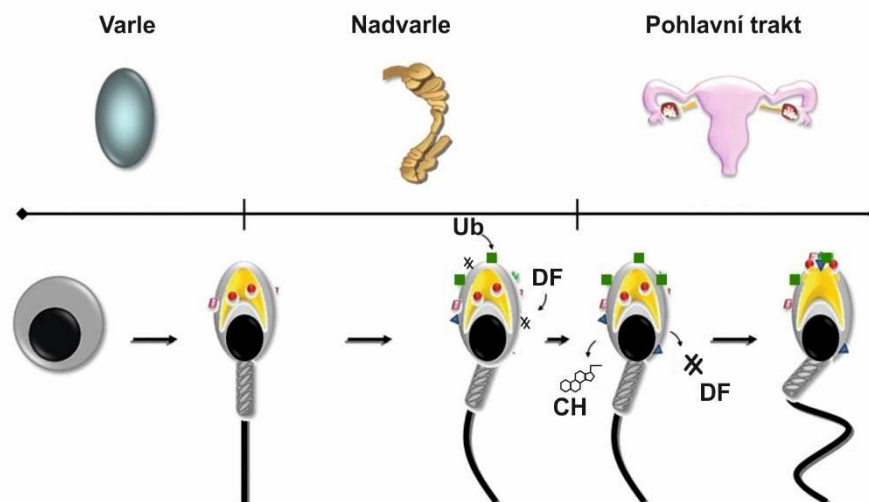
Poslední fází spermatogeneze je spermiogeneze, což je morfologická změna z původně oválné spermatidy ve funkční spermii. Musí dojít ke kondenzaci jádra, která je umožněna výměnou v průměru 90 % histonu za protaminy. Ty umožňují těsnější sbalení jádra díky velkým částem tvořeným argininem, který neutralizuje fosfodiesterovou kostru DNA. Odstínění záporného náboje dovoluje sbalení DNA do toroidní (tvar cívky) podoby. Původní histony na sebe váží 2-15 % DNA, a právě tyto části genetické informace jsou funkční geny, které mají jistou roli pro spermiogenezi, vykazují poslední aktivitu během kondenzace, a poté se uplatňují bezprostředně po oplození. Dokonce některé z těchto histonů přetrvávají až do samčího prvojádra (Ward, 2010).

Podstatnou změnou prochází Golgiho komplex, který slouží jako základ akrozomálního váčku a tvoří pak čepičku spermie. Tedy alespoň podle běžně přijímané teorie, ačkoli

existují i názory, že akrozom je spíše organelou odvozenou od lysozomu (Berruti, 2016). V neposlední řadě je velmi silně redukována cytoplazma spermie, která se odděluje od buňky v podobě kapének (droplets) poté, co tyto putují podél bičíku k distálnímu konci spermie. Tyto kapénky můžeme dobře pozorovat při odběru spermií přímo z varlete, ale i v ejakulátu lze najít spermie, které tyto kapénky na bičíku mají a obecně se považují za morfologickou abnormalitu a známku zhoršené kvality spermie.

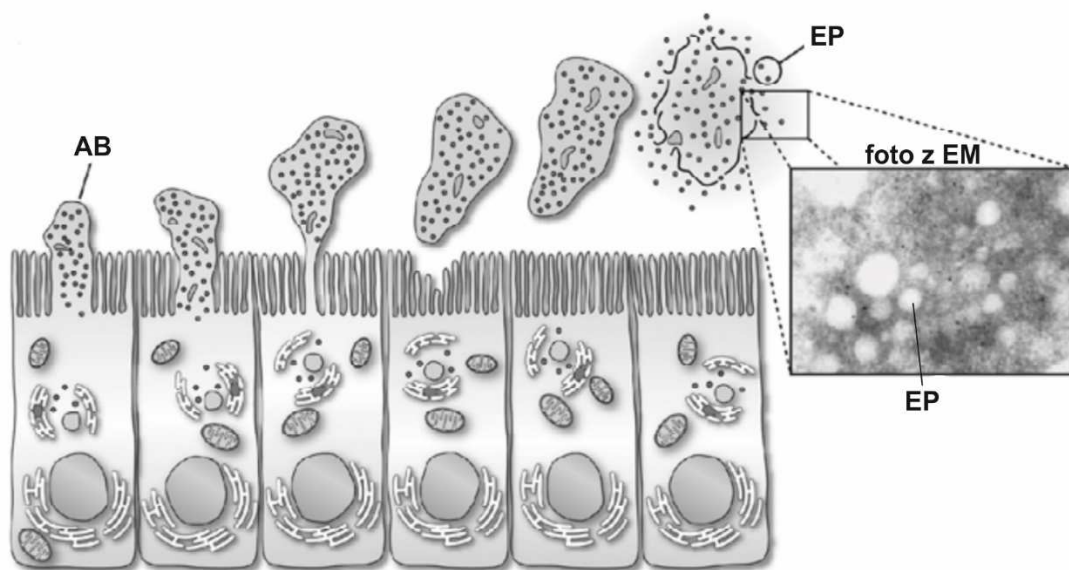
2.2.2 Maturace spermií

Po vzniku haploidních spermatid ve varlatech a jejich morfologické změně v rámci spermiogeneze nejsou spermie stále schopné oplodnit oocyt. Pro získání kompetence k oplození musí ještě proběhnout celá řada změn v rámci jejich průchodu kanálkem epididymis, která se nazývá maturace spermií. Tato vývojová etapa je z pohledu mé práce velmi podstatná, protože právě během ní dochází k navázání extracelulárního Ub, který potom patrně může ovlivňovat další osud dané spermie. Během této maturace získá spermie potřebnou motilitu a dojde ke změnám ve stovkách povrchových i intracelulárních proteinů. V nadvarletí jsou také uchovávány zralé spermie před ejakulací. Lumen epididymis s velmi komplexním složením epididymální tekutiny v jednotlivých částech zajišťuje optimální podmínky pro udržení spermií v životaschopném stavu a pomocí připojení dekapacitačních faktorů je udržuje v klidovém stádiu (Obr. 3).



Obrázek 3: Modifikace na membráně spermií v průběhu její maturace. Během zrání v nadvarletí dochází k připojení dekapacitačních faktorů (DF) a ubiquitinu (Ub) na membránu spermie. V samičím pohlavním traktu dekapacitační faktory disociují společně s cholesterolem (CH), čímž se zvyšuje fluidita membrány a spermie kapacituje (převzato Reid et al., 2011, upraveno).

Maturace spermií v nadvarletí zahrnuje změny v morfologii, biochemii a fyziologii spermie, mění se hlavně složení plazmatické membrány a organizace akrozomálního váčku. U myši, která patří jako nejběžnější savčí modelový organismus k nejlépe prozkoumaným, je již popsáno odstranění více než jednoho tisíce proteinů během průchodu epididymis, zatímco dalších sedm set je nově přidáno (Skerget et al., 2015). Tyto proteiny jsou do epididymální tekutiny sekretovány převážně merokrinní (ekrinní) cestou přes endoplazmatické retikulum a Golgiho komplex nebo alternativní apokrinní cestou odštěpováním váčků z apikálních buněk epitelu lumen nadvarlete, tzv. „apical blebs“ a epididymozomů (Obr. 4). Právě apokrinní sekrece se velmi často objevuje v orgánech spojených s reprodukcí a byla již popsána v prostatě, seminálních váčcích, přídatných pohlavních žlázách, chámovodu, děloze a běžně známým příkladem jsou i prsní žlázy. Tento typ sekrece je také často pod kontrolou pohlavních hormonů a začne se objevovat až v rámci pohlavního dospívání.



Obrázek 4: Znázornění apokrinní sekrece do intraluminálního prostoru v epididymis pomocí „apical blebs“ (AB) a epididymozomů (EP). V pravé části je vidět detail fotografie z elektronového mikroskopu s viditelnými epididymozomy (převzato Sullivan et al., 2007, upraveno).

Epididymis spojuje varlata s chámovodem a je tvořen kanálkem v délce až několika desítek metrů. Dělí se na tři části: caput (hlava), corpus (tělo), cauda (ocas). Přívodní kanálky ústí na vrcholu varlete do části caput, který se společně s částí corpus podílí na maturaci, distální caput pak uchovává zralé spermie a přechází do chámovodu. Kanálek má zužující se průměr a změny označované jako maturace jsou řízeny vnitřním prostředím v jeho lumen. Epididymální kanálek je charakteristický pseudo-vrstevnatým

epitelem s těsnými spoji (tight junction) mezi jednotlivými buňkami, což umožňuje složení epididymální tekutiny v lumen se značně odlišnou koncentrací elektrolytů a makromolekul od ostatních tělních tekutin. Epididymální tekutina má také v jednotlivých částech nadvarlete značně odlišné složení a maturace spermií je velmi přesně řízena i v rámci posloupností jednotlivých procesů během průchodu kanálkem epididymis. Nutnost řízení změn vnějším prostředím je logicky dána kompaktním jádrem spermie, které neumožňuje transkripci, a velmi redukovanou cytoplazmou, kde neprobíhá translace, a možnosti regulací takto komplexních změn jsou velmi omezené. Naopak byly popsány velké rozdíly v genové expresi buněk nadvarlete v caput oproti corpusu a caudě (Thimon et al., 2007; Cornwall, 2009).

Epididymozómy byly poprvé popsány v osmdesátých letech jako 10-250 nm velké váčky a je možné je rozdělit do několika podskupin s odlišnými funkcemi. Některé z nich transportují svůj obsah do lumen epididymis, tímto způsobem se dostává do epididymální tekutiny i většina složek UPS (Baska et al., 2008), jiná skupina váček se váže na odumírající spermie a patrně tak chrání ostatní spermie před působením ROS (reactive oxygen species) vznikajících při rozpadu odumírajících spermií. Epididymozómy, které můžeme rozpoznat jako CD9 pozitivní, se mohou vázat na spermie, fúzovat s nimi přes tetraspaninový komplex, a vnášet některé proteiny přímo do membrány viabilních spermií. Jiné typy mají zase naopak výrazně vyšší afinitu k hlavičkám neviabilních spermií (Sullivan, 2015).

2.2.3 Selekcce spermií v nadvarletí

Před samotnou ejakulací dochází k selekci vadných a neviabilních spermií právě v nadvarletí. Během průchodu nadvarletem jsou tyto spermie označeny a poté odstraněny pomocí fagocytózy epiteliálními buňkami nadvarlete nebo makrofágy přítomnými v epididymální tekutině, čímž dochází k poklesu koncentrace defektních spermií v distálních částech kanálku (Sutovsky, 2003).

Možný způsob fungování tohoto systému není zatím dostatečně prozkoumán, a to jak v ohledu na mechanismus určení vadných spermií, tak i následné degradace. Velmi dobře je však popsána vazba mezi mírou extracelulárního Ub a proteinů rodiny SUMO (hlavně SUMO1, SUMO2/3) a defektními spermiemi (Vigodner et al., 2013; Sutovsky, 2018). Množství membránových a povrchových proteinů, které jsou značeny Ub, negativně koreluje s kvalitou spermií ve vzorku (viabilita, motilita, normální morfologie, vyšší koncentrace na ml ejakulátu) a naopak pozitivně koreluje s poškozením jádra jedno-

řetězcovými zlomy (Sutovsky et al., 2002; Hodjat et al., 2008). Ubiquitinované spermie také častěji vykazují špatnou morfologii bičíku (zdvojený nebo stočený bičík) a abnormality jako například zdvojenou hlavičku spermie.

2.2.4 Hodnocení kvality spermií a SUTI (sperm ubiquitin tag immunoassay)

Charakterizace kvality spermatu se v současné době provádí hlavně analýzou spermií pod mikroskopem nebo přístrojově pomocí počítačem asistované analýzy spermatu (computer-assisted semen analysis neboli CASA). Vyhodnocení spermioqramu, vyjma koncentrace, je poměrně subjektivní záležitostí a vyžaduje značnou praxi. Vyhodnocení spermatu pomocí počítačové analýzy dosahuje velmi podobných výsledků jako klasické vyšetření pod mikroskopem (Vested et al., 2011), navíc v současné době je i snadno a široce dostupné například jako doplněk oblíbeného nástroje ImageJ, který se sice nevyrovná speciálnímu software, ale i tak poskytne velké množství informací, které by neškolený pozorovatel neodhalil. Tímto způsobem je možné rozpoznat nejen morfologické abnormality, ale i charakteristiku pohybu a částečně i schopnost kapacitace a stav akrozomálního váčku. Tento způsob hodnocení také umožňuje analýzu výrazně většího počtu spermií (van der Horst et al., 2018).

Další možností, jak charakterizovat kvalitu vzorku spermií, který pak již ale není dále možné použít, je ověření stavu plazmatické membrány hlavičky spermie nebo akrozomu. Nejjednodušeji se provádí pomocí konvenčního barvení po fixaci pomocí formaldehydu, alternativně pak na živých spermiích pomocí některé fluorescenční látky, která se váže na jádro, ale neprochází plazmatickou membránou, např. propidium jodidu, nebo pomocí barvení, kde je barvicí látka aktivně transportována do buněk, např. SYBR-14 (Katila, 2001). Vzhledem k minimálnímu objemu cytoplazmy však tento způsob určování viability není příliš vhodný.

Ověření kvality spermií je možné i značením pomocí lektinů, např. PNA (peanut agglutinin) nebo PSA (pea agglutinin), konjugovaných s fluorescenční látkou. Tyto lektiny se váží na špatně zformovaný akrozom s přístupnou membránou, případně na komponenty akrozomální matrix. Tento stav může vzniknout buď již během spermioogeneze ve varlatech nebo v epididymis, nebo po ejakulaci následkem předčasné kapacitace, či nesprávného odběru. Tato metoda však také není zcela spolehlivá, jelikož u některých spermií může dojít k vazbě na membránu i v důsledku začínajících změn způsobených spontánní kapacitací po ejakulaci. Rozdíl je poměrně obtížně rozpoznatelný

při přímém pozorování podle odlišného vzoru barvení, ale částečně to znevýhodňuje tuto metodu při použití například s průtokovou cytometrií, pokud není vyhodnocení založené na rozpoznání obrazu (image-based FC) (Cross a Watson, 1994; Sutovsky, 2015).

Pro správný vývoj po oplození je velmi důležitý stav jádra spermie a uložené DNA, pro odhalení problémů v jádře se používá detekce jedno-řetězcových zlomů (TUNEL, terminal deoxynucleotid transferase-mediated dUDP nick labeling) nebo analýza míry denaturace DNA při změně pH pomocí metod SCSA (sperm chromatin structure assay), SCD (sperm chromatin dispersion test) a dalších ((Evenson et al., 1994; Fernández et al., 2003; Yeste, 2016).

V předchozí kapitole již byla zmíněna úloha ubiquitinace během selekce v nadvarletí. Systém kontroly však není ideální. Ubiquitované spermie se objevují i v ejakulátu, ale můžeme pozorovat také spermie, které vykazují defektní morfologii, a přesto nejsou povrchově značeny Ub. Nicméně byly již publikovány studie, které prokazují negativní korelaci i mezi vyšším počtem ubiquitovaných spermií v ejakulátu a nižší pravděpodobností početí a menší velikostí potomků u některých zvířat i u lidí (Sutovsky et al., 2004; Ozanon et al., 2005; Lovercamp et al., 2007). Také byla již zmíněna negativní korelace mezi vlastní kvalitou spermií a mírou extracelulární ubiquitinace. To dělá z povrchové ubiquitinace další využitelný marker kvality. Na tomto teoretickém základu stojí i praktické využití těchto poznatků v podobě metody SUTI, která se používá na hodnocení kvality spermií u skotu a byla zkoušena i v klinické praxi (Ozanon et al., 2005). Hodnocení množství spermií s vysokou povrchovou ubiquitací v ejakulátu je v některých případech vhodné doplnění běžně používaných metod analýzy.

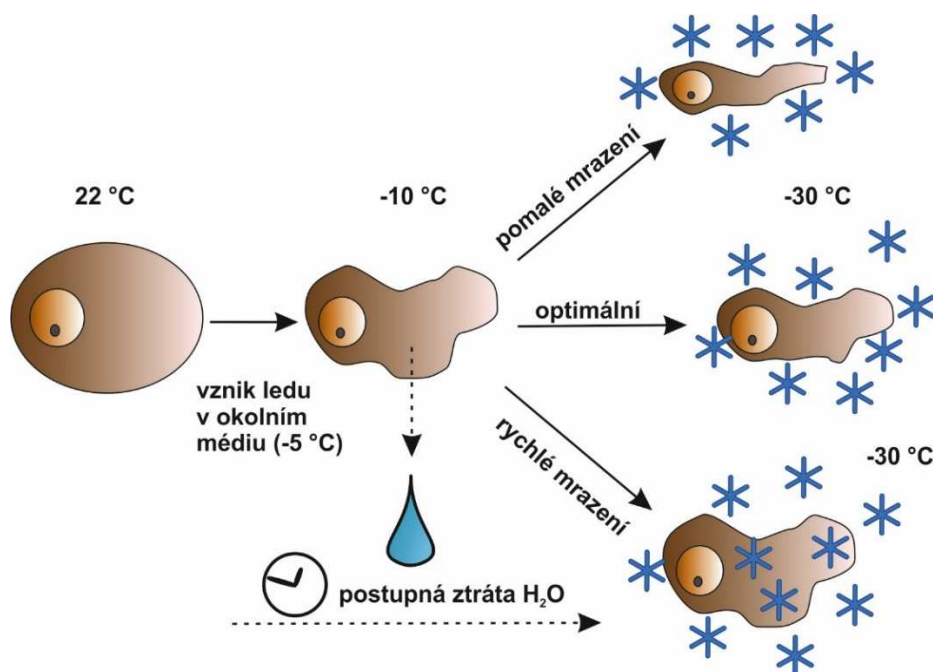
Extracelulární ubiquitin však některé studie jako negativní marker kvality zamítají a některé dokonce přicházejí s opačnými výsledky, které ukázaly pozitivní korelaci mezi mírou ubiquitinace a některými kvalitativními parametry ejakulátu (koncentrací v ejakulátu, motilitou a správnou morfologií, přežitím po kryoprezervaci) (Muratoro et al., 2005; Varum et al., 2007; Purdy, 2008). Tento rozpor by ale mohl být způsoben vyhodnocením na průtokovém cytometru, kde mohla být do výsledku zahrnuta i tělíčka (M540 bodies), která byla rovněž značena Ub, nebo mohl být detekován i intracelulární ubiquitin. Zajímavá je také studie (Eskandari-Shahraki et al., 2013), kde autoři sice prokázali negativní korelaci míry extracelulárního Ub a koncentrace spermií v ejakulátu, ale při následném oplození oocytů pomocí metody ICSI (intracytoplasmic sperm injection) dosáhli horší úspěšnosti oplození se vzorky spermií, které vykazovaly nižší míru

extracelulární ubiquitinace. Výsledek vysvětlují pomocí teorie hypoubiquitinace. Domnívají se, že ke správné funkci selekčního systému epididymis je zapotřebí dostatečně silný signál Ub, který ji spouští, a poté se do ejakulátu dostane jen minimální množství spermií značených Ub. V případě, že tento mechanismus nepracuje správně a nedochází k vytvoření spouštěče selekčního mechanismu, do ejakulátu se dostávají i spermie, které měly být eliminovány, a právě tato část spermií vytváří onu vyšší koncentraci. Spermii je tedy sice v ejakulátu více (to je považováno za znak kvality), ale je tam větší podíl nekvalitních spermií, což není vůbec žádoucí stav, zvláště když k tomu připočteme již zmiňovanou korelaci mezi DNA zlomy a množstvím extracelulárního Ub. Bohužel autoři této publikace se tématu dále nevěnovali a ani jinde v dostupné literatuře jsem nenašel její rozpracování.

2.2.5 Kryoprezervace spermií

Možnost uchovávat buňky po dlouhou dobu je velmi výhodná v mnoha případech, zvláště je to pak vhodné u pohlavních buněk. Umožňuje nám to jak přepravu na dlouhé vzdálenosti, tak i uchování vhodného genetického materiálu. Konkrétně mražení kančích spermií pro použití v ART (assisted reproductive technology) je záležitostí starší než 50 let a první selata počatá s využitím kryoprezervovaných spermií se narodila v roce 1957 (Hess et al., 1957). Značnými nevýhodami proti použití krátkodobě uchovaných spermií bez mražení je výrazně větší komplikovanost metod a poškození buněk během mražení a rozmražení (F/T, frozen/thawed). Pro buňky je nejvíce ničivý přechod vody obsažené uvnitř spermií do jiného skupenství. Při ochlazování na teplotu nižší než 5 °C dochází k podchlazení (supercooling) suspenze buněk a následně k postupnému zamrznání okolního média a tím ke zvýšení relativní koncentrace v něm rozpuštěných látek. Dojde k porušení osmotické rovnováhy a spermie začnou ztrácet vodu. Pokud jsou poté buňky ochlazovány příliš rychle, dojde velmi brzy k zamrznutí intracelulárního prostoru a ve spermii se utvoří ledové krystaly, protože většina vody zůstane uvnitř, což má za následek značné poškození jádra i organel. Naopak v situaci, kdy dochází k příliš pomalému ochlazování, téměř veškerá intracelulární voda projde do extracelulárního prostoru a dochází tak dříve k naprosté dehydrataci než ke zmražení. Rozpuštěné látky v cytoplazmě pak nabývají velmi vysokých koncentrací a mohou i přecházet do pevného skupenství, také se veškerý obsah buňky značně deformuje, což může vést ke změnám ve složení a uspořádání membrán organel. Může docházet i k denaturaci proteinů, poškození DNA vlivem zvýšeného oxidativního stresu, poškození mRNA, ke změnám v rozložení a funkci tyrozinových kináz, k velmi významnému snížení motility, poškození plazmatické

membrány a akrozomu, a případně i ke kompletní lýzi buňky nebo její apoptóze bezprostředně po rozmrazení (Gao a Critser, 2000; Thomson et al., 2009; Yeste, 2016). Přitom u spermií, které mají cytoplazmu značně redukovanou, může k tomuto problému docházet snadněji než u jiných zamrazovaných buněčných typů. Ideální rychlost ochlazování je navíc specifická pro každý buněčný typ a musí být jen minimálně pomalejší, než je potřeba pro zabránění tvorby ledových krystalů uvnitř buněk (Obr. 5).



Obrázek 5: Vliv rychlosti klesání teploty při zamrazení buněk. Při poklesu teploty k -5 °C začíná docházet k tvorbě krystalů vody v médiu a tím k růstu koncentrace rozpuštěných látek ve zbývajícím objemu. Buňky se tak dostávají do hypertonického prostředí a začínají ztrácet vodu z cytoplazmy. Pokud teplota dále klesá příliš pomalu, dojde k poškození vlivem dehydratace a deformace dříve, než stačí buňky zmrznout. V případě příliš rychlého poklesu teploty bude buňka obsahovat větší množství vody a utvoří v cytoplazmě ledové krystaly, které poškodí organely. Optimální rychlost je tedy taková, aby stačilo uniknout dostatek vody z cytoplazmy, ale ještě nedocházelo k přílišnému poškození vlivem dehydratace.

Kromě vlastní teploty a rychlosti, jakou dochází k ochlazování, se dá mrazení ještě regulovat různými kryoprotektanty, které lze rozdělit na dva základní druhy. Jedním jsou látky neprostupující plazmatickou membránou. Mezi ně patří proteiny izolované z vaječného žloutku nebo žloutek samotný, proteiny mléka, dále některé cukry (dextran, laktóza) a látky s vysokou molekulovou hmotností (lecitin, polyetylglykol, polyvinylpyrrolidon). Často se tyto látky kombinují s různými detergenty, například SDS nebo Orvus ES Paste (obchodní název průmyslově používaného detergentu), které usnadňují jejich interakci s membránou buněk. Pro druhou skupinu látek je plazmatická membrána prostupná. Příklady těchto kryoprotektantů jsou glycerol, DMSO, propylenglykol a etylenglykol, butandiol nebo i metanol. Všechny tyto látky jsou poměrně

málo toxické, a to až do koncentrace 1 M nebo i větší (Gao a Critser, 2000), a zároveň dokáží nějakým způsobem ovlivňovat charakteristiku přechodu cytoplazmy do zmrazeného stavu. Obecně jde o snížení koncentrace elektrolytů v cytoplazmě a zabránění přílišnému smrštění vlivem nízké teploty organel a jádra, mohou také měnit viskozitu cytoplazmy a upravovat rychlost difuze vody z buněk svojí přítomností uprostřed plazmatické membrány, mezi oběma fosfolipidovými vrstvami. Všechny tyto látky ovšem mají škodlivý vliv na spermie při dlouhodobé expozici při teplotách vyšších než 5 °C. Zajímavé je, že tento negativní vliv je velmi odlišný u různých druhů zvířat (Holt, 2000). Výběr nejvhodnějšího kryoprotektantu nebo jejich kombinace je tak velmi špatně proveditelný bez sérií experimentů, např. při mražení kančích spermií se nejčastěji používá glycerol, který je ale naprosto nevhodný pro mražení kohoutích spermií, a naopak spermie vačnatců ho tolerují i v koncentracích dvojnásobně vyšších než kančí (Hammerstedt a Graham, 1992; Taggart et al., 1996; Zeng et al., 2014). Další defekty mohou způsobit kryoprotektanty po rozmrazení buněk a je proto velmi žádoucí ihned po rozmrazení snížit jejich koncentraci ředěním nebo promytím buněk.

Různé buňky tedy reagují na mražení specificky podle typu a objemu cytoplazmy, samotné spermie se velmi liší v toleranci různých kryoprotektantů, navíc ještě existuje obrovská variabilita i mezi samci jednoho druhu, plemena, a dokonce každého jednotlivého samce. Poslední jmenovaný je bohužel právě případ kančích spermií. Lze najít kance, jehož spermie jsou mrazitelné s velmi dobrými výsledky a následné oplození je bezproblémové, ale také jedince z téhož chovu, u kterého kryoprezervace funguje významně hůře (Fraser et al., 2014; Petelak a Krylov, 2016). Na otázku, jaké jsou přesné rozdíly mezi kanci, jejichž spermie dobře odolávají kryoprezervaci, a těmi, kteří dosahují špatných výsledků, není dosud uspokojující odpověď. Jednou z možností jsou odchylky ve složení plazmatické membrány. Plazmatická membrána spermií obsahuje velmi nadprůměrně vysoký podíl polynenasycených mastných kyselin, konkrétně dokosapentaenové a dokosahexaenové kyseliny. Lepší výsledky, viabilitu a integritu membrány po F/T pak vykazují spermie s vyšším obsahem těchto mastných kyselin v plazmatické membráně (White, 1993; Waterhouse et al., 2006). Podobně bychom ovšem našli i celou řadu dalších buněčných komponent, jejichž výskyt může signalizovat dobrou mrazitelnost; patří mezi ně membránové kanály VDAC2, proteiny teplotního šoku (HSP90, ODF1 a ODF2) a řada dalších proteinů (SOD1, AKAP3, ACRBP) (Casas et al., 2010; Chen et al., 2014; Vilagran et al., 2014), ale případné vzájemné vazby a vliv na zvládnutí osmotického stresu nebo poškození během kryoprezervace nejsou objasněny.

Mimoto je možné vylepšit kvalitu spermií a úspěšnost oplození po F/T u kanců se špatnými výsledky tím, že k nim před mražením přidáme seminální tekutinu od kanců, kteří dosahují lepších výsledků, což vede k další možnosti: že klíč není ve spermiích samotných, ale v nějakém vnějším faktoru. Bohužel studie (Hernandez et al., 2007) nepřinesla žádné vysvětlení, co by tím faktorem mohlo být, v porovnávaném celkovém množství proteinů a antioxidantů v seminální tekutině žádné rozdíly neobjevila. Také je možné, že přidání seminální plazmy je prospěšné nezávisle na tom, ze kterého kance pochází, a přínosem je její samotné opětovné přidání do suspenze promytých spermií, přičemž ideální je přidání seminální plazmy z frakce ejakulátu bohaté na spermie (sperm rich fraction) (Torres et al., 2016),

Úspěšnost mražení, podobně jako maturace oocytů a úspěšnost oplození, vykazuje i sezónní specifitu a závisí na teplotě, což víme jak z vlastních zkušeností, tak z dalších studií, např. (Barranco et al., 2013).

Nedořešenou otázkou také zůstává, jaký vliv má na buňky obecně dlouhodobé uložení v tekutém dusíku a jestli je tato doba nějak limitována. Při hodnocení spermií kryoprezervovaných po dobu 42-48 měsíců byl po F/T pozorován pokles motility, integrity plazmatické membrány a funkce mitochondrií oproti skupině, která byla uložena v tekutém dusíku pouze na týden (Fraser et al., 2014). Výsledky byly jasně signifikantní (motilita $30,9 \pm 1,2$ % vs. $24,3 \pm 0,9$ %, neporušená membrána u $49,6 \pm 1,3$ % vs. $37,9 \pm 1,6$ %), ale byly vyhodnoceny z poměrně malého počtu deseti kanců.

Celkově se tedy zdá, že zásadní důležitost pro úspěšnou kryoprezervaci mají genetické rozdíly jednotlivých kanců, vlastní spermatogeneze a podmínky pro zrání v nadvarleti, ale je potřeba počítat i s vnějšími vlivy, jako je aktuální sezóna, podmínky chovu a potrava. Přestože je popsáno velké množství nejrůznějších modifikací, mrazení spermií u kanců stále nedosahuje optimálních výsledků a skýtá velký prostor pro další pokroky. Velmi slibné jsou v tomto ohledu i některé zatím méně používané metody. Velmi studovaným je proces vitrifikace, kde rychlost ochlazení je natolik velká, že ledové krystaly v cytoplazmě se nestačí vytvořit a voda se rovnou promění v amorfní látku. Další možností je „sperm freeze drying“ což je obdoba lyofilizace proteinů. Podobně jako vitrifikace se nejedná o nikterak novou metodu. Prvním, respektive prvním dostatečně podloženým příkladem využití této metody, byly myši narozené již před 20 lety v rámci studie (Wakayama a Yanagimachi, 1998). Jak je již však uvedeno výše, manipulace se spermiemi je vysoce

variabilní a u druhů, které by byly významné i z jiného než výzkumného hlediska, se různé raritní postupy provádí jen zřídka a nelze je považovat za aktuálně využitelné.

2.2.6 Třídění spermií

V obecné rovině je možné do pojmu třídění spermií zahrnout celou řadu technik. Pro využití v ART je důležité již to nejzákladnější třídění na viabilní a neviabilní spermie. Viabilita spermií se dá poměrně dobře rozpoznat podle jejich motility, ačkoli ne všechny spermie, které jsou nehybné, vykazují i další znaky závažného poškození, jako například porušenou plazmatickou membránu. Jednoduchý postup oddělení pohyblivých spermií je swim-up test. Můžeme ho realizovat v několika podobách. Spermie můžeme nechat sedimentovat na dno zkumavky pomocí centrifugace, vzniklou peletu nechat pár desítek minut inkubovat a poté odebrat supernatant, ve kterém se již budou vyskytovat pouze motilní spermie. Obdobou tohoto postupu je vytvořit jakési bludiště ve tvaru písmene H z média, poté do jednoho konce přidat malé množství spermiové suspenze a po krátké inkubaci odebrat spermie z opačného konce na druhé straně bludiště. Tímto postupem však můžeme získat pouze malé množství spermií, které je dostatečné například pro oplození pomocí ICSI, ale není dostatečné pro klasické IVF (*in vitro* fertilization).

Rozdělení spermií podle vznášivé hustoty je další možností. Základem je centrifugace ve zkumavce s vrstveným médiem s různou hustotou, kde spodní vrstva média bude mít právě takovou hustotu, aby intaktní spermie byly těžší. Spermie, které mají plazmatickou membránu porušenou, se ve velké míře odseparují ve vrchních vrstvách o nižší hustotě. Pro tyto účely izopyktnické separace můžeme použít média s koloidními částicemi oxidu křemičitého (Percoll) nebo některých polysacharidů (Ficoll), případně některé z mnoha dalších komerčně dostupných medií (Mortimer, 2000).

Poměrně náročnou metodou separace spermií je použití průtokové cytometrie, která se díky snižujícím se nákladům dnes využívá výrazně častěji. Průtoková cytometrie se dříve používala pouze k analýze buněk, včetně spermií, jelikož je díky ní možné ve velmi krátkém čase prověřit obrovské množství buněk a díky využití cytometrů s několika lasery může být testováno mnoho parametrů. Nejmodernější (image-based) cytometry jsou již navíc schopné rozlišit místo na způsob značení na těle buňky, spermie, a nejsou odkázány jen na celkovou intenzitu fluorescenčního signálu. FACS (fluorescence-activated cell sorting) je dnes využíván v ART hlavně pro možnost určení pohlaví budoucích jedinců. Jelikož X a Y chromozomy mají značně odlišnou velikost, je možné z celkového objemu DNA v hlavičce určit, který z nich daná spermie obsahuje, roztřídit je a použít k umělému

oplození (Johnson et al., 1987). Tato metoda se dnes již poměrně běžně používá pro reprodukci hospodářských zvířat, jelikož tam má značné přínosy. Například u prasat je výhodné chovat samice kvůli větším přírůstkům svalové hmoty i kvůli možnosti omezení kastrací kanců. První selata se díky této metodě narodila v roce 1991 (Johnson, 1991). U skotu poté záleží na typu chovu, pokud se jedná o chov udržovaný pro produkci mléka, je samozřejmě výhodné opět selektovat samice, ale u masných plemen je zase vyšší poptávka po býcích z důvodu vyšších přírůstků. Třídění pomocí FACS má však jisté omezení, co se týče rychlosti, přičemž moderní sortery zvládnou roztrždit přes 200×10^6 spermií za hodinu. Tato rychlost je naprosto dostatečná pro oplození u skotu, ale u prasete je na minimální inseminační dávku pro jednu samici zapotřebí až desetinásobné množství (Rath et al., 2015). Nemůžeme také opomenout další již zmiňovaný problém u prasete, kterým je velká variabilita odolnosti spermií mezi jedinci; navíc u některých z nich nejsou rozdíly mezi spermiemi nesoucími X nebo Y chromozom vůbec patrné, což se týká asi 15 % kanců v rámci studie (Alkmin et al., 2014).

Použití sortování spermií podle pohlaví u lidí se příliš neprovádí. V mnoha zemích, včetně ČR, není dovoleno zákonem určit si pohlaví dítěte, mimo výjimek založených na riziku genetických poruch nebo geneticky podmíněných chorob vázaných na pohlavní chromozomy. V těchto případech se však častěji používá metoda preimplantační diagnostiky blastocysty a poté se implantují ty, které mají požadovaný genotyp. To ovšem vyžaduje vždy oplození pomocí konvenčního IVF nebo pomocí ICSI. Existují však i centra asistované reprodukce (The Genetics & IVF Institute, Fairfax, Virginie), kde je možné použít FACS na třídění mužských spermií a ty poté použít opět pro IVF nebo ICSI, ale dokonce i pro intrauterinní inseminaci, což je metoda pro ženy daleko šetrnější. Další zvláštností je, že je možné tuto metodu podstoupit i v rámci programu „family balancing“, tedy je možné si zvolit pohlaví druhého nebo dalšího dítěte v závislosti na pohlaví vašeho již narozeného potomka (Karabinus et al., 2014), a to i přesto, že u použití značení spermií, které jsou později určeny pro oplození, nejsou zcela jasně vyloučena případná rizika v podobě genetických nebo epigenetických abnormalit.

Průtokový cytometr se tedy dá použít na rozdělení spermií podle kteréhokoli znaku, který je možné vizualizovat pomocí fluorescence. Nejde tedy jen o obsah jaderné DNA, ale je možné využít značení specifickou protilátkou, která se může vázat na povrchové proteiny, a tím získat kritéria pro následnou selekci. Právě tímto způsobem byly selektovány spermie podle množství extracelulárního Ub, které jsme poté použili na oplození pomocí

ICSI. Jsou známé i další povrchové markery, které se dají využít nejen pro analýzu kvality spermatu, ale i pro třídění kvalitních spermií. Mohou jimi být již výše zmiňované lektiny konjugované s fluorescenční látkou nebo detekce PAWP (post-acrosomal sheat WW-domain binding protein), jenž koreluje se sníženou schopností oplození u skotu a u člověka (Kennedy et al., 2014; Aarabi et al., 2014). Případně je možné detekovat spermie s vázanými cytoplazmatickými kapénkami, které by se správně měly oddělit během spermiogeneze, jejich přítomnost u spermií může značit vývojové problémy spermie a je spojena s nižší schopností se vázat na epiteliální buňky vejcovodu v oviduktálním rezervoáru (Waberski et al., 2006). Ve studii (Kuster et al., 2004) se také objevuje úvaha, jestli tyto cytoplazmatické kapénky, vykazující velkou míru ubiquitinovaných proteinů, nemohou mít po oplození škodlivý vliv na vývoj embrya právě vlivem zaměření degradace na některé nezbytné organely paternálního původu.

Metodou pracující s povrchovými znaky buněk a umožňující jejich selekci je také separace pomocí magnetických částic (MACS, magnetic-activated cell sorting), na které je opět možno navázat protilátku. Buňky s odpovídajícím epitopem jsou tedy k částicím vázány a poté protékají magnetickým polem, které v koloně udrží hledané buňky a ostatní protečou dál (Bjerke et al., 1993). Tuto techniku je možné s dobrými výsledky možné použít i u spermií (Anslinger et al., 2008) a přináší výhody ve větší šetrnosti k nim. Během průchodu cytometrem dochází vlivem velkých tlaků a průchodu tryskou k poškození spermií, které se u tohoto způsobu separace nevyskytuje. U kančích spermií byla dokonce tato metoda použita přímo pro selekci na základě míry extracelulární ubiquitinace, kdy se autorům pomocí tohoto markeru podařilo odstranit defektní spermie a zlepšit tak parametry kvality výsledné suspenze (Zhang et al., 2018). Objevují se studie s možností využití této techniky v klinické praxi, které ukazují přínosy takové selekce pro pacienty, ale zatím je to jen velmi okrajová záležitost (Ziarati et al., 2018).

2.3 Maturace a stárnutí oocytů

2.3.1 Oogeneze a ovulace

Ke vzniku oocytů u savců dochází již během prenatálního vývoje. Primordiální buňky migrují do genitálních rýh a pak se uhnízdí ve vyvíjejících se vaječnicích. Poté přestanou být schopné pohybu a zahájí proliferační fázi, kdy dochází k namnožení oogonií v řádu několika milionů. V době narození nebo relativně blízko něj, v závislosti na živočišném druhu, je počet oogoniálních buněk na svém maximu a následně se snižuje s přibývajícím věkem. Tato zásoba oogonií pak musí pokrýt celý reprodukční věk. Existují i studie, které popisují výskyt oogoniálních kmenových buněk u žen a u samic některých druhů savců (White et al., 2012; Dunlop et al., 2014), ale jejich fyziologický význam není dosud uspokojivě objasněn. Možnost jejich využití v podobě možného odběru a následné diferenciaci v oogonium i následný vznik potomků byl již ověřen několika studiemi na myších (Zou et al., 2009; Pacchiarotti et al., 2010), ale stále ještě zůstává mnoho nejasností ohledně původu těchto buněk (Dunlop et al., 2014).

Po ukončení proliferační mitózy vstoupí oocyty do premeiotické fáze, kdy dojde k utlumení jejich pluripotentního potenciálu, a následně vstoupí do meiózy, u prasete 64. den fetálního vývoje. V tomto přechodu dochází k apoptóze velkého počtu oogonií a ty, které pokračují ve vývoji dál, jsou obklopeny primordiálními folikuly (Pepling, 2006). Meiotické dělení je však velmi brzy přerušeno a oocyty zůstávají v profázi prvního meiotického dělení, v diplotene. Toto stádium je také často označováno podle podoby jádra oocytu jako stádium zárodečného váčku (GV, germinal vesicle). V závislosti na druhu mohou oocyty setrávat v GV několik měsíců až desítky let, od dosažení pohlavní dospělosti do jejího ukončení nebo smrti. Jádro je rozvolněné a může v něm docházet k transkripci, ale metabolicky je jen minimálně aktivní, dokud u něj nedojde k zahájení růstové fáze. Během doby, po kterou se GV nachází v oocytu, u něj dochází k několika změnám uspořádání chromatinu. V základním rozdělení se jedná hlavně o dvě hlavní varianty, kde buď jsou (surrounded nucleolus) nebo nejsou (non-surrounded nucleolus) viditelné filamenty chromatinu kolem jádérka. Po většinu doby existence se GV nachází v konformaci, kdy chromatinová filamenta nejsou rozpoznatelná a v oocytech může docházet k transkripci. V konečné fázi růstu folikulu dochází ke vzniku těchto filament a transkripce je výrazně utlumena. U prasat se rozlišuje „non surrounded“ fáze, označovaná jako GV 0, ve které jsou oocyty v primárních folikulech a v malých sekundárních folikulech. Během dalšího růstu folikulů se pak dají rozpoznat ještě další čtyři stádia (GV I

- GV IV), která se liší tvarem filamentárního chromatinu, přítomností jadérka a v poslední fázi již absencí jaderné membrány (Motlik a Fulka, 1976; Sun et al., 2004).

Před ovulací dochází k růstu daného počtu folikulů a dochází také k růstové fázi oocytů. Folikul se postupně zvětšuje, plní folikulární tekutinou a oocyt je přidržován na jeho stěně granulózními buňkami. Objem oocytu také roste, jednak jeho vlastní aktivitou, ale také je pomocí cytoplazmatických můstků (gap junctions) propojen s kumulárními buňkami, které ho těsně obklopují v několika vrstvách (buňky nejbližší oocytu se nazývají corona radiata) a ze kterých jsou do oocytu transportovány ionty, nukleotidy, aminokyseliny, sacharidy a mRNA, obecně látky s velikostí do přibližně 1 kDa (Sela-Abramovich et al., 2006). Tyto spoje také umožňují oboustrannou komunikaci mezi kumulárními buňkami a oocytem, která je velmi intenzivní a pokračuje i během následné maturace oocytů (Chermuła et al., 2018). Blok oocytu ve stádiu GV je řízen nízkou aktivitou MPF v cytoplazmě (M-phase Promoting Factor). Tento heterodimer je tvořen katalytickou podjednotkou CDK1 (Cyclin Dependent Kinase), která může být také označována jako p34^{cdc2}, a regulační podjednotkou, kterou je cyklin B. Společně s oocytem se na udržení oocytu v stádiu GV spolupodílí i kumulární buňky (Jones, 2004). Znovuobnovení meiózy, spuštěné náhlým zvýšením koncentrace luteinizačního hormonu, nastává snížením koncentrace cAMP a cGMP, které jsou transportovány přes cytoplazmatické můstky z kumulárních buněk do oocytu. Vysoká koncentrace cAMP zajišťuje aktivitu PKA (protein kinase A), která fosforyluje klíčové komponenty, jejichž aktivita by vedla ke zvýšení MPF. Tím udržuje oocyt v GV a brání uvolnění z 1. meiotického bloku (Russell et al., 2016). Cyklické GMP pak k tomu přispívá tím, že inhibuje hlavní fosfodiesterázu (PDE3A) štěpící v oocyту cAMP (Norris et al., 2009). Další nezbytnou drahou, jejíž aktivace vede k opuštění stádia GV, je MAPK (mitogen activated protein kinase, další název je EKR – extracellular-regulated kinase) signalizační kaskáda. Tato dráha je odpovědná za kondenzaci chromatinu GV a při její inhibici není oocyt schopen znovuzahájit meiotické dělení a získat kompetenci pro oplození (Whitaker, 1996; Downs, 2010; Conti a Franciosi, 2018). ERK dráha však nefunguje pouze v samotném oocyту, ale je aktivní i v kumulárních buňkách, kde reguluje průchod výše zmíněného cGMP přes cytoplazmatické spoje mezi oocytem a kumulárními buňkami (Li a Albertini, 2013).

Při ovulaci, po skončení růstové fáze, je průměr oocytu u prasete přibližně 120 μm ; dochází k jeho uvolnění z folikulu a úplnému zastavení transkripce, která se obnoví až po reaktivaci embryonálního genomu (Gosden, 2002). Ovulace může být indukovaná

prostředím či pohlavním stykem nebo je spouštěna opakovaně vlivem estrálního cyklu (jednou až několikrát do roka) případně vlivem menstruačního cyklu, který se z estrálního cyklu vyvinul u lidí a lidoopů. Řídícím prvkem je sekrece luteinizačního hormonu (LH) a folikuly stimulujícího hormonu (FSH) z hypofýzy, ke které dochází pod vlivem gonadotropiny uvolňujícího hormonu (GnRH, gonadotropin releasing hormon) z hypotalamu. Ovulaci je možné navodit i uměle podáním těchto hormonů pomocí injekce nebo například přes nosní sliznici. Nárůst koncentrace LH je však klíčový pro uvolnění oocyty z prvního meiotického bloku, ačkoli v *in vitro* podmínkách je možné obnovit meiotické dělení již izolací z folikulární tekutiny a odstraněním kumulárních buněk.

2.3.1.1 Maturace jádra

Po rozpadu zárodečného váčku (GVBD, germinal vesicle breakdown) následně dochází ke kondenzaci chromozomů (prometafáze I), crossing overu a seřazení chromozomů na dělicí vřetenko (metafáze I). Doba, která je potřebná pro přechod ze stádia GV do metafáze I, je druhově poměrně variabilní a oocyty prasete potřebují na tuto změnu od 16 do 24 hodin po izolaci z folikulu (Motlik a Fulka, 1976; Dieci et al., 2013). Maturace jádra začíná poslední částí profáze 1. meiotického dělení, kterou je diakineze. Musí dojít ke správnému sestavení dělicího vřetenka, které je vytvářeno na základě mnoha desítek MTOC (microtubule organizing center) nahrazujících centrioly, jež oocyt ztrácí v časně oogenezi (Szollosi et al., 1972). Tato organizační centra jsou během stádia GV volně rozptýlena v cytoplazmě a po GVBD dochází k jejich nahloučení ve středu oocyty. Poté dojde k utvoření kulovité struktury propojené s bivalenty homologních chromozomů a nukleaci mikrotubulů, které vytvoří dělicí vřetenko (Schuh a Ellenberg, 2007). Precizní uspořádání na dělicím vřetenku vede ke stabilizaci jeho vláken a poté k inaktivaci SAC (spindle assembly checkpoint), známé také jako mitotický kontrolní bod M-fáze buněčného cyklu. Průchod tímto kontrolním mechanismem se projeví aktivitou APC/C (anaphase promoting complex/cyclosome) a degradací cyklinu B, což vede ke spuštění anafáze (Lara-Gonzalez et al., 2012).

Dělicí vřetenko zároveň migruje k okraji oocyty, kde dojde k asymetrickému dělení a vyloučení prvního pólového tělíska (1. PB), které obsahuje jen minimum cytoplazmy (Maro a Verlhac, 2002). Vzniká tím sekundární oocyt, u něž probíhá vývoj do stádia metafáze II (MII, metafáze II. meiotického dělení). V rámci druhého meiotického dělení již však nedochází k replikaci DNA, což vede k redukci počtu chromozomů. Savčí oocyty jsou pak v metafázi udržovány pomocí aktivního CSF (cytostatic factor), který dále

udržuje aktivní MPF, tím brání dokončení dělení v anafázi, a udržuje spolu s dalšími faktory aktivní MAPK. Aktivita MAPK hraje roli jednak v charakteru II. meiotického dělení (chybějící S-fáze) a společně s MPF spoluvytváří blok v MII (Whitaker, 1996).

V tomto stádiu oocyt zůstává až do vstupu spermie nebo do případné partenogenetické aktivace.

2.3.1.2 Maturace cytoplazmy

Současně s meiotickým dělením dochází k maturaci cytoplazmy oocytu. Ta prodělává rozsáhlé změny, které zahrnují přesun organel v cytoplazmě oocytu, přestavbu cytoskeletu a přípravu mRNA a proteinů, které budou využity do doby reaktivace embryonálního genomu (Ferreira et al., 2009; Conti a Franciosi, 2018).

V rámci redistribuce organel se mění rozložení mitochondrií v oocytu. Nejprve dochází k rozptýlení mitochondrií z okrajových částí cytoplazmy do celého jejího objemu, ale před dosažením MII se mitochondrie, společně s tukovými granuly v cytoplazmě, seskupí kolem centra oocytu. Počet mitochondrií, který velmi dramaticky vzroste v průběhu růstové fáze (Cotterill et al., 2013), se během maturace oocytu již nemění a spíše je regulována jejich aktivita (Van Blerkom, 2011). V průběhu maturace mitochondrie syntetizují ATP, které pokrývá energetickou spotřebu pramenící z poměrně intenzivní translace mRNA naakumulované v cytoplazmě, z celkové reorganizace oocytu a metabolické aktivity (Ferreira et al., 2009). Po oplození a před reaktivací embryonálního genomu jsou mitochondrie již jen středně aktivní, patrně v rámci ochrany před působením ROS v této fázi, a po reaktivaci embryonálního genomu jejich aktivita opět klesá, jelikož embryonální buňky již mohou více využívat další metabolické cesty jako anaerobní glykolýzu k získávání energie (Tarazona et al., 2006).

2.3.2 Stárnutí oocytu (Ageing)

Tímto termínem se v literatuře běžně označují dva velmi odlišné děje. Velké množství studií se dnes věnuje stárnutí oocytů z pohledu humánní medicíny a aktuálního problému vyššího věku žen při otěhotnění (Cimadomo et al., 2018). Oocyty musí přečkat ve vaječnicích delší dobu, a to se odráží v jejich horší kondici, nižší meiotické kompetenci, mitochondriálních dysfunkcích, vyšší šanci aneuploidii a epigenetických změnách, které mohou být přenášeny i do další generace (Ge et al., 2015). V užším významu se termín stárnutí oocytů používá pro post-ovulační vývoj oocytu, který nejprve zahrnuje jeho řádnou maturaci a meiotický vývoj do MII, ale postupně přechází do procesu, který má

poškozující účinky na oocyt, snižuje možnost oplození, a nakonec vede k jeho destrukci (Miao et al., 2009).

Po ukončení maturace je oocyt zastaven v II. meiotickém bloku až do oplození, ale stále v něm probíhá mnoho procesů, které jsou nezvratné a postupně vedou ke snižování kompetence oocytu pro oplození až do stádia, kdy oplození není možné. Časové okno, ve kterém je oocyt schopen oplození, je opět druhově velmi specifické a souvisí s fyziologií daného druhu, navíc v *in vitro* podmínkách je tato doba ještě zkrácena. V pohlavním traktu prasnice může dojít k oplození v rozmezí 12-24 hodin po ovulaci. Pokud k němu během této doby nedojde, oocyt zaniká (Hunter, 1981). Stárnutí oocytů zahrnuje mnoho funkčních a strukturálních změn a jejich následkem dochází k fragmentaci nebo lýzi oocytů, případně může dojít k partenogenetické aktivaci (Krejčova et al., 2015), která však u savců nemůže vést k novému jedinci, a to hlavně kvůli odlišnému genovému imprintingu jádra oocytů a spermií.

U vnějšího glykoproteinového obalu oocytu, *zony pellucidy* (ZP), dochází vlivem stárnutí k jejímu „hardeningu“, který je již dlouho považován za jasný ukazatel stárnutí (Drobnis et al., 1988; Fukuda et al., 1992). Jde o vytvoření pevné struktury glykoproteinových agregátů neprostupné pro spermie, k němuž dochází přirozeně po oplození v rámci prevence polyspermiálního oplození. U stárnoucích oocytů však může nastávat i před průnikem první spermie, což vede ke znemožnění oplození (Gulyas a Yuan, 1985; Miao et al., 2005).

Změny jsou patrné i u plazmatické membrány oocytu, kde dochází k nestejnomyšernému rozložení mikrovilli, které se během stárnutí prodlužují dále do perivitelinního prostoru mezi plazmatickou membránou ZP, jenž se s postupem stárnutí průběžně rozšiřuje (Miao et al., 2009).

Hned pod plazmatickou membránou se nacházejí kortikální granula, která vlivem stárnutí mohou být částečně nebo úplně exocytována. Exocytóza kortikálních granul po oplození vede k pomalému bloku polyspermiálního oplození vyvoláním změn v ZP (Goud et al., 2005).

Stárnutím dochází k poškození dělicího vřeténka, jehož stav je ovšem určující pro správné dokončení meiotického dělení a úspěšné oplození. U oocytu čekajícího na oplození je dělicí vřeténko umístěno těsně pod plazmatickou membránou v orientaci kolmé k membráně (Hoshino, 2018). Část dělicího vřeténka, která bude vyloučena do 2. PB, je

menší než část zůstávající v cytoplazmě a okolo obou pólů je jen minimum astrálních mikrotubulů (Sun a Schatten, 2007). Po příliš dlouhém stárnutí oocyty dochází ke zkrácení dělicího vřeténka a začíná docházet k rozpadu jeho pólů, které vznikly spojením MTOC. Tím se může vytvořit dělicí vřeténko, které je multipolární a není již schopno se korektně rozdělit. Vzniká též větší množství astrálních mikrotubulů, které směřují do cytoplazmy v centru oocyty, kde jsou však zase rychle depolymerizovány (Goud et al., 2005). Dochází také k problémům napojení chromozomů na kinetochory a poklesu obsahu proteinů, které jsou nezbytné pro udržení rovnoměrného rozmístění chromozomů na dělicím vřeténku, např. centromerní proteiny CENPA, CENPB a další (Ma et al., 2005). Stejně tak jsou degradovány proteiny kontrolující defekty dělicího vřeténka Mad2 (mitotic arrest-deficient protein 2) a dyneiny, které jsou nezbytné pro rozchod chromozomů (Hoffman et al., 2001). Tyto a další problémy vedou z počátku ke vzniku aneuploidií po oddělení 2. PB, při dlouhodobějším stárnutí se chromozomy samovolně rozcházejí od centrální roviny dělicího vřeténka, dekondenzují a zanikají (Miao et al., 2009). Jádro oocyty je postiženo i epigenetickými změnami, které vedou ke změnám metylace DNA imprintovaných genů a acetylaci histonů, ovšem mechanismus těchto změn a jejich význam pro následující generaci není zcela objasněn (Cui et al., 2011; Ge et al., 2015).

Stárnutí se v MII-fázi netýká pouze oocyty, ale i 1. PB, což v jistém slova smyslu je sesterská buňka oocyty. Tyto změny se navíc v 1. PB projevují dříve než v samotném oocyty, takže morfologii 1. PB můžeme použít jako marker kvality a může nám napovědět něco o stavu oocyty, což je výhodné při selekci oocytů před použitím ART. Pokud je 1. PB jasně ohraničené a intaktní, je vyšší pravděpodobnost oplození i následného správného vývoje embrya (Ebner et al., 2002). Také se v průběhu stárnutí mění jeho vzdálenost od jádra, což je důležitý aspekt u oplození pomocí ICSI. Při injikaci spermie nesmí být kapilárou poškozen dělicí aparát oocyty a pro orientaci se používá právě 1. PB, což podrobně popisuje kapitola 5.12. V případě oddálení 1. PB je následně vyšší šance nesprávné orientace oocyty při injikaci, což může vést k selhání oplození (Miao et al., 2004).

Mitochondrie v průběhu stárnutí oocyty snižují svou aktivitu, dochází k narušení jejich membrány a poklesu membránového potenciálu. Mitochondrie se během stárnutí oocyty přeskupují a vytváří agregace v cytoplazmě (Wilding et al., 2001; Ma et al., 2005). V průběhu maturace, jak již bylo zmíněno, dochází k posunu využití metabolických drah

od glykolýzy k oxidativní fosforylaci, takže během ní jsou mitochondrie hlavním zdrojem energie v podobě ATP. Narušení jejich morfologie a činnosti tak vede k poklesu ATP v cytoplazmě, což rovněž vede k snížené nebo nulové kompetenci oocyty pro oplození (Chappel, 2013). Dalším problémem porušení struktury mitochondrií je obsah proapoptotických faktorů v jejich matrix, které se fragmentací mitochondrií uvolňují do cytoplazmy, společně s cytochromem c; to vede ke spuštění kaspázové signální kaskády vedoucí k apoptóze. Tento proces je navíc během stárnutí doprovázen poklesem antiapoptotického Bcl-2, který v normálních oocytech uvolnění cytochromu c brání (Kluck et al., 1997; Cory a Adams, 2002).

2.3.3 Potlačení stárnutí oocytů

Výzkumem možností potlačení vlivu post ovulačního stárnutí se již zabývala řada studií a jejich pozornost se zaměřuje dvěma hlavními směry. První možností je minimalizace poškození způsobeného během dlouhotrvající maturace, které pochází hlavně z nedostatku ATP a působení ROS, a v důsledku vede k apoptóze nebo lýzi oocyty. Druhý typ přístupu se zaměřuje na podporu 2. meiotického bloku a udržení vysoké aktivity MPF a MAPK, což prodlouží dobu, během které může dojít k oplození, oddálí některé z maturačních změn a případnou partenogenetickou aktivaci, apoptózu nebo lýzi oocyty.

Největší část poškození během stárnutí oocytů způsobuje oxidativní stres (Ferreira et al., 2009; Liang et al., 2017) a předpokládá se, že vyrovnaný poměr mezi ROS a antioxidanty je klíčový pro mnoho buněčných dějů, včetně rozchodu chromozomů (Huang et al., 2010), tvorbu dělicího vřeténka (Rajani et al., 2012), metylaci DNA (Heinzmann et al., 2015) a funkci mitochondrií (Lord a Aitken, 2013). K produkci ROS dochází převážně právě v mitochondriích a v průběhu stárnutí oocyty postupně dochází k úbytku buněčných antioxidantů, což u prasečích oocytů je hlavně glutation, společně se superoxid dismutázou a katalázou (Cetica et al., 2001). Ty by měly ROS likvidovat, a při jejich nedostatku dochází k poškození jak samotných mitochondrií, tak dalších buněčných komponent. Naopak dodání antioxidantů dokáže oxidativnímu stresu bránit (Balao da Silva et al., 2013; Truong et al., 2016). Látky, které je možné přidávat k oocytům během maturace a stárnutí, jsou například acetyl-L-karnitin, N-acetyl-L-cystein, melatonin a kyselina α -lipoová (Truong et al., 2016).

Negativní účinky stárnutí na oocyt může také pomáhat redukovat aktivace sirtuinů (silent information regulator proteins). Sirtuiny jsou skupinou NAD^+ -dependentních deacetyláz, tedy enzymů využívajících NAD^+ k odstranění acetylových skupin z proteinu.

Tyto enzymy mají důležitou úlohu v mnoha dějích, které jsou spojené s ochranou buněk proti stárnutí v obecném smyslu, a se stárnutím buněk a tkání dochází k jejich poklesu (Lafontaine-Lacasse et al., 2010; Donato et al., 2011), navíc podle rostoucího počtu studií, které zkoumají jejich význam, se přímo nebo zprostředkovaně podílí na téměř všech buněčných procesech. U savců je zatím známo sedm zástupců této rodiny a stále pokračuje jejich intenzivní výzkum v rámci civilizačních chorob (Zhou et al., 2018), reakce buněk na zvýšený oxidativní stres (Singh et al., 2018), funkce imunitního systému (Ghirotto et al., 2019), nebo kmenových buněk a epigenetiky (Nevoral et al., 2015; Fang et al., 2019). U oocytů je velmi zajímavá jejich úloha ve vypořádání se stárnutím a oxidativním stresem poté, co byly prasečí oocyty maturovány v médiu obsahujícím resveratrol (Ma et al., 2015) nebo melatonin (Yang et al., 2018), což jsou aktivátory SIRT1. Ke snížení účinků stárnutí mohou sirtuiny (SIRT1, 2, 3) přispívat více způsoby, jednak regulují aktivitu mitochondrií a vstup do apoptózy, ale mají i aktivační vliv, pomocí deacetylace histonů, na FOXO3a0 (forkhead box O 3a), což je transkripční aktivátor genu pro MnSOD (manganese superoxide dismutase) (Wang et al., 2007; Di Emidio et al., 2014; Zhang et al., 2016). SIRT 1 má i další zásadní funkci: modifikuje histony přímou deacetylací i přes další nepřímé regulace a pomáhá při ustanovení histonového kódu po oplození a v časném embryu (Nevoral et al., 2015). Na druhou stranu inhibice jiných deacetyláz, pomocí trichostatinu A, který nemá vliv na sirtuiny, je další možností pro zlepšení stavu stárnoucích oocytů (Ješeta et al., 2008). Také byl již prokázán pozitivní vliv sirtuinů na ochranu před zlomy DNA a jejich opravu, na gametogenezi a časný embryonální vývoj (Haigis a Guarente, 2006). Expresi SIRT1 je možné zvýšit uměle i v *in vivo* podmínkách pomocí podání resveratrolu. U myši byl injikován intraperitoneálně a následně izolované oocyty vykazovaly nižší obsah ROS během post ovulačního stárnutí (Liang et al., 2018), což otevírá nové terapeutické možnosti nejen v souvislosti s ART, ale i jako doplněk při přirozeném oplození.

K potlačení stárnutí pomocí zvýšení aktivity MPF v oocytu je možné využít působení kofeinu, který je inhibitorem Wee1/Myt1. Tato tyrozin kináza ovlivňuje bilanci aktivní a inaktivní formy MPF inhibiční fosforylací katalytické podjednotky CDK1 na treoninu 14 a tyrozinu 15. Tato inaktivní forma se poté označuje jako pre-MPF. Zpětný převod na aktivní formu je poté zajišťován defosforylací zmíněných míst vlivem CDC25 (Jones, 2004). Stárnoucí oocyty inkubované v médiu s kofeinem tedy vykazují nižší podíl inaktivní, fosforylované, formy pre-MPF a vykazují vyšší kompetenci pro oplození a následný vývoj. Je však možné docílit i opačného efektu při inkubaci oocytů v médiu

s vanadátem, který naopak inhibuje CDC25 a tím podíl pre-MPF v cytoplazmě zvyšuje, což vede k uvolnění v MII fázi (Kikuchi et al., 2000).

V II. meiotickém bloku udržuje oocyt i aktivita MAPK (Whitaker, 1996) a vlivem stárnutí dochází ke snižování její aktivity. To může vést ke spuštění partenogenetické aktivace nebo apoptózy (fragmentace) oocytu. MAPK je klíčová pro aktivaci MPF (Dupré et al., 2011), ale po zastavení vývoje oocytu v MII fázi dochází naopak k poklesu její aktivity v návaznosti na snížení aktivity MPF, jen její pokles je pomalejší (Lee a Campbell, 2008). Zvýšení aktivity MAPK je možné vyvolat přímým ovlivněním nebo regulací Mos. Mos je serin/treonin kináza regulující přes MEK aktivitu MAPK, jedná se tak vlastně o kinázu kinázy fosforylující a aktivující MAPK. Případně se tedy MEK se dá označit jako MAPKK a Mos se může označovat jako MAPKKK (MAPK kinase kinase) a (Dupré et al., 2011).

Stárnutí oocytů může být také do jisté míry zvráceno pomocí transplantace cytoplazmy z nestárnoucích oocytů, při které jde hlavně o dodání nových nepoškozených mitochondrií a dalších buněčných komponent, jako například mRNA pro antiapoptotický Bcl-2. Přidání čerstvých mitochondrií z nestárnoucích oocytů vede ke zvýšení šance na oplození oocytu a na správný embryonální vývoj (Miao et al., 2009). Tato metoda může být také použita jako klinická terapie oocytů, které jsou stárnoucí v tom obecnějším slova smyslu, čili pocházejí od žen v pokročilém věku (Kristensen et al., 2017).

2.3.4 Gasotransmitery

Velmi účinným způsobem, jak ovlivnit stárnutí oocytů, je ovlivnění pomocí plyných hormonů, gasotransmiterů, NO, CO a H₂S. Tyto malé molekuly mohou volně procházet přes plazmatickou membránu buněk, ovlivňují specifické cílové molekuly a spouští signalizační dráhy v mnoha typech buněk včetně oocytů a kumulárních buněk (Jablonka-Shariff a Olson, 1998; Nevorál et al., 2016; Němeček et al., 2017).

Nejlépe prostudovaným zástupcem gasotransmiterů je oxid dusnatý, u kterého je popsána regulace folikulogeneze, oogeneze i embryogeneze (Jablonka-Shariff a Olson, 1997). Jeho tvorbu v buňkách zajišťuje enzym NOS (nitric oxid synthase), který katalyzuje štěpení L-argininu. NOS se u savců vyskytuje ve třech různých izoformách, jsou jimi nNOS (neural NOS), eNOS (endothelial NOS) a iNOS (inducible NOS), která může vytvářet až několiksetkrát větší množství NO než první dvě a může být regulována cytokiny nebo případně endotoxiny. Přítomnost všech tří izoform pak byla prokázána v cytoplazmě oocytu, kde ovšem vlivem stárnutí oocytu dochází k poklesu jejich množství

(Chmelíková et al., 2010; Nevoral et al., 2013). Signalizace pomocí NO se podílí na vyvolání ovulace oocytů a jejich následné maturaci, ale toto působení je závislé na jeho koncentraci v cytoplazmě a při vysokých koncentracích již inhibuje maturaci oocytů i případný embryonální vývoj (Bu et al., 2003). Mechanismů působení NOS na buňku je několik. Aktivuje činnost guanylát cyklázy a tím se podílí na zvýšení koncentrace cGMP v cytoplazmě, což u oocytů opět posiluje udržení v MII fázi, zpomalení stárnutí a prodloužení času, během kterého je oocyt kompetentní k oplození (Goud et al., 2008). V jeho přítomnosti také může docházet k posttranslačním modifikacím proteinů s-nitrosylací a tím NO dále ovlivňuje mnoho buněčných dějů včetně maturace oocytů a jejich oplození (Zhang a Hogg, 2005; Romero-Aguirregomezcorta et al., 2014). S-nitrosylace byla již popsána u několika klíčových enzymů v cytoplazmě oocytu, jako APC/C, Wee1/Myt1 a CDC25 (Nevalor et al., 2014).

Podobně důležitým regulátorem mnoha fyziologických dějů se, podobně jako NO, zda být i sulfan (H_2S), který vzniká endogenně v savcích tkání štěpením L-cysteinu (Stipanuk a Beck, 1982) a je rovněž řazen mezi gasotransmitery (Abe a Kimura, 1996). Tvorbu sulfanu zajišťují tři enzymy, které se liší mírou své exprese v jednotlivých tkáních i mechanismem syntézy, jedná se o cystathionin- β -syntázu (CBS), cystathionin- γ -lyázu (CSE) a 3-merkaptopyruvat sulfurtransferázu (3-MPST) (Kamoun, 2004).

Opět se jedná o malou molekulu, která difuzí prostupuje přes plazmatickou membránu buněk, i když v porovnání s NO přece jenom hůře, a její působení je realizováno především vlivem sulfhydratace proteinů, což je další z posttranslační modifikací (Mustafa et al., 2009).

Expresí enzymů, které H_2S vytvářejí, byla již popsána v mnoha tkáních (játra, ledviny, hladká svalovina), kde je tvořen hlavně pomocí CBS, v mozku, kde jej vytváří CSE, a v srdeční svalovině, kde vzniká vlivem 3-MPST (Kamoun, 2004). Produkci ve folikulech zajišťuje CBS (Liang et al., 2007).

Regulace pomocí H_2S se uplatňuje především v mozkové tkáni, kde je i jeho nejvyšší koncentrace. V mozku sulfan působí na NMDA (N-methyl-D-aspartate) receptory a ovlivňuje dlouhodobou potenciaci neuronů, což představuje mechanismus posilující synaptické přenosy a podílející se na vytváření paměťových stop (Abe a Kimura, 1996). Také může regulovat komunikaci mezi astrocyty a neurony pomocí ovlivnění Ca^{2+} kanálů a tvorbě specifických vápníkových oscilací (Nagai et al., 2004). Přes kanály Ca^{2+} funguje

i signalizace H_2S v hladké svalovině (Dunn et al., 2016) a v srdeční svalovině (Donnarumma et al., 2017), kde způsobuje vasodilataci. K tomu se ještě přidává vliv sulfanu na ATP-dependentní kanály pro K^+ ionty, které otevírá a umožňuje tak membránovou hyperpolarizaci (Zhao et al., 2001). Vysoká aktivita kanálů pro K^+ ionty je přitom popsána jako charakteristická pro neoplozené oocyty a obecně jsou tyto kanály považovány za důležité v rámci regulace buněčného cyklu, ačkoli informace o jejich přesném vlivu jsou zatím nedostatečně prozkoumány (Day et al., 1993; Urrego et al., 2014).

Jeho účinek na maturaci oocytů také nebyl ještě přesně popsán, ale opět by mohlo jít o modulaci aktivity MAPK (Li et al., 2011) a iontových kanálů pro Ca^{2+} typu L (Long lasting) a K^+ , čemuž nasvědčují i výsledky experimentů, na jejichž publikaci jsem se spolupodílel (Nevoral et al., 2018). Byl také popsán pozitivní vliv na stárnutí oocytů v případě, že byly oocyty inkubovány v médiu s donorem sulfanu, Na_2S (Krejčova et al., 2015). Tento vliv by mohl být velmi prospěšný, jak v základním výzkumu, tak v klinické praxi. Konkrétně při oplození metodou ICSI je značný problém se zajištěním injikace spermií do oocytů v časovém okně, které je optimální pro oplození. Prodloužení tohoto okna by mohlo vést k vyšším počtům oocytů/embryí v experimentálních skupinách. To by značně zpřesnilo výsledky studií, jelikož zvláště u pokusů na prasečím modelu je velký problém s kolísající kvalitou spermií i oocytů mezi jednotlivými opakováními. V humánní medicíně by zase mohl být přínos prodloužené optimální doby pro oplození v pozdržení oplození o několik hodin, kdy je větší pravděpodobnost, že všechny oocyty, u kterých se oplození provádí, jsou opravdu kompetentní k přijetí spermie. V dnešní praxi se totiž může stávat, že oocyty sice mají viditelné 1. PB, ale ještě v čase, kdy se oplození běžně provádí, nejsou ještě připraveny na oplození v MII fázi. Přitom tyto oocyty jsou při delší maturaci schopny vytvořit vyvíjející se embryo (Holubcová et al., 2019).

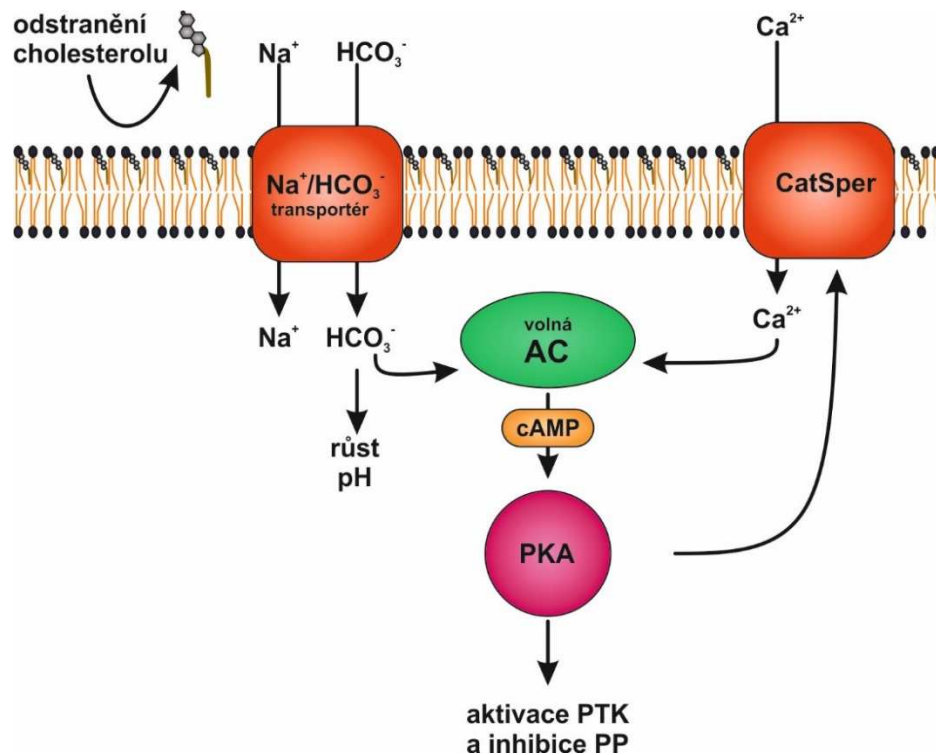
Oxid uhelnatý (CO) je dalším z gasotransmitterů a jeho regulaci zajišťuje hemoxygenáza. Jedná se o enzym, který štěpí hem, součást hemoglobinu, a rozkládá ho na biliverdin, ionty železa a právě CO. Tato signalizace může modulovat apoptotické děje v mnoha typech somatických buněk a přes různé signalizační dráhy (Petrache et al., 2000; Brouard et al., 2000). Ačkoli je vliv CO přímo na oocyty je zatím velmi málo prozkoumán, existují již důkazy o tom, že kultivace oocytů v médiích s donory CO vede ke snížení účinků proapoptotických faktorů a stárnutí na oocyt (Němeček et al., 2017).

2.4 Oplození

2.4.1 Kapacitace spermií

Bezprostředně po ejakulaci nejsou spermie schopné oplození a teprve při průchodu pohlavním traktem se stávají kompetentními ke sledování správného směru k oocytu, k průniku přes kumulární buňky, přes ZP i k vlastní fúzi s oocytem. Souhrn těchto změn označovaný jako kapacitace je většinou spouštěn specifickými podmínkami pohlavního traktu samice, ale může se spustit i spontánně nebo arteficiálně. Jde o nezbytný proces pro přirozené oplození i pro téměř všechny formy umělého oplození. Kapacitaci je potřeba navodit i v případě oplození pomocí ICSI, kde sice není potřeba žádný z výše zmíněných dějů, ale i přesto dochází k výraznému vylepšení úspěšnosti oplození a dalšího vývoje než v případě, kdy kapacitace není navozena.

Kapacitace je v *in vivo* podmínkách spouštěna hlavně faktory v prostředí samičího pohlavního traktu. Je to jednak značná koncentrace proteinu albuminu, který funguje jako receptor pro cholesterol v membráně a zajišťuje jeho odstranění. Tím dojde i ke změnám v rozložení některých komponent plazmatické membrány spermie ($\text{Na}^+/\text{HCO}_3^-$ transportéru, CatSper) a ke změně její fluidity, čímž je usnadněna akrozomální reakce i následná fúze s membránou oocytu (Signorelli et al., 2012). Díky uvolnění cholesterolu z membrány dojde také k disociaci dekapacitačních faktorů, které inhibují Ca^{2+} -ATPázovou aktivitu kanálu CatSper (Adeoya-Osiguwa a Fraser, 1996), a dalších proteinů, které blokují vazbu na ZP. Další důležitý faktor je vysoká koncentrace Ca^{2+} a HCO_3^- , které pomocí specifických přenašečů vstupují do buňky. Přesun iontů HCO_3^- do spermie vede k jejich vazbě na volnou adenylátcyklázu (AC). Tím je umožněna tvorba cAMP, který spouští influx iontů Na^+ . To se následně projeví zvýšením vnitřního pH, které hraje důležitou roli pro další vstup vápenatých iontů do cytoplasmy. Díky hyperpolarizaci membránového potenciálu také dochází k vtoku vápenatých iontů, které zpětně udržují v činnosti AC. Tím je umožněna další produkce cAMP, který již působí jako druhý posel a spouští dráhu vedoucí ke zvýšení aktivity tyrozinových kináz, inhibici fosfatáz (Obr. 6) a následně k hypermobilitě spermie a umožnění akrozomální reakce (Navarro et al., 2008; Signorelli et al., 2012). Následně dojde k fosforylaci mnoha proteinů, včetně proteinu Izumo, který je považován za klíčový pro fúzi spermie a oocytu a následně putuje na povrch membrány hlavičky, nebo dalších proteinů bičíku ovlivňujících právě hyperaktivaci.



Obrázek 6: Schéma hlavních dějů vedoucích ke kapacitaci spermie. Po ejakulaci dochází k odstranění cholesterolu z membrány spermie vlivem albuminu a transportu iontů Ca^{2+} a HCO_3^- , přítomných v seminální plazmě, do cytoplazmy. Ty aktivují volnou adenylátcyklázu (AC), což vede k aktivaci protein kinázy A (PKA). PKA dále zvyšuje influx Ca^{2+} iontů, aktivuje tyrozinové kinázy (PTK) a inhibuje protein fosfatázy (PP). Tím dochází k hyperaktivaci spermie a její přípravě na oplození.

Při zvýšení motility dochází pochopitelně k růstu spotřeby kyslíku a energie. Spermie se také začne pohybovat více v lineárním směru, což je velmi dobře rozpoznatelné výše uvedeným systémem CASA. Pohyb spermii reaguje na některé podněty z okolí. Spermie se v prvních fázích orientují pomocí termotaxe, směřují k vyšší teplotě uvnitř těla samice, a pomocí rheotaxe, pohybují se proti proudu tekutiny směřující z vaječníků do dělohy (Perez-Cereales et al., 2015). V blízkosti oocyty, přibližně kolem jednoho mm, se pak začnou orientovat chemotaxicky, a to v závislosti na koncentraci progesteronu sekretovaného kumulárními buňkami (Abou-haila a Tulsiani, 2009). Celý proces navádění spermie k oocyty je u savců ještě nedostatečně prozkoumán. Každopádně hlavní úlohu v tomto procesu bude hrát aktivace Ca^{2+} kanálu CatSper, zvýšení intracelulární koncentrace Ca^{2+} a jeho navázání na calmodulin, který dále reguluje samotnou kapacitaci a hyperaktivaci, ale i orientaci spermie a její pohyb (Abou-haila a Tulsiani, 2009; Wachten et al., 2017). Také je prokázána ztráta plodnosti u myši a lidí při absenci tohoto kanálu a jeho přímá souvislost s rheotaktickým chováním spermie (Miki a Clapham, 2013; Lishko a Mannowetz, 2018).

2.4.2 Kumulární buňky

Granulózní buňky, které těsně přiléhají k oocytu, se označují jako kumulární buňky a společně s oocytem vytvářejí COC (cumulus oophorus complex), okolo kterého se v průběhu růstu folikulu vytváří folikulární tekutina. Kumulární buňky vytvářejí kolem oocytu 3-5 vrstev a jsou s oocytem propojeny cytoplazmatickými můstky, které umožňují transport malých molekul a komunikaci mezi oocytem a kumulárními buňkami, přičemž v případě, že je tato komunikace narušena, nemusí dojít ani k samotné ovulaci oocytu z folikulu (Robker et al., 2018). Již byla také zmíněna jejich úloha v maturaci oocytu a v navigaci spermie k oocytu na krátkou vzdálenost. Jejich přítomnost je nezbytná pro správný vývoj oocytu a využívá se i jako parametr pro hodnocení kvality oocytů a jejich případnou selekci po izolaci (Wang et al., 2018; Munakata et al., 2018).

Pro kompetenci oocytu k oplození je nezbytná expanze COC po ovulaci. K té dochází také vlivem nárůstu koncentrace LH a FSH, který stimuluje kumulární buňky k tvorbě proteinů, proteoglykanů a mukopolysacharidů (převážně kyseliny hyaluronové), které vytvářejí specifickou extracelulární matrix, což vede k několikanásobné expanzi objemu COC (Russell a Robker, 2007).

2.4.3 Akrozomální reakce (AR)

Exocytóza akrozomálního váčku spermie probíhá před průchodem spermie přes *zonu pellucidu*, ale mechanismus tohoto spuštění stále není zcela objasněn. Během výzkumu tohoto jevu se střídavě studie přiklání k indukci AR látkami sekretovanými kumulárními buňkami nebo k vyvolání AR vazbou spermie na ZP. Bylo prokázáno, že progesteron, který je uvolňován z kumulárních buněk, může spouštět akrozomální reakci u lidí nebo u skotu (Osman et al., 1989; Therien a Manjunath, 2003). Stejně tak bylo možné navodit AR kontaktem spermií se suspenzí mrazem lyzovaných kumulárních buněk (Hong et al., 2009). Přitom autoři této studie ještě popisují zajímavý poznatek, že kontakt s tímto lyzátem spouštěl akrozomální reakci, ale neovlivňoval motilitu spermií, ovšem při koinkubaci s hyaluronovou kyselinou tomu bylo právě naopak. Mnohé další studie (i vlastní nepublikovaná data) zase dokazují, že k AR může docházet i při umělém oplození *in vitro*, kdy se používají oocyty zbavené kumulárních buněk, a tento děj je spouštěn kontaktem se ZP; např. (Wassarman et al., 2001; Florman et al., 2008; Abouhaila a Tulsiani, 2009). Situace tak nejspíš bude taková, že kontakt se ZP sice může vyvolávat nebo alespoň urychlovat AR, ale v *in vivo* podmínkách je zahájena již předem, při kontaktu s kumulárními buňkami (Jin et al., 2011).

Ať už po spuštění jakýmkoli podnětem, je u AR zcela zásadní velké skokové zvýšení intracelulární koncentrace Ca^{2+} , po kterém se udržuje setrvale lehce zvýšená koncentrace Ca^{2+} , a zvýšení vnitřního pH (Chávez et al., 2018). Po indukci této signalizace a aktivaci dalších kaskád dojde k tvorbě fúzogenních faktorů a depolymeraci aktinu, který odděluje vnější akrozomální membránu a plazmatickou membránu spermie. Tím dojde k jejich přiblížení, ke splynutí pomocí fúzogenních faktorů. Tvoří se dočasné vezikuly, které umožňují vyhlí obsahu akrozomu do extracelulárního prostoru (Abou-haila a Tulsiani, 2009).

2.4.4 Penetrace *zony pellucidy*

Funkcí glykoproteinového obalu kolem oocyty je hlavně selektivní propouštění spermií k oocyty poté, co u nich proběhne AR, a změny ve struktuře *zony pellucidy* po vstupu první spermie brání polyspermnímu oplození, jelikož při vstupu více než jedné spermie do oocyty nemůže dojít ke správnému rýhování zygoty na dvě embryonální buňky. Dále také ZP slouží jako ochrana proti předčasnému zahnízdění embrya ve vejcovodu, jelikož embrya tento obal opouští až ve stádiu blastocysty. Průchod spermie přes ZP je umožněn proteolytickými enzymy, které byly exocytovány v rámci akrozomální reakce, a samozřejmě i aktivním pohybem spermie, který ovšem sám o sobě k průniku nestačí (Green, 1987). *Zona pellucida* je složena ze tří, případně čtyř, hlavních proteinů. Názvosloví těchto proteinů je u jednotlivých savčích druhů poněkud matoucí. U člověka se nazývají ZP1-ZP4, přičemž ZP1 je v ZP velmi málo zastoupen a ZP2 slouží jako hlavní vazebný protein pro spermie (Lefievre et al., 2004). U prasete jsou potom většinou užívány názvy ZPA, ZPB, ZPC a tyto proteiny vznikají podle ortologních genů k proteinům ZP2, ZP4, ZP3. Hlavním vazebným proteinem u prasete je však ZPB, respektive heterodimery ZPB a ZPC, které tvoří dlouhá filamenta a jsou propojeny pomocí ZPA (Goudet et al., 2008).

Vznik ZP je u různých druhů také poměrně odlišný, jelikož u některých dochází k syntéze těchto glykoproteinů výlučně oocytem, např. u myši (Qi et al., 2002), naproti tomu právě u prasete nebo také u psů jsou syntetizovány jak oocytem, tak kumulárními buňkami (Kölle et al., 1996; Blackmore et al., 2004).

2.4.5 Ubiquitinace ZP a vliv UPS

Bylo již zmíněno, že právě gamety jsou u savců jedny z buněk, u kterých byla pozorována extracelulární ubiquitinace. U spermií tedy tato značka slouží k rozpoznání méně kvalitních spermií, ale u oocytů má význam zcela jiný. Proteolytických enzymů, které se

uvolňují během AR, je velmi široké spektrum a stále není zcela jasné, jak se který z nich podílí na oplození. Dlouhou dobu byl za hlavní enzym zodpovědný za průchod spermie přes ZP považován akrozin, ale další studie ukázaly, že oplození, i když se zpožděním, je možné i při jeho inhibici nebo absenci (Baba et al., 1994). V rámci novějších výzkumů se ovšem uvažuje spíše o zapojení UPC (Zimmerman et al., 2011; Saldívar-Hernández et al., 2015), který je taktéž v akrozomálním váčku (Sutovsky et al., 2004) a jeho význam pro průchod spermie vitelinní membránou byl již popsán u sumek (Sawada et al., 2002) a ježovek (Yokota a Sawada, 2007). Ověření toho, že UPC nesený spermií je pro oplození klíčový, bylo provedeno pomocí specifického inhibitoru proteazomálního komplexu MG 132 (někdy uváděn pod jménem Z-Leu-Leu-Leu-al). Inkubace oocytů během oplození *in vitro* v médiu s tímto reverzibilním inhibitorem vede k naprostému zabránění průniku spermie přes ZP. Pomocí Western blotu byl pozorován velmi podobný profil degradace po koinkubaci proteinů ZP s izolovaným proteazomálním komplexem z akrozomu spermie, přičemž je degradován hlavně protein ZPC u prasečích oocytů (Zimmerman et al., 2011) a protein ZP4 u člověka (Saldívar-Hernández et al., 2015). Proteiny ZP jsou pak degradovány v různé míře i dalšími akrozomálními enzymy, převážně metaloproteázami a serinovými proteázami, jejichž nezbytnost není ještě zcela prozkoumána, ale je možné je inhibovat. Při těchto studiích byl pozorován další zajímavý fenomén, kdy inhibice UPC vedla nejen k zabránění průniku spermií přes ZP, ale zhoršovala i jejich schopnost vázat se na ZP, zatímco při inhibici metaloproteáz (o-fenatrolinem) a metaloproteáz (pomocí benzamidinu) nedošlo k podobnému zhoršení (Saldívar-Hernández et al., 2015). Mohlo by to však mít pouze souvislost tím, že UPC je důležitý i pro vlastní akrozomální reakci, respektive pro AR indukovanou vazbou ZP, protože vyvolání AR například pomocí ionoforu proběhne i v přítomnosti inhibitorů UPC (Morales et al., 2003; Chakravarty et al., 2008).

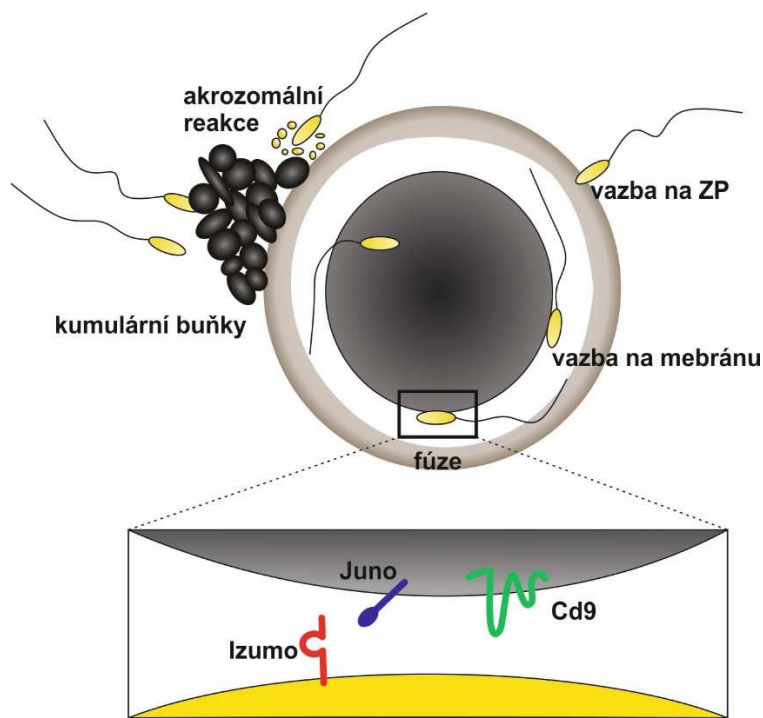
2.4.6 Fúze gamet

Splynutí gamet se u savců studuje jen s velkými obtížemi, zejména z toho důvodu, že se přirozeně odehrává v pohlavním traktu samic, což je velmi těžce dosažitelné a komplexní prostředí, které je obtížné nasimulovat v *in vitro* podmínkách. Ovšem i přes dlouholetý výzkum je tento děj stále velmi nejasný, a to hlavně z molekulárního hlediska.

Obecně přijímaný popis je, že po průniku spermie přes ZP dochází k fúzi membrány spermie v oblasti ekvatoriálního segmentu a membrány oocyty. Doposud je známo jen několik proteinů, které tuto fúzi umožňují, ale způsob, jakým k ní dojde, je teprve

předmětem studií. V současné době je však nashromážděno i velké množství dat o potenciálně důležitých součástech tohoto procesu a pomocí metod genetických manipulací je možné určovat konkrétní fenotypové problémy při oplození u myši s knock-outovanými geny pro vytipované proteiny, které by mohly být pro oplození nezbytné (Miyado et al., 2018).

Velmi zkoumaná je hlavně dvojice proteinů Izumo a Juno, u které je dokázáno, že je nezbytná pro úspěšnou fúzi spermie a oocyty (Inoue et al., 2005). Protein Izumo se po vylití akrozomálního váčku přesouvá do ekvatoriální části hlavičky spermie, ta se po penetraci ZP přibližuje v membráně oocyty perivitelinním prostorem a při kontaktu membrán je Izumo vázán folátovým receptorem Juno (Folr4) na mikrovilli membrány oocyty (Bianchi et al., 2014), jak je znázorněno na obrázku 7.



Obrázek 7: Znázornění dějů probíhajících při kontaktu spermií s oocytem. Pro oplození je nezbytných několik kroků; spuštění akrozomální reakce, vazba spermie na *zonu pellucidu* a její penetrace, vazba spermie na membránu spermie. Posledním krokem je fúze membrány spermie a oocyty, pro zahájení fúze je nezbytná interakce proteinu Izumo na spermii a jeho receptoru Juno na oolemě. Podstatným se zdá být i protein Cd9 patřící mezi tetraspaniny, ale jeho přesná funkce není zcela objasněna.

Vazba těchto dvou proteinů je sice naprosto esenciální pro úspěšnou fúzi, ale sama o sobě není dostatečná a patrně bezprostředně po vazbě dochází k dimerizaci proteinů Juno a aktivaci zatím neidentifikovaných fúzogenních faktorů (Inoue et al., 2015). Dalším důležitým proteinem je Cd9 patřící mezi tetraspaniny, které se obecně uplatňují v buněčné adhezi, migraci buněk a jejich komunikaci. O jeho působení existuje několik různých

teorií, ale opět se uvažuje spíše o roli v rámci adheze spermií k oocytu než o samotném zajištění vlastní fúze (Klinovska et al., 2014; Miyado et al., 2018). Po fúzi membrán dochází k inkorporaci celé spermie do cytoplazmy oocytu. Zároveň však se i po fúzi část membrány spermie dostane do cytoplazmy oocytu, kde je i po oplození rozpoznatelná (Satouh et al., 2012).

2.4.7 Aktivace oocytu

Po průniku spermie přes ZP a fúzi membrán dochází k aktivaci oocytu pomocí faktorů uvolněných z cytoplazmy spermie a označovaných jako SOAF (sperm-borne oocyte activating factor). Za nejpodstatnější z těchto faktorů je považována fosfolipáza C- ζ (PLC- ζ) (Fujimoto et al., 2004; Satouh a Ikawa, 2018), která následně štěpí fosfatidylinositol-4,5-bisfosfát (PIP₂) na 1,2-diacylglycerol (DAG) a inositol-1,4,5-trifosfát (IP₃) indukující uvolnění Ca²⁺ z endoplazmatického retikula. Aktivace této dráhy vede k prvotnímu velkému zvýšení intracelulárního Ca²⁺, které pak přechází do periodických oscilací, které jsou specifické pro daný druh živočichů a mohou se lišit i podle způsobu průniku spermie do oocytu (přirozené oplození, IVF, ICSI) (Yanagida et al., 2001; Morozumi et al., 2006). Tyto vápníkové oscilace pak dále spouští celou řadu dějů, včetně exocytózy kortikálních granulí, aktivace APC/C a uvolnění oocytu z MII a ve výsledku i k tvorbě prvojadér (Amdani et al., 2015).

2.4.8 Degradace paternálních mitochondrií

V savčím embryu dochází k dědičnosti pouze maternální mitochondriální DNA (mtDNA) a paternální mitochondrie vnesené spermií se degradují (Hutchison et al., 1974). Tento jev se obecně dává do souvislosti v možným poškozením mtDNA, způsobeném oxidativním stresem před oplozením. Toto poškození způsobují ROS vznikající při oxidativní fosforylaci, jež je zdrojem ATP pro spermii během cesty k oocytu a oplození (Donnelly et al., 2000; Aitken et al., 2012). V nově vznikajícím embryu je také důležité udržovat co možná nejnižší heterogenitu mtDNA, jelikož i v případě, že se jedná o dvě normální varianty mtDNA bez poškození, tak jejich společný výskyt v buňkách může vést k metabolickým a kognitivním problémům nových jedinců (Sharpley et al., 2012).

Degradace paternálních mitochondrií u savců není ještě zcela vysvětleným jevem. Jedna z nejpřijímanějších teorií je založena na detekci ubiquitinace paternálních mitochondrií během spermiogeneze, ve stádiu spermatocytů druhého řádu, a jejich následné degradaci po oplození v cytoplazmě oocytu na základě tohoto označení (Sutovsky et al., 1999, 2000). U prasete dochází k této degradaci před prvním rýhováním embrya a je možné ho

zastavit koinkubací zygot s inhibítozem proteazomu MG132 nebo také s chloridem amonným, který může blokovat činnost lysozomu. MtDNA je tedy degradovaná za přispění jak UPS, tak lysozomu (Sutovsky et al., 2000; Sutovsky, 2003). Pravděpodobnou cestou k degradaci mitochondrií by mohla být mitofágie (Al Rawi et al., 2011; Sato a Sato, 2011; Song et al., 2014). Tento proces je principiálně podobný autofágii, která vede k degradaci organel nebo cytoplazmatických složek v lysozomu, a je nezbytně důležitá pro časný embryonální vývoj (Tsukamoto et al., 2008). Mitofágie však probíhá i v somatických buňkách a vede k degradaci poškozených mitochondrií nebo k redukci jejich počtu v rámci diferenciaci některých buněk, např. u červených krvinek (Youle a Narendra, 2011). Do degradace mitochondrií může být také zapojena dislokáza p97/VCP, která má schopnost extrahovat ubiquitinované proteiny z mitochondriální membrány a dále umožňuje jejich degradaci pomocí UPS a další mechanismy (Song et al., 2014). Existují ale i studie, které vysvětlují maternální dědičnost mitochondrií u savců jako pasivní proces, který je způsoben degradací mtDNA ve spermii ještě před oplozením (Luo et al., 2013).

System degradace paternálních mitochondrií také nefunguje naprosto dokonale a v některých případech může docházet i k jejich dědění mezi generacemi (Gyllensten et al., 1991; Schwartz a Vissing, 2002).

3 Cíle a hypotéza dizertační práce

Výzkum si kladl za cíl přímé ověření vlivu extracelulární ubiquitinace spermií na úspěšnost oplození a časný embryonální vývoj do stádia blastocysty. Je nashromážděno již větší množství důkazů o negativní korelaci extracelulární ubiquitinace a úspěšnosti oplození. Předchozí studie však pouze porovnávají analýzu části vzorku spermií s výsledky umělého nebo přirozeného oplození.

Prvním cílem bylo ustanovení postupu, který by přímou spojitost mohl prokázat. Z tohoto důvodu jsme ustanovili metodu sortingu spermií na průtokovém cytometru. Dalším problémem byla vysoká variabilita kvality u spermií od jednotlivých kanců i mezi odběry od stejného kance, proto jsme zkombinovali třídění spermií s jejich kryoprezervací, abychom je mohli používat opakovaně.

Pomocí zavedených metod jsme dokázali pro následné experimenty používat homogenní skupinu spermií, co se týče jejich kvality i míry extracelulární ubiquitinace. Dalším cílem pak bylo, pomocí oplození metodou intracytoplazmatické injekce spermie, zjistit vývojovou kompetenci těchto embryí.

Poté jsme chtěli podpořit naši hypotézu, že extracelulární Ub není pouze markerem kvality spermií, jehož množství na membráně pouze koreluje s výsledky oplození a časného vývoje. Domníváme se, že existuje proces, který aktivuje degradační mechanismy v cytoplazmě oocyty a je schopen reagovat právě na míru ubiquitinace spermií. Testovali jsme proto úspěšnost oplození pomocí injekce spermií, které měly maskován extracelulární ubiquitin pomocí specifické protilátky.

Posledním cílem bylo objasnění způsobu protektivního vlivu gasotransmiterů při stárnutí oocytů, jejichž účinky by se daly použít pro optimalizaci času, ve kterém musí dojít k oplození. Šlo nám konkrétně o působení H₂S. Byly testovány různé regulátory ATP-dependentních K⁺ kanálů a dlouhodobě působících (typ L) Ca²⁺ kanálů, které umožňovaly napodobení těchto protektivních účinků nebo naopak jejich potlačení.

4 Materiál a přístroje

4.1 Chemikálie

Název chemikálie	Výrobce	Katalogové číslo
α -Laktóza monohdrát	Sigma-Aldrich, St. Louis, USA	L2643-500G
BAY K6844	Sigma-Aldrich, St. Louis, USA	B112-5MG
BME (Basal Medium Eagle)	Sigma-Aldrich, St. Louis, USA	B6766
BSA (albumin z bovinního séra)	Sigma-Aldrich, St. Louis, USA	A6003-5G
D-(+)-glukóza	Sigma-Aldrich, St. Louis, USA	G6152-100G
DAPI roztok (4',6-diamidino-2-phenylindole)	Imgenex, San Diego, USA	DES500L
Dihydrogenfosforečnan draselný	Sigma-Aldrich, St. Louis, USA	P5655-100G
Dodecylsíran sodný	Sigma-Aldrich, St. Louis, USA	L4390
Dulbecco's PBS (DPBS)	Gibco, Paisley, UK	21600-069
Etanol 96%, kvasný	Merci, Brno, ČR	64-17-5
Fenolová červeň	Sigma-Aldrich, St. Louis, USA	P5530-5G
Fetální telecí sérum	Gibco, Life Technologies, Germany	26140079
FSH (folikuly stimulující hormon)	Sigma-Aldrich, St. Louis, USA	F2293-1VL
Gentamicin	Gibco, Paisley, UK	5750-037
Glibenclamid	Sigma-Aldrich, St. Louis, USA	PHR1287-1G
Glycerol 100ML	Sigma-Aldrich, St. Louis, USA	G2025-
Goat anti-rabbit IgG FITC	Imgenex, San Diego, USA	20302
GPBoS, růstové proteiny bovinního séra	Sevapharma, Praha, ČR	

HEPES	Sigma-Aldrich, St. Louis, USA	H7006-25G
Hoechst 33342	Sigma-Aldrich, St. Louis, USA	B2261
Hyalurodináza 100MG	Sigma-Aldrich, St. Louis, USA	H3506-
Hydrogenuhlíčan sodný	Sigma-Aldrich, St. Louis, USA	S5761-500G
Hypotaurin	Sigma-Aldrich, St. Louis, USA	H1384-1G
Chlorid draselný	Sigma-Aldrich, St. Louis, USA	P5405-250G
Chlorid sodný	Sigma-Aldrich, St. Louis, USA	S5886-500G
Chlorid vápenatý, dihydrát	Sigma-Aldrich, St. Louis, USA	C7602-500G
Kalcium laktát, pentahydrát	Sigma-Aldrich, St. Louis, USA	C8356-250G
L-Cystein	Sigma-Aldrich, St. Louis, USA	C7352-25G
L-Glutamin	Sigma-Aldrich, St. Louis, USA	G3126-100G
LH (luteinizační hormon)	Sigma-Aldrich, St. Louis, USA	L5269-1VL
M2 médium	Sigma-Aldrich, St. Louis, USA	M7167
M199 médium	Sigma-Aldrich, St. Louis, USA	M4530
MEM (Minimum Essential Medium)	Sigma-Aldrich, St. Louis, USA	M7145
MG132	Sigma-Aldrich, St. Louis, USA	M8699-1MG
Minoxidil	Sigma-Aldrich, St. Louis, USA	M4145
Na ₂ S x 9H ₂ O	Sigma-Aldrich, USA	431648-50G
NGS (normal goat serum)	Milipore, Billerica, USA	S26-100ML
Olej minerální 100ML	Sigma-Aldrich, St. Louis, USA	M8410-
Olej parafinový	Carl Roth, Karlsruhe, Německo	8904.1
Paraformaldehyd (36-38 %)	Penta, Chrudim, ČR	140907F

P. G. 600	Intervet International GmbH	
Percoll	GE Healthcare Biosciences AB, Uppsala, Švédsko	17-0891-02
Poly-L-Lysin	Sigma-Aldrich, St. Louis, USA	P4707
PVA (polyvinylalkohol)	Sigma-Aldrich, St. Louis, USA	P8136-250G
PVP (polyvinylpyrrolidon)	Cook Medical, Queensland, Austrálie	G26774
Pyruvát sodný	Sigma-Aldrich, St. Louis, USA	P4562-5G
Rtuť	Sigma-Aldrich, St. Louis, USA	261017-250G
SDS (sodium dodecyl sulfate)	Sigma-Aldrich, St. Louis, USA	436143
Solusem	Varkens K.I. Nederland, Deventer, Netherlands	
Síran hořečnatý, heptahydrát	Sigma-Aldrich, St. Louis, USA	M7774-500G
Trizma base	Sigma-Aldrich, St. Louis, USA	T6066-100G
Ubiquitin Antibody	Novus Biologicals, USA	NBP2-30132
Verapamil hydrochlorid	Sigma-Aldrich, St. Louis, USA	V4629

4.2 Složení médií

DPBS: rozpuštěním jednoho balení Dulbecco's PBS v 1 l deionizované vody byl podle návodu výrobce připraven 10x koncentrovaný roztok, 1x koncentrovaný roztok DPBS vznikl naředěním 10x koncentrovaného DPBS v poměru 1:9 s deionizovanou vodou.

DPBS+PVA: roztok byl připraven přidáním 0,1 g PVA do 1 l 1x koncentrovaného DPBS.

Fenolová červeně: roztok byl připraven rozpuštěním 5 mg fenolové červeně v 1 ml deionizované vody.

4% roztok paraformaldehydu: 100 ml tohoto roztoku bylo připraveno smícháním 10 ml 10x koncentrovaného DPBS, 4 ml 38% paraformaldehydu a 86 ml deionizované vody.

M199+LH, FSH: 4 mg/ml GPBoS, 3,6 mM pyruvát sodný, 5,8 mM L-cystein, 2 µg/ml LH, 2 µg/ml FSH a 1 µl/ml gentamicinu v základním médiu M199.

mM199+P. G. 600: 32,5 mM hydrogenuhličitan sodný, 2,75 mM kalcium laktát, 22,5 mM pyruvát sodný, 6,3 mM HEPES, 10 % bovinního séra, 13.5 IU eCG a 6.6 IU hCG/ml (P. G. 600) a 1 µl gentamicinu/ml v základním médiu M199.

mTBM: 113,1 mM NaCl, 3 mM KCl, 20 mM Trizma base, 5 mM glukóza, 5 mM pyruvát sodný, 1 mM kofein, 2,5 mM CaCl₂ x 2H₂O, 14,1 nM fenolová červeň, 2 mg BSA/ml.

PZM3: 108 mM NaCl, 9,9 mM KCl, 0,35 mM KH₂PO₄, 0,4 mM MgSO₄ x 7H₂O, 25 mM NaHCO₃, 2 mM kalcium laktát, 1 mM L-glutamin, 5 mM hypotaurin a 0,2 mM pyruvát sodný, 3 mg BSA/ml, 1 µl gentamicinu/ml, 20 µl BME/ml, 10 µl MEM/ml a 1 µl zásobního roztoku fenolové červeně/ml. Základem média je deionizovaná voda (Yoshioka et al., 2002).

Percoll: 100% Percoll vznikl naředěním základního roztoku v poměru 1:9 s 10x koncentrovaným roztokem DPBS, 80% roztok Percollu byl připraven naředěním 100% Percollu v poměru 4:1 s DPBS, 40% roztok Percollu vznikl naředěním 100% Percollu v poměru 2:3 s DPBS.

Zamrazovací médium: frakce A- 0,3 M laktóza monohydrátu, 20 % (v/v) vaječného žloutku, rozpuštěno v deionizované vodě; **frakce B-** frakce A, 0,82 M glycerol a 8,3 mM SDS (modifikovaná verze média podle Yi *et al.*, 2002).

4.3 Přístroje a vybavení

Binolupa Olympus SZX2-ILLK	Olympus, Japonsko
Box Biosan UVC/T-AR	Biosan, Litva
Bürkerova komůrka	Karl Hecht, Německo
Centrifuga MPW-340	Mechanika Precyzyjna, Polsko
Inkubátor Hera Cell	Kendro, Německo
Mikromanipulátor Narishige	Narishige, Japonsko
Mikroskop Nikon Eclipse TE200	Nikon, Japonsko
Mikroskop Olympus IX81 CellR	Olympus, Japonsko

PMAS-CT150 (piezo micro manipulator controller)	Prime Tech, Japonsko
Plynový hořák GS-510	Pro's Kit, USA
Průtokový cytometr se sorterem BD-Influx	BD Biosciences, USA
Topná deska Thermo plate Mats-U505 R30	Tokai Hit, Japonsko
Váhy SI-234	Denver Instrument, USA
Vodní lázeň DKB-8A	Ibersan, Portugalsko

5 Metody

5.1 Izolace oocytů

Oocyty byly získávány z vaječníků prepubertálních prasnic porážených na jatkách. Vaječníky byly z jatek převáženy při teplotě 30-35 °C. Oocyty pro výzkum vlivu iontových kanálů na stárnutí oocytů byly izolovány pomocí aspirační metody. Oocyty byly v tomto případě nasávány z folikulů o průměru 3-5 mm pomocí 20G injekční jehly. Z folikulární tekutiny byly následně vybrány oocyty s rovnoměrně rozloženou cytoplazmou a s kompaktním vícevrstevným obalem kumulárních buněk. Ty byly následně přeneseny do maturačního média.

Pro izolaci oocytů určených pro experimenty s oplozením metodou ICSI byla použita disekční metoda (Lin a Moor, 1997). Oocyty byly izolovány pouze z morfoloicky kvalitních folikulů o velikosti 3-7 mm. Folikuly byly preparovány pomocí dvojice skalpelů, folikuly o vhodné velikosti byly přeneseny do média DPBS+PVA, jehož teplota byla udržována pomocí vyhřívané plotny na 37 °C. Pod binolupou byly folikuly následně zbaveny přebytečné tkáně pomocí hodinářských pinzet a umístěny do manipulačního média M2. To umožnilo vyhodnotit morfolonii každého folikulu díky průsvitné folikulární stěně. Folikuly, jejichž folikulární tekutina obsahovala uvolněné granulózní buňky nebo uvolněný oocyt, byly vyřazeny. Každý folikul byl poté roztržen pomocí hodinářských pinzet a oocyt byl opatrně oddělen od folikulární stěny. Poté byly ještě selektovány samotné oocyty tak, aby do maturačního média byly přeneseny pouze oocyty s rovnoměrně rozloženou cytoplazmou a vícevrstevným obalem kumulárních buněk.

5.2 Maturace oocytů

Izolované oocyty pro experimenty s oplozením pomocí ICSI byly maturovány ve čtyřjamkové destičce v 0,5 ml média M199+LH, FSH převrstveného parafinovým olejem. Maturace probíhala po dobu 44-48 hodin v inkubátoru při teplotě 38,5 °C a 5% atmosféře CO₂ (Krylov et al., 2005). Oocyty použité pro výzkum vlivu regulátorů iontových kanálů byly inkubovány za stejných podmínek v modifikovaném médiu mM199+P. G. 600 (Krejčova et al., 2015).

5.3 Odstranění kumulárních buněk

Do jamky s maturovanými oocyty bylo přidáno 25 µl roztoku hyaluronidázy (1 mg/ml základního M199). Po 5-7 minutách byly oocyty přeneseny do kapek manipulačního média překrytých parafinovým olejem. Pod binolupou byly oocyty protahovány skleněnou kapilárou, čímž došlo k mechanickému svlečení kumulárních buněk. Pro další použití byly vybrány pouze oocyty s rovnoměrně rozloženou cytoplazmou a viditelným 1. PB.

Stejným způsobem byly zbaveny kumulárních buněk i všechny maturované oocyty použité pro sledování vlivu regulátorů iontových kanálů.

5.4 Kultivace stárnoucích maturovaných oocytů

Maturované oocyty byly kultivovány po dobu 72 hodin po odstranění kumulárních buněk v modifikovaném médiu mM199 bez P. G. 600 (Krejčova et al., 2015). Do tohoto média byly přidány regulátory iontových kanálů, minoxidil (aktivátor ATP-dependentních K⁺ kanálů) nebo verapamil (inhibitor Ca²⁺ kanálů typu L) v požadované koncentraci. V dalším experimentu byly kombinovány různé koncentrace inhibitoru glibenclamid (blokace K⁺ kanálů) a látky BAY K6844 (agonista Ca²⁺ kanálů) s přidáním donoru sulfanu Na₂S x 9H₂O v cílové koncentraci 1 mM (což odpovídá koncentraci Na₂S 300 µM) nebo bez jeho přidání.

5.5 Vyhodnocení stárnutí oocytů

Oocyty byly uchyceny pod krycí sklíčko, přidržované pomocí malého množství lékařské vazelíny umístěné v rozích, na podložní sklo. Poté byly fixovány v roztoku etanolu a kyseliny octové v objemovém poměru 3:1 po dobu minimálně 48 hodin. Následně byly obarveny v 1% roztoku orceinu v 50% kyselině octové a barvivo bylo odmyto pomocí roztoku glycerolu, kyseliny octové a deionizované vody v poměrech 1:1:3. Následně byly oocyty zařazeny do jedné ze tří skupin; 1. oocyty bez morfologických změn v MII, 2. oocyty

apoptotické nebo lyzované (byla patrná apoptotická tělíska nebo byly oocyty fragmentované), 3. partenogeneticky aktivované oocyty, u kterých došlo k dělení.

5.6 Příprava čerstvých spermií

Spermie byly získávány ze standardních inseminačních dávek od chovných kanců (Chovservis a.s., Hradec Králové). Během transportu i po něm byly spermie uchovávány při teplotě 17 °C až do jejich zpracování.

Do zkumavky bylo odebráno 10 ml resuspendované inseminační suspenze, která byla centrifugována (5 minut, 700 x g). Supernatant byl odsát na objem 1 ml a spermie v něm byly resuspendovány. Pro separaci neviabilních spermií s poškozenou membránou byl použit vrstvený gradient Percollu (5 ml 40% Percollu podvrstvených 2 ml 80% Percollu) a následná centrifugace (15 minut, 700 x g). Po centrifugaci byl odsát supernatant a spermie byly dvakrát promyty pomocí DPBS+PVA, kdy byly centrifugovány 5 minut při 700 x g.

Koncentrace spermií byla následně spočítána pomocí Bürkerovy komůrky. Pro účely oplození byly spermie naředěny do média mTBM na výslednou koncentraci 2×10^6 spermií/ml a kapacitovány v inkubátoru po dobu 30 minut, při teplotě 38,5 °C a 5% atmosféře CO₂.

5.7 Zamrazení spermií

12 ml inseminační suspenze bylo centrifugováno po dobu 5 minut při 700 x g. Supernatant byl odsát na objem 1ml, ve kterém byly spermie resuspendovány. Koncentrované spermie byly navrstveny na gradient Percollu (80%, 40%) a centrifugovány (15 minut, 700 x g). Po centrifugaci byl supernatant odstraněn a sediment resuspendován v takovém objemu DPBS+PVA, aby výsledná koncentrace činila 5×10^7 spermií/ml. 2 ml této suspenze bylo centrifugováno (5 minut, 700 x g). Supernatant byl odsát a sediment resuspendován v 0,5 ml frakce A zamrazovacího média. Suspenze byla po dobu 2 hodin postupně chlazena na teplotu 5 °C. K suspenzi bylo přidáno 0,5 ml frakce B zamrazovacího média a v chladové místnosti o teplotě 5 °C byla suspenze ihned rozplněna do 50 µl kapilár. Do střední části kapiláry bylo nasáto 30 µl suspenze spermií a konce kapilár byly zataveny pomocí plynového kahanu. Kapiláry byly na dobu 5 minut horizontálně položeny na plastový držák umístěný v polystyrenové krabici s tekutým dusíkem. Plastový držák byl umístěn tak, aby byl 5 cm nad hladinou tekutého dusíku.

Vzorky jsme nechali zmrznout nad parami tekutého dusíku. Následně byly kapiláry skladovány v nádobě s tekutým dusíkem.

5.8 Rozmražení spermií před ICSI

Těsně před pokusem byly spermie rozmrazeny umístěním kapiláry do vody o teplotě 37 °C po dobu 3 minut. Následně byla kapilára na obou koncích ulomena a suspenze spermií byla přidána do mikrozkušavky s 200 µl média mTBM. Z důvodu odstranění reziduí zamrazovacího média byl roztok centrifugován (5 minut, 700 x g). Supernatant byl odstraněn a sediment resuspendován v 200 µl mTBM.

5.9 Příprava spermií pro pokus s maskováním extracelulárního Ub

5.9.1 Centrifugace na gradientu Percollu

Do zkumavky bylo odměřeno 10 ml resuspendované inseminační suspenze, která byla následně centrifugována (5 minut, 700 x g). Supernatant byl odsát na objem 1 ml, ve kterém byly spermie resuspendovány. Takto koncentrovaný roztok spermií byl navrstven na gradient Percollu (80%, 40%) a centrifugován (15 minut, 700 x g). Kvůli kompletnímu odstranění Percollu byl celý supernatant odebrán a sediment byl resuspendován v 1 ml 1% NGS. Následovala centrifugace spermií (5 minut, 700 x g). Supernatant byl odebrán a sediment byl opět resuspendován v 1 ml 1% NGS.

Koncentrace spermií ve vzniklém roztoku byla zjištěna pomocí Bürkerovy komůrky. Pro počítání množství spermií byla suspenze naředěna 100x vodou. Suspenze spermií byla poté naředěna na objem o výsledné koncentraci 4×10^7 spermií/ml.

5.9.2 Inkubace s primární protilátkou

Pro následující práci se dále používalo 0,5 ml suspenze, která byla centrifugována (5 minut, 700 x g). Supernatant byl odsát a sediment resuspendován v 5% NGS o objemu 0,5 ml, následné blokování probíhalo po dobu 30 minut při 17 °C a poté byla suspenze centrifugována (5 minut, 700 x g). Vzniklý supernatant byl odstraněn a sediment resuspendován v 0,5 ml 1% NGS. Do dvou mikrozkušavek bylo odebráno 50 µl této suspenze a do jedné z nich byla navíc přidána primární protilátka proti Ub (ředění 1:100). Obě mikrozkušavky byly inkubovány po dobu 45 minut při teplotě 17 °C. Po inkubaci byly spermie centrifugovány (5 minut, 700 x g), supernatant byl odebrán a peleta resuspendována v 50 µl 1% NGS. Spermie neinkubované s protilátkou byly použity pro párové pokusy k oplození kontrolní skupiny oocytů.

5.9.3 Kapacitace spermií

Z každé mikrozkušavky bylo odebráno 10 μ l suspenze (se zbylými 40 μ l suspenze bylo provedeno kontrolní barvení) a přidáno do 200 μ l média mTBM. Výsledná koncentrace spermií v mTBM činila 2×10^6 spermií/ml. Spermie byly kapacitovány v inkubátoru (teplota 38,5 °C, 5% atmosféra CO₂) po dobu 20-30 minut. Kapacitované spermie byly následně použity pro ICSI.

5.9.4 Inkubace se sekundární protilátkou

Ke zbylým 40 μ l suspenze v každé mikrozkušavce bylo napipetováno dalších 40 μ l 1% NGS a do obou mikrozkušavek byla přidána sekundární protilátka (ředění 1:200). Při teplotě 17 °C probíhala inkubace po dobu 1 hodiny. Obě zkušavky byly centrifugovány (5 minut, 700 x g). Supernatant byl odstraněn a sediment resuspendován v 80 μ l 1% NGS. Pro odstranění přebytečné sekundární protilátky byly spermie dvakrát promyty v 1% NGS. Na podložní sklíčko bylo napipetováno 5 μ l z každé mikrozkušavky a překryto krycím sklíčkem. Sklíčka byla vyhodnocena pod mikroskopem.

5.10 Příprava spermií pro pokus se sortovanými spermii

5.10.1 Centrifugace na gradientu Percollu

20 ml inseminační dávky bylo připraveno podobně jako u čerstvých spermií určených pro oplození, ale s tím rozdílem, že promytí od Percollu bylo provedeno pouze jednou a nebyl proveden krok kapacitace. Výsledná koncentrace suspenze zde činila 1×10^8 spermií/ml.

5.10.2 Inkubace s primární a sekundární protilátkou

Bylo odebráno 5 ml suspenze a centrifugováno (5 minut, 700 x g). Supernatant byl odsát a sediment resuspendován v 5 ml 5% NGS. Blokování probíhalo po dobu 30 minut při 17 °C. Následně byly spermie centrifugovány (5 minut, 350 x g). Supernatant byl odstraněn a sediment byl resuspendován v 0,5 ml 1% NGS do kterého byla přidána primární protilátka proti Ub (ředění 1:100). Inkubace probíhala po dobu 40 minut při teplotě 17 °C. Suspenze byla centrifugována (5 minut, 350 x g) a vzniklý supernatant byl odsát. Spermie byly dvakrát promyty v 1% NGS a následně inkubovány v 1 ml 1% NGS se sekundární protilátkou (ředění 1:200) po dobu 60 minut při teplotě 17 °C. Suspenze byla centrifugována (5 minut, 350 x g), supernatant byl odsát a peleta resuspendována ve 2 ml zvoleného média. Při experimentech sledujícím úspěšnost oplození a vývoje do blastocysty se vždy jednalo o médium Solusem.

5.10.3 FACS

Spermie byly tříděny na průtokovém cytometru se sorterem BD-Influx v Servisním pracovišti pro světelnou mikroskopii a průtokovou cytometrii Ústavu molekulární genetiky, Akademie věd České republiky.

Pro odlišení spermií od debris a jiných částic bylo provedeno barvení pomocí Hoechst 33342. Výsledná koncentrace Hoechst 33342 v roztoku DPBS+PVA se spermiemi činila 1 µg/ml. Barvení probíhalo po dobu 15 minut. Vzorek byl filtrován přes 40 µm sítko kvůli odstranění shluků spermií.

Spermie byly tříděny podle míry povrchové ubiquitinace pomocí polychromatického vysokorychlostního průtokového cytometru se sorterem BD-Influx vybaveného lasery 355 nm a 488 nm. Jako hnací kapalina zde sloužil klasický roztok PBS. Spermie byly tříděny do dvou skupin. V první skupině byly spermie s nízkou intenzitou signálu FITC (fluorescein isothiocyanate) a ve druhé skupině se nacházely spermie vykazující vysokou intenzitu signálu. Z hlediska co největší podobnosti v rámci každé skupiny byla vybrána pouze populace spermií vykazující obdobnou intenzitu signálu FITC. K vyhodnocení byl použit program BD FACSDiva Software (BD Biosciences, USA). Spermie byly tříděny do mikrozkušavek obsahujících 700 µl zvoleného média.

5.10.4 Zamrazení spermií po FACS

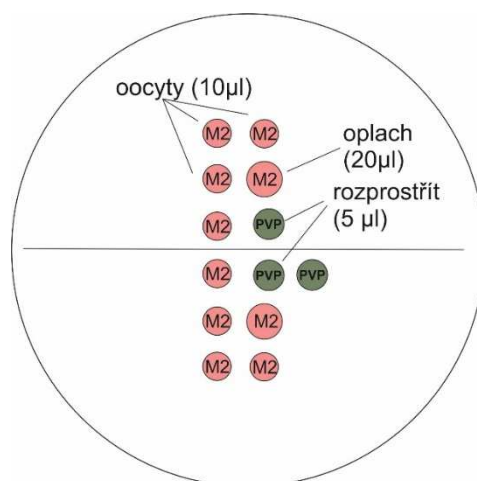
Obsah zkumavek s tříděnými spermiemi byl centrifugován (5 minut, 700 x g). Supernatant byl odstraněn a sediment byl jemně resuspendován v 200 µl frakce A zamrazovacího média. Suspenze byla postupně chlazená v lednici po dobu 2 hodin na teplotu 5 °C. K suspenzi bylo přidáno 200 µl frakce B zamrazovacího média a další postup byl proveden jako v kapitole 2.7.

5.11 Vyhodnocení viability spermií po FACS a po kryoprezervaci

Po 20 minutách od dokončení třídění na cytometru nebo po převedení F/T spermií do média mTBM byly spermie analyzovány v Bürkerově komůrce. Byla zjišťována koncentrace a motilita u 100 spermií ve dvou hodnoceních následujících po sobě pro každé opakování pokusu. Nemotilní spermie byly považovány za neviabilní, jelikož výsledky viability a motility poskytují velmi podobné výsledky (Gil et al., 2005; Martinez-Alborcia et al., 2012).

5.12 ICSI

Na IVF/ICSI miskou bylo napipetováno několik kapek manipulačního média M2 a PVP. Kapky byly následně překryty parafinovým olejem, aby se zamezilo jejich odpařování. Do 10 μ l kapek byly pomocí skleněné kapiláry přeneseny oocyty, přičemž v jedné kapce se nacházelo vždy více oocytů. Do 5 μ l kapek PVP bylo napipetováno 5 μ l kapacitovaných spermií v médiu mTBM a připravená miska (Obr. 8) byla umístěna pod mikromanipulátor.



Obrázek 8: Rozložení kapek na misce pro ICSI o průměru 50 mm. Oocyty jsou rozmístěny v jednotlivých kapkách s manipulačním médiem M2, dvě větší kapky stejného média slouží k oplachu od spermií navázaných vně injekční kapiláry. Do kapek PVP se rozředí suspenze spermií a je nutné suspenzi s PVP důkladně promíchat. PVP slouží ke zpomalení spermií pro usnadnění jejich imobilizace.

Spermie byla imobilizována zlomením bičíku pomocí rychlého pohybu injekční kapiláry. Kapilára s nasátou spermií byla protažena očišťovací kapkou s manipulačním médiem, aby došlo k odstranění spermií přichycených vně kapiláry a byla přemístěna do kapky s oocyty. Daný oocyt byl vždy zafixován pomocí holdingové kapiláry tak, že se 1. PB nacházelo v poloze odpovídající 1. nebo 5. hodině na ciferníku hodin. Injekční kapilára tedy byla v poloze 3. hodiny, což minimalizuje možnost poškození jádra. Pomocí pulzů piezo jednotky byla následně penetrována ZP oocytu a z kapiláry byla odstraněna zátko tvořená ZP. K průniku přes plazmatickou membránu byly použity slabší pulzy v momentu, kdy konec injekční kapiláry se nacházel za polovinou průměru oocytu. Penetrace byla potvrzena nasátím malého množství ooplazmy, která byla následně injikována i se spermií zpět do oocytu. Kapilára byla vytažena tak, aby došlo k rychlému zacelení plazmatické membrány a z oocytu nevytékala cytoplazma. Po provedení ICSI byly oocyty přeneseny do jamek s 0,5 ml média PZM3 překrytého parafinovým olejem.

5.13 Kultivace po oplození

Embrya byla po oplození kultivována v inkubátoru při teplotě 38,5 °C a 5% atmosféře CO₂ v médiu PZM3. Doba kultivace závisela na charakteru pokusu. Pokud se u embryí sledovala tvorba prvojader, byla doba kultivace 18 hodin. Kultivace embryí do stádia blastocysty probíhala po dobu jednoho týdne. Při experimentech s inhibitorem byl MG132 rozpuštěn v 96% etanolu (1 mg/ml) a následně byl přidán do kultivačního média, u kontrolní skupiny bylo do kultivačního média přidáno ekvivalentní množství 96% etanolu.

5.14 Fixace a barvení embryí

Pro fixaci embryí byl použit 4% roztok paraformaldehydu, který byl napipetován v objemu 0,5 ml do čtyřjamkové destičky. Do jamky s roztokem byla pomocí skleněné kapiláry přenesena embrya a fixována přes noc při pokojové teplotě.

Fixovaná embrya byla přenesena do kapky DPBS+PVA a promyta od paraformaldehydu. Po pěti minutách byla embrya umístěna do kapky s čistým DPBS+PVA a celý proces se opakoval ještě dvakrát. Po odstranění paraformaldehydu byla embrya spolu s minimálním množstvím DPBS+PVA přenesena pomocí kapiláry do 3 µl montovacího média s DAPI na podložní sklíčku a překryta krycím sklíčkem. Následovalo vyhodnocení preparátů s využitím fluorescenčním mikroskopu.

5.15 Imunofluorescenční značení spermií

Na dno jamek ve čtyřjamkové destičce byla umístěna kulatá krycí sklíčka a překryta 200 µl poly-L-lysinu. Inkubace probíhala po dobu 30 minut na vyhřívané plotně (38 °C). Sklíčka byla dvakrát opláchnuta pomocí deionizované vody a přebytečná voda byla odsáta. Na poly-L-lysinem potažená sklíčka bylo napipetováno 300 µl suspenze spermií v DPBS o koncentraci 2x10⁶ spermií/ml. Po 25 minutách inkubace byla přebytečná suspenze odsáta a sklíčka byla opláchnuta DPBS. Následovala blokace v 300 µl 5% NGS po dobu 30 minut. Přebytečná tekutina byla odsáta a sklíčka byla inkubována s 200 µl 1% NGS s primární protilátkou proti Ub (ředění 1:100) po dobu 1 hodiny. Sklíčka byla poté třikrát opláchnuta 1% NGS (5 minut na jeden oplach) a inkubována se sekundární protilátkou v 200 µl 1% NGS (ředění 1:250) po dobu 1 hodiny. Následoval oplach 1% NGS (3x 5 minut). Na podložní sklíčko bylo napipetováno 5 µl montovacího média s DAPI a na tuto kapku bylo položeno krycí sklíčko se spermiemi (stranou s přichycenými spermiemi dolů).

5.16 Statistická analýza

Statistická analýza a grafy byly vytvořeny pomocí programu GraphPad Prism, verze 7 (GraphPad Software Inc., San Diego, USA). Data byla analyzována pomocí metody ANOVA a t-testu, pokud vykazovala normální rozdělení. Pro porovnání jednotlivých skupin u vyhodnocení vlivu regulátorů iontových kanálů byl ještě použit Bonferroni *post hoc* test. U vyhodnocení porovnání úspěšnosti vývoje do blastocysty při použití čerstvých a F/T spermií jedna ze skupin nevykazovala normální rozdělení, proto byl v tomto případě pro porovnání použit neparametrický Mann-Whitney test. Výsledky jsou uvedeny jako průměr \pm SEM, pokud není uvedeno jinak. Výsledky byly považovány za signifikantní, pokud $P < 0,05$.

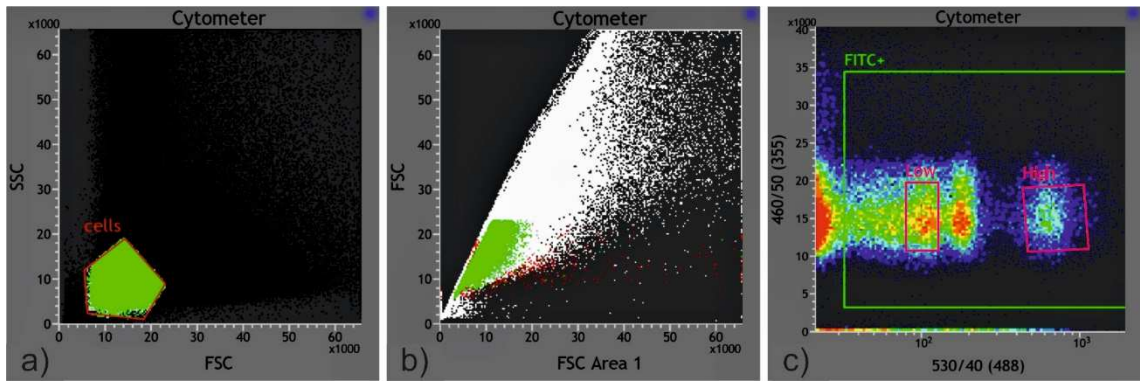
6 Výsledky

6.1 Sorting a kryoprezervace kančích spermií

Kombinace cytometrického třídění kančích spermií a jejich následná kryoprezervace je natolik raritní záležitostí, že bylo nutné zavést kompletně novou metodiku, která by tyto manipulace umožňovala i u kančích spermií, které jsou zvláště náchylné k poškození, a to jak během třídění, tak při mražení.

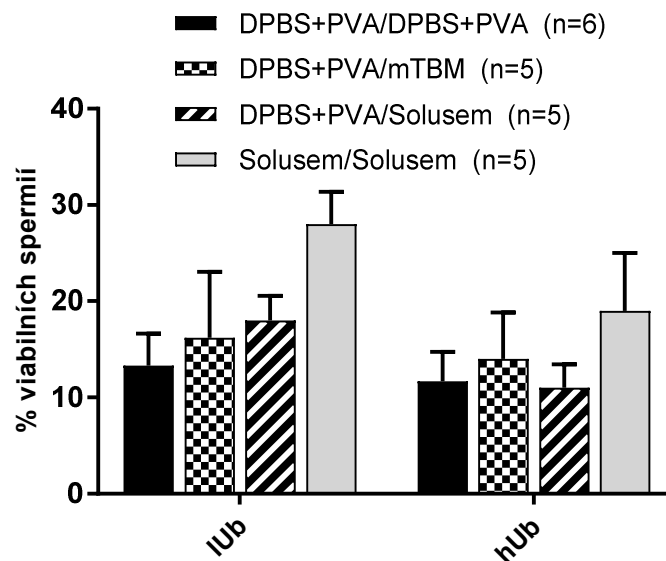
Procento viabilních spermií po alespoň týdenním skladování v tekutém dusíku nám v předběžných pokusech kolísalo mezi 0-55 % (nepublikovaná data). Při souběžných přípravných pokusech třídění na cytometru jsme dospěli ke zjištění, že pro úspěch celé metody je nezbytné pracovat pouze s inseminačními dávkami spermií, které po F/T vykazují alespoň 40 % motilních spermií. Při následných experimentech použitých pro publikaci jsme proto vždy nejprve provedli s částí inseminační dávky předběžný test motility po F/T a dále pracovali pouze s těmi dávkami, které měly dostatečně dobré výsledky, což je naprosto nutný předvýběrový test.

Další pokusy se pak zaměřily na optimalizaci podmínek pro průchod cytometrem. Nastavení zacílení přístroje a ukázka tříděných spermií je vidět na obr. 9. Při vybírání spermií, které měly být vytrženy, jsme se zaměřili hlavně na specifitu výběru tak, abychom při reanalýze dosáhli co nejmenší kontaminace buňkami, které nespádaly do námi zvolené populace. Pro potřeby oplození pomocí ICSI nebylo naprosto nutné sortovat velké množství buněk, a i s ohledem na vysokou náchylnost k poškození u kančích spermií jsme volili spíše pomalejší rychlost třídění. Ta byla v průměru 75 spermií za sekundu (sp/s) u buněk s nízkou extracelulární ubiquitinací (lUb, lowly ubiquitinated) a 148 sp/s u vysoce ubiquitovaných spermií (hUb, highly ubiquitinated). Tento přístup zajišťoval přiměřeně dobré procento přeživších spermií a vysokou specifitu třídění. Roztříděné spermie byly u všech vzorků průběžně zpětně analyzovány. Skupina málo ubiquitovaných spermií vykazovala průměrnou kontaminaci 0,73 % vysoce ubiquitovanými spermiemi. U skupiny vysoce ubiquitovaných spermií jsme potom naměřili průměrnou kontaminaci 6,65 % spermií, které při reanalýze odpovídaly nízké hodnotě extracelulárního Ub.



Obrázek 9: Ukázka zacílení při průtokové cytometrii na spermie barvené pomocí Hoechst 33258 a s FITC konjugovanou sekundární protilátkou vázící se na primární protilátku proti Ub. Výběr pro odlišení buněk od debris a dalších útvarů přítomných v suspenzi (a), zacílení na jednotlivé spermie, které tvoří shluky dvou a více buněk (b) a odlišení jednotlivých populací (IUb a hUb) podle míry extracelulární ubiquitinace (c).

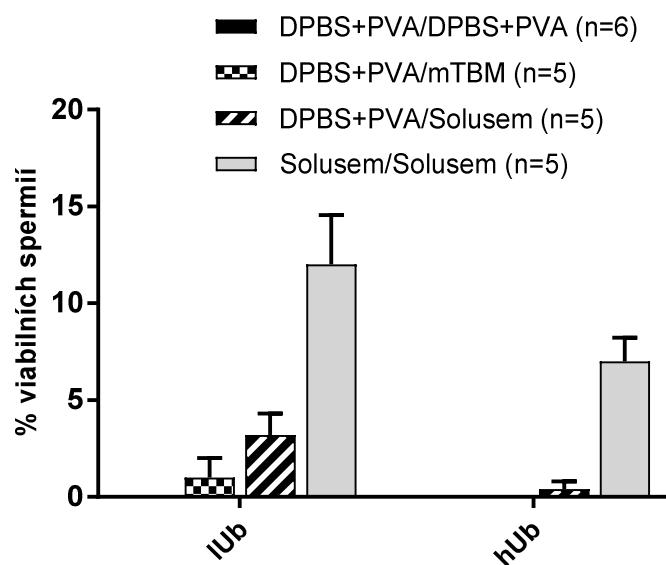
Průměrné hodnoty viabilních spermií po třídění při použití různých kombinací médií před a po sortingu ukazuje graf 1. Viabilita vysoce ubiquitinovaných spermií byla u všech skupin zhoršená v porovnání s málo ubiquitinovanými spermii, ale na natolik, aby se výsledky signifikantně lišily.



Graf 1: Znázornění procenta viabilních spermií po sortování na průtokovém cytometru při použití různých médií pro uchování spermií před a po třídění. Jednotlivé sloupce ukazují průměrnou viabilitu \pm SEM z počtu opakování daného experimentu uvedeného v závorkách. Pro každé opakování bylo analyzováno 200 spermií.

Viabilita po alespoň týdenním skladování v tekutém dusíku se ještě dále snížila, jak můžeme vidět na grafu 2. Při použití média DPBS+PVA pro kultivaci spermií před i po sortingu nebyly pozorovány žádné viabilní spermie po rozmrazení. Po rozmrazení

spermii, které před tříděním byly v tomtéž médiu, ale po průchodu cytometrem byly dočasně v médiu mTBM nebo v komerčním médiu Solusem, jsme mohli pozorovat malá procenta viabilních spermii ve skupinách s nízkou i vysokou mírou ubiquitinace, ale bez patrné progresivní motility. Nejlepších výsledků bylo dosaženo při použití média Solusem před i po třídění na cytometru. Takto uchovávané spermie vykazovaly i po kryoprezervaci progresivní motilitu a opět lépe přežily nízce ubiquitinované spermie (12 %) v porovnání s vysoce ubiquitinovanými spermii (7 %, $P < 0,05$).



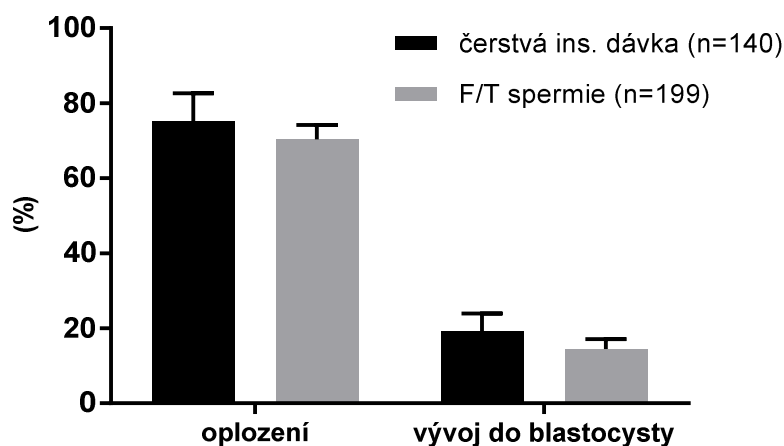
Graf 2: Znázornění procenta viabilních spermii po kryoprezervaci u skupin, které před a po sortování na průtokovém cytometru byly uchovávány v různých kombinacích médií. Jednotlivé sloupce ukazují průměrnou viabilitu \pm SEM z počtu opakování daného experimentu uvedeného v závorkách. Pro každé opakování bylo analyzováno 200 spermii.

6.2 Vliv ubiquitinace na úspěšnost oplození a vývoj do stádia blastocysty

6.2.1 Porovnání úspěšnosti oplození při použití čerstvé inseminační dávky nebo F/T spermii

Vzhledem k nutnosti používat pro pokusy sledující vliv extracelulární ubiquitinace spermie kryoprezervované v tekutém dusíku bylo potřeba ověřit úspěšnost oplození metodou ICSI i následného embryonálního vývoje. Oplození oocytů spermii z čerstvé inseminační dávky bylo v naší laboratoři již dlouhodobě prováděno a při těchto ověřovacích pokusech jsme s nimi dosáhli úspěšnosti 75 %, z celkových 140 injikovaných oocytů. U F/T spermii byl výsledek o něco horší a činil 70,36 % ($n=199$, hodnota t-testu

P=0,416). U ostatních oocytů byla pozorována fragmentace oocytu, případně bylo možné detekovat zcela intaktní spermie, u kterých nedošlo k dekonduzaci hlavičky, nebo oocyty s vytvořeným jedním nebo dvěma prvojádry, ale bez dalšího rýhování. Po dlouhodobější kultivaci 7 dnů po oplození jsme analyzovali procento embryí, která byla schopna se vyvinout do stádia blastocysty. Tohoto stádia se podařilo dosáhnout u 19,29 % embryí vzniklých injikací spermie z čerstvé inseminační dávky a 14,57 % embryí vzniklých z F/T spermii. Celkově je tento výsledek shrnut na grafu 3. Při statistickém vyhodnocení pomocí Mann-Whitney testu nevykazovaly skupiny signifikantní rozdíl v úspěšnosti oplození ani v úspěšnosti vývoje do blastocysty.

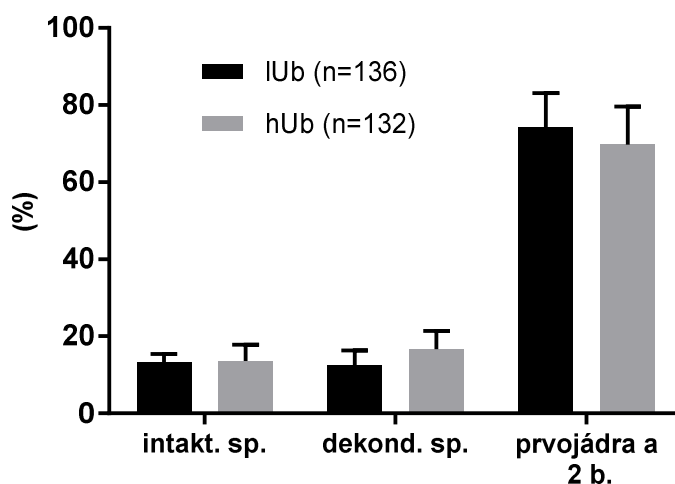


Graf 3: Porovnání úspěšnosti oplození a vývoje do blastocysty u oocytů, do kterých byly injikovány spermie z čerstvé inseminační dávky nebo spermie po kryoprezervaci. Experiment neprobíhal v paralelních skupinách. Výsledky byly získány z 10 opakování při použití čerstvých spermii a z 9 opakování při použití F/T spermii.

6.2.2 Porovnání úspěšnosti formování prvojader po ICSI při použití tříděných spermii podle míry extracelulární ubiquitinace

U porovnání úspěšnosti oplození po použití sortovaných a dále kryoprezervovaných spermii jsme se nejprve zaměřili na formování prvojader. Oocyty jsme zafixovali 18 hodin po oplození metodou ICSI a po vizualizaci DNA fluorescenční barvou jsme vyhodnotili jejich stav. Celkem jsme hodnotili 136 oocytů oplozených pomocí IUb a 132 oocytů oplozených hUb. Rozdíly mezi oocyty oplozenými pomocí spermii s nízkou nebo vysokou úrovní extracelulární ubiquitinace byly velmi malé. Viditelné dvě buňky nebo zformování obou prvojader bylo pozorováno u 74,26 % zygot v případech minimálně ubiquitinovaných spermii, a 69,7 % u zygot vzniklých injikací vysoce ubiquitinovaných spermii. Ačkoli IUb spermie opět dosahovaly částečně lepších výsledků, byl tento rozdíl pod úrovní statistické

významnosti (výsledek t-testu $P=0,31$). V cytoplazmě části oocytů pak bylo možno pozorovat hlavičky spermií, které byly zcela intaktní, a také již částečně dekonzenzované spermie, u nichž ale nedošlo k vytvoření prvojádra (graf 4).

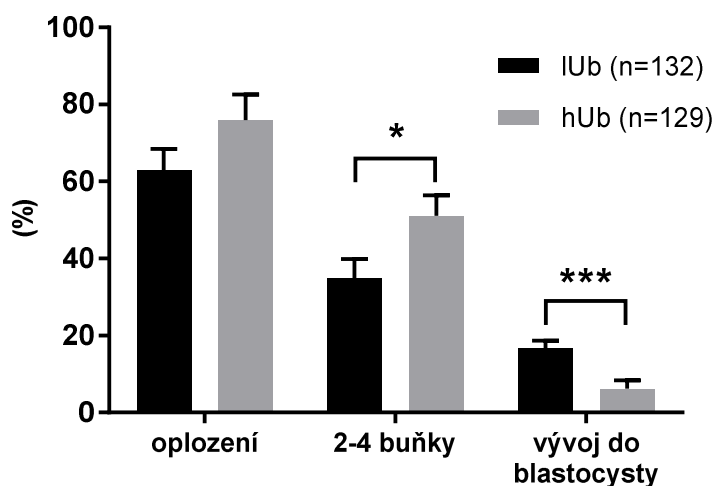


Graf 4: Porovnání vývoje oocytů po injikaci sortovaných spermií, které vykazovaly nízkou (IUb) nebo vysokou (hUb) extracelulární ubiquitinací. V případě intaktních spermií (intakt. sp.) nedošlo vůbec k rozpoznání spermie a aktivaci oocytu. U dekonzenzovaných spermií (dekond. sp.) k jejich rozpoznání sice došlo, ale nebylo vytvořeno prvojádro. Poslední skupinu (prvojádra a 2 b.) tvoří oocyty, u kterých po 18 hodinách kultivace po ICSI došlo ke vzniku prvojader nebo již i k prvnímu rýhování. Experiment probíhal v paralelních skupinách. Výsledky byly získány z 9 opakování.

6.2.3 Úspěšnost časného embryonálního vývoje do stádia blastocysty při použití tříděných spermií podle míry extracelulární ubiquitinace

Výrazný rozdíl jsme zaznamenali u vývoje do stádia blastocysty. Oocyty jsme po oplození tříděnými F/T spermii kultivovali po dobu 7 dnů a následně jsme vyhodnotili procento utvořených blastocyst a analyzovali jsme počet buněk v blastocystách. Výsledky můžeme vidět na grafu 5. Opět nebyl signifikantní rozdíl mezi úspěšností oplození, respektive prvního rýhování zygot, ačkoli výsledky byly mírně zhoršené pro skupinu oocytů oplozených IUb (62,88 %, $n=132$), než u skupiny oocytů oplozených hUb (75,97 %, $n=129$, s výsledkem t-testu $P=0,08$). Signifikantně vyšší procento embryí (51,16 %) vzniklých injikací hUb spermií do oocytů však ukončilo svůj vývoj ve 2 až 4-buněčném stádiu, oproti druhé skupině, kde byl výsledek 34,85 % (hodnota pro t-test $P=0,043$). U vlastního vývoje embryí do stádia blastocysty pak byl prokázán jasně signifikantní rozdíl mezi skupinami. Oocyty oplozené spermii s minimální extracelulární ubiquitinací dokázaly vyvinout embrya ve stádiu blastocysty v 16,67 %, kdežto po oplození spermii

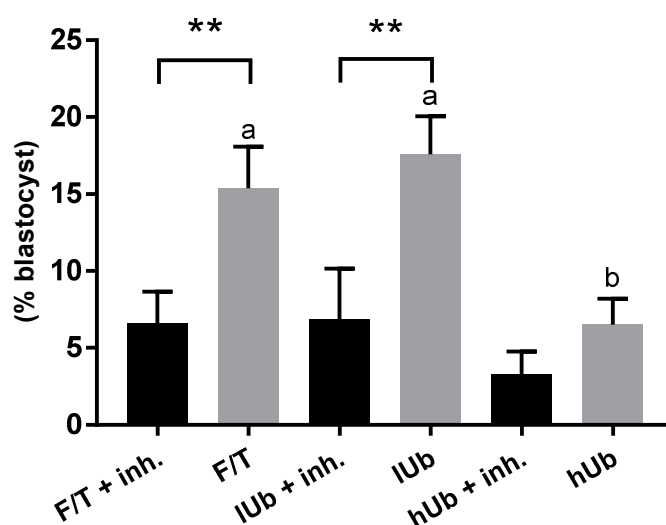
s vysokou mírou ubiquitinace to bylo pouze 6,2 % (výsledek t-testu $P=0,0002$). U těchto blastocyst jsme vyhodnotili i počty buněk, ale u nich jsme zjistili pouze malý nesignifikantní rozdíl. U embryí vzniklých po použití IUb byl průměrný počet buněk v blastocystách průměrně 52,55 buněk, u druhé skupiny embryí vzniklých po injikaci ubiquitinem silně značených spermii činil průměr 57,5 buňky (hodnota t-testu $P=0,4$).



Graf 5: Výsledky z dlouhodobé kultivace po dobu 7 dnů. Při použití IUb nebo hUb nebyl opět zjištěn signifikantní rozdíl v úspěšnosti oplození. Během dalšího vývoje se ale signifikantně víc embryí vzniklých injikací hUb zastavilo před EGA (reaktivace embryonálního genomu, u prasete ve 4-b. stádiu). U embryí, která pokračovala ve vývoji, se do stádia blastocysty vyvinulo signifikantně vyšší procento těch, které vznikly po injikaci IUb spermii. Experiment probíhal v paralelních skupinách. Výsledky byly získány z 9 opakování.

6.2.4 Vliv inhibitoru proteazomu na úspěšnost oplození a embryonální vývoj do stádia blastocysty při použití tříděných a následně kryoprezervovaných spermii

V rámci naší hypotézy jsme předpokládali rozdílnou reakci na dočasnou inkubaci s reverzibilním inhibitorem proteazomálního komplexu. Tento rozdíl se nám potvrdit nepodařilo a výsledky nejsou zahrnuty do publikace. Obecně docházelo k výraznému zhoršení vývoje do blastocysty u všech skupin bez závislosti na tom, zda byly použity pouze neroztříděné F/T spermie nebo IUb a hUb spermie po kryoprezervaci. Výsledky jsou vidět na grafu 6 a v tabulce 1. Zajímavá je podoba výsledků vývoje do blastocysty v kontrolních skupinách u embryí vzniklých injikací IUb a hUb, jejichž hodnota a vzájemný rozdíl jsou velmi blízké výsledkům z předchozího experimentu, a to i přesto, že v tomto případě nebyly tyto skupiny injikovány párově v identických podmínkách.



Graf 6: Porovnání vývoje do stádia blastocysty u oocytů, do kterých byly injikovány spermie pouze po kryoprezervaci (F/T) nebo tříděné a kryoprezervované spermie s minimální (IUb) nebo vysokou (hUb) mírou extracelulární ubiquitinace. Oocyty byly po ICSI rozděleny na dvě poloviny a jedna byla inkubována po dobu 18 hodin v médiu s inhibitorem proteazomu MG132, poté byly promyty a dále kultivovány v médiu PZM3. Odlišné indexy nad sloupci značí signifikantní rozdíl skupin ($P < 0,005$).

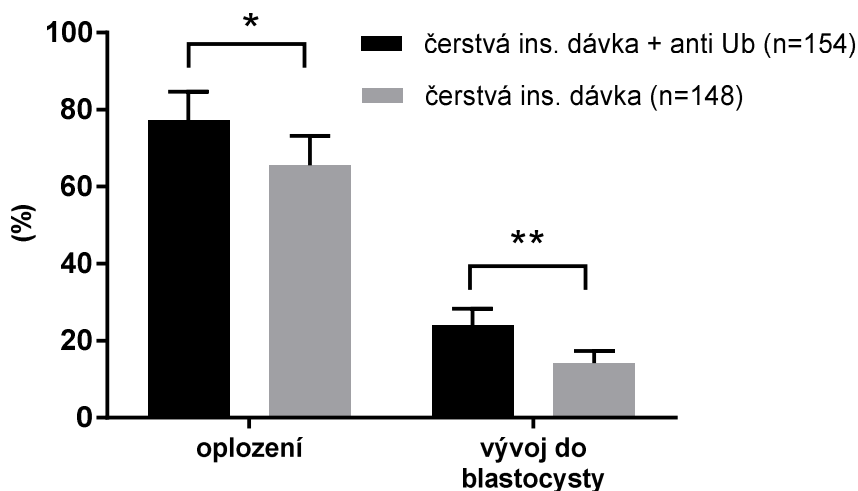
	s inhibitorem		bez inhibitoru	
	oplození (SEM)	blastocysty (SEM; n=)	oplození (SEM)	blastocysty (SEM; n=)
F/T (p. o.=5)	62,64 % (4,1)	6,59 % (2,1; 91)	67,03 % (4,7)	15,38 % (2,7; 91)
IUb (p. o.=6)	71,23 % (6,2)	6,85 % (3,3; 73)	72,97 % (10,0)	17,57 % (2,5; 74)
hUb (p. o.=6)	68,13 % (5,8)	3,3 % (1,5; 91)	63,04 % (7,3)	6,52 % (1,7; 92)

Tabulka 1: Přesné hodnoty úspěšnosti oplození a vývoje do stádia blastocysty po injikaci pouze kryoprezervovaných spermií (F/T spermie) nebo spermií tříděných dle množství extracelulární Ub (IUb, hUb). Počet opakování (p. o.) experimentů je v příslušném řádku v prvním sloupci.

6.2.5 Vliv koinkubace spermií s protilátkou proti Ub na úspěšnost oplození a embryonální vývoj do stádia blastocysty.

Při použití spermií pocházejících z čerstvé inseminační dávky a jejich experimentální koinkubace s protilátkou proti Ub, před oplozením metodou ICSI, bylo dosaženo signifikantně lepších výsledků oplození i vývoje do stádia blastocysty, jak ukazuje graf 7. Pro experimentální zamaskování extracelulárního Ub jsme do oocytů injikovali spermie (n=154), které byly nejprve inkubovány 45 minut s primární protilátkou proti Ub. Tyto

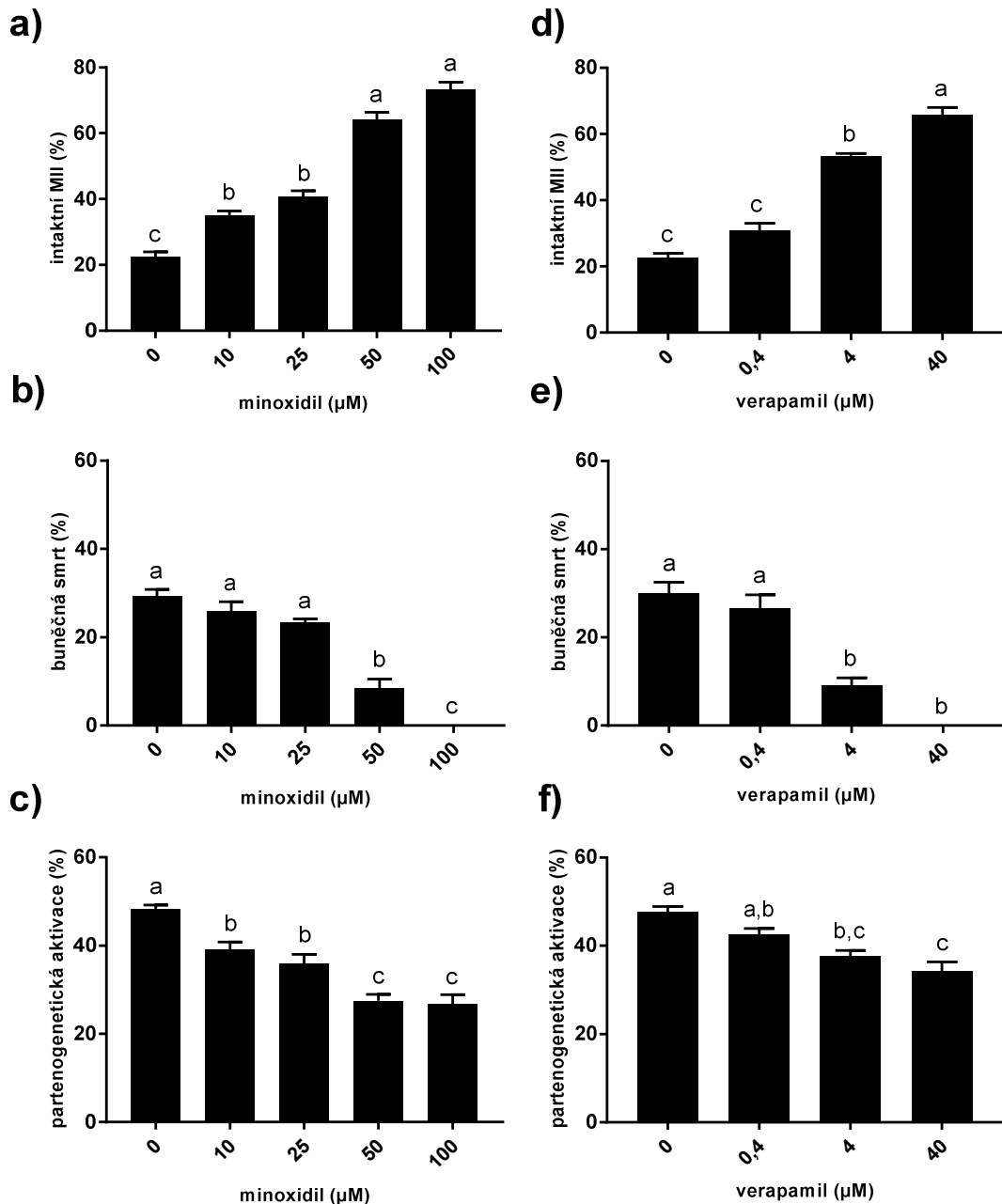
oocyty pak vykazovaly úspěšnost oplození, respektive prvního rýhování, v 77,24 %. V druhé kontrolní skupině byly spermie z čerstvé inseminační dávky injikovány do oocytů po identickém postupu a manipulacích, jen bez přidané protilátky. V této skupině (n=148) došlo k rozdělení zygoty ve 64,54 % případů (hodnota t-testu P=0,029). Ještě výraznější efekt byl patrný při sledování vývoje těchto skupin do stádia blastocysty. Z oocytů s injikovanými spermii po inkubaci s protilátkou byl tento vývoj úspěšný v 24,03 % případů. Paralelní kontrolní skupina poté vykazovala úspěšný vývoj do blastocysty v 14,19 % (hodnota t-testu P=0,0087).



Graf 7: Porovnání úspěšnosti oplození a vývoje do stádia blastocysty u oocytů, které byly oplozeny pomocí čerstvých spermií nebo čerstvých spermií, které byly nejprve inkubovány s primární protilátkou proti Ub. Experiment probíhal v paralelních skupinách. Výsledky byly získány ze 13 opakování.

6.3 Vliv napodobení protektivních účinků účinku sulfanu na oocyty v MII fázi

Při napodobení protektivního účinku sulfanu byl předpokládán jeho regulační vliv na Ca^{2+} iontové kanály typu L a na ATP dependentní kanály pro ionty K^+ . Prodloužená inkubace oocytů MII fázi po dobu dalších 72 hodin vedla u kontrolní skupiny ve velké míře k buněčné smrti nebo k partenogenetické aktivaci. Při inkubaci společně s aktivátorem K^+ kanálů (minoxidil) zůstávalo signifikantně vyšší procento oocytů v intaktním stavu, ve kterém nebyly morfologicky patrné známky stárnutí, jako lýze nebo fragmentace. Podobné výsledky vykazovalo i použití látky verapamil, která inhibuje Ca^{2+} kanály (graf 8). U všech skupin bylo vyhodnoceno 120 oocytů, které pocházely ze třech opakovaných experimentů.

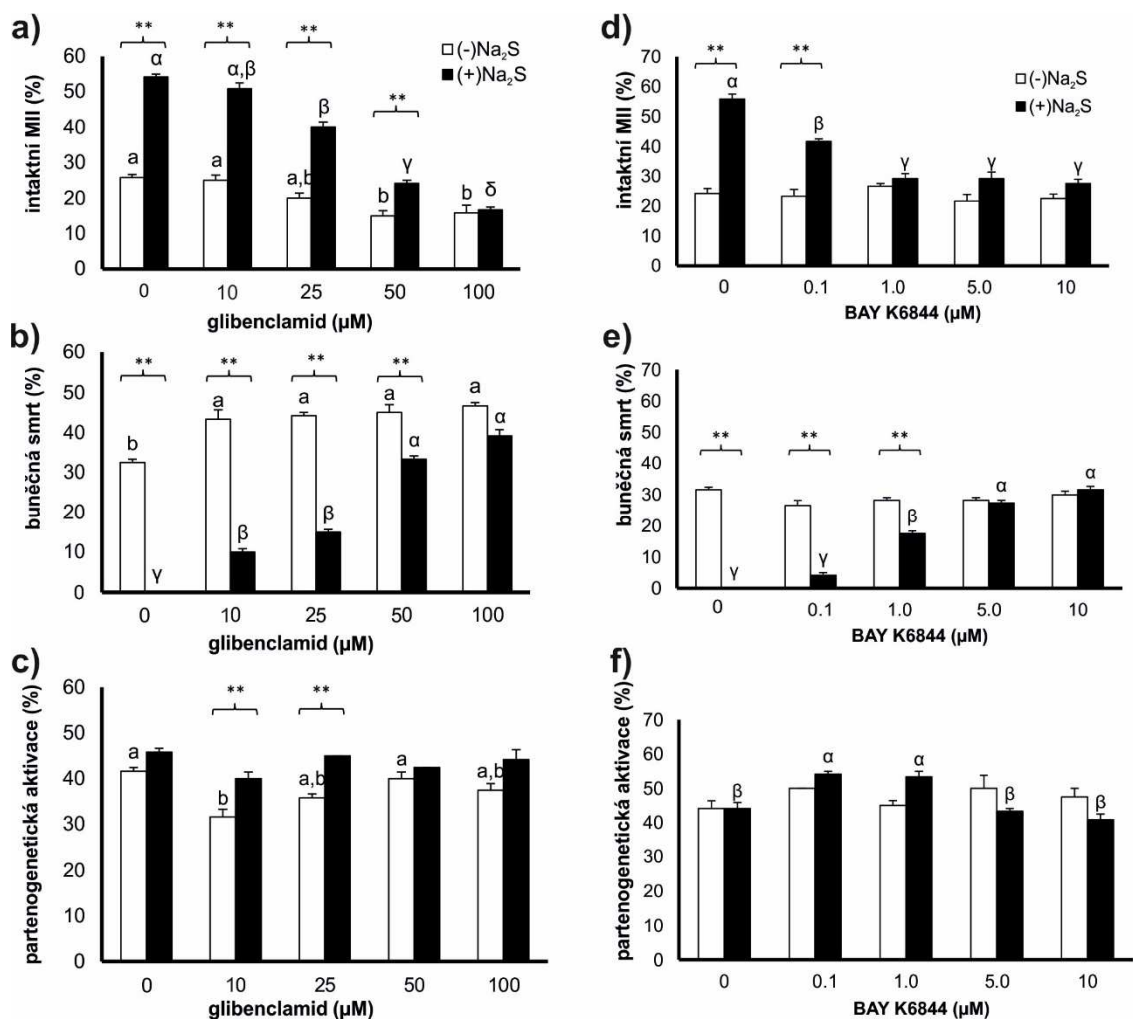


Graf 8: Vliv regulátorů iontových kanálů na stárnutí maturovaných oocytů po 72 hodinách inkubace od dosažení MII. a) - c) protektivní účinek aktivátoru ATP-dependentních K^+ kanálů (minoxidil). d) - f) velmi podobný efekt při inhibici Ca^{2+} kanálů typu L pomocí látky verapamil. Dochází ke zvýšení počtu morfologicky nezměněných, intaktních, oocytů (a, d). Naopak klesá procento oocytů, u kterých by došlo k lýzi a k fragmentaci (b, e) nebo k partenogenetické aktivaci (c, f). Odlišné indexy nad sloupci značí signifikantní rozdíl skupin ($P < 0,05$).

6.4 Vyušení účinků H_2S na stárnutí oocytů

Protektivní účinky H_2S na stárnutí oocytu byly již prokázány předchozími studiemi a další experiment se pokouší odpovědět na otázku, zda je tento vliv spojen s K^+ a Ca^{2+} kanály. Oocyty tedy byly kultivovány v médiu s donorem H_2S , kterým je Na_2S . Kultivace s donorem H_2S vedla ke zvýšení procenta oocytů, které ani po 72 hodinách kultivace ve stádiu MII nevykazovaly známky stárnutí a degradace. Při přidání inhibitoru ATP

dependentních K^+ kanálů (glibenclamid) v různých koncentracích docházelo k vyrušení tohoto působení H_2S na oocyty, až bylo, při vyšších koncentracích inhibitoru, úplně potlačeno, jak je vidět na grafu 9. Při vyšších koncentracích inhibitoru navíc docházelo ke snížení počtu intaktních oocytů i ve skupině, která nebyla inkubována s donorem H_2S . Stejným způsobem dále fungovala aktivace Ca^{2+} kanálů pomocí látky BAY K8644, která opět redukovala a následně zcela potlačila protektivní účinek působení H_2S , a to bez toho, že by samotná její koncentrace nějak ovlivňovala oocyty, které byly inkubovány v médiu bez Na_2S . U všech skupin bylo vyhodnoceno 120 oocytů, které pocházely ze třech opakovaní experimentů.



Graf 9: Efekt kombinovaného působení Na_2S (donor H_2S) a různých koncentrací regulátorů iontových kanálů s opačným účinkem. a) - c) vyrušení protektivního vlivu H_2S pomocí inhibitoru ATP-dependentních K^+ kanálů (glibenclamid). Účinek inhibitoru je silně patrný při kombinaci s donorem H_2S u morfoloogicky nezměněných oocytů a oocytů degradovaných, ale nemá zásadní vliv na partenogenetickou aktivaci. Stejně tak v kontrolních skupinách bez gasotransmiteru je jeho vliv výrazně nižší. d) - f) působení agonisty Ca^{2+} kanálů typu L (BAY K6844) při současném vlivu H_2S . Opět je patrné signifikantní zvýšení procenta lyzovaných a fragmentovaných oocytů při vyrušení protektivního vlivu H_2S na maturované oocyty. Vliv na partenogenetickou aktivaci je opět minimální. Odlišné indexy nad sloupci značí signifikantní rozdíl skupin ($P < 0,05$).

7 Diskuze

V rámci diskuze bych chtěl nejen rozebrat jednotlivé výsledky a snažit se je porovnat se současným stavem poznání v oboru, ale chtěl bych i poskytnout některé užitečné postřehy, které nebylo možno zařadit do předchozího textu. Domnívám se totiž, že pokud by tato práce mohla někomu posloužit, bude to právě těmi drobnými detaily, na které v publikacích nebývá místo.

7.1 Třídění kančích spermií a jejich následná kryoprezervace

Možnosti analýzy a selekce spermií na průtokovém cytometru jsou poměrně široké. U hospodářských zvířat se nejčastěji tento přístup používá u skotu (Verberckmoes et al., 2005; Garner, 2006; Rath et al., 2009; Jo et al., 2014). Zde začíná být celkem běžným jevem výstupní kontrola inseminačních dávek pomocí FACS a vzhledem k rychlosti a spolehlivosti se bude patrně dále rozšiřovat, což je umožněno i díky snižující se finanční náročnosti této metody. Třídění spermií je již také celkem zavedenou metodou, ačkoli se používá převážně jen pro selekci spermií na základě obsahu pohlavních chromozomů, a tedy možnosti vytvořit inseminační dávky, které s velkou mírou spolehlivosti zaručí pohlaví nového jedince (Garner, 2006). U kančích spermií je však situace oproti skotu značně odlišná, což je způsobeno výrazně nižší prestiží odvětví v porovnání se šlechtěním skotu a zároveň i nižším ekonomickým potenciálem. Dalším důvodem je potřeba velmi vysokého počtu spermií pro vytvoření jedné inseminační dávky. U skotu je možné pro běžnou inseminaci použít dávku s 10-20 miliony spermií a při některých postupech i pouze s 2 miliony (Verberckmoes et al., 2005; Schenk et al., 2006). Oproti tomu běžná inseminační dávka u prasat obsahuje $1,5-6 \times 10^9$ spermií, při použití endoskopického intraděložního oplození potom 5×10^7 (Martinez et al., 2001). Dalším problémem je vysoká náchylnost kančích spermií k poškození. Výsledkem je, že tato metoda je velmi málo používaná a tím i nedostatečně optimalizovaná. Velmi podobná situace je i s kryoprezervací kančích spermií (Spinaci et al., 2016; Yeste et al., 2017). Přes všechny tyto nevýhody bylo pro náš výzkum nezbytné zavedení obou metod. Díky třídění na FACS jsme mohli získat populace spermií, s odlišnou mírou povrchové ubiquitinace. Kryoprezervace nám zase umožnila odstranit variabilitu pokusů, kterou způsobovalo použití inseminačních dávek od různých kanců, případně i jen z různých odběrů u stejného kance (Alkmin et al., 2014). Tento efekt je poměrně dobře patrný na rozptylu hodnot našich výsledků. Při použití F/T spermií byly výsledky vždy méně variabilní s nižší hodnotou SEM. Optimalizace sortingu vedla k získání zvolené populace spermií

s minimální kontaminací s jinými parametry, ale bohužel rychlost třídění je zatím stále velmi nízká (Cossarizza et al., 2017). To sice není problém pro vlastní metodu ICSI, kde je spermií potřeba jen pár desítek, ale výrazně to ztěžuje kryoprezervaci. Velmi podstatnou se zdá být i důkladná selekce neviabilních spermií před sortingem, jelikož jejich přítomnost v tříděné suspenzi značně zhoršuje přesnost výsledků, zvláště vzhledem k tomu, že u spermií s již poškozenou membránou odhalí intracytoplazmatické a akrozomální proteiny, které jsou často rovněž značeny pomocí Ub.

Postupy pro mrazení spermií jsou optimalizovány na koncentrace několika desítek až stovek milionů spermií na mililitr (Rodriguez-Martinez a Wallgren, 2011). V rámci našich experimentů jsme potřebovali zamrazit pouze několik tisíc spermií v každé zatavené kapiláře. Z tohoto důvodu jsme pracovali jen s 30 μ l alikvóty, které byly umístěny ve skleněné kapiláře, namísto použití klasických plastových „brček“ s objemem 0,25-5 ml. Tento malý objem a z něj vyplývající minimální tepelná kapacita vyžadovaly, aby přidání složky zamrazovacího média s kryoprotektanty, po postupném ochlazení suspenze na 5 °C, bylo provedeno v chladové místnosti s naprostým vyloučením všech teplotních skoků (třeba jen vteřinového uchopení kapiláry do holé ruky). V okamžiku zavedení tohoto postupu se výrazně zlepšila viabilita spermií po rozmrazení. Podobně důležité bylo také minimalizování pobytu spermií v kryoprotektivním médiu za pokojové teploty, a to jak před zamrazením, tak po něm. Vlastní výběr vhodné kombinace médií je pro celkový úspěch zcela zásadní. Námi zvolené komerční médium Solusem je dobře dostupnou a ověřenou variantou k rozšířenějšímu médiu Androhep (Minitube, Německo) a umožňuje dlouhodobější pobyt spermií v sorteru a tím i dostatečný prostor pro selekci potřebného množství spermií pro vytvoření alikvót pro další použití (Petelak a Krylov, 2016). Navíc jeho složení příliš neovlivňuje povrchové napětí, které je důležité pro správnou tvorbu kapének (Cossarizza et al., 2017). Kromě úspěšného zavedení obou metod je výsledkem i další důkaz, že extracelulární Ub by mohl sloužit jako marker kvality pro savčí spermie, jelikož spermie s vyšší mírou extracelulární ubiquitinace vykazovaly horší viabilitu a častější morfologické defekty (nepublikovaná data), což je v souladu s jinými studiemi (Sutovsky et al., 2002, 2004; Hodjat et al., 2008).

7.2 Vliv ubiquitinace na úspěšnost oplození a vývoj do stádia blastocysty

7.2.1 Porovnání úspěšnosti oplození po ICSI při použití čerstvé inseminační dávky nebo F/T spermii

Přes zmíněné komplikace při mražení spermii se podařilo dosáhnout i s F/T spermii dobrých výsledků úspěšnosti oplození i vývoje do stádia blastocysty. V porovnání s oocyty oplozenými pomocí nemražených spermii byly tyto výsledky sice zhoršené, ale ne natolik, aby tento rozdíl byl signifikantní. Přitom protokol pro kryoprezervaci kančích spermii, který jsme použili, je stále založen na přidání 20 % vaječného žloutku a glycerolu, přičemž tento recept byl ustanoven v 50. letech minulého století (Polge et al., 1949; Walters et al., 2009). Z různých zkoušených variant ovšem poskytoval nejlepší výsledky i při jednoduchém mražení v parách tekutého dusíku.

Výsledná úspěšnost oplození metodou ICSI i následného vývoje do stádia blastocysty je srovnatelná s výsledky podobných studií při použití čerstvých i F/T spermii (Kwon et al., 2004; Garcia-Rosello et al., 2006; García-Roselló et al., 2009).

Oplození pomocí ICSI bylo v rámci našich experimentů nepostradatelné. Zdánlivě by se sice nabízela možnost použití konvenční techniky IVF, která u čerstvých i mražených spermii umožňuje dosažení podobných výsledků jako u metody ICSI (Daigneault et al., 2014), problém však byl v aplikaci inhibitoru proteazomálního komplexu MG132 a v inkubaci spermii s protilátkou proti Ub před oplozením. V kapitole 2.4.5 je zmíněna úloha proteazomu neseného spermii při průniku přes ZP. Pokud bychom chtěli testovat naši teorii o rozdílném vlivu inhibitoru MG132 na úspěšnost oplození a časný embryonální vývoj s použitím sortovaných spermii, bylo by nutné přidat inhibitor až do média pro kultivaci po oplození. Jeho aplikace do média, ve kterém k oplození dochází, znemožní spermii proniknout přes ZP k membráně oocytu (Sutovsky et al., 2004; Zimmerman et al., 2011). Podobná situace nastává i při inkubaci spermii s protilátkou proti Ub. Zde sice může docházet k oplození, ale jeho úspěšnost je sotva čtvrtinová v porovnání se skupinou, která s protilátkou inkubována nebyla (Wang et al., 2002). Autoři této studie předpokládali, že extracelulární Ub je podstatný pro vazbu spermie na ZP, na druhou stranu důkazy pro toto tvrzení neexistují. Tato domněnka se zakládá hlavně na faktu, že inhibice oplození pomocí protilátky proti Ub fungovala pouze u oocytů s intaktní ZP, pokud byly oocyty ZP zbaveny, docházelo k oplození se stejným úspěchem jako u spermii bez inkubace s protilátkou (Wang et al., 2002).

7.2.2 Porovnání úspěšnosti oplození a časného embryonálního vývoje po ICSI v závislosti na extracelulárním Ub

Při vyhodnocení úspěšnosti oplození a formování prvojader jsme nezjistili signifikantní rozdíly mezi oocyty, do kterých jsme injikovali tříděné F/T spermie. Tyto výsledky jsou konzistentní i s dalším experimentem, kdy byla úspěšnost oplození analyzována i u oocytů určených pro vývoj do stádia blastocysty. Zdá se tak, že vliv extracelulárního Ub nabývá na významu až v pozdějších fázích časného embryonálního vývoje, ale není zásadní pro první rýhování zygoty. Znamená to také, že pokud by vylepšení úspěšnosti oplození a vývoje do blastocysty po použití spermií koinkubovaných s protilátkou proti Ub bylo způsobeno zcela jiným mechanismem než právě blokováním extracelulárního Ub, tak i méně kvalitní spermie mohou dát vzniknout zygotě se stejnou pravděpodobností jako spermie kvalitnější. Samozřejmě při přijetí teorie, že extracelulární úroveň značení pomocí Ub je spjata s jejich kvalitou. Tuto teorii však potvrzuje velké množství studií vzniklých v minulosti (Sutovsky et al., 2002; Ozanon et al., 2005; Lovercamp et al., 2007; Hodjat et al., 2008), a jen u několika z nich jsou závěry opačné (Varum et al., 2007; Eskandari-Shahraki et al., 2013). Podrobněji jsou tyto studie rozebírány v kapitole 2.2.4.

Zajímavější výsledky však poskytla dlouhodobější kultivace oocytů oplozených tříděnými spermiemi. Rozdíl byl patrný již ve fázích vývoje před reaktivací embryonálního genomu (EGA), která u prasete nastává ve 4 buněčném stádiu (Telford et al., 1990). U embryí, která vznikla po injikaci hUb, se vývoj ve 2-4 buněčném stádiu zastavil signifikantně častěji než u embryí vzniklých injikací lUb. Ještě výraznější rozdíl je poté v samotném vývoji embryí do blastocysty, kdy nízce ubiquitinované spermie dávaly vzniknout blastocystám ve více než dvojnásobku případů. Tento výsledek silně podporuje možnost využití extracelulárního Ub jako markeru kvality a je vlastně prvním přímým důkazem jejich snížené schopnosti dát vzniknout řádnému embryu. Předchozí studie vyjadřovaly vždy jen korelaci výsledku analýzy míry extracelulární ubiquitinace v části vzorku a následné úspěšnosti oplození, vývoje do blastocysty, implantace do dělohy, případně vzniku potomků (Sutovsky et al., 2004; Lovercamp et al., 2007; Sutovsky, 2015). V naší studii jsou však přímo použity spermie s vybranou mírou extracelulární ubiquitinace pro vlastní oplození. Přitom z výsledku vyplývá, že extracelulárně značené spermie mají signifikantně horší výsledky než spermie neznačené. Problémem se nezdá být ani předchozí značení Ub pro analýzu a třídění spermií, které by mohlo maskovat extracelulární ubiquitin podobně, jako jsme to provedli v experimentu při inkubaci

s protilátkou. V několika pokusech jsme si ověřili (nepublikovaná data), že pokud jsou spermie před zamrazením inkubovány pouze s primární protilátkou a po rozmrazení se inkubují se sekundární protilátkou s navázaným FITC, není následně viditelný žádný fluorescenční signál. Na druhou stranu je možné inkubovat F/T spermie s primární a následně sekundární protilátkou. V tomto případě je již je fluorescenční signál možné detekovat.

V dalším experimentu se nám bohužel nepodařilo prokázat rozdílný vliv inhibitoru proteazomu MG132 na oplození a časný embryonální vývoj u oocytů, které byly oplozeny F/T spermii nebo spermii po třídění a následné kryoprezervaci. V rámci naší hypotézy jsme uvažovali o možném rozpoznání extracelulárního ubiquitinu na membráně spermií právě pomocí proteazomálního komplexu v cytoplazmě oocytu. Inhibicí proteazomálního komplexu však dojde současně k zabránění aktivace APC/C, degradace cyklinu B a k setrvalé aktivitě MPF, což má za následek, že dokončení II. meiózy a formování prvojader může nastat až se zpožděním po zrušení působení inhibitoru (Amdani et al., 2015). O tomto faktu jsme věděli již z předběžných experimentů, které jsem použil pro diplomovou práci. Jejich výsledky dokonce naznačily (bez prokázané signifikance) i možné zlepšení vývoje do stádia blastocysty u oocytů, které byly bezprostředně po oplození čerstvými spermii kultivovány po dobu 18 hodin v médiu s MG132. Zajímalo nás, jestli oocyty oplozené spermii s různou mírou extracelulární ubiquitinace budou na podobnou inhibici reagovat odlišně. Pokud jsme hodnotili úspěšnost oplození, rozdíly mezi skupinami nebyly patrné. Na druhou stranu docházelo k opoždění vzniku prvojader a první rýhy, patrně díky stabilizovanému MPF. U všech experimentálních skupin (oocytů oplozených F/T spermii bez třídění; oocytů oplozených F/T IUb spermii; oocytů oplozených F/T hUb spermii) docházelo k úspěšnému prvnímu rýhování s podobnou četností, a to bez ohledu na to, zda byly oocyty prvních 18 hodin po oplození kultivovány v médiu s MG132 nebo bez něj. Obecně však došlo k výraznému snížení úspěšnosti vývoje do stádia blastocysty ve skupinách inkubovaných s inhibitorem nezávisle na tom, jestli byly použity pouze F/T spermie nebo spermie tříděné podle míry extracelulární ubiquitinace a následně kryoprezervované. Četnost blastocyst byla vždy zhruba poloviční oproti kontrolním skupinám bez inhibitoru. Rozpor těchto výsledků s předběžnými experimenty by mohl být v rozdílném momentu přidání inhibitoru k oocytům. V předchozích pokusech byl totiž MG132 až v médiu, do kterého se oocyty přenesly po oplození pomocí ICSI, což mohlo poskytnout prostor pro degradaci MPF nebo zahájení rozpoznání a dekonkondenzace spermií. Rozdíl by také mohl

vyplývat z použití kryoprezervovaných spermií, které jsou velmi náchylné na poškození během zamrazení.

Daleko zajímavějších výsledků jsme dosáhli s oplozením pomocí spermií, které byly před injekcí inkubovány s protilátkou proti Ub. Signifikantní zlepšení bylo patrné jak v úspěšnosti oplození, tak v rámci vývoje embryí do stádia blastocysty. Jelikož všechna opakování byla prováděna paralelně, se stejnými manipulacemi, pouze s přidanou protilátkou proti Ub, můžeme se domnívat, že zamaskování Ub na povrchu spermie má pozitivní vliv na vývoj po injekci spermie do oocyty. Mechanismus tohoto působení není znám, ale výsledek je v souladu s naší hypotézou o přímém vlivu Ub, kdy by se nejednalo pouze o marker kvality. Experimenty s protilátkou musely být provedeny na čerstvých spermiích. Jak je již uvedeno výše, je sice možné F/T spermie opětovně značit protilátkou a bylo by přínosné vyzkoušet vliv maskování Ub na tříděných spermiích, narážíme zde však opět na vysokou náchylnost kančích spermií na poškození (Yeste, 2016). Pokud jsme totiž zkusili značit protilátkou tříděné spermie po kryoprezervaci, během které dochází k disociaci protilátky z Ub, v poměrně krátkém čase docházelo u spermií ke ztrátě viability a celistvosti plazmatické membrány. Po skončení potřebné inkubace s protilátkou jsme pak již nedokázali najít ve vzorku motilní spermie, které by byly vhodné pro ICSI. Na druhou stranu bez kryoprezervace by nebylo možné sledovat vliv maskování na tříděné spermie, protože po sortingu by bylo nutné navázanou protilátku disociovat, což je u takto choulostivých buněk nejspíš prakticky nemožné. Dostali bychom tak tříděné spermie, ale se zamaskovaným Ub, což by následně mělo nulovou vypovídací hodnotu ohledně jeho případného vlivu v cytoplazmě oocyty.

Otázkou tak stále zůstává, zda naše výsledky znamenají pouze to, že extracelulární Ub je značkou, která upozorňuje na defektní spermie, jež by měly být degradovány v epididymis, ale unikly selekci (Sutovsky, 2003). Na druhou stranu, data získaná v rámci inkubace spermií s protilátkou proti Ub naznačují, že by skutečně mohl existovat mechanismus, který dokáže tyto spermie, jež nebyly zastaveny v epididymis, odhalit a přerušit vývoj takto vzniklého embrya. Míra extracelulární ubiquitinace také podle našich výsledků neovlivňuje vlastní oplození. Zjistili jsme jen minimální rozdíly v úspěšnosti prvního rýhování zygoty mezi skupinou oocytů oplozených spermiemi s minimálním množstvím extracelulárního Ub a oocytů oplozených spermiemi s vysokou mírou ubiquitinace. V experimentu s protilátkou proti Ub se sice objevil signifikantní rozdíl, ale ne příliš výrazný.

Nabízí se tedy možné vysvětlení, že za vlivem extracelulární ubiquitinace stojí aktivace degradačního aparátu, který by mohl interagovat s jádrem spermie, možná na podobných principech, které se uplatňují při degradaci mtDNA (Sato a Sato, 2011; Song et al., 2014). Tím by nemusela být ovlivněna fáze před EGA, kdy většina regulací je řízena oocytární cytoplazmou a maternální mRNA (Telford et al., 1990), ale problémy by se začaly objevovat až při reaktivaci genomu a po něm, během vývoje do blastocysty. Nalezení klíče pro správnou selekci spermií by poté mohlo výrazně ulehčit experimenty u modelových organismů jako je právě prase, které mají velký potenciál limitovaný nízkou úspěšností technik oplození *in vitro* (Gruppen, 2014).

7.3 Vliv regulace iontových kanálů na stárnutí oocytů

Využití protektivního vlivu gasotransmiterů na stárnutí oocytů by pak mohlo dále vylepšit použitelnost ART. Zdá se, že tento efekt je způsoben regulací iontových kanálů pro Ca^{2+} a K^+ . Podobný efekt, jaký byl pozorován při využití H_2S (Nevoral et al., 2014; Krejčova et al., 2015), je možné tedy napodobit, nebo naopak vyrušit, přímou regulací těchto iontových kanálů. Zpomalení stárnutí bylo pozorováno při inhibici Ca^{2+} kanálů typu L vlivem verapamilu. Tento specifický inhibitor, který se v klinické praxi již dlouho používá pro léčbu hypertenze (Midtbø et al., 1986), dokáže snižovat procento oocytů, u kterých vlivem stárnutí dochází k apoptóze nebo k lýzi. Tento účinek se navíc zesiluje se zvyšující se koncentrací verapamilu v kultivačním médiu. Aktivátor ATP-dependentních kanálů K^+ iontů minoxidil má podobné účinky, ale kromě snižování procenta oocytů, které lyzují nebo u nich probíhá apoptóza, zabraňuje i výrazně úspěšněji partenogenetické aktivaci než verapamil. Opačně působící regulátory těchto kanálů, tedy aktivátor ATP-dependentních K^+ kanálů glibenclamid nebo agonista Ca^{2+} kanálů označující se BAY K6844, poté dokáží eliminovat protektivní působení H_2S na oocyty. Tento reverzní experiment dále posiluje hypotézu o mechanismu působení H_2S přes regulaci iontových kanálů, jelikož oba dva tyto regulátory dokáží jeho vliv zvrátit a při jejich zvyšující se koncentraci v médiu s donorem H_2S sulfidem sodným (Na_2S) dochází ke stárnutí oocytů podobně, jako v nepřítomnosti H_2S .

Inhibice kanálů pro Ca^{2+} a aktivace K^+ tedy vede u udržení oocytů v II. meiotickém bloku a zpomalení stárnutí oocytů (Nevoral et al., 2018). Prodloužení časového okna, během kterého může dojít k oplození, pomocí zpomalení stárnutí by mohlo být velmi výhodné právě při kombinaci s metodou ICSI. Tento způsob oplození je poměrně pomalý a náročný na vlastní mechanické provedení. Zároveň mohou být výsledky značně ovlivněny

variabilitou kvality oocytů. Ty pocházejí ze zvířat, které nejsou chovány pro laboratorní účely, a jejich životní podmínky, dieta a přesný věk porážky jsou značně variabilní. Vliv má i variabilita kvality spermií, která je speciálně u kanců také velmi vysoká. Ze všech těchto důvodů by bylo výhodné, aby skupiny v párových pokusech byly co možná největší, čímž by se vliv zmíněné variability mohl značně snížit.

8 Závěr

Náš výzkum se snažil objasnit přímý vliv extracelulární ubiquitinace na úspěšnost oplození a časného embryonálního vývoje. Pro umožnění experimentů, které by tento vliv mohly prokázat, jsme museli zavést novou metodiku pro sorting spermií pomocí průtokového cytometru a následnou kryoprezervaci. Námi popsaná metoda poskytuje dostatečné množství spermií potřebných pro oplození oocytů metodou ICSI. Pokud jsme následně použili pro injikaci do oocytů spermie vybrané na základě vysoké míry extracelulární ubiquitinace, nedošlo ke zhoršení výsledků úspěšnosti oplození v porovnání se spermiemi s minimálním množstvím extracelulárního ubiquitinu. Došlo však k signifikantnímu snížení procenta embryí, která byla schopna vývoje do stádia blastocysty. Přitom v rámci porovnání obou skupin byl zjištěn i signifikantně větší počet embryí, která vznikla pomocí vysoce ubiquitinovaných spermií a jejichž vývoj se zastavil před reaktivací embryonálního genomu. Dále jsme prokázali signifikantní zlepšení vývoje do stádia blastocysty při zamaskování extracelulárního ubiquitinu specifickou protilátkou. Všechny tyto výsledky jsou ve shodě s naší hypotézou předpokládající existenci regulačního mechanismu v cytoplazmě oocyty, který může být aktivován právě ubiquitinem na vnější plazmatické membráně spermie. Pokud by se jednalo pouze o korelaci míry ubiquitinace a kvality spermií, tak by nemělo dojít k vylepšení po zamaskování extracelulárního ubiquitinu. Zdá se však, že oocyt je schopen reagovat spíše přímo na ubiquitinovou značku, než na vlastní kvalitu spermie. Dokázali jsme také simulovat nebo vyrušit protektivní působení gasotransmiteru H_2S , který zpomaluje stárnutí maturovaných oocytů. Těchto účinků bylo dosaženo pomocí regulace iontových kanálů pro K^+ a Ca^{2+} ionty, které se zdají být klíčové pro udržení oocytů v II. metafázi, aby nedošlo k partenogenetické aktivaci, apoptóze nebo lýzi oocytů.

Výsledky výzkumu mohou pomoci vylepšit celkově nízkou úspěšnost umělého oplození u prasete.

9 Seznam literatury

- Aarabi, M.; Balakier, H.; Bashar, S.; Moskovtsev, S. I.; Sutovsky, P.; Librach, C. L.; Oko, R., 2014. *Sperm-derived WW domain-binding protein, PAWP, elicits calcium oscillations and oocyte activation in humans and mice*. The FASEB Journal 28(10), 4434–4440. <https://doi.org/10.1096/fj.14-256495>
- Abe, K.; Kimura, H., 1996. *The possible role of hydrogen sulfide as an endogenous neuromodulator*. The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience 16(3), 1066–71. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.16-03-01066.1996>
- Abou-haila, A.; Tulsiani, D. R. P., 2009. *Signal transduction pathways that regulate sperm capacitation and the acrosome reaction*. Archives of Biochemistry and Biophysics 485(1), 72–81. <https://doi.org/10.1016/j.abb.2009.02.003>
- Adeoya-Osiguwa, S. A.; Fraser, L. R., 1996. *Evidence for Ca²⁺-dependent ATPase activity, stimulated by decapacitation factor and calmodulin, in mouse sperm*. Molecular Reproduction and Development 44(1), 111–120. [https://doi.org/10.1002/\(SICI\)1098-2795\(199605\)44:1<111::AID-MRD13>3.0.CO;2-7](https://doi.org/10.1002/(SICI)1098-2795(199605)44:1<111::AID-MRD13>3.0.CO;2-7)
- Aitken, R. J.; Jones, K. T.; Robertson, S. A., 2012. *Reactive Oxygen Species and Sperm Function--In Sickness and In Health*. Journal of Andrology 33(6), 1096–1106. <https://doi.org/10.2164/jandrol.112.016535>
- Al Rawi, S.; Louvet-Vallée, S.; Djeddi, A.; Sachse, M.; Culetto, E.; Hajjar, C.; Boyd, L.; Legouis, R.; Galy, V., 2011. *Postfertilization autophagy of sperm organelles prevents paternal mitochondrial DNA transmission*. Science (New York, N.Y.) 334(6059), 1144–7. <https://doi.org/10.1126/science.1211878>
- Alkmin, D. V.; Parrilla, I.; Tarantini, T.; Parlapan, L.; Del Olmo, D.; Vazquez, J. M.; Martinez, E. A.; Roca, J., 2014. *Intra- and interboar variability in flow cytometric sperm sex sorting*. Theriogenology 82(3), 501–8. <https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2014.05.008>
- Almeida, F. F. L.; Leal, M. C.; Franc, a, L. R., 2006. *Testis Morphometry, Duration of Spermatogenesis, and Spermatogenic Efficiency in the Wild Boar (Sus scrofa scrofa)1*. Biology of Reproduction 75(5), 792–799.

<https://doi.org/10.1095/biolreprod.106.053835>

- Amdani, S. N.; Yeste, M.; Jones, C.; Coward, K., 2015. *Sperm Factors and Oocyte Activation: Current Controversies and Considerations I*. *Biology of Reproduction* 93(2), 1–8. <https://doi.org/10.1095/biolreprod.115.130609>
- Anslinger, K.; Bayer, B.; Danilov, S. M.; Metzger, R., 2008. *Application of sperm-specific antibodies for the separation of sperm from cell mixtures*. *Forensic Science International: Genetics Supplement Series* 1(1), 394–395. <https://doi.org/10.1016/J.FSIGSS.2007.10.140>
- Baba, T.; Azuma, S.; Kashiwabara, S.; Toyoda, Y., 1994. *Sperm from mice carrying a targeted mutation of the acrosin gene can penetrate the oocyte zona pellucida and effect fertilization*. *The Journal of biological chemistry* 269(50), 31845–9.
- Balao da Silva, C. M.; Ortega Ferrusola, C.; Morillo Rodriguez, A.; Gallardo Bolaños, J. M.; Plaza Dávila, M.; Morrell, J. M.; Rodriguez Martínez, H.; Tapia, J. A.; Aparicio, I. M.; Peña, F. J., 2013. *Sex sorting increases the permeability of the membrane of stallion spermatozoa*. *Animal Reproduction Science* 138(3–4), 241–251. <https://doi.org/10.1016/j.anireprosci.2013.02.021>
- Barranco, I.; Ortega, M. D.; Martinez-Alborcia, M. J.; Vazquez, J. M.; Martinez, E. A.; Roca, J., 2013. *Season of ejaculate collection influences the freezability of boar spermatozoa*. *Cryobiology* 67(3), 299–304. <https://doi.org/10.1016/J.CRYOBIOL.2013.09.001>
- Baska, K. M.; Manandhar, G.; Feng, D.; Agca, Y.; Tengowski, M. W.; Sutovsky, M.; Yi, Y.-J.; Sutovsky, P., 2008. *Mechanism of extracellular ubiquitination in the mammalian epididymis*. *Journal of Cellular Physiology* 215(3), 684–696. <https://doi.org/10.1002/jcp.21349>
- Ben-Saadon, R.; Zaaroor, D.; Ziv, T.; Ciechanover, A., 2006. *The Polycomb Protein Ring1B Generates Self Atypical Mixed Ubiquitin Chains Required for Its In Vitro Histone H2A Ligase Activity*. *Molecular Cell* 24(5), 701–711. <https://doi.org/10.1016/J.MOLCEL.2006.10.022>
- Berruti, G., 2016. *Towards defining an ‘origin’—The case for the mammalian acrosome*. *Seminars in Cell & Developmental Biology* 59, 46–53. <https://doi.org/10.1016/J.SEMCDB.2016.01.013>

- Bianchi, E.; Doe, B.; Goulding, D.; Wright, G. J., 2014. *Juno is the egg Izumo receptor and is essential for mammalian fertilization*. *Nature* 508(7497), 483–487. <https://doi.org/10.1038/nature13203>
- Bjerke, T.; Nielsen, S.; Helgestad, J.; Nielsen, B. W.; Schiøtz, P. O., 1993. *Purification of human blood basophils by negative selection using immunomagnetic beads*. *Journal of Immunological Methods* 157(1–2), 49–56. [https://doi.org/10.1016/0022-1759\(93\)90069-J](https://doi.org/10.1016/0022-1759(93)90069-J)
- Blackmore, D. G.; Baillie, L. R.; Holt, J. E.; Dierkx, L.; Aitken, R. J.; McLaughlin, E. A., 2004. *Biosynthesis of the Canine Zona Pellucida Requires the Integrated Participation of Both Oocytes and Granulosa Cells*. *Biology of Reproduction* 71(2), 661–668. <https://doi.org/10.1095/biolreprod.104.028779>
- Boutet, S. C.; Disatnik, M.-H.; Chan, L. S.; Iori, K.; Rando, T. A., 2007. *Regulation of Pax3 by Proteasomal Degradation of Monoubiquitinated Protein in Skeletal Muscle Progenitors*. *Cell* 130(2), 349–362. <https://doi.org/10.1016/J.CELL.2007.05.044>
- Brouard, S.; Otterbein, L. E.; Anrather, J.; Tobiasch, E.; Bach, F. H.; Choi, A. M.; Soares, M. P., 2000. *Carbon monoxide generated by heme oxygenase 1 suppresses endothelial cell apoptosis*. *The Journal of experimental medicine* 192(7), 1015–26. <https://doi.org/10.1084/JEM.192.7.1015>
- Bu, S.; Xia, G.; Tao, Y.; Lei, L.; Zhou, B., 2003. *Dual effects of nitric oxide on meiotic maturation of mouse cumulus cell-enclosed oocytes in vitro*. *Molecular and Cellular Endocrinology* 207(1–2), 21–30. [https://doi.org/10.1016/S0303-7207\(03\)00213-2](https://doi.org/10.1016/S0303-7207(03)00213-2)
- Buschow, S. I.; Liefhebber, J. M. P.; Wubbolts, R.; Stoorvogel, W., 2005. *Exosomes contain ubiquitinated proteins*. *Blood Cells, Molecules, and Diseases* 35(3), 398–403. <https://doi.org/10.1016/J.BCMD.2005.08.005>
- Carvalho, L.; Muñoz, R.; Bustos, F.; Escobedo, N.; Carrasco, H.; Olivares, G.; Larrain, J., 2010. *Non-canonical Wnt signaling induces ubiquitination and degradation of Syndecan4*. *The Journal of biological chemistry* 285(38), 29546–55. <https://doi.org/10.1074/jbc.M110.155812>
- Casas, I.; Sancho, S.; Ballester, J.; Briz, M.; Pinart, E.; Bussalleu, E.; Yeste, M.; Fàbrega, A.; Rodríguez-Gil, J. E.; Bonet, S., 2010. *The HSP90AA1 sperm content and the*

- prediction of the boar ejaculate freezability*. *Theriogenology* 74(6), 940–950. <https://doi.org/10.1016/J.THERIOGENOLOGY.2010.04.021>
- Cetica, D.; Pintos, L. N.; G. C. Dalv, P.; Pintos, L. N.; Dalvit, G. C.; Beconi, M. T., 2001. *Antioxidant Enzyme Activity and Oxidative Stress in Bovine Oocyte In Vitro Maturation*. *IUBMB Life (International Union of Biochemistry and Molecular Biology: Life)* 51(1), 57–64. <https://doi.org/10.1080/15216540119253>
- Chakravarty, S.; Bansal, P.; Sutovsky, P.; Gupta, S. K., 2008. *Role of proteasomal activity in the induction of acrosomal exocytosis in human spermatozoa*. *Reproductive BioMedicine Online* 16(3), 391–400. [https://doi.org/10.1016/S1472-6483\(10\)60601-3](https://doi.org/10.1016/S1472-6483(10)60601-3)
- Chappel, S., 2013. *The role of mitochondria from mature oocyte to viable blastocyst*. *Obstetrics and gynecology international* 2013, 183024. <https://doi.org/10.1155/2013/183024>
- Chávez, J. C.; De la Vega-Beltrán, J. L.; José, O.; Torres, P.; Nishigaki, T.; Treviño, C. L.; Darszon, A., 2018. *Acrosomal alkalization triggers Ca²⁺ release and acrosome reaction in mammalian spermatozoa*. *Journal of Cellular Physiology* 233(6), 4735–4747. <https://doi.org/10.1002/jcp.26262>
- Chen, X.; Zhu, H.; Hu, C.; Hao, H.; Zhang, J.; Li, K.; Zhao, X.; Qin, T.; Zhao, K.; Zhu, H.; Wang, D., 2014. *Identification of differentially expressed proteins in fresh and frozen-thawed boar spermatozoa by iTRAQ-coupled 2D LC-MS/MS*. *Reproduction* 147(3), 321–330. <https://doi.org/10.1530/REP-13-0313>
- Chermuła, B.; Brązert, M.; Jeseta, M.; Ożegowska, K.; Sujka-Kordowska, P.; Konwerska, A.; Bryja, A.; Kranc, W.; Jankowski, M.; Nawrocki, M. J.; Kocherova, I.; Celichowski, P.; Borowiec, B.; Popis, M.; Budna-Tukan, J.; Antosik, P.; Bukowska, D.; Brussow, K. P.; Pawelczyk, L.; Bruska, M.; Zabel, M.; Nowicki, M.; Kempisty, B., 2018. *The Unique Mechanisms of Cellular Proliferation, Migration and Apoptosis are Regulated through Oocyte Maturation Development-A Complete Transcriptomic and Histochemical Study*. *International journal of molecular sciences* 20(1). <https://doi.org/10.3390/ijms20010084>
- Chmelíková, E.; Jeřeta, M.; Sedmíková, M.; Petr, J.; Tůmová, L.; Kott, T.; Lipovová, P.; Jílek, F., 2010. *Nitric oxide synthase isoforms and the effect of their inhibition on*

- meiotic maturation of porcine oocytes.* *Zygote* 18(03), 235–244.
<https://doi.org/10.1017/S0967199409990268>
- Ciechanover, A.; Stanhill, A., 2014. *The complexity of recognition of ubiquitinated substrates by the 26S proteasome.* *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Cell Research* 1843(1), 86–96. <https://doi.org/10.1016/J.BBAMCR.2013.07.007>
- Cimadomo, D.; Fabozzi, G.; Vaiarelli, A.; Ubaldi, N.; Ubaldi, F. M.; Rienzi, L., 2018. *Impact of Maternal Age on Oocyte and Embryo Competence.* *Frontiers in endocrinology* 9, 327. <https://doi.org/10.3389/fendo.2018.00327>
- Conaway, R. C., 2002. *Emerging Roles of Ubiquitin in Transcription Regulation.* *Science* 296(5571), 1254–1258. <https://doi.org/10.1126/science.1067466>
- Conti, M.; Franciosi, F., 2018. *Acquisition of oocyte competence to develop as an embryo: integrated nuclear and cytoplasmic events.* *Human Reproduction Update* 24(3), 245–266. <https://doi.org/10.1093/humupd/dmx040>
- Cornwall, G. A., 2009. *New insights into epididymal biology and function.* *Human Reproduction Update* 15(2), 213–227. <https://doi.org/10.1093/humupd/dmn055>
- Cory, S.; Adams, J. M., 2002. *The Bcl2 family: regulators of the cellular life-or-death switch.* *Nature Reviews Cancer* 2(9), 647–656. <https://doi.org/10.1038/nrc883>
- Cossarizza, A.; Chang, H.-D.; Radbruch, A.; Goettlinger, C.; Goodyear, C. S.; Gori, A.; Grogan, J.; Gross, M.; Grützkau, A.; Grummitt, D.; Hahn, J.; Herrmann, M.; Hiepe, F.; Holland, T.; Lopez, L.; Lovett-Racke, A.; Lubberts, E.; Ludewig, B.; Lugli, E.; Maecker, H. T.; Martrus, G.; Matarese, G.; Maueröder, C.; McGrath, M.; McInnes, I.; Mei, H. E.; Melchers, F.; Melzer, S.; Mielenz, D.; Mills, K.; Mirrer, D.; Mjösberg, J.; Moore, J.; Ouyang, W.; Oxenius, A.; Palankar, R.; Panse, I.; Peterson, P.; Peth, C.; Petriz, J.; Philips, D.; Pickl, W.; Piconese, S.; Pinti, M.; Pockley, A. G.; Podolska, M. J.; Pucillo, C.; Quataert, S. A.; Radstake, T. R. D. J.; Ziegler, S.; Zimmermann, J., 2017. *Guidelines for the use of flow cytometry and cell sorting in immunological studies.* *European Journal of Immunology* 47(10), 1584–1797. <https://doi.org/10.1002/eji.201646632>
- Cotterill, M.; Harris, S. E.; Collado Fernandez, E.; Lu, J.; Huntriss, J. D.; Campbell, B. K.; Picton, H. M., 2013. *The activity and copy number of mitochondrial DNA in ovine oocytes throughout oogenesis in vivo and during oocyte maturation in vitro.*

- Molecular human reproduction 19(7), 444–50.
<https://doi.org/10.1093/molehr/gat013>
- Cross, N. L.; Watson, S. K., 1994. *Assessing acrosomal status of bovine sperm using fluoresceinated lectins.* Theriogenology 42(1), 89–98.
[https://doi.org/10.1016/0093-691X\(94\)90665-6](https://doi.org/10.1016/0093-691X(94)90665-6)
- Cui, M.-S.; Wang, X.-L.; Tang, D.-W.; Zhang, J.; Liu, Y.; Zeng, S.-M., 2011. *Acetylation of H4K12 in porcine oocytes during in vitro aging: potential role of ooplasmic reactive oxygen species.* Theriogenology 75(4), 638–646.
<https://doi.org/10.1016/J.THERIOGENOLOGY.2010.09.031>
- Daigneault, B. W.; McNamara, K. A.; Purdy, P. H.; Krisher, R. L.; Knox, R. V.; Miller, D. J., 2014. *Novel and traditional traits of frozen-thawed porcine sperm related to in vitro fertilization success.* Theriogenology 82(2), 266–273.
<https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2014.04.006>
- Day, M. L.; Pickering, S. J.; Johnson, M. H.; Cook, D. I., 1993. *Cell-cycle control of a large-conductance K⁺ channel in mouse early embryos.* Nature 365(6446), 560–562.
<https://doi.org/10.1038/365560a0>
- Di Emidio, G.; Falone, S.; Vitti, M.; D’Alessandro, A. M.; Vento, M.; Di Pietro, C.; Amicarelli, F.; Tatone, C., 2014. *SIRT1 signalling protects mouse oocytes against oxidative stress and is deregulated during aging.* Human Reproduction 29(9), 2006–2017. <https://doi.org/10.1093/humrep/deu160>
- Dieci, C.; Lodde, V.; Franciosi, F.; Lagutina, I.; Tessaro, I.; Modena, S. C.; Albertini, D. F.; Lazzari, G.; Galli, C.; Luciano, A. M., 2013. *The Effect of Cilostamide on Gap Junction Communication Dynamics, Chromatin Remodeling, and Competence Acquisition in Pig Oocytes Following Parthenogenetic Activation and Nuclear Transfer1.* Biology of Reproduction 89(3), 68.
<https://doi.org/10.1095/biolreprod.113.110577>
- Dimova, N. V.; Hathaway, N. A.; Lee, B.-H.; Kirkpatrick, D. S.; Berkowitz, M. L.; Gygi, S. P.; Finley, D.; King, R. W., 2012. *APC/C-mediated multiple monoubiquitylation provides an alternative degradation signal for cyclin B1.* Nature cell biology 14(2), 168–76. <https://doi.org/10.1038/ncb2425>
- Donato, A. J.; Magerko, K. A.; Lawson, B. R.; Durrant, J. R.; Lesniewski, L. A.; Seals, D.

- R., 2011. *SIRT-1 and vascular endothelial dysfunction with ageing in mice and humans*. The Journal of Physiology 589(18), 4545–4554. <https://doi.org/10.1113/jphysiol.2011.211219>
- Donnarumma, E.; Trivedi, R. K.; Lefer, D. J., 2017. *Protective Actions of H₂S in Acute Myocardial Infarction and Heart Failure*, In: Comprehensive Physiology. John Wiley & Sons, Inc., Hoboken, NJ, USA. <https://doi.org/10.1002/cphy.c160023>
- Donnelly, E. T.; O’Connell, M.; McClure, N.; Lewis, S. E. M., 2000. *Differences in nuclear DNA fragmentation and mitochondrial integrity of semen and prepared human spermatozoa*. Human Reproduction 15(7), 1552–1561. <https://doi.org/10.1093/humrep/15.7.1552>
- Downs, S. M., 2010. *Regulation of the G2/M transition in rodent oocytes*. Molecular reproduction and development 77(7), 566–85. <https://doi.org/10.1002/mrd.21175>
- Drobnis, E. Z.; Andrew, J. B.; Katz, D. F., 1988. *Biophysical properties of the zona pellucida measured by capillary suction: Is zona hardening a mechanical phenomenon?* Journal of Experimental Zoology 245(2), 206–219. <https://doi.org/10.1002/jez.1402450210>
- Dunlop, C. E.; Bayne, R. A.; McLaughlin, M.; Telfer, E. E.; Anderson, R. A., 2014. *Isolation, purification, and culture of oogonial stem cells from adult human and bovine ovarian cortex*. The Lancet 383(Special Issue), S45. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(14\)60308-1](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(14)60308-1)
- Dunlop, C. E.; Telfer, E. E.; Anderson, R. A., 2014. *Ovarian germline stem cells*. Stem Cell Research & Therapy 5(4), 98. <https://doi.org/10.1186/scrt487>
- Dunn, W. R.; Alexander, S. P. H.; Ralevic, V.; Roberts, R. E., 2016. *Effects of hydrogen sulphide in smooth muscle*. Pharmacology & Therapeutics 158, 101–113. <https://doi.org/10.1016/J.PHARMTHERA.2015.12.007>
- Dupré, A.; Haccard, O.; Jesus, C., 2011. *Mos in the oocyte: how to use MAPK independently of growth factors and transcription to control meiotic divisions*. Journal of signal transduction 2011, 350412. <https://doi.org/10.1155/2011/350412>
- Ebner, T.; Moser, M.; Sommergruber, M.; Yaman, C.; Pfleger, U.; Tews, G., 2002. *First*

- polar body morphology and blastocyst formation rate in ICSI patients.* Human reproduction (Oxford, England) 17(9), 2415–8.
- Eskandari-Shahraki, M.; Tavalae, M.; Deemeh, M. R.; Jelodar, G. A.; Nasr-Esfahani, M. H., 2013. *Proper ubiquitination effect on the fertilisation outcome post-ICSI.* Andrologia 45(3), 204–210. <https://doi.org/10.1111/j.1439-0272.2012.01330.x>
- Evenson, D. P.; Thompson, L.; Jost, L., 1994. *Flow cytometric evaluation of boar semen by the sperm chromatin structure assay as related to cryopreservation and fertility.* Theriogenology 41(3), 637–651. [https://doi.org/10.1016/0093-691X\(94\)90174-H](https://doi.org/10.1016/0093-691X(94)90174-H)
- Fang, Y.; Tang, S.; Li, X., 2019. *Sirtuins in Metabolic and Epigenetic Regulation of Stem Cells.* Trends in Endocrinology & Metabolism 30(3), 177–188. <https://doi.org/10.1016/j.tem.2018.12.002>
- Fernández, J. L.; Muriel, L.; Rivero, M. T.; Goyanes, V.; Vazquez, R.; Alvarez, J. G., 2003. *The Sperm Chromatin Dispersion Test: A Simple Method for the Determination of Sperm DNA Fragmentation.* Journal of Andrology 24(1), 59–66. <https://doi.org/10.1002/J.1939-4640.2003.TB02641.X>
- Ferreira, E. M.; Vireque, A. A.; Adona, P. R.; Meirelles, F. V.; Ferriani, R. A.; Navarro, P. A. A. S., 2009. *Cytoplasmic maturation of bovine oocytes: Structural and biochemical modifications and acquisition of developmental competence.* Theriogenology 71(5), 836–848. <https://doi.org/10.1016/J.THERIOGENOLOGY.2008.10.023>
- Florman, H. M.; Jungnickel, M. K.; Sutton, K. A., 2008. *Regulating the acrosome reaction.* The International Journal of Developmental Biology 52(5–6), 503–510. <https://doi.org/10.1387/ijdb.082696hf>
- Fraser, L.; Strzeżek, J.; Kordan, W., 2014. *Post-thaw sperm characteristics following long-term storage of boar semen in liquid nitrogen.* Animal Reproduction Science 147(3–4), 119–127. <https://doi.org/10.1016/J.ANIREPROSCI.2014.04.010>
- Fujimoto, S.; Yoshida, N.; Fukui, T.; Amanai, M.; Isobe, T.; Itagaki, C.; Izumi, T.; Perry, A. C. F., 2004. *Mammalian phospholipase C ζ induces oocyte activation from the sperm perinuclear matrix.* Developmental Biology 274(2), 370–383. <https://doi.org/10.1016/J.YDBIO.2004.07.025>

- Fukuda, A.; Roudebush, W. E.; Thatcher, S. S., 1992. *Influences of in vitro oocyte aging on microfertilization in the mouse with reference to zona hardening*. Journal of assisted reproduction and genetics 9(4), 378–83.
- Gao, D.; Critser, J. K., 2000. *Mechanisms of Cryoinjury in Living Cells*. ILAR Journal 41(4), 187–196. <https://doi.org/10.1093/ilar.41.4.187>
- Gao, M.; Karin, M., 2005. *Regulating the Regulators: Control of Protein Ubiquitination and Ubiquitin-like Modifications by Extracellular Stimuli*. Molecular Cell 19(5), 581–593. <https://doi.org/10.1016/J.MOLCEL.2005.08.017>
- García-Roselló, E.; García-Mengual, E.; Coy, P.; Alfonso, J.; Silvestre, M., 2009. *Intracytoplasmic Sperm Injection in Livestock Species: An Update*. Reproduction in Domestic Animals 44(1), 143–151. <https://doi.org/10.1111/j.1439-0531.2007.01018.x>
- Garcia-Rosello, E.; Matás, C.; Cánovas, S.; Moreira, P. N.; Gadea, J.; Coy, P., 2006. *Influence of Sperm Pretreatment on the Efficiency of Intracytoplasmic Sperm Injection in Pigs*. Journal of Andrology 27(2), 268–275. <https://doi.org/10.2164/jandrol.05110>
- Garner, D. L., 2006. *Flow cytometric sexing of mammalian sperm*. Theriogenology 65(5), 943–957. <https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2005.09.009>
- Ge, Z.-J.; Schatten, H.; Zhang, C.-L.; Sun, Q.-Y., 2015. *Oocyte ageing and epigenetics*. Reproduction (Cambridge, England) 149(3), R103-14. <https://doi.org/10.1530/REP-14-0242>
- Ghirotto, B.; Terra, F. F.; Câmara, N. O. S.; Basso, P. J., 2019. *Sirtuins in B lymphocytes metabolism and function*. World Journal of Experimental Medicine 9(1), 1–13. <https://doi.org/10.5493/wjem.v9.i1.1>
- Gil, M. A.; Roca, J.; Cremades, T.; Hernandez, M.; Vazquez, J. M.; Rodriguez-Martinez, H.; Martinez, E. A., 2005. *Does multivariate analysis of post-thaw sperm characteristics accurately estimate in vitro fertility of boar individual ejaculates?* Theriogenology 64(2), 305–316. <https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2004.11.024>
- Glickman, M. H.; Ciechanover, A., 2002. *The Ubiquitin-Proteasome Proteolytic Pathway:*

- Destruction for the Sake of Construction*. Physiological Reviews 82(2), 373–428. <https://doi.org/10.1152/physrev.00027.2001>.
- Gosden, R. ., 2002. *Oogenesis as a foundation for embryogenesis*. Molecular and Cellular Endocrinology 186(2), 149–153. [https://doi.org/10.1016/S0303-7207\(01\)00683-9](https://doi.org/10.1016/S0303-7207(01)00683-9)
- Goud, A.; Goud, P.; Diamond, M.; Van Oostveldt, P.; Hughes, M., 2005. *Microtubule turnover in ooplasm biopsy reflects ageing phenomena in the parent oocyte*. Reproductive BioMedicine Online 11(1), 43–52. [https://doi.org/10.1016/S1472-6483\(10\)61297-7](https://doi.org/10.1016/S1472-6483(10)61297-7)
- Goud, P. T.; Goud, A. P.; Diamond, M. P.; Gonik, B.; Abu-Soud, H. M., 2008. *Nitric oxide extends the oocyte temporal window for optimal fertilization*. Free radical biology & medicine 45(4), 453–9. <https://doi.org/10.1016/j.freeradbiomed.2008.04.035>
- Goudet, G.; Mugnier, S.; Callebaut, I.; Monget, P., 2008. *Phylogenetic Analysis and Identification of Pseudogenes Reveal a Progressive Loss of Zona Pellucida Genes During Evolution of Vertebrates1*. Biology of Reproduction 78(5), 796–806. <https://doi.org/10.1095/biolreprod.107.064568>
- Green, D. P., 1987. *Mammalian sperm cannot penetrate the zona pellucida solely by force*. Experimental cell research 169(1), 31–8.
- Gruppen, C. G., 2014. *The evolution of porcine embryo invitro production*. Theriogenology. <https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2013.09.022>
- Gulyas, B. J.; Yuan, L. C., 1985. *Cortical reaction and zona hardening in mouse oocytes following exposure to ethanol*. Journal of Experimental Zoology 233(2), 269–276. <https://doi.org/10.1002/jez.1402330215>
- Gyllensten, U.; Wharton, D.; Josefsson, A.; Wilson, A. C., 1991. *Paternal inheritance of mitochondrial DNA in mice*. Nature 352(6332), 255–257. <https://doi.org/10.1038/352255a0>
- Haigis, M. C.; Guarente, L. P., 2006. *Mammalian sirtuins--emerging roles in physiology, aging, and calorie restriction*. Genes & development 20(21), 2913–21. <https://doi.org/10.1101/gad.1467506>
- Hammerstedt, R. H.; Graham, J. K., 1992. *Cryopreservation of poultry sperm: the enigma*

- of glycerol*. Cryobiology 29(1), 26–38.
- Heinzmann, J.; Mattern, F.; Aldag, P.; Bernal-Ulloa, S. M.; Schneider, T.; Haaf, T.; Niemann, H., 2015. *Extended in vitro maturation affects gene expression and DNA methylation in bovine oocytes*. Molecular Human Reproduction 21(10), 770–782. <https://doi.org/10.1093/molehr/gav040>
- Hernandez, M.; Roca, J.; Calvete, J. J.; Sanz, L.; Muino-Blanco, T.; Cebrian-Perez, J. A.; Vazquez, J. M.; Martinez, E. A., 2007. *Cryosurvival and In Vitro Fertilizing Capacity Postthaw Is Improved When Boar Spermatozoa Are Frozen in the Presence of Seminal Plasma From Good Freezer Boars*. Journal of Andrology 28(5), 689–697. <https://doi.org/10.2164/jandrol.107.002725>
- Herrmann, J.; Lerman, L. O.; Lerman, A., 2007. *Ubiquitin and Ubiquitin-Like Proteins in Protein Regulation*. Circulation Research 100(9), 1276–1291. <https://doi.org/10.1161/01.RES.0000264500.11888.f0>
- Hershko, A.; Ciechanover, A., 1998. *THE UBIQUITIN SYSTEM*. Annual Review of Biochemistry 67(1), 425–479. <https://doi.org/10.1146/annurev.biochem.67.1.425>
- Hess, E. A.; Teague, H. S.; Ludwick, T. M.; Martig, R. C., 1957. *Swine can be bred with frozen semen*. Ohio Fm Home Res 42, 100.
- Hodjat, M.; Akhondi, M. A.; Al-Hasani, S.; Mobaraki, M.; Sadeghi, M. R., 2008. *Increased sperm ubiquitination correlates with abnormal chromatin integrity*. Reprod Biomed Online 17(3), 324–330.
- Hoffman, D. B.; Pearson, C. G.; Yen, T. J.; Howell, B. J.; Salmon, E. D., 2001. *Microtubule-dependent changes in assembly of microtubule motor proteins and mitotic spindle checkpoint proteins at PtK1 kinetochores*. Molecular biology of the cell 12(7), 1995–2009. <https://doi.org/10.1091/mbc.12.7.1995>
- Holt, W. V., 2000. *Basic aspects of frozen storage of semen*. Animal Reproduction Science 62(1–3), 3–22. [https://doi.org/10.1016/S0378-4320\(00\)00152-4](https://doi.org/10.1016/S0378-4320(00)00152-4)
- Holubcová, Z.; Kyjovská, D.; Martonová, M.; Páralová, D.; Klenková, T.; Otevřel, P.; Štěpánová, R.; Kloudová, S.; Hampl, A., 2019. *Egg maturity assessment prior to ICSI prevents premature fertilization of late-maturing oocytes*. Journal of Assisted Reproduction and Genetics 1–8. <https://doi.org/10.1007/s10815-018-1393-0>

- Hong, S.-J.; Chiu, P. C.-N.; Lee, K.-F.; Tse, J. Y.-M.; Ho, P.-C.; Yeung, W. S.-B., 2009. *Cumulus cells and their extracellular matrix affect the quality of the spermatozoa penetrating the cumulus mass*. *Fertility and Sterility* 92(3), 971–978. <https://doi.org/10.1016/j.fertnstert.2008.07.1760>
- Hoshino, Y., 2018. *Updating the markers for oocyte quality evaluation: intracellular temperature as a new index*. *Reproductive medicine and biology* 17(4), 434–441. <https://doi.org/10.1002/rmb2.12245>
- Huang, J.; Okuka, M.; McLean, M.; Keefe, D. L.; Liu, L., 2010. *Telomere susceptibility to cigarette smoke-induced oxidative damage and chromosomal instability of mouse embryos in vitro*. *Free Radical Biology and Medicine* 48(12), 1663–1676. <https://doi.org/10.1016/J.FREERADBIOMED.2010.03.026>
- Hunter, R. H., 1981. *Sperm transport and reservoirs in the pig oviduct in relation to the time of ovulation*. *Journal of reproduction and fertility* 63(1), 109–17.
- Hutchison, C. A.; Newbold, J. E.; Potter, S. S.; Edgell, M. H., 1974. *Maternal inheritance of mammalian mitochondrial DNA*. *Nature* 251(5475), 536–538. <https://doi.org/10.1038/251536a0>
- Inoue, N.; Hagihara, Y.; Wright, D.; Suzuki, T.; Wada, I., 2015. *Oocyte-triggered dimerization of sperm IZUMO1 promotes sperm–egg fusion in mice*. *Nature Communications* 6(1), 8858. <https://doi.org/10.1038/ncomms9858>
- Inoue, N.; Ikawa, M.; Isotani, A.; Okabe, M., 2005. *The immunoglobulin superfamily protein Izumo is required for sperm to fuse with eggs*. *Nature* 434(7030), 234–238. <https://doi.org/10.1038/nature03362>
- Jablonka-Shariff, A.; Olson, L. M., 1998. *The Role of Nitric Oxide in Oocyte Meiotic Maturation and Ovulation: Meiotic Abnormalities of Endothelial Nitric Oxide Synthase Knock-Out Mouse Oocytes¹*. *Endocrinology* 139(6), 2944–2954. <https://doi.org/10.1210/endo.139.6.6054>
- Jablonka-Shariff, A.; Olson, L. M., 1997. *Hormonal Regulation of Nitric Oxide Synthases and Their Cell-Specific Expression during Follicular Development in the Rat Ovary¹*. *Endocrinology* 138(1), 460–468. <https://doi.org/10.1210/endo.138.1.4884>
- Jeřeta, M.; Petr, J.; Krejčová, T.; Chmelíková, E.; Jílek, F., 2008. *In vitro ageing of pig*

- oocytes: effects of the histone deacetylase inhibitor trichostatin A*. *Zygote* 16(02), 145–152. <https://doi.org/10.1017/S0967199408004668>
- Jin, M.; Fujiwara, E.; Kakiuchi, Y.; Okabe, M.; Satouh, Y.; Baba, S. A.; Chiba, K.; Hirohashi, N., 2011. *Most fertilizing mouse spermatozoa begin their acrosome reaction before contact with the zona pellucida during in vitro fertilization*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 108(12), 4892–6. <https://doi.org/10.1073/pnas.1018202108>
- Jo, H. T.; Bang, J. I.; Kim, S. S.; Choi, B. H.; Jin, J. I.; Kim, H. L.; Jung, I. S.; Suh, T. K.; Ghanem, N.; Wang, Z.; Kong, I., 2014. *Production of female bovine embryos with sex-sorted sperm using intracytoplasmic sperm injection: Efficiency and in vitro developmental competence*. *Theriogenology* 81(5), 675–682 e1. <https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2013.11.010>
- Johnson, L. A., 1991. *Sex Preselection in Swine: Altered Sex Ratios in Offspring following Surgical Insemination of Flow Sorted X- and Y-Bearing Sperm*. *Reproduction in Domestic Animals* 26(6), 309–314. <https://doi.org/10.1111/j.1439-0531.1991.tb01546.x>
- Johnson, L. A.; Flook, J. P.; Look, M. V, 1987. *Flow cytometry of X and Y chromosome-bearing sperm for DNA using an improved preparation method and staining with Hoechst 33342*. *Gamete Res* 17(3), 203–212. <https://doi.org/10.1002/mrd.1120170303>
- Jones, K. T., 2004. *Turning it on and off: M-phase promoting factor during meiotic maturation and fertilization*. *Molecular Human Reproduction* 10(1), 1–5. <https://doi.org/10.1093/molehr/gah009>
- Kamoun, P., 2004. *Endogenous production of hydrogen sulfide in mammals*. *Amino Acids* 26(3), 243–254. <https://doi.org/10.1007/s00726-004-0072-x>
- Karabinus, D. S.; Marazzo, D. P.; Stern, H. J.; Potter, D. A.; Opanga, C. I.; Cole, M. L.; Johnson, L. A.; Schulman, J. D., 2014. *The effectiveness of flow cytometric sorting of human sperm (MicroSort®) for influencing a child's sex*. *Reproductive Biology and Endocrinology* 12(1), 106. <https://doi.org/10.1186/1477-7827-12-106>
- Katila, T., 2001. *In vitro evaluation of frozen-thawed stallion semen: a review*. *Acta veterinaria Scandinavica* 42(2), 199–217. [99](https://doi.org/10.1186/1751-0147-42-</p></div><div data-bbox=)

- Kennedy, C. E.; Krieger, K. B.; Sutovsky, M.; Xu, W.; Vargovič, P.; Didion, B. A.; Ellersieck, M. R.; Hennessy, M. E.; Verstegen, J.; Oko, R.; Sutovsky, P., 2014. *Protein expression pattern of PAWP in bull spermatozoa is associated with sperm quality and fertility following artificial insemination*. *Molecular Reproduction and Development* 81(5), 436–449. <https://doi.org/10.1002/mrd.22309>
- Khor, B.; Bredemeyer, A. L.; Huang, C.-Y.; Turnbull, I. R.; Evans, R.; Maggi, L. B.; White, J. M.; Walker, L. M.; Carnes, K.; Hess, R. A.; Sleckman, B. P., 2006. *Proteasome Activator PA200 Is Required for Normal Spermatogenesis*. *Molecular and Cellular Biology* 26(8), 2999–3007. <https://doi.org/10.1128/MCB.26.8.2999-3007.2006>
- Kikuchi, K.; Naito, K.; Noguchi, J.; Shimada, A.; Kaneko, H.; Yamashita, M.; Aoki, F.; Tojo, H.; Toyoda, Y., 2000. *Maturation/M-Phase Promoting Factor: A Regulator of Aging in Porcine Oocytes1*. *Biology of Reproduction* 63(3), 715–722. <https://doi.org/10.1095/biolreprod63.3.715>
- Klinovska, K.; Sebkova, N.; Dvorakova-Hortova, K.; Klinovska, K.; Sebkova, N.; Dvorakova-Hortova, K., 2014. *Sperm-Egg Fusion: A Molecular Enigma of Mammalian Reproduction*. *International Journal of Molecular Sciences* 15(6), 10652–10668. <https://doi.org/10.3390/ijms150610652>
- Kluck, R. M.; Bossy-Wetzel, E.; Green, D. R.; Newmeyer, D. D., 1997. *The release of cytochrome c from mitochondria: a primary site for Bcl-2 regulation of apoptosis*. *Science* (New York, N.Y.) 275(5303), 1132–6. <https://doi.org/10.1126/SCIENCE.275.5303.1132>
- Kölle, S.; Sinowatz, F.; Boie, G.; Totzauer, I.; Amselgruber, W.; Plendl, J., 1996. *Localization of the mRNA encoding the zona protein ZP3 alpha in the porcine ovary, oocyte and embryo by non-radioactive in situ hybridization*. *The Histochemical journal* 28(6), 441–7.
- Krejčová, T.; Smelcová, M.; Petr, J.; Bodart, J.-F.; Sedmíková, M.; Nevoral, J.; Dvorakova, M.; Vyskocilová, A.; Weingartová, I.; Kucerová-Chrpová, V.; Chmelíková, E.; Tůmová, L.; Jílek, F., 2015. *Hydrogen Sulfide Donor Protects Porcine Oocytes against Aging and Improves the Developmental Potential of Aged Porcine Oocytes*. *PLOS ONE* 10(1), e0116964. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0116964>

- Kristensen, S. G.; Pors, S. E.; Andersen, C. Y., 2017. *Improving oocyte quality by transfer of autologous mitochondria from fully grown oocytes*. Human Reproduction 32(4), 1–8. <https://doi.org/10.1093/humrep/dex043>
- Krylov, V.; Křen, R.; Okada, K.; Vacková, I.; Tlapáková, T.; Fulka, J., 2005. *Effect of Protein Supplement Source on Porcine Oocyte Maturation and Subsequent Embryonic Development after Parthenogenetic Activation*. Folia Biologica 51, 29–33.
- Kuster, C. E.; Hess, R. A.; Althouse, G. C., 2004. *Immunofluorescence Reveals Ubiquitination of Retained Distal Cytoplasmic Droplets on Ejaculated Porcine Spermatozoa*. Journal of Andrology 25(3), 340–347. <https://doi.org/10.1002/j.1939-4640.2004.tb02798.x>
- Kwon, I.-K.; Park, K.-E.; Niwa, K., 2004. *Activation, Pronuclear Formation, and Development In Vitro of Pig Oocytes Following Intracytoplasmic Injection of Freeze-Dried Spermatozoa1*. Biology of Reproduction 71(5), 1430–1436. <https://doi.org/10.1095/biolreprod.104.031260>
- Lafontaine-Lacasse, M.; Richard, D.; Picard, F., 2010. *Effects of age and gender on Sirt 1 mRNA expressions in the hypothalamus of the mouse*. Neuroscience Letters 480(1), 1–3. <https://doi.org/10.1016/j.neulet.2010.01.008>
- Lara-Gonzalez, P.; Westhorpe, F. G.; Taylor, S. S., 2012. *The Spindle Assembly Checkpoint*. Current Biology 22(22), R966–R980. <https://doi.org/10.1016/J.CUB.2012.10.006>
- Lee, D. H.; Goldberg, A. L., 1998. *Proteasome inhibitors: valuable new tools for cell biologists*. Trends in Cell Biology 8(10), 397–403. [https://doi.org/10.1016/S0962-8924\(98\)01346-4](https://doi.org/10.1016/S0962-8924(98)01346-4)
- Lee, J.-H.; Campbell, K. H. S., 2008. *Caffeine Treatment Prevents Age-Related Changes in Ovine Oocytes and Increases Cell Numbers in Blastocysts Produced by Somatic Cell Nuclear Transfer*. Cloning and Stem Cells 10(3), 381–390. <https://doi.org/10.1089/clo.2007.0091>
- Lefievre, L.; Conner, S. J.; Salpekar, A.; Olufowobi, O.; Ashton, P.; Pavlovic, B.; Lenton, W.; Afnan, M.; Brewis, I. A.; Monk, M.; Hughes, D. C.; Barratt, C. L. R., 2004. *Four zona pellucida glycoproteins are expressed in the human*. Human Reproduction

- 19(7), 1580–1586. <https://doi.org/10.1093/humrep/deh301>
- Li, L.; Rose, P.; Moore, P. K., 2011. *Hydrogen Sulfide and Cell Signaling*. Annual Review of Pharmacology and Toxicology 51(1), 169–187. <https://doi.org/10.1146/annurev-pharmtox-010510-100505>
- Li, R.; Albertini, D. F., 2013. *The road to maturation: somatic cell interaction and self-organization of the mammalian oocyte*. Nature Reviews Molecular Cell Biology 14(3), 141–152. <https://doi.org/10.1038/nrm3531>
- Liang, L.-F.; Qi, S.-T.; Xian, Y.-X.; Huang, L.; Sun, X.-F.; Wang, W.-H., 2017. *Protective effect of antioxidants on the pre-maturation aging of mouse oocytes*. Scientific reports 7(1), 1434. <https://doi.org/10.1038/s41598-017-01609-3>
- Liang, Q.-X.; Lin, Y.-H.; Zhang, C.-H.; Sun, H.-M.; Zhou, L.; Schatten, H.; Sun, Q.-Y.; Qian, W.-P., 2018. *Resveratrol increases resistance of mouse oocytes to postovulatory aging in vivo*. Aging 10(7), 1586–1596. <https://doi.org/10.18632/aging.101494>
- Liang, R.; Yu, W.-D.; Du, J.-B.; Yang, L.-J.; Yang, J.-J.; Xu, J.; Shang, M.; Guo, J.-Z., 2007. *Cystathionine β synthase participates in murine oocyte maturation mediated by homocysteine*. Reproductive Toxicology 24(1), 89–96. <https://doi.org/10.1016/J.REPROTOX.2007.04.002>
- Lin, L.; Moor, R. M., 1997. *Factors affecting electrical activation of porcine oocyte matured in vitro*. Animal Reproduction Science 48(1), 67–80. [https://doi.org/10.1016/S0378-4320\(97\)00044-4](https://doi.org/10.1016/S0378-4320(97)00044-4)
- Lishko, P. V; Mannowetz, N., 2018. *CatSper: a unique calcium channel of the sperm flagellum*. Current Opinion in Physiology 2, 109–113. <https://doi.org/10.1016/J.COPHYS.2018.02.004>
- Lord, T.; Aitken, R. J., 2013. *Oxidative stress and ageing of the post-ovulatory oocyte*. Reproduction 146(6), R217–R227. <https://doi.org/10.1530/REP-13-0111>
- Lovercamp, K. W.; Safranski, T. J.; Fischer, K. A.; Manandhar, G.; Sutovsky, M.; Herring, W.; Sutovsky, P., 2007. *Arachidonate 15-lipoxygenase and ubiquitin as fertility markers in boars*. Theriogenology 67(4), 704–718. <https://doi.org/10.1016/J.THERIOGENOLOGY.2006.08.019>

- Luo, S.-M.; Ge, Z.-J.; Wang, Z.-W.; Jiang, Z.-Z.; Wang, Z.-B.; Ouyang, Y.-C.; Hou, Y.; Schatten, H.; Sun, Q.-Y., 2013. *Unique insights into maternal mitochondrial inheritance in mice*. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America 110(32), 13038–43. <https://doi.org/10.1073/pnas.1303231110>
- Ma, R.; Zhang, Y.; Zhang, L.; Han, J.; Rui, R., 2015. *Sirt1 protects pig oocyte against in vitro aging*. Animal Science Journal 86(9), n/a-n/a. <https://doi.org/10.1111/asj.12360>
- Ma, W.; Zhang, D.; Hou, Y.; Li, Y.-H.; Sun, Q.-Y.; Sun, X.-F.; Wang, W.-H., 2005. *Reduced Expression of MAD2, BCL2, and MAP Kinase Activity in Pig Oocytes after In Vitro Aging Are Associated with Defects in Sister Chromatid Segregation During Meiosis II and Embryo Fragmentation After Activation1*. Biology of Reproduction 72(2), 373–383. <https://doi.org/10.1095/biolreprod.104.030999>
- Majetschak, M., 2011. *Extracellular ubiquitin: immune modulator and endogenous opponent of damage-associated molecular pattern molecules*. Journal of Leukocyte Biology 89(2), 205–219. <https://doi.org/10.1189/jlb.0510316>
- Maro, B.; Verlhac, M.-H., 2002. *Polar body formation: new rules for asymmetric divisions*. Nature Cell Biology 4(12), E281–E283. <https://doi.org/10.1038/ncb1202-e281>
- Martinez-Alborcia, M. J.; Valverde, A.; Parrilla, I.; Vazquez, J. M.; Martinez, E. A.; Roca, J., 2012. *Detrimental effects of non-functional spermatozoa on the freezability of functional spermatozoa from boar ejaculate*. PLoS One 7(5), e36550. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0036550>
- Martinez, E. A.; Vazquez, J. M.; Roca, J.; Lucas, X.; Gil, M. A.; Parrilla, I.; Vazquez, J. L.; Day, B. N., 2001. *Successful non-surgical deep intrauterine insemination with small numbers of spermatozoa in sows*. Reproduction (Cambridge, England) 122(2), 289–96.
- Mevissen, T. E. T.; Komander, D., 2017. *Mechanisms of Deubiquitinase Specificity and Regulation*. Annual Review of Biochemistry 86(1), 159–192. <https://doi.org/10.1146/annurev-biochem-061516-044916>
- Miao, Y.-L.; Kikuchi, K.; Sun, Q.-Y.; Schatten, H., 2009. *Oocyte aging: cellular and molecular changes, developmental potential and reversal possibility*. Human

- Reproduction Update 15(5), 573–585. <https://doi.org/10.1093/humupd/dmp014>
- Miao, Y.-L.; Liu, X.-Y.; Qiao, T.-W.; Miao, D.-Q.; Luo, M.-J.; Tan, J.-H., 2005. *Cumulus Cells Accelerate Aging of Mouse Oocytes*. *Biology of Reproduction* 73(5), 1025–1031. <https://doi.org/10.1095/biolreprod.105.043703>
- Miao, Y.; Ma, S.; Liu, X.; Miao, D.; Chang, Z.; Luo, M.; Tan, J., 2004. *Fate of the first polar bodies in mouse oocytes*. *Molecular Reproduction and Development* 69(1), 66–76. <https://doi.org/10.1002/mrd.20148>
- Midtbø, K.; Hals, O.; Lauve, O.; van der Meer, J.; Storstein, L., 1986. *Studies on verapamil in the treatment of essential hypertension: a review*. *British journal of clinical pharmacology* 21 Suppl 2(Suppl 2), 165S–171S.
- Miki, K.; Clapham, D. E., 2013. *Rheotaxis Guides Mammalian Sperm*. *Current Biology* 23(6), 443–452. <https://doi.org/10.1016/J.CUB.2013.02.007>
- Miyado, K.; Yamatoya, K.; Kang, W.; Kawano, N., 2018. *Regulation of Sperm-Egg Fusion at the Plasma Membrane*, In: Kondo, M. (Ed.), *Reproductive and Developmental Strategies*. Springer, Tokyo. https://doi.org/10.1007/978-4-431-56609-0_26
- Morales, P.; Kong, M.; Pizarro, E.; Pasten, C., 2003. *Participation of the sperm proteasome in human fertilization*. *Human Reproduction* 18(5), 1010–1017. <https://doi.org/10.1093/humrep/deg111>
- Morozumi, K.; Shikano, T.; Miyazaki, S.; Yanagimachi, R., 2006. *Simultaneous removal of sperm plasma membrane and acrosome before intracytoplasmic sperm injection improves oocyte activation/embryonic development*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 103(47), 17661–6. <https://doi.org/10.1073/pnas.0608183103>
- Mortimer, D., 2000. *Sperm Preparation Methods*. *Journal of Andrology* 21(3), 357–366. <https://doi.org/10.1002/J.1939-4640.2000.TB03390.X>
- Motlik, J.; Fulka, J., 1976. *Breakdown of the germinal vesicle in pig oocytes in vivo and in vitro*. *The Journal of experimental zoology* 198(2), 155–62. <https://doi.org/10.1002/jez.1401980205>
- Munakata, Y.; Ueda, M.; Kawahara-Miki, R.; Kansaku, K.; Itami, N.; Shirasuna, K.;

- Kuwayama, T.; Iwata, H., 2018. *Follicular factors determining granulosa cell number and developmental competence of porcine oocytes*. Journal of Assisted Reproduction and Genetics 35(10), 1809–1819. <https://doi.org/10.1007/s10815-018-1247-9>
- Murata, S.; Takahama, Y.; Kasahara, M.; Tanaka, K., 2018. *The immunoproteasome and thymoproteasome: functions, evolution and human disease*. Nature Immunology 19(9), 923–931. <https://doi.org/10.1038/s41590-018-0186-z>
- Muratori, M.; Marchiani, S.; Forti, G.; Baldi, E., 2005. *Sperm ubiquitination positively correlates to normal morphology in human semen*. Hum Reprod 20(4), 1035–1043. <https://doi.org/10.1093/humrep/deh678>
- Mustafa, A. K.; Gadalla, M. M.; Sen, N.; Kim, S.; Mu, W.; Gazi, S. K.; Barrow, R. K.; Yang, G.; Wang, R.; Snyder, S. H., 2009. *H2S signals through protein S-sulfhydration*. Science signaling 2(96), ra72. <https://doi.org/10.1126/scisignal.2000464>
- Nagai, Y.; Tsugane, M.; Oka, J.-I.; Kimura, H., 2004. *Hydrogen sulfide induces calcium waves in astrocytes*. The FASEB Journal 18(3), 557–559. <https://doi.org/10.1096/fj.03-1052fje>
- Navarro, B.; Kirichok, Y.; Chung, J.-J.; Clapham, D. E., 2008. *Ion channels that control fertility in mammalian spermatozoa*. The International journal of developmental biology 52(5–6), 607–13. <https://doi.org/10.1387/ijdb.072554bn>
- Němeček, D.; Dvořáková, M.; Heroutová, I.; Chmelíková, E.; Sedmíková, M., 2017. *Anti-apoptotic properties of carbon monoxide in porcine oocyte during in vitro aging*. PeerJ 5, e3876. <https://doi.org/10.7717/peerj.3876>
- Nevoral, J.; Bodart, J.-F.; Petr, J., 2016. *Gasotransmitters in Gametogenesis and Early Development: Holy Trinity for Assisted Reproductive Technology-A Review*. Oxidative medicine and cellular longevity 2016, 1730750. <https://doi.org/10.1155/2016/1730750>
- Nevoral, J.; Krejčová, T.; Petr, J.; Melicharová, P.; Vyskočilová, A.; Dvořáková, M.; Weingartová, I.; Chmelíková, E.; Tůmová, L.; Hošková, K.; Kučerová-Chrpová, V.; Sedmíková, M., 2013. *The role of nitric oxide synthase isoforms in aged porcine oocytes*, Czech J. Anim. Sci.

- Nevoral, J.; Petr, J.; Gelaude, A.; Bodart, J.-F.; Kucerova-Chrpova, V.; Sedmikova, M.; Krejcova, T.; Kolbabova, T.; Dvorakova, M.; Vyskocilova, A.; Weingartova, I.; Krivohlavkova, L.; Zalmanova, T.; Jilek, F., 2014. *Dual Effects of Hydrogen Sulfide Donor on Meiosis and Cumulus Expansion of Porcine Cumulus-Oocyte Complexes*. PLoS ONE 9(7), e99613. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0099613>
- Nevoral, J.; Sutovsky, P.; Zamostna, K.; Petelak, A.; Hoskova, K.; Zalmanova, T.; Petr, J., 2015. *Strt1 as A Key Factor for Histone Code Establishment in Early Embryo, from A Perspective of Assisted Reproductioin*. Slovak Journal of Animal Science 48(4), 145–194.
- Nevoral, J.; Zalmanova, T.; Hoskova, K.; Stiavnicka, M.; Hosek, P.; Petelak, A.; Petr, J., 2018. *Involvement of K+ATP and Ca2+ channels in hydrogen sulfide-suppressed ageing of porcine oocytes*. Biological research 51(1), 38. <https://doi.org/10.1186/s40659-018-0187-2>
- Norris, R. P.; Ratzan, W. J.; Freudzon, M.; Mehlmann, L. M.; Krall, J.; Movsesian, M. A.; Wang, H.; Ke, H.; Nikolaev, V. O.; Jaffe, L. A., 2009. *Cyclic GMP from the surrounding somatic cells regulates cyclic AMP and meiosis in the mouse oocyte*. Development (Cambridge, England) 136(11), 1869–78. <https://doi.org/10.1242/dev.035238>
- Osman, R. A.; Andria, M. L.; Jones, A. D.; Meizel, S., 1989. *Steroid induced exocytosis: the human sperm acrosome reaction*. Biochemical and biophysical research communications 160(2), 828–33.
- Ozanon, C.; Chouteau, J.; Sutovsky, P., 2005. *Clinical adaptation of the sperm ubiquitin tag immunoassay (SUTI): relationship of sperm ubiquitylation with sperm quality in gradient-purified semen samples from 93 men from a general infertility clinic population*. Human Reproduction 20(8), 2271–2278. <https://doi.org/10.1093/humrep/dei013>
- Pacchiarotti, J.; Maki, C.; Ramos, T.; Marh, J.; Howerton, K.; Wong, J.; Pham, J.; Anorve, S.; Chow, Y.-C.; Izadyar, F., 2010. *Differentiation potential of germ line stem cells derived from the postnatal mouse ovary*. Differentiation 79(3), 159–170. <https://doi.org/10.1016/J.DIFF.2010.01.001>
- Pepling, M. E., 2006. *From primordial germ cell to primordial follicle: mammalian female*

- germ cell development.* Genesis 44(12), 622–632.
<https://doi.org/10.1002/dvg.20258>
- Perez-Cerezales, S.; Boryshpolets, S.; Eisenbach, M., 2015. *Behavioral mechanisms of mammalian sperm guidance.* Asian Journal of Andrology 17(4), 628.
<https://doi.org/10.4103/1008-682X.154308>
- Petelak, A.; Krylov, V., 2016. *Cryopreservation of fluorescence activated cell sorted boar spermatozoa based on extracellular ubiquitination.* Czech Journal of Animal Science 61(7), 310–316. <https://doi.org/10.17221/27/2015-CJAS>
- Petrache, I.; Otterbein, L. E.; Alam, J.; Wiegand, G. W.; Choi, A. M. K., 2000. *Heme oxygenase-1 inhibits TNF- α -induced apoptosis in cultured fibroblasts.* American Journal of Physiology-Lung Cellular and Molecular Physiology 278(2), L312–L319.
<https://doi.org/10.1152/ajplung.2000.278.2.L312>
- Pickart, C. M., 2004. *Back to the Future with Ubiquitin.* Cell 116(2), 181–190.
[https://doi.org/10.1016/S0092-8674\(03\)01074-2](https://doi.org/10.1016/S0092-8674(03)01074-2)
- Polge, C.; Smith, A. U.; Parkes, A. S., 1949. *Revival of spermatozoa after vitrification and dehydration at low temperatures.* Nature. <https://doi.org/10.1038/164666a0>
- Purdy, P. H., 2008. *Ubiquitination and its influence in boar sperm physiology and cryopreservation.* Theriogenology 70(5), 818–826.
<https://doi.org/10.1016/J.THERIOGENOLOGY.2008.05.044>
- Qi, H.; Williams, Z.; Wassarman, P. M., 2002. *Secretion and Assembly of Zona Pellucida Glycoproteins by Growing Mouse Oocytes Microinjected with Epitope-tagged cDNAs for mZP2 and mZP3.* Molecular Biology of the Cell 13(2), 530–541.
<https://doi.org/10.1091/mbc.01-09-0440>
- Rajani, S.; Sharma, S.; Chakravarty, B.; Chattopadhyay, R.; Ghosh, S.; Goswami, S., 2012. *Assessment of oocyte quality in polycystic ovarian syndrome and endometriosis by spindle imaging and reactive oxygen species levels in follicular fluid and its relationship with IVF-ET outcome.* Journal of Human Reproductive Sciences 5(2), 187. <https://doi.org/10.4103/0974-1208.101020>
- Rath, D.; Moench-Tegeder, G.; Taylor, U.; Johnson, L. A., 2009. *Improved quality of sex-sorted sperm: a prerequisite for wider commercial application.* Theriogenology

- 71(1), 22–29. <https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2008.09.027>
- Rath, D.; Tiedemann, D.; Gamrad, L.; Johnson, L.; Klein, S.; Kues, W.; Mancini, R.; Rehbock, C.; Taylor, U.; Barcikowski, S., 2015. *Sex-Sorted Boar Sperm - An Update on Related Production Methods*. *Reproduction in Domestic Animals* 50, 56–60. <https://doi.org/10.1111/rda.12572>
- Reid, A. T.; Redgrove, K.; Aitken, R. J.; Nixon, B., 2011. *Cellular mechanisms regulating sperm-zona pellucida interaction*. *Asian journal of andrology* 13(1), 88–96. <https://doi.org/10.1038/aja.2010.74>
- Robker, R. L.; Hennebold, J. D.; Russell, D. L., 2018. *Coordination of Ovulation and Oocyte Maturation: A Good Egg at the Right Time*. *Endocrinology* 159(9), 3209–3218. <https://doi.org/10.1210/en.2018-00485>
- Rodriguez-Martinez, H.; Wallgren, M., 2011. *Advances in Boar Semen Cryopreservation*. *Veterinary Medicine International* 2011, 1–5. <https://doi.org/10.4061/2011/396181>
- Romero-Aguirregomezcorta, J.; Santa, Á. P.; García-Vázquez, F. A.; Coy, P.; Matás, C., 2014. *Nitric oxide synthase (NOS) inhibition during porcine in vitro maturation modifies oocyte protein S-nitrosylation and in vitro fertilization*. *PloS one* 9(12), e115044. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0115044>
- Russell, D. L.; Gilchrist, R. B.; Brown, H. M.; Thompson, J. G., 2016. *Bidirectional communication between cumulus cells and the oocyte: Old hands and new players?* *Theriogenology* 86(1), 62–68. <https://doi.org/10.1016/J.THERIOGENOLOGY.2016.04.019>
- Russell, D. L.; Robker, R. L., 2007. *Molecular mechanisms of ovulation: co-ordination through the cumulus complex*. *Human Reproduction Update* 13(3), 289–312. <https://doi.org/10.1093/humupd/dml062>
- Saeki, Y., 2017. *Ubiquitin recognition by the proteasome*. *Journal of Biochemistry* 161(2), 113–124. <https://doi.org/10.1093/jb/mvw091>
- Saldívar-Hernández, A.; González-González, M. E.; Sánchez-Tusié, A.; Maldonado-Rosas, I.; López, P.; Treviño, C. L.; Larrea, F.; Chirinos, M., 2015. *Human sperm degradation of zona pellucida proteins contributes to fertilization*. *Reproductive*

- Biology and Endocrinology 13(1), 99. <https://doi.org/10.1186/s12958-015-0094-0>
- Sane, S.; Rezvani, K.; Sane, S.; Rezvani, K., 2017. *Essential Roles of E3 Ubiquitin Ligases in p53 Regulation*. International Journal of Molecular Sciences 18(2), 442. <https://doi.org/10.3390/ijms18020442>
- Saric, T.; Graef, C. I.; Goldberg, A. L., 2004. *Pathway for degradation of peptides generated by proteasomes: a key role for thimet oligopeptidase and other metallopeptidases*. The Journal of biological chemistry 279(45), 46723–32. <https://doi.org/10.1074/jbc.M406537200>
- Sato, M.; Sato, K., 2011. *Degradation of paternal mitochondria by fertilization-triggered autophagy in C. elegans embryos*. Science (New York, N.Y.) 334(6059), 1141–4. <https://doi.org/10.1126/science.1210333>
- Satouh, Y.; Ikawa, M., 2018. *New Insights into the Molecular Events of Mammalian Fertilization*. Trends in Biochemical Sciences 43(10), 818–828. <https://doi.org/10.1016/J.TIBS.2018.08.006>
- Satouh, Y.; Inoue, N.; Ikawa, M.; Okabe, M., 2012. *Visualization of the moment of mouse sperm-egg fusion and dynamic localization of IZUMO1*. Journal of cell science 125(Pt 21), 4985–90. <https://doi.org/10.1242/jcs.100867>
- Sawada, H.; Sakai, N.; Abe, Y.; Tanaka, E.; Takahashi, Y.; Fujino, J.; Kodama, E.; Takizawa, S.; Yokosawa, H., 2002. *Extracellular ubiquitination and proteasome-mediated degradation of the ascidian sperm receptor*. Proceedings of the National Academy of Sciences 99(3), 1223–1228. <https://doi.org/10.1073/pnas.032389499>
- Schenk, J. L.; Suh, T. K.; Seidel Jr., G. E., 2006. *Embryo production from superovulated cattle following insemination of sexed sperm*. Theriogenology 65(2), 299–307. [https://doi.org/S0093-691X\(05\)00207-4](https://doi.org/S0093-691X(05)00207-4)
[pii]10.1016/j.theriogenology.2005.04.026
- Schuh, M.; Ellenberg, J., 2007. *Self-Organization of MTOCs Replaces Centrosome Function during Acentrosomal Spindle Assembly in Live Mouse Oocytes*. Cell 130(3), 484–498. <https://doi.org/10.1016/J.CELL.2007.06.025>
- Schwartz, M.; Vissing, J., 2002. *Paternal Inheritance of Mitochondrial DNA*. New England Journal of Medicine 347(8), 576–580.

<https://doi.org/10.1056/NEJMoa020350>

- Sela-Abramovich, S.; Edry, I.; Galiani, D.; Nevo, N.; Dekel, N., 2006. *Disruption of Gap Junctional Communication within the Ovarian Follicle Induces Oocyte Maturation*. *Endocrinology* 147(5), 2280–2286. <https://doi.org/10.1210/en.2005-1011>
- Shabek, N.; Herman-Bachinsky, Y.; Buchsbaum, S.; Lewinson, O.; Haj-Yahya, M.; Hejjaoui, M.; Lashuel, H. A.; Sommer, T.; Brik, A.; Ciechanover, A., 2012. *The Size of the Proteasomal Substrate Determines Whether Its Degradation Will Be Mediated by Mono- or Polyubiquitylation*. *Molecular Cell* 48(1), 87–97. <https://doi.org/10.1016/J.MOLCEL.2012.07.011>
- Sharpley, M. S.; Marciniak, C.; Eckel-Mahan, K.; McManus, M.; Crimi, M.; Waymire, K.; Lin, C. S.; Masubuchi, S.; Friend, N.; Koike, M.; Chalkia, D.; MacGregor, G.; Sassone-Corsi, P.; Wallace, D. C., 2012. *Heteroplasmy of Mouse mtDNA Is Genetically Unstable and Results in Altered Behavior and Cognition*. *Cell* 151(2), 333–343. <https://doi.org/10.1016/J.CELL.2012.09.004>
- Signorelli, J.; Diaz, E. S.; Morales, P., 2012. *Kinases, phosphatases and proteases during sperm capacitation*. *Cell and Tissue Research* 349(3), 765–782. <https://doi.org/10.1007/s00441-012-1370-3>
- Singh, C. K.; Chhabra, G.; Ndiaye, M. A.; Garcia-Peterson, L. M.; Mack, N. J.; Ahmad, N., 2018. *The Role of Sirtuins in Antioxidant and Redox Signaling*. *Antioxidants & Redox Signaling* 28(8), 643–661. <https://doi.org/10.1089/ars.2017.7290>
- Skerget, S.; Rosenow, M. A.; Petritis, K.; Karr, T. L., 2015. *Sperm Proteome Maturation in the Mouse Epididymis*. *PLoS ONE* 10(11), e0140650. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0140650>
- Song, W.-H.; Ballard, J. W. O.; Yi, Y.-J.; Sutovsky, P., 2014. *Regulation of Mitochondrial Genome Inheritance by Autophagy and Ubiquitin-Proteasome System: Implications for Health, Fitness, and Fertility*. *BioMed Research International* 2014, 1–16. <https://doi.org/10.1155/2014/981867>
- Spinaci, M.; Perteghella, S.; Chlapanidas, T.; Galeati, G.; Vigo, D.; Tamanini, C.; Bucci, D., 2016. *Storage of sexed boar spermatozoa: Limits and perspectives*. *Theriogenology* 85(1), 65–73. <https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2015.05.018>

- Stewart, M. D.; Ritterhoff, T.; Klevit, R. E.; Brzovic, P. S., 2016. *E2 enzymes: more than just middle men*. *Cell research* 26(4), 423–40. <https://doi.org/10.1038/cr.2016.35>
- Stipanuk, M. H.; Beck, P. W., 1982. *Characterization of the enzymic capacity for cysteine desulphhydration in liver and kidney of the rat*. *The Biochemical journal* 206(2), 267–77.
- Sullivan, R., 2015. *Epididymosomes: a heterogeneous population of microvesicles with multiple functions in sperm maturation and storage*. *Asian Journal of Andrology*. <https://doi.org/10.4103/1008-682X.155255>
- Sullivan, R.; Frenette, G.; Girouard, J., 2007. *Epididymosomes are involved in the acquisition of new sperm proteins during epididymal transit*. *Asian Journal of Andrology* 9(4), 483–491. <https://doi.org/10.1111/j.1745-7262.2007.00281.x>
- Sun, Q.-Y.; Schatten, H., 2007. *Centrosome Inheritance after Fertilization and Nuclear Transfer in Mammals*, In: *Somatic Cell Nuclear Transfer*. Springer New York, New York, NY. https://doi.org/10.1007/978-0-387-37754-4_4
- Sun, X.-S.; Liu, Y.; Yue, K.-Z.; Ma, S.-F.; Tan, J.-H., 2004. *Changes in germinal vesicle (GV) chromatin configurations during growth and maturation of porcine oocytes*. *Molecular Reproduction and Development* 69(2), 228–234. <https://doi.org/10.1002/mrd.20123>
- Sutovsky, P., 2018. *Review: Sperm–oocyte interactions and their implications for bull fertility, with emphasis on the ubiquitin–proteasome system*. *Animal* 12(s1), s121–s132. <https://doi.org/10.1017/S1751731118000253>
- Sutovsky, P., 2015. *New Approaches to Boar Semen Evaluation, Processing and Improvement*. *Reproduction in Domestic Animals* 50(S2), 11–19. <https://doi.org/10.1111/rda.12554>
- Sutovsky, P., 2011. *Sperm proteasome and fertilization*. *Reproduction* 142(1), 1–14. <https://doi.org/10.1530/REP-11-0041>
- Sutovsky, P., 2003. *Ubiquitin-dependent proteolysis in mammalian spermatogenesis, fertilization, and sperm quality control: Killing three birds with one stone*. *Microscopy Research and Technique* 61(1), 88–102. <https://doi.org/10.1002/jemt.10319>

- Sutovsky, P.; Hauser, R.; Sutovsky, M., 2004. *Increased levels of sperm ubiquitin correlate with semen quality in men from an andrology laboratory clinic population.* Human Reproduction 19(3), 628–638. <https://doi.org/10.1093/humrep/deh131>
- Sutovsky, P.; Manandhar, G.; McCauley, T. C.; Caamanõ, J. N.; Sutovsky, M.; Thompson, W. E.; Day, B. N., 2004. *Proteasomal Interference Prevents Zona Pellucida Penetration and Fertilization in Mammals*. Biology of Reproduction 71(5), 1625–1637. <https://doi.org/10.1095/biolreprod.104.032532>
- Sutovsky, P.; Moreno, R. D.; Ramalho-Santos, J.; Dominko, T.; Simerly, C.; Schatten, G., 2000. *Ubiquitinated Sperm Mitochondria, Selective Proteolysis, and the Regulation of Mitochondrial Inheritance in Mammalian Embryos*. Biology of Reproduction 63(2), 582–590. <https://doi.org/10.1095/biolreprod63.2.582>
- 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. <https://doi.org/10.1038/46466>
- Sutovsky, P.; Neuber, E.; Schatten, G., 2002. *Ubiquitin-dependent sperm quality control mechanism recognizes spermatozoa with DNA defects as revealed by dual ubiquitin-TUNEL assay.* Mol Reprod Dev 61(3), 406–413. <https://doi.org/10.1002/mrd.10101>
- Szollosi, D.; Calarco, P.; Donahue, R. P., 1972. *Absence of Centrioles in the First and Second Meiotic Spindles of Mouse Oocytes.* Journal of Cell Science 11(2).
- Taggart, D. A.; Leigh, C. M.; Steele, V. R.; Breed, W. G.; Temple-Smith, P. D.; Phelan, J., 1996. *Effect of cooling and cryopreservation on sperm motility and morphology of several species of marsupial.* Reproduction, fertility, and development 8(4), 673–9.
- Tanaka, K., 2009. *The proteasome: overview of structure and functions.* Proceedings of the Japan Academy. Series B, Physical and biological sciences 85(1), 12–36. <https://doi.org/10.2183/PJAB.85.12>
- Tarazona, A.; Rodriguez, J.; Restrepo, L.; Olivera-Angel, M., 2006. *Mitochondrial Activity, Distribution and Segregation in Bovine Oocytes and in Embryos Produced in Vitro.* Reproduction in Domestic Animals 41(1), 5–11. <https://doi.org/10.1111/j.1439-0531.2006.00615.x>

- Telford, N. A.; Watson, A. J.; Schultz, G. A., 1990. *Transition from maternal to embryonic control in early mammalian development: A comparison of several species.* Molecular Reproduction and Development 26(1), 90–100. <https://doi.org/10.1002/mrd.1080260113>
- Therien, I.; Manjunath, P., 2003. *Effect of Progesterone on Bovine Sperm Capacitation and Acrosome Reaction.* Biology of Reproduction 69(4), 1408–1415. <https://doi.org/10.1095/biolreprod.103.017855>
- Thimon, V.; Koukoui, O.; Calvo, E.; Sullivan, R., 2007. *Region-specific gene expression profiling along the human epididymis.* Molecular Human Reproduction 13(10), 691–704. <https://doi.org/10.1093/molehr/gam051>
- Thompson, S. J.; Loftus, L. T.; Ashley, M. D.; Meller, R., 2008. *Ubiquitin-proteasome system as a modulator of cell fate.* Current opinion in pharmacology 8(1), 90–5. <https://doi.org/10.1016/j.coph.2007.09.010>
- Thomson, L. K.; Fleming, S. D.; Aitken, R. J.; De Iuliis, G. N.; Zieschang, J.-A.; Clark, A. M., 2009. *Cryopreservation-induced human sperm DNA damage is predominantly mediated by oxidative stress rather than apoptosis.* Human Reproduction 24(9), 2061–2070. <https://doi.org/10.1093/humrep/dep214>
- Thrower, J. S.; Hoffman, L.; Rechsteiner, M.; Pickart, C. M., 2000. *Recognition of the polyubiquitin proteolytic signal.* The EMBO journal 19(1), 94–102. <https://doi.org/10.1093/emboj/19.1.94>
- Torres, M. A.; Díaz, R.; Boguen, R.; Martins, S. M. M. K.; Ravagnani, G. M.; Leal, D. F.; Oliveira, M. de L.; Muro, B. B. D.; Parra, B. M.; Meirelles, F. V.; Papa, F. O.; Dell’Aqua, J. A.; Alvarenga, M. A.; Moretti, A. de S.; Sepúlveda, N.; de Andrade, A. F. C., 2016. *Novel Flow Cytometry Analyses of Boar Sperm Viability: Can the Addition of Whole Sperm-Rich Fraction Seminal Plasma to Frozen-Thawed Boar Sperm Affect It?* PLoS ONE 11(8), e0160988. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0160988>
- Truong, T. T.; Soh, Y. M.; Gardner, D. K., 2016. *Antioxidants improve mouse preimplantation embryo development and viability.* Human Reproduction 31(7), 1445–1454. <https://doi.org/10.1093/humrep/dew098>
- Tsukamoto, S.; Kuma, A.; Murakami, M.; Kishi, C.; Yamamoto, A.; Mizushima, N.; Boyd,

- L.; Legouis, R.; Galy, V., 2008. *Autophagy is essential for preimplantation development of mouse embryos*. Science (New York, N.Y.) 321(5885), 117–20. <https://doi.org/10.1126/science.1154822>
- Urrego, D.; Tomczak, A. P.; Zahed, F.; Stühmer, W.; Pardo, L. A., 2014. *Potassium channels in cell cycle and cell proliferation*. Philosophical transactions of the Royal Society of London. Series B, Biological sciences 369(1638), 20130094. <https://doi.org/10.1098/rstb.2013.0094>
- Van Blerkom, J., 2011. *Mitochondrial function in the human oocyte and embryo and their role in developmental competence*. Mitochondrion 11(5), 797–813. <https://doi.org/10.1016/J.MITO.2010.09.012>
- van der Horst, G.; Maree, L.; du Plessis, S. S., 2018. *Current perspectives of CASA applications in diverse mammalian spermatozoa*. Reproduction, Fertility and Development 30(6), 875. <https://doi.org/10.1071/RD17468>
- Varum, S.; Bento, C.; Sousa, A. P. M.; Gomes-Santos, C. S. S.; Henriques, P.; Almeida-Santos, T.; Teodósio, C.; Paiva, A.; Ramalho-Santos, J., 2007. *Characterization of human sperm populations using conventional parameters, surface ubiquitination, and apoptotic markers*. Fertility and Sterility 87(3), 572–583. <https://doi.org/10.1016/j.fertnstert.2006.07.1528>
- Verberckmoes, S.; Van Soom, A.; Dewulf, J.; Thys, M.; de Kruif, A., 2005. *Low dose insemination in cattle with the Ghent device*. Theriogenology 64(8), 1716–1728. <https://doi.org/10.1016/J.THERIOGENOLOGY.2005.04.017>
- Vested, A.; Ramlau-Hansen, C. H.; Bonde, J. P.; Thulstrup, A. M.; Kristensen, S. L.; Toft, G., 2011. *A comparison of conventional and computer-assisted semen analysis (CRISMAS software) using samples from 166 young Danish men*. Asian journal of andrology 13(3), 453–8. <https://doi.org/10.1038/aja.2011.14>
- Vigodner, M.; Shrivastava, V.; Gutstein, L. E.; Schneider, J.; Nieves, E.; Goldstein, M.; Feliciano, M.; Callaway, M., 2013. *Localization and identification of sumoylated proteins in human sperm: excessive sumoylation is a marker of defective spermatozoa*. Human reproduction (Oxford, England) 28(1), 210–23. <https://doi.org/10.1093/humrep/des317>
- Vilagran, I.; Yeste, M.; Sancho, S.; Casas, I.; Rivera del Álamo, M. M.; Bonet, S., 2014.

- Relationship of sperm small heat-shock protein 10 and voltage-dependent anion channel 2 with semen freezability in boars.* Theriogenology 82(3), 418–426.
<https://doi.org/10.1016/J.THERIOGENOLOGY.2014.04.023>
- Waberski, D.; Magnus, F.; Ardón, F.; Petrunkina, A. M.; Weitze, K. F.; Töpfer-Petersen, E., 2006. *Binding of boar spermatozoa to oviductal epithelium in vitro in relation to sperm morphology and storage time.* Reproduction (Cambridge, England) 131(2), 311–8. <https://doi.org/10.1530/rep.1.00814>
- Wachten, D.; Jikeli, J. F.; Kaupp, U. B., 2017. *Sperm Sensory Signaling.* Cold Spring Harbor perspectives in biology 9(7), a028225.
<https://doi.org/10.1101/cshperspect.a028225>
- Wakayama, T.; Yanagimachi, R., 1998. *Development of normal mice from oocytes injected with freeze-dried spermatozoa.* Nature Biotechnology 16(7), 639–641.
<https://doi.org/10.1038/nbt0798-639>
- Walters, E. M.; Benson, J. D.; Woods, E. J.; Critser, J. K., 2009. *The history of sperm cryopreservation,* In: Pacey, A. A.; Tomlinson, M. J. (Ed.), Sperm Banking. Cambridge University Press, Cambridge.
<https://doi.org/10.1017/CBO9781139193771.002>
- Wang, C.; Feng, G.; Shu, J.; Zhou, H.; Zhang, B.; Chen, H.; Lin, R.; Gan, X.; Wu, Z.; Wei, T., 2018. *Cumulus oophorus complexes favor physiologic selection of spermatozoa for intracytoplasmic sperm injection.* Fertility and Sterility 109(5), 823–831.
<https://doi.org/10.1016/J.FERTNSTERT.2017.12.026>
- Wang, F.; Nguyen, M.; Qin, F. X.-F.; Tong, Q., 2007. *SIRT2 deacetylates FOXO3a in response to oxidative stress and caloric restriction.* Aging Cell 6(4), 505–514.
<https://doi.org/10.1111/j.1474-9726.2007.00304.x>
- Wang, H.; Song, C.; Duan, C.; Shi, W.; Li, C.; Chen, D.; Wang, Y., 2002. *Effects of ubiquitin-proteasome pathway on mouse sperm capacitation, acrosome reaction and in vitro fertilization.* Chinese Science Bulletin 47(2), 127–132.
<https://doi.org/10.1360/02tb9029>
- Ward, W. S., 2010. *Function of sperm chromatin structural elements in fertilization and development.* Molecular Human Reproduction 16(1), 30–36.
<https://doi.org/10.1093/molehr/gap080>

- Wassarman, P. M.; Jovine, L.; Litscher, E. S., 2001. *A profile of fertilization in mammals*. Nature Cell Biology 3(2), 59–64. <https://doi.org/10.1038/35055178>
- Waterhouse, K. E.; Hofmo, P. O.; Tverdal, A.; Miller, R. R., 2006. *Within and between breed differences in freezing tolerance and plasma membrane fatty acid composition of boar sperm*. Reproduction 131(5), 887–894. <https://doi.org/10.1530/rep.1.01049>
- Whitaker, M., 1996. *Control of meiotic arrest*. Reviews of Reproduction 1(2), 127–135. <https://doi.org/10.1530/revreprod/1.2.127>
- White, I. G., 1993. *Lipids and calcium uptake of sperm in relation to cold shock and preservation: a review*. Reproduction, fertility, and development 5(6), 639–58.
- White, Y. A. R.; Woods, D. C.; Takai, Y.; Ishihara, O.; Seki, H.; Tilly, J. L., 2012. *Oocyte formation by mitotically active germ cells purified from ovaries of reproductive-age women*. Nature medicine 18(3), 413–21. <https://doi.org/10.1038/nm.2669>
- Wilding, M.; Dale, B.; Marino, M.; di Matteo, L.; Alviggi, C.; Pisaturo, M. L.; Lombardi, L.; De Placido, G., 2001. *Mitochondrial aggregation patterns and activity in human oocytes and preimplantation embryos*. Human reproduction (Oxford, England) 16(5), 909–17.
- Yanagida, K.; Katayose, H.; Hirata, S.; Yazawa, H.; Hayashi, S.; Sato, A., 2001. *Influence of sperm immobilization on onset of Ca(2+) oscillations after ICSI*. Human reproduction (Oxford, England) 16(1), 148–152.
- Yang, Q.; Dai, S.; Luo, X.; Zhu, J.; Li, F.; Liu, J.; Yao, G.; Sun, Y., 2018. *Melatonin attenuates postovulatory oocyte dysfunction by regulating SIRT1 expression*. Reproduction 156(1), 81–92. <https://doi.org/10.1530/REP-18-0211>
- Yeste, M., 2016. *Sperm cryopreservation update: Cryodamage, markers, and factors affecting the sperm freezability in pigs*. Theriogenology 85(1), 47–64. <https://doi.org/10.1016/J.THERIOGENOLOGY.2015.09.047>
- Yeste, M.; Rodríguez-Gil, J. E.; Bonet, S., 2017. *Artificial insemination with frozen-thawed boar sperm*. Molecular Reproduction and Development 84(9), 802–813. <https://doi.org/10.1002/mrd.22840>
- Yi, Y. J.; Im, G. S.; Park, C. S., 2002. *Lactose-egg yolk diluent supplemented with N-*

- acetyl-D-glucosamine affect acrosome morphology and motility of frozen-thawed boar sperm.* *Animal reproduction science* 74(3–4), 187–94.
[https://doi.org/https://doi.org/10.1016/S0378-4320\(02\)00187-2](https://doi.org/https://doi.org/10.1016/S0378-4320(02)00187-2)
- Yokota, N.; Sawada, H., 2007. *Sperm proteasomes are responsible for the acrosome reaction and sperm penetration of the vitelline envelope during fertilization of the sea urchin *Pseudocentrotus depressus*.* *Developmental Biology* 308(1), 222–231.
<https://doi.org/10.1016/J.YDBIO.2007.05.025>
- Yoshioka, K.; Suzuki, C.; Tanaka, A.; Anas, I. M.-K.; Iwamura, S., 2002. *Birth of Piglets Derived from Porcine Zygotes Cultured in a Chemically Defined Medium1.* *Biology of Reproduction* 66(1), 112–119. <https://doi.org/10.1095/biolreprod66.1.112>
- Youle, R. J.; Narendra, D. P., 2011. *Mechanisms of mitophagy.* *Nature Reviews Molecular Cell Biology* 12(1), 9–14. <https://doi.org/10.1038/nrm3028>
- Zeng, C.; Tang, K.; He, L.; Peng, W.; Ding, L.; Fang, D.; Zhang, Y., 2014. *Effects of glycerol on apoptotic signaling pathways during boar spermatozoa cryopreservation.* *Cryobiology* 68(3), 395–404.
<https://doi.org/10.1016/J.CRYOBIOL.2014.03.008>
- Zhang, J.; Su, J.; Hu, S.; Zhang, J.; Ding, R.; Guo, J.; Cao, G.; Li, R.; Sun, Q.-Y.; Li, X., 2018. *Correlation between ubiquitination and defects of bull spermatozoa and removal of defective spermatozoa using anti-ubiquitin antibody-coated magnetized beads.* *Animal Reproduction Science* 192, 44–52.
<https://doi.org/10.1016/J.ANIREPROSCI.2018.01.018>
- Zhang, T.; Zhou, Y.; Li, L.; Wang, H.-H.; Ma, X.-S.; Qian, W.-P.; Shen, W.; Schatten, H.; Sun, Q.-Y., 2016. *SIRT1, 2, 3 protect mouse oocytes from postovulatory aging.* *Aging* 8(4), 685–96. <https://doi.org/10.18632/aging.100911>
- Zhang, Y.; Hogg, N., 2005. *S-Nitrosothiols: cellular formation and transport.* *Free Radical Biology and Medicine* 38(7), 831–838.
<https://doi.org/10.1016/J.FREERADBIOMED.2004.12.016>
- Zhao, W.; Zhang, J.; Lu, Y.; Wang, R., 2001. *The vasorelaxant effect of H(2)S as a novel endogenous gaseous K(ATP) channel opener.* *The EMBO journal* 20(21), 6008–16.
<https://doi.org/10.1093/emboj/20.21.6008>

- Zhou, S.; Tang, X.; Chen, H.-Z., 2018. *Sirtuins and Insulin Resistance*. *Frontiers in Endocrinology* 9, 748. <https://doi.org/10.3389/fendo.2018.00748>
- Ziarati, N.; Tavalae, M.; Bahadorani, M.; Nasr Esfahani, M. H., 2018. *Clinical outcomes of magnetic activated sperm sorting in infertile men candidate for ICSI*. *Human fertility* (Cambridge, England) (Epub), 1–8. <https://doi.org/10.1080/14647273.2018.1424354>
- Zimmerman, S. W.; Manandhar, G.; Yi, Y.-J.; Gupta, S. K.; Sutovsky, M.; Odhiambo, J. F.; Powell, M. D.; Miller, D. J.; Sutovsky, P., 2011. *Sperm Proteasomes Degrade Sperm Receptor on the Egg Zona Pellucida during Mammalian Fertilization*. *PLoS ONE* 6(2), e17256. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0017256>
- Zou, K.; Yuan, Z.; Yang, Z.; Luo, H.; Sun, K.; Zhou, L.; Xiang, J.; Shi, L.; Yu, Q.; Zhang, Y.; Hou, R.; Wu, J., 2009. *Production of offspring from a germline stem cell line derived from neonatal ovaries*. *Nature Cell Biology* 11(5), 631–636. <https://doi.org/10.1038/ncb1869>

10 Seznam publikací autora

Publikace relevantní k dizertační práci (s IF):

Petelak, A.; Krylov, V., 2016. Cryopreservation of fluorescence activated cell sorted boar spermatozoa based on extracellular ubiquitination. *Czech Journal of Animal Science* 61(7), 310–316. (IF = 0,741)

podíl autora na publikaci: příprava experimentů, získání veškerých dat, tvorba manuskriptu

Nevoral, J.; Zalmanova, T.; Hoskova, K.; Stiavnicka, M.; Hosek, P.; Petelak, A.; Petr, J., 2018. Involvement of K⁺ATP and Ca²⁺ channels in hydrogen sulfide-suppressed ageing of porcine oocytes. *Biological research* 51(1), 38. (IF 2017 = 2,357)

podíl autora na publikaci: podíl na interpretaci dat a tvorbě manuskriptu

Publikace před vydáním:

Petelak, A.; Krylov, V. Surface sperm cell ubiquitination directly impaired blastocyst formation rate after intracytoplasmic sperm injection in pig

článek je v době odevzdání práce v recenzním řízení v časopise *Theriogenology*

podíl autora na publikaci: příprava experimentů, získání veškerých dat, tvorba manuskriptu

Další publikace autora:

Nevoral, J.; Sutovsky, P.; Zamostna, K.; Petelak, A.; Hoskova, K.; Zalmanova, T.; Petr, J., 2015. Strt1 as A Key Factor for Histone Code Establishment in Early Embryo, from A Perspective of Assisted Reproduction. *Slovak Journal of Animal Science* 48(4), 145-194.

11 Přílohy

Cryopreservation of fluorescence activated cell sorted boar spermatozoa based on extracellular ubiquitination

A. PETELÁK, V. KRYLOV

Faculty of Science, Charles University in Prague, Prague, Czech Republic

ABSTRACT: The present study is focused on the methodology of fluorescence activated cell sorting (FACS) of spermatozoa stained by the antibody against extracellular surface marker ubiquitin (eUb) and subsequent protocol for their long term storage in liquid nitrogen (LN). High level of spermatozoa surface ubiquitination has been previously discussed as a negative quality marker. From a general point of view, any other outer membrane antigen would be compatible with our approach. Regarding our experimental design we found that only those insemination doses with at least 40% of motile spermatozoa after freezing and thawing (F/T) in the egg-yolk medium with lactose are suitable for the subsequent antibody staining and FACS. The sorting rate was sufficient for the preparation of up to 20 spermatozoa aliquots for intracytoplasmic sperm injections (ICSI). Two significantly different groups with good freezability were prepared and stored in LN (0.73% contamination of spermatozoa with high eUb level in non-ubiquitinated group and reversely 6.65% spermatozoa without eUb in highly ubiquitinated group). Sperm viability after FACS varied from 11 to 28% regardless of the used media ($P = 0.15$). Required viability of F/T sorted spermatozoa was obtained by using Solusem[®] extender as a load and collection medium. In this case 12% of viable spermatozoa with progressive motility in low eUb level group and 7% in high eUb level group ($P < 0.05$) were detected. Our approach allows obtaining sufficient number of viable spermatozoa for subsequent artificial fertilization by ICSI. This procedure could be used for a wide variety of spermatozoa sorting based on different surface markers.

Keywords: pig; antibody staining; quality marker; porcine sperm; FACS; ubiquitin; cryopreservation

INTRODUCTION

Domestic pig (*Sus scrofa domestica*) represents an important model organism in clinical applications and regenerative medicine (Nagashima et al. 2012). However, *in vitro* production of quality embryos is hampered by the low success in artificial reproduction techniques (ART) such as *in vitro* fertilization (IVF) and intracytoplasmic sperm injection (ICSI). With this regard the focus is given to the precise execution and monitoring of all key steps throughout the process.

A fundamental criterion for proper fertilization is the spermatozoa quality concerning the morphology, motility, and fertilization rate. Currently, spermatozoa evaluation is performed using

a hemocytometer (mostly used), computer assisted semen analysis (CASA), photometric measurement or flow cytometry (FC) (Hansen et al. 2006). FC technique would be easily coupled with the analysis of spermatozoa extracellular ubiquitination (eUb) level since this indicator was found to be negatively correlated with their fertilization ability (Sutovsky et al. 2002; Hodjat et al. 2008). The eUb level determination would then improve the quality control in livestock reproduction and clinical medicine (Ozanon et al. 2005).

To confirm the direct effect of spermatozoa outer membrane ubiquitination on its quality and subsequent embryonic development, *in vitro* fertilization (IVF) or intracytoplasmic sperm injection (ICSI) could be utilized using spermatozoa labelled by anti

Supported by the Charles University Grant Agency (GAUK) (Project No. 589512) and by the Ministry of Agriculture of the Czech Republic (Project No. QJ1510138).

doi: 10.17221/27/2015-CJAS

Ub primary antibody (Ab). Secondary Ab coupled with fluorophore would enable their sorting, based on the presence or absence of fluorescence signal using fluorescence activated cell sorting (FACS). Currently, this technique is employed in spermatozoa sorting based on the sex chromosomes content, i.e. sperm sexing (Vazquez et al. 2009). Precisely separated populations of low eUb and high eUb spermatozoa are necessary for the subsequent comparison of fertilization tests using the techniques of *in vitro* assisted reproduction. In porcine model ICSI would be preferentially employed for its ability to overcome the lower spermatozoa motility after FACS procedure and to eliminate a polyspermic penetration, the common problem observed in standard porcine IVF protocols (Kren et al. 2003). ICSI provided similar fertilization and blastocyst forming rates when FACS sex sorted and unsorted spermatozoa were compared (Jo et al. 2014).

To overcome the problems with spermatozoa variability among particular insemination doses (Alkmin et al. 2014) it is necessary to have a well-established freezing and long-term storage protocol. In domestic animals a cryopreservation of cattle and horse semen is commonly used and improved (Barbas and Mascarenhas 2009), but the protocol for boar spermatozoa freezing is usually still based on egg-yolk extender (Pursel et al. 1972).

The low viability and conception rates of frozen and thawed (F/T) spermatozoa currently obtained after insemination are due to a combination of detrimental effects on sperm function and structural integrity during the freeze–thawing process (Watson 1995). In addition, boar spermatozoa membranes are highly sensitive to freezing stress (White 1993) and no more than 70% of spermatozoa are able to survive the cryopreservation (Gil et al. 2005; Martinez-Alborcia et al. 2012).

In this study we described a new combination of FACS procedure based on the surface marker and freezing protocol providing spermatozoa of sufficient quality for subsequent use in ART.

For the successful combination of cryopreservation and FACS it is important to optimize the extender and collection medium and make all processes with standard routine.

MATERIAL AND METHODS

Preparation of spermatozoa suspension. Insemination doses were purchased from local pro-

ducer (Chovservis a.s., SOSK Brná, Hradec Králové, Czech Republic). Boar semen was collected by gloved-hand technique and all procedures were in accordance with Czech law. 20 ml of spermatozoa suspension was centrifuged for 5 min at 700 *g* and supernatant was aspirated leaving approximately 1 ml of the original solution. Sediment was then resuspended and sorted on Percoll gradient (700 *g* for 15 min) consisting of 5 ml 40% Percoll (GE Healthcare Biosciences AB, Uppsala, Sweden) underlain with 2 ml of 80% Percoll. Dulbecco's phosphate buffered saline (DPBS) (Life Technologies, Carlsbad, USA) was used instead of standard PBS for the Percoll dilution. All media and solutions were tempered to 17°C. After centrifugation the supernatant was discarded and the spermatozoa pellet was resuspended with DPBS + 0.01% polyvinyl alcohol (PVA) (Sigma-Aldrich, St. Louis, USA) to a final concentration 1×10^8 spermatozoa/ml.

Antibody staining. Blocking of spermatozoa (30 min) was performed in 5% normal goat serum (5% NGS) (Sigma-Aldrich) in DPBS prior to staining. After a 5 min centrifugation of 5 ml spermatozoa suspension at 350 *g*, the supernatant was removed and pellet resuspended in 0.5 ml of 1% NGS with primary antibody (Anti Ubiquitin; Imgenex Corp., San Diego, USA) diluted 1:100 and incubated for 40 min at 17°C. Spermatozoa were then washed twice with 1% NGS and incubated for 60 min in 1% NGS with secondary antibody (Goat-anti-rabbit IgG FITC; Imgenex Corp.) diluted 1:200. After staining, cells were washed in appropriate load medium, DPBS + 0.01% PVA or Solusem® (Varkens KI Nederland, Deventer, the Netherlands), the standard extender routinely used by insemination doses producer.

FACS. To distinguish spermatozoa from other particles and debris, cells were stained for 15 min with Hoechst 33342 (Sigma-Aldrich) added to the appropriate load medium to a final concentration 1 µg/ml (Marchiani et al. 2007). To remove debris or clumped spermatozoa, samples were then filtered through a 40 µm mesh. A polychromatic high-speed cell sorter BD-Influx (BD Biosciences, San Jose, USA) equipped with lasers (355, 488 nm) was used. DPBS served as a sheath fluid. A standard nozzle was used for both groups during passage through the FACS. Sorted spermatozoa were deflected into 1.5 ml mini tubes containing 700 µl collection medium DPBS + 0.01% PVA or modified Tris-buffered medium (mTBM) (MilliQ water

with 113.1mM NaCl₂, 3mM KCl, 20mM Trizma base, 5mM glucose, 5mM sodium pyruvate, bovine serum albumin in the concentration of 2 µg/ml, and 14.1mM phenol red – all Sigma-Aldrich) or extender Solusem[®]. The data were acquired using BD FACSDiva Software (BD Biosciences).

Spermatozoa were sorted into two groups to acquire the largest difference in the eUb level. In the first one (low eUb level) we selected spermatozoa with minimal fluorescein isothiocyanate (FITC) signal intensity and in the second group (high eUb) spermatozoa with strong signal were collected. Both groups included consistent population of spermatozoa with similar intensity of fluorescent signal to obtain enough intra-group similarity (Figure 2).

Freezing protocol. Sperm freezing medium was prepared according to study of Yi et al. (2002) with modification in surfactant component in fraction B where 8.3mM sodium dodecyl sulfate (SDS) (Sigma-Aldrich) was used instead of Orvus ES Paste.

We established our modified protocol for spermatozoa freezing and thawing which we used for freezability test. Twelve ml of spermatozoa suspension from insemination dose was centrifuged for 5 min at 700 g, supernatant was aspirated to a final volume of approximately 0.75 ml. Pellet was then resuspended and sorted on Percoll gradient tempered to 17°C, the supernatant was removed and pellet was resuspended in DPBS + 0.01% PVA tempered to 17°C to a final concentration of 5×10^7 spermatozoa/ml. Two ml of this suspension was centrifuged for 5 min and supernatant was discarded. The pellet was resuspended in 0.5 ml fraction A of freezing medium (20% (v/v) of egg yolk diluted in MilliQ water, 0.3M lactose monohydrate). Suspension was over a 2 h period slowly cooled in a refrigerator to 5°C and 0.5 ml of freezing medium fraction B (fraction A with 0.82M glycerol and 8.3mM SDS) was added. In a room tempered to 5°C, glass 50 µl capillaries (Drummond Scientific Co., Broomall, USA) were filled immediately with approximately 30 µl of suspension, the suspension was aligned to the centre, and Bunsen torch was used to seal the ends. Capillaries were horizontally placed on a plastic holder situated 5 cm above the liquid nitrogen (LN) surface in a tank for 10 min before they were immersed into LN and then stored.

For freezing FACS sorted spermatozoa some minor modification was performed. We did not make Percoll selection since this step was performed already before Ab staining. Collection medium

with spermatozoa was centrifuged for 5 min at 700 g, supernatant was discarded, and pellet was gently resuspended in 200 µl fraction A of freezing medium. After refrigeration, 200 µl of fraction B was added. Subsequent procedures were the same as for the freezability test.

The spermatozoa suspension was thawed in 37°C water bath for 3 min and then immediately added to a test tube containing 250 µl mTBM-ICSI (mTBM with 2mM CaCl₂ 2H₂O and 1mM caffeine). Sperm motility was evaluated after a 20 min incubation.

Viability analysis. After the 20 min incubation in mTBM-ICSI at 38°C spermatozoa motility was evaluated using standard Bürker chamber. To determine spermatozoa concentration and motility, two independent measurements were performed, counting 200 spermatozoa in each replicate. Particular media combination for FACS was tried on 5 or 6 different insemination doses with good freezability.

Evaluation of spermatozoa viability based only on motility was sufficient for our purposes because this value is closely related to their viability and gives similar evaluation results (Gil et al. 2005; Martinez-Alborcia et al. 2012). Immotile spermatozoa were assessed as non-viable.

A comparison of viability between low- and highly-ubiquitinated spermatozoa was carried out in paired experiments.

Statistical analysis. Statistical analysis and graphs were carried out using the GraphPad Prism, Version 5.01 (GraphPad Software Inc., San Diego, USA). Data were analyzed by one-way ANOVA and *t*-test. Values were considered statistically significant at $P < 0.05$.

RESULTS

Selection of appropriate insemination dose.

Insemination doses from different boars were prepared for cryopreservation, stored in LN for one day, and thawed. The motility of F/T spermatozoa varied from 0 to 55%. We arbitrarily determined the presence of 40% motile spermatozoa after F/T as the lowest limit for using the original insemination dose for sorting procedure. Insemination doses with spermatozoa viability lower than 40% always revealed spermatozoa motility close to zero after FACS and F/T (data not shown).

FACS and the selection of collection medium.

Representative patterns of spermatozoa immuno-

doi: 10.17221/27/2015-CJAS

fluorescence labelling with anti-ubiquitin antibody after FACS is shown in Figure 1. FACS analysis outcome (Figure 2) revealed distinct spermatozoa populations based on the FITC signal intensity derived from the staining by secondary antibody. Figure 2 shows gating of events determined as single cells and the intensity plot used for the sorting of high eUb level spermatozoa and cells with the minimal eUb level.

Sorting rate of high eUb level spermatozoa varied from 26 to 194 spermatozoa per second (sp/s) with the average value of 75 sp/s, low eUb level revealed values ranging from 63 to 318 sp/s with the average of 148 sp/s. These sorting rates kept

spermatozoa in a relatively good condition and ensured a sufficient sorting resolution.

Sorted spermatozoa were reanalyzed by flow cytometry with identical configuration as for sorting. In the experimental groups with low ubiquitinated spermatozoa we found the average contamination 0.73% of spermatozoa with high level of eUb. Conversely, in the group of highly ubiquitinated spermatozoa low ubiquitinated counterparts were presented with 6.65% on average.

The viability of spermatozoa after sorting was the highest in the experimental group where load and collection medium was the Solusem® extender (Figure 3A).

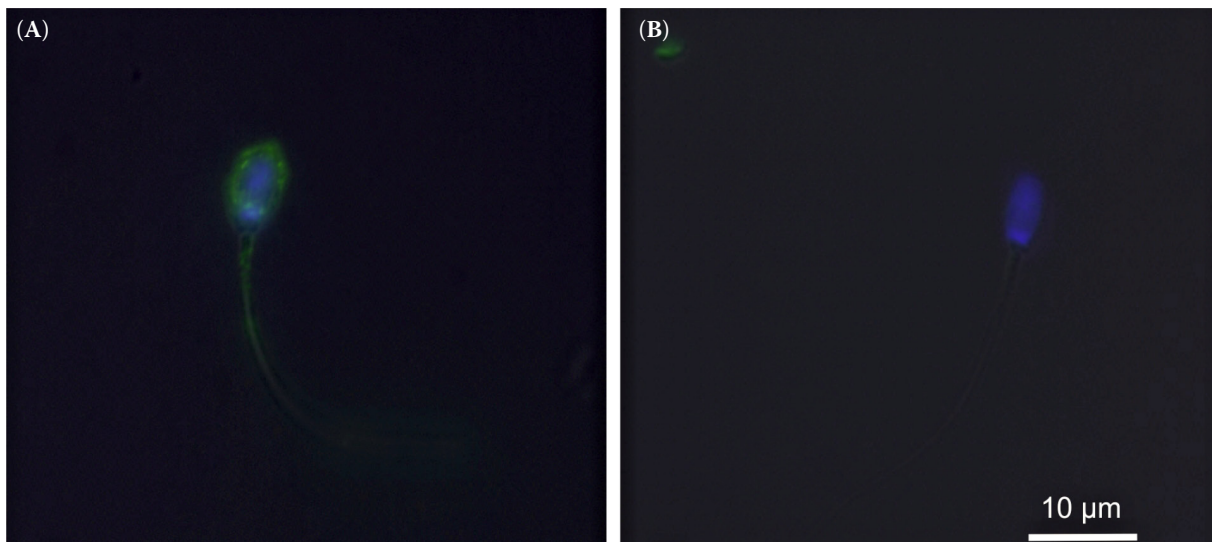


Figure 1. Commonly observed ubiquitination patterns (green) on sorted spermatozoa in the group with high ubiquitination level (A) and equally stained spermatozoa from low extracellular ubiquitination (eUb) level group (B). Chromatin was counterstained with DAPI (blue)

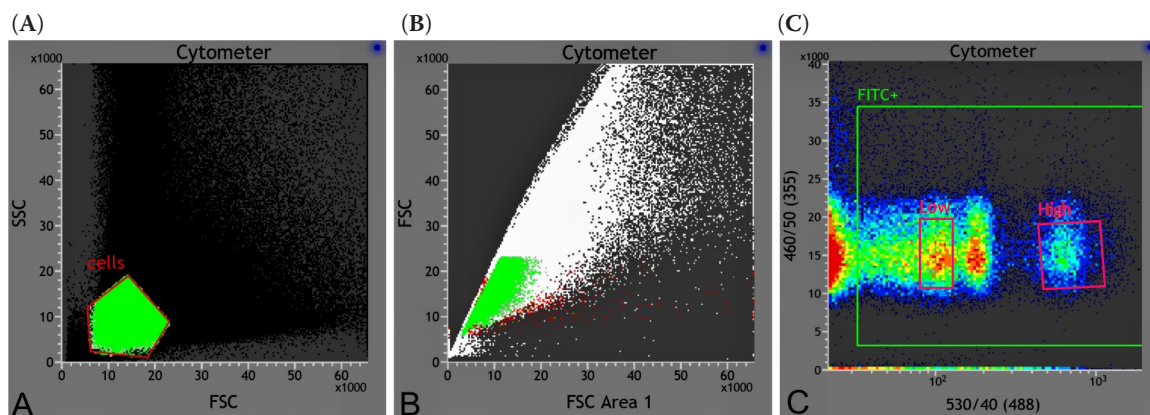


Figure 2. Flow cytometry analysis outcome of spermatozoa stained with Hoechst 33342 and FITC-conjugated secondary anti Ub primary antibody (Ab)

gating to distinguish debris and other bodies from spermatozoa (A), gating to select clumped spermatozoa from single cells (B), visible population of spermatozoa with low extracellular ubiquitination (eUb) level (Low) and high eUb level (High) (C)

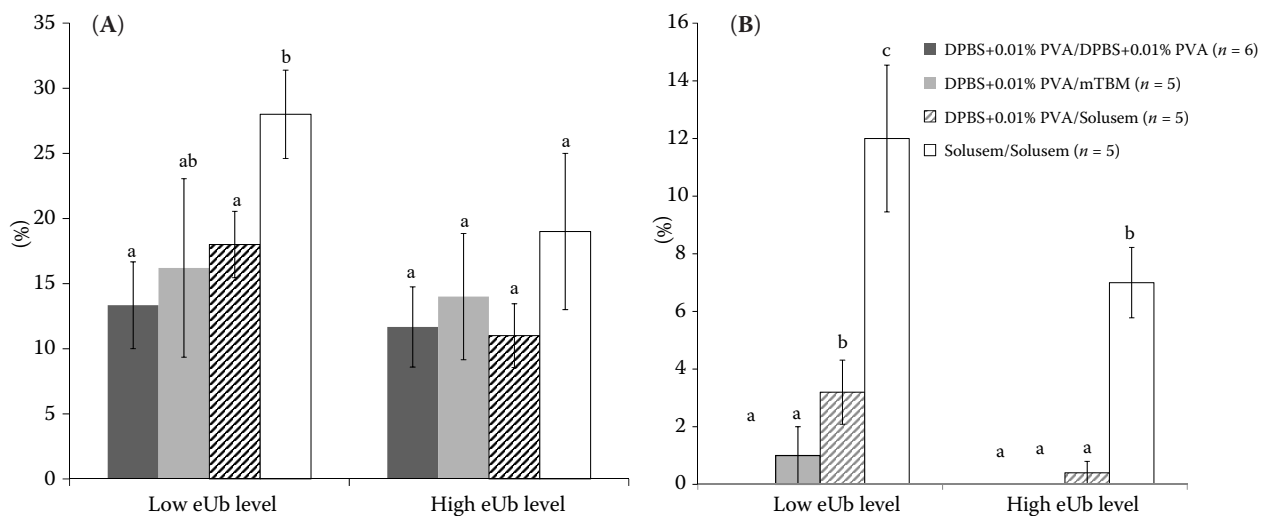


Figure 3. Percentage of viable low and highly ubiquitinated spermatozoa (A) and frozen/thawed spermatozoa (B) after fluorescence activated cell sorting (FACS) in different load/collection media (mean \pm SEM). 200 spermatozoa were analyzed in each replicate (numbers of replicates are in brackets)

^{a-c}significant difference ($P < 0.05$)

eUb = extracellular surface marker ubiquitin, DPBS = Dulbecco's phosphate buffered saline, PVA = polyvinyl alcohol, mTBM = modified Tris-buffered medium

The overall viability regardless of the used load and collection media was better for low ubiquitinated spermatozoa after FACS (18.6%) in comparison with the high eUb level experimental group (13.8%, $P < 0.005$) indicating a negative correlation between surface eUb level and spermatozoa quality.

Viability after thawing. The high viability rate of F/T spermatozoa after FACS is the key factor for the successful fertilization and early embryonic development. When DPBS + 0.01% PVA was utilized as a load and collection medium, no viable and motile spermatozoa were observed after FACS and F/T. Using DPBS + 0.01% PVA as a load and mTBM or standard extender as a collection medium, only few viable spermatozoa were detected but without progressive motility. The best viability rate with progressively moving spermatozoa was determined when Solusem[®] extender was employed as a load and collection medium (Figure 3B). In this case the viability of low ubiquitinated spermatozoa after FACS and F/T was 12.0% and in the high eUb level experimental group it was 7.0% ($P < 0.05$).

DISCUSSION

Plasma membrane of boar spermatozoa is sensitive to stress, which greatly limits the utilization of FACS and freezing and makes the IVF techniques

more complicated (Vazquez et al. 2009; Balao da Silva et al. 2013). In addition, there is a wide individual variability among particular boars (Medrano et al. 2009) and even among individual semen collections from the same animal (Ciereszko et al. 2000). It is therefore important to evaluate the actual semen quality before subsequent fertilization or experimental trial. The first concern was to optimize spermatozoa survival rate during and after the freezing/thawing procedure.

Initial freezability test was important to overcome the above mentioned difficulties. Insemination doses without appropriate motility after F/T (below 40%) are not suitable for next procedures.

In contrast to cattle and horse, sorting of spermatozoa by FACS is used rarely in pig. Utilization of FACS to obtain sexed spermatozoa and piglets of desired sex was described by several authors (Vazquez et al. 2009), but only one approach was considered for commercial use (del Olmo et al. 2014). The necessity of large spermatozoa quantity for swine insemination (Vazquez et al. 2009) pre-determines FACS especially in combination with cryopreservation to fertilization by ICSI. In our study we have shown that the average speed limit for the sorting rate regarding antibody staining of surface eUb is around 5×10^5 spermatozoa per hour which is incompatible with the preparation

doi: 10.17221/27/2015-CJAS

of standard insemination dose (minimum up to 5×10^8 F/T spermatozoa) (Knox and Yantis 2014) but it is sufficient for one laparoscopic insemination (del Olmo et al. 2014) or for many ICSI procedures.

A standard cytometer nozzle was used for all sorted groups because signal intensity of high eUb and low eUb populations was highly different and spermatozoon orientation during passage through the FACS detector had only minor contribution. In contrary to our experimental design, a standard nozzle is useless for the spermatozoa sexing where the signal intensity is very similar for XX and XY spermatozoa (Garner 2006). Staining of semen samples with Hoechst 33342 to distinguish spermatozoa from other particles and debris was also performed by Marchiani et al. (2007) or Martinez-Alborcia et al. (2012).

During FACS, spermatozoa are in the suboptimal condition and motility and viability decrease. On the other hand, high pressure during fast sorting has the same negative effect. We determined the optimal sorting duration up to 90 min. Above this time limit we observed serious decrease of spermatozoa motility and viability (personal observation).

To obtain two populations with maximal resolution regarding the ubiquitination level, only 1.51 and/or 0.91% of spermatozoa was selected into group with low and/or high eUb level. Interestingly, we observed significantly lower spermatozoa viability in the high eUb group compared to low eUb counterpart. This result corresponds to the hypothesis regarding the selection of epididymal spermatozoa based on eUb level (Sutovsky et al. 2002).

However, not all studies revealed this negative correlation between eUb level and spermatozoa quality. Muratori et al. (2005) and Varum et al. (2007) reported the opposite results. These discrepancies could be explained either by hypo-functionality of ubiquitin-based spermatozoa selection and degradation in epididymis (Eskandari-Shahraki et al. 2013) or by detection of ubiquitinated proteins, albeit not those on the sperm surface, that are intrinsic to normal spermatozoa (Sutovsky et al. 2015).

Our results are also in contradiction to study by Purdy (2008) concerning positive correlation between percentage of ubiquitinated spermatozoa in whole boar insemination dose and its freezability. The author highlighted the general beneficial effect of protein incorporation in the spermatozoa membrane (surface ubiquitin in this case) on its fluidity and cryopreservation success. With this

regard it means that a separated group of highly ubiquitinated spermatozoa should reveal better survival rate after F/T in comparison with a non-ubiquitinated counterpart. However, our results indicated the opposite reliance, thus we disprove this hypothesis.

The viability after thawing greatly depends on initial semen parameters and precise manipulation during all processes. Unpublished data suggest temperature fluctuations during manipulation with spermatozoa as a crucial problem, especially after the initial cooling down to 5°C.

CONCLUSION

Spermatozoa undergo various kinds of stress during a relatively long procedure of Ab staining and FACS. Our approach allows obtaining a sufficient number of viable spermatozoa for subsequent artificial fertilization by ICSI. This procedure could be used for a wide variety of spermatozoa sorting based on different surface markers.

REFERENCES

- Alkmin D.V., Parrilla I., Tarantini T., Parlapan L., Del Olmo D., Vazquez J.M., Martinez E.A., Roca J. (2014): Intra- and interboar variability in flow cytometric sperm sex sorting. *Theriogenology*, 82, 501–508.
- Balao da Silva C.M., Ortega Ferrusola C., Morillo Rodriguez A., Gallardo Bolanos J.M., Plaza Davila M., Morrell J.M., Rodriguez Martinez H., Tapia J.A., Aparicio I.M., Pena F.J. (2013): Sex sorting increases the permeability of the membrane of stallion spermatozoa. *Animal Reproduction Science*, 138, 241–251.
- Barbas J.P., Mascarenhas R.D. (2009): Cryopreservation of domestic animal sperm cells. *Cell and Tissue Banking*, 10, 49–62.
- Ciereszko A., Ottobre J.S., Glogowski J. (2000): Effects of season and breed on sperm acrosin activity and semen quality of boars. *Animal Reproduction Science*, 64, 89–96.
- del Olmo D., Parrilla I., Sanchez-Osorio J., Gomis J., Angel M.A., Tarantini T., Gil M.A., Cuello C., Vazquez J.L., Roca J., Vazquez J.M., Martinez E.A. (2014): Successful laparoscopic insemination with a very low number of flow cytometrically sorted boar sperm in field conditions. *Theriogenology*, 81, 315–320.
- Eskandari-Shahraki M., Tavalaee M., Deemeh M.R., Jelodar G.A., Nasr-Esfahani M.H. (2013): Proper ubiquitination effect on the fertilisation outcome post-ICSI. *Andrologia*, 45, 204–210.

- Garner D.L. (2006): Flow cytometric sexing of mammalian sperm. *Theriogenology*, 65, 943–957.
- Gil M.A., Roca J., Cremades T., Hernandez M., Vazquez J.M., Rodriguez-Martinez H., Martinez E.A. (2005): Does multivariate analysis of post-thaw sperm characteristics accurately estimate in vitro fertility of boar individual ejaculates? *Theriogenology*, 64, 305–316.
- Hansen C., Vermeiden T., Vermeiden J.P., Simmet C., Day B.C., Feitsma H. (2006): Comparison of FACSCount AF system, Improved Neubauer hemocytometer, Corning 254 photometer, SpermVision, UltiMate and NucleoCounter SP-100 for determination of sperm concentration of boar semen. *Theriogenology*, 66, 2188–2194.
- Hodjat M., Akhondi M.A., Al-Hasani S., Mobaraki M., Sadeghi M.R. (2008): Increased sperm ubiquitination correlates with abnormal chromatin integrity. *Reproductive Biomedicine Online*, 17, 324–330.
- Jo H.T., Bang J.I., Kim S.S., Choi B.H., Jin J.I., Kim H.L., Jung I.S., Suh T.K., Ghanem N., Wang Z., Kong I. (2014): Production of female bovine embryos with sex-sorted sperm using intracytoplasmic sperm injection: efficiency and in vitro developmental competence. *Theriogenology*, 81, 675–682.
- Knox R.V., Yantis B.M. (2014): The effect of numbers of frozen-thawed boar sperm and addition of prostaglandin F₂α at insemination on fertility in pigs. *Animal Reproduction Science*, 151, 194–200.
- Kren R., Kikuchi K., Nakai M., Miyano T., Ogushi S., Nagai T., Suzuki S., Fulka J., Fulka Jr. J. (2003): Intracytoplasmic sperm injection in the pig: where is the problem? *The Journal of Reproduction and Development*, 49, 271–273.
- Marchiani S., Tamburrino L., Forti G., Baldi E., Muratori M. (2007): M540 bodies and their impact on flow cytometric analyses of human spermatozoa. *Society of Reproduction and Fertility Supplement*, 65, 509–514.
- Martinez-Alborcia M.J., Valverde A., Parrilla I., Vazquez J.M., Martinez E.A., Roca J. (2012): Detrimental effects of non-functional spermatozoa on the freezability of functional spermatozoa from boar ejaculate. *PLoS ONE*, 7, e36550.
- Medrano A., Holt W.V., Watson P.F. (2009): Controlled freezing studies on boar sperm cryopreservation. *Andrologia*, 41, 246–250.
- Muratori M., Marchiani S., Forti G., Baldi E. (2005): Sperm ubiquitination positively correlates to normal morphology in human semen. *Human Reproduction*, 20, 1035–1043.
- Nagashima H., Matsunari H., Nakano K., Watanabe M., Umeyama K., Nagaya M. (2012): Advancing pig cloning technologies towards application in regenerative medicine. *Reproduction in Domestic Animals*, 47 (Suppl. 4), 120–126.
- Ozanon C., Chouteau J., Sutovsky P. (2005): Clinical adaptation of the sperm ubiquitin tag immunoassay (SUTI): relationship of sperm ubiquitylation with sperm quality in gradient-purified semen samples from 93 men from a general infertility clinic population. *Human Reproduction*, 20, 2271–2278.
- Purdy P.H. (2008): Ubiquitination and its influence in boar sperm physiology and cryopreservation. *Theriogenology*, 70, 818–826.
- Pursel V.G., Johnson L.A., Schulman L.L. (1972): Interaction of extender composition and incubation period on cold shock susceptibility of boar spermatozoa. *Journal of Animal Science*, 35, 580–584.
- Sutovsky P., Neuber E., Schatten G. (2002): Ubiquitin-dependent sperm quality control mechanism recognizes spermatozoa with DNA defects as revealed by dual ubiquitin-TUNEL assay. *Molecular Reproduction and Development*, 61, 406–413.
- Sutovsky P., Aarabi M., Miranda-Vizuete A., Oko R. (2015): Negative biomarker based male fertility evaluation: sperm phenotypes associated with molecular-level anomalies. *Asian Journal of Andrology*, 17, 554–560.
- Varum S., Bento C., Sousa A.P., Gomes-Santos C.S., Henriques P., Almeida-Santos T., Teodosio C., Paiva A., Ramalho-Santos J. (2007): Characterization of human sperm populations using conventional parameters, surface ubiquitination, and apoptotic markers. *Fertility and Sterility*, 87, 572–583.
- Vazquez J.M., Parrilla I., Roca J., Gil M.A., Cuello C., Vazquez J.L., Martinez E.A. (2009): Sex-sorting sperm by flow cytometry in pigs: issues and perspectives. *Theriogenology*, 71, 80–88.
- Watson P.F. (1995): Recent developments and concepts in the cryopreservation of spermatozoa and the assessment of their post-thawing function. *Reproduction, Fertility and Development*, 7, 871–891.
- White I.G. (1993): Lipids and calcium uptake of sperm in relation to cold shock and preservation: a review. *Reproduction, Fertility and Development*, 5, 639–658.
- Yi Y.J., Im G.S., Park C.S. (2002): Lactose-egg yolk diluent supplemented with N-acetyl-D-glucosamine affect acrosome morphology and motility of frozen-thawed boar sperm. *Animal Reproduction Science*, 74, 187–194.

Received: 2015–04–09

Accepted after corrections: 2016–03–02

Corresponding Author


Mgr. Aleš Petelák, Charles University in Prague, Faculty of Science, Viničná 7, 128 44 Prague 2, Czech Republic
Phone: +420 221 951 782, e-mail: petelak@natur.cuni.cz

SHORT REPORT

Open Access



Involvement of K^+_{ATP} and Ca^{2+} channels in hydrogen sulfide-suppressed ageing of porcine oocytes

Jan Nevoral^{1,2*} , Tereza Zalmanova³, Kristyna Hoskova³, Miriam Stivnicka¹, Petr Hosek¹, Ales Petelak^{3,4} and Jaroslav Petr³

Abstract

Background: Hydrogen sulfide has been shown to improve the quality of oocytes destined for in vitro fertilization. Although hydrogen sulfide is capable of modulating ion channel activity in somatic cells, the role of hydrogen sulfide in gametes and embryos remains unknown. Our observations confirmed the hypothesis that the K_{ATP} and L-type Ca^{2+} ion channels play roles in porcine oocyte ageing and revealed a plausible contribution of hydrogen sulfide to the modulation of ion channel activity.

Results: We confirmed the benefits of the activation and suppression of the K_{ATP} and L-type Ca^{2+} ion channels, respectively, for the preservation of oocyte quality.

Conclusions: Our experiments identified hydrogen sulfide as promoting the desired ion channel activity, with the capacity to protect porcine oocytes against cell death. Further experiments are needed to determine the exact mechanism of hydrogen sulfide in gametes and embryos.

Keywords: Oocyte, Gasotransmitter, Hydrogen sulfide, Ion channel, Oocyte ageing

Introduction

Matured metaphase II (MII) oocytes are destined for fertilization and, therefore, represent essential cells in human reproduction, as well as assisted reproduction technologies (ART) when natural reproduction fails. However, oocyte maturation is not strictly synchronized at MII, and oocytes undergo undesirable changes related to post-ovulatory ageing. These changes ultimately manifest in cell death (i.e., apoptosis or lysis) or parthenogenetically activated embryonic development [1, 2].

Accordingly, age-related signalling has been extensively studied, and various substances with oocyte protective effects have been tested [3, 4]. Gasotransmitters, particularly hydrogen sulfide, represent potent signalling molecules involved in the regulation of oocyte maturation and ageing [3, 5, 6]. Accordingly, a hydrogen sulfide treatment

suppresses the negative effects of oocyte ageing, such as parthenogenetic activation and oocyte/embryo death, in a dose-dependent manner [3]. The mechanism of hydrogen sulfide action is well studied. Indeed, hydrogen sulfide-activated ATP-sensitive K^+ (K^+_{ATP}) ion channels have been described, while L-type Ca^{2+} ion channels have also been shown to be inhibited by hydrogen sulfide [7, 8]. S-sulfhydration, a hydrogen sulfide-derived post-translational modification [9], is considered to be the mechanism of hydrogen sulfide action towards ion channels [10]. Although the actions of hydrogen sulfide have been intensively studied in somatic cells, findings in gametes are rare [5, 11].

In the present study, we hypothesized that hydrogen sulfide also modulates the activity of K^+_{ATP} and/or L-type Ca^{2+} ion channels in aged oocytes. We used oocytes from the well-established biomedical model of the domestic pig (*Sus scrofa*) and explored possible ways to preserve the quality of oocytes and improve their availability for ART. We have observed a protective effect of

*Correspondence: jan.nevoral@lfp.cuni.cz

¹ Biomedical Center, Faculty of Medicine in Pilsen, Charles University, alej Svobody 1655/76, Pilsen, Czech Republic

Full list of author information is available at the end of the article



hydrogen sulfide treatment on aged oocytes and subsequently revealed hydrogen sulfide to be a signalling molecule in oocyte [reviewed by 12]. Based on known targets of hydrogen sulfide with potent cell-protective activities [13], we pharmacologically induced the activation and inhibition of K^+_{ATP} and Ca^{2+} ion channels through minoxidil and verapamil treatment of aged oocytes, respectively. We tracked intact MII oocytes and all undesired oocyte phenotypes.

Materials and methods

All chemicals were purchased from Sigma-Aldrich (USA) unless otherwise stated.

Pig oocyte collection and oocyte ageing

Pig ovaries were obtained from non-cyclic gilts at a local slaughterhouse (Jatky Cesky Brod, a.s., Czech Republic) and transported to the laboratory. Cumulus-oocyte complexes were collected from 3 to 5 mm follicles by aspiration using a syringe and 20G needle. Fully grown immature oocytes with intact ooplasm and compact layers of cumulus cells were selected for in vitro maturation in modified M199 culture medium for 48 h at 39 °C and 5% CO_2 [6]. Matured MII oocytes were denuded and subjected to further in vitro cultivation in modified M199 under standard conditions for 72 h [3].

Pharmacological treatment of aged oocytes

During the 72 h in vitro culture of matured oocytes, minoxidil (K^+_{ATP} channel activator), verapamil hydrochloride (L-type Ca^{2+} channel blocker) or $Na_2S \cdot 9H_2O$ was added. In further experiments, Na_2S supplementation was combined with different concentrations of glibenclamide (K^+ channel blocker) or BAY K8644 (L-type Ca^{2+} channel agonist).

Evaluation of oocyte ageing

At the end of in vitro culture, aged oocytes were mounted on slides using Vaseline and fixed in acetic alcohol (1:3, v/v) for at least 48 h. Fixed oocytes were stained with 1.0% orcein and evaluated via phase contrast microscopy (Olympus, Germany). Aged oocytes were evaluated as follows: (i) intact MII oocytes without visible morphological changes; (ii) cell death, i.e. apoptosis (marked with visible apoptotic bodies, also called fragmentation) or

lysis (necrosis) or (iii) parthenogenetic activation (recognized by spontaneous embryonic development). Ageing phenotypes are shown on Fig. 1.

Statistics

Data from 120 oocytes per group in three independent experiments are expressed as the mean \pm S.E.M. The data were processed using Statistica Cz 12 (StatSoft, USA). For comparisons of the study groups, one-way ANOVA (for quantitative variables) was used. In the case of a significant overall finding, differences between individual group pairs were assessed using the Bonferroni post hoc test. The level of statistical significance was set at $\alpha = 0.05$.

Results and discussion

The modulation of ion channel activity suppresses oocyte ageing

We observed an improvement in oocyte quality following the modulation of ion channel activity using the K^+ and L-type Ca^{2+} channel activator and inhibitor, respectively. Both agents yielded a dose-dependent increases in the number of intact MII oocytes (Fig. 2A, D), along with the suppression of cell death, such as apoptosis or lysis (Fig. 2B, E). The positive effect of hydrogen sulfide on oocyte ageing [3], as well as its ability to modulate ion channel activity [reviewed by 7] have been described. Therefore, subsequent experiments were performed using combined treatment with a hydrogen sulfide donor and modulators of ion channel activity.

K^+ channel inhibition reduces the protective effect of hydrogen sulfide against oocyte ageing

Based on the aforementioned protective effect of hydrogen sulfide [3], we speculated that K^+ channel activity has a positive effect on aged oocytes. Moreover, the ability of hydrogen sulfide to modulate ion channel activity is known [7, 8], as is the protective effect of K^+_{ATP} channel activation alone (see above). Based on the ability of hydrogen sulfide to activate K^+_{ATP} channels, we sought to reverse the positive effect of the hydrogen sulfide donor using glibenclamide, a K^+_{ATP} channel blocker (iK_{ATP}).

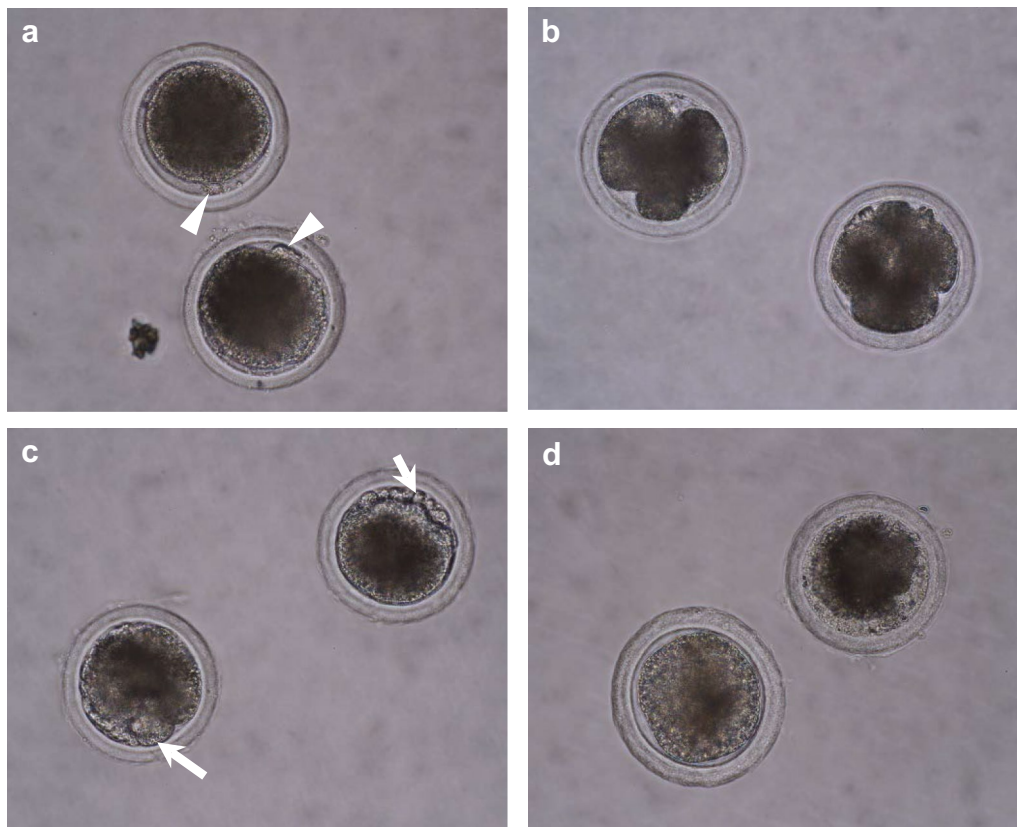


Fig. 1 Aged porcine oocytes with different manifestations of ageing. **a** Intact MII: matured oocytes physiologically arrested in metaphase of the 2nd meiotic division. The 1st polar body is extruded (arrowhead) and marks matured oocyte destined for fertilization. **b** Activated: parthenogenetically activated oocytes with spontaneous embryonic development. **c, d** Cell death: oocytes underwent either fragmentation or lysis, respectively. Apoptotic bodies are indicated (arrow)

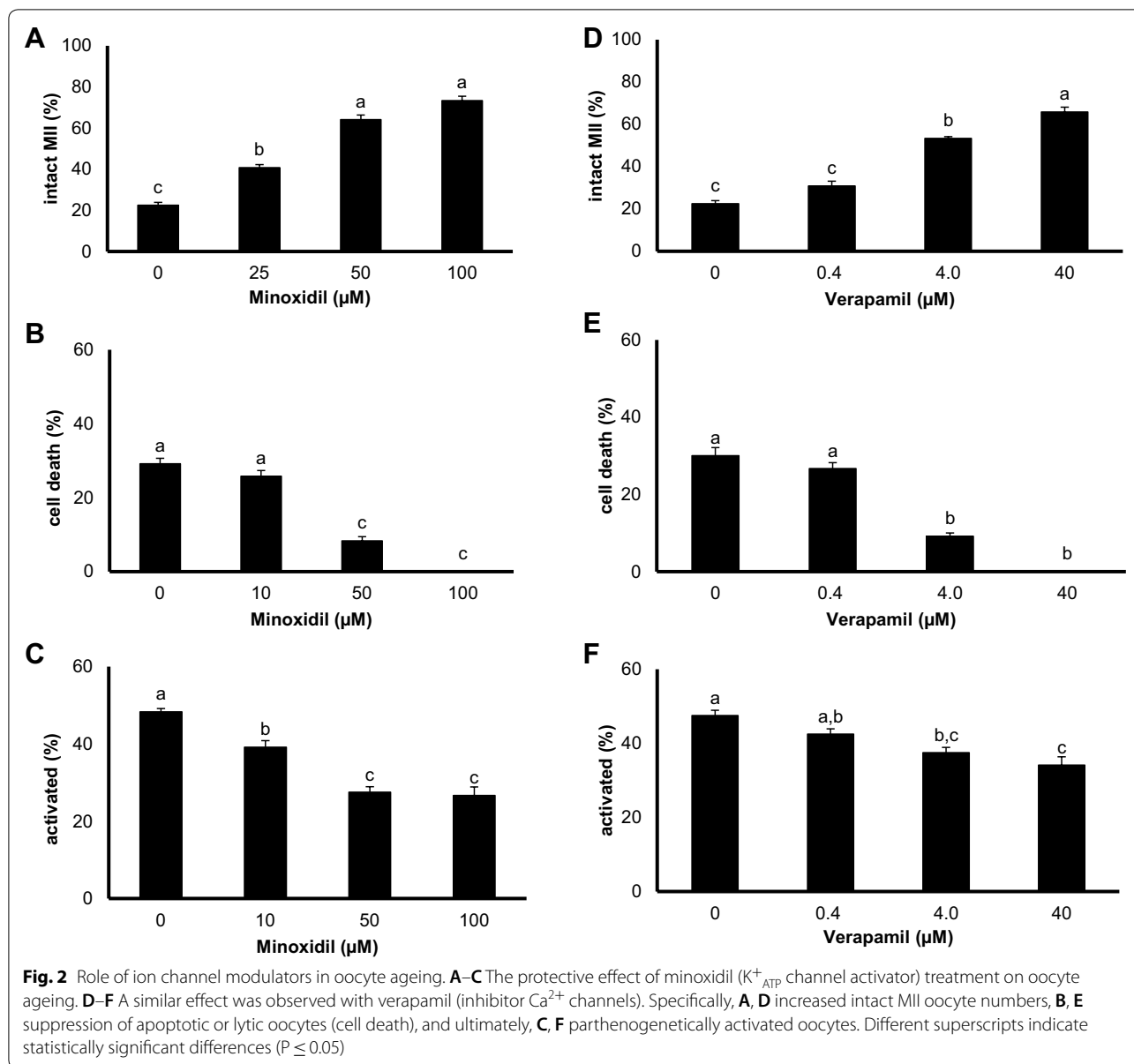
As expected, iK_{ATP} impaired the quality of aged oocytes compared with control oocytes aged in pure medium (Fig. 3; $(-)\text{Na}_2\text{S}$). In contrast, addition of a hydrogen sulfide donor alone (control oocytes for $(+)\text{Na}_2\text{S}$ treatment) increased the intact MII oocytes up to $54.2 \pm 0.8\%$ (Fig. 3A), while oocyte apoptosis/lysis (cell death) was completely inhibited (Fig. 3B). iK_{ATP} reduced the hydrogen sulfide-increased portion of intact MII oocytes after 72 h of oocyte ageing in a dose-dependent manner (Fig. 3A). While hydrogen sulfide-treated oocytes showed a significantly decreased prevalence of oocyte cell death (Fig. 3B), iK_{ATP} treatment reversed the positive effect of hydrogen sulfide (Fig. 3A, B). The observation is consistent with the general assumption that hydrogen sulfide acts as a K^+_{ATP} ion channel activator, as evidenced in

vascular smooth muscle cells [14], cardiomyocytes [15], neuronal cells [16] and/or pancreatic beta cells [17].

L-type Ca^{2+} channel activation impairs the protective effect of hydrogen sulfide against oocyte ageing

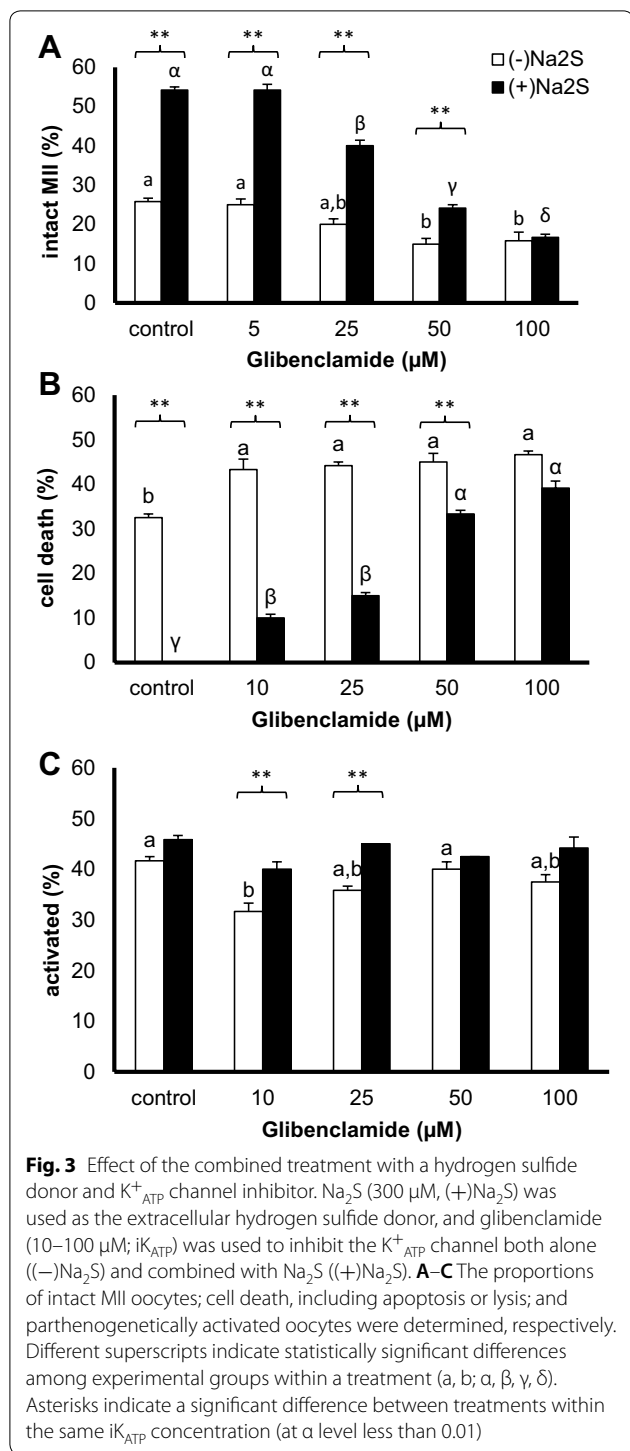
In addition to K^+_{ATP} channels, we tested the role of Ca^{2+} channels in hydrogen sulfide-protected oocytes. Consistent with our observation of the beneficial effect of Ca^{2+} channel inhibition (see above), we experimentally reversed the positive effect of the hydrogen sulfide donor using BAY K8644 an activator of L-type Ca^{2+} channels (aCa).

Different concentrations of the Ca^{2+} channel activator ($(-)\text{Na}_2\text{S}$) had no observable effect on oocyte phenotypes (Fig. 4). When coupled with hydrogen sulfide



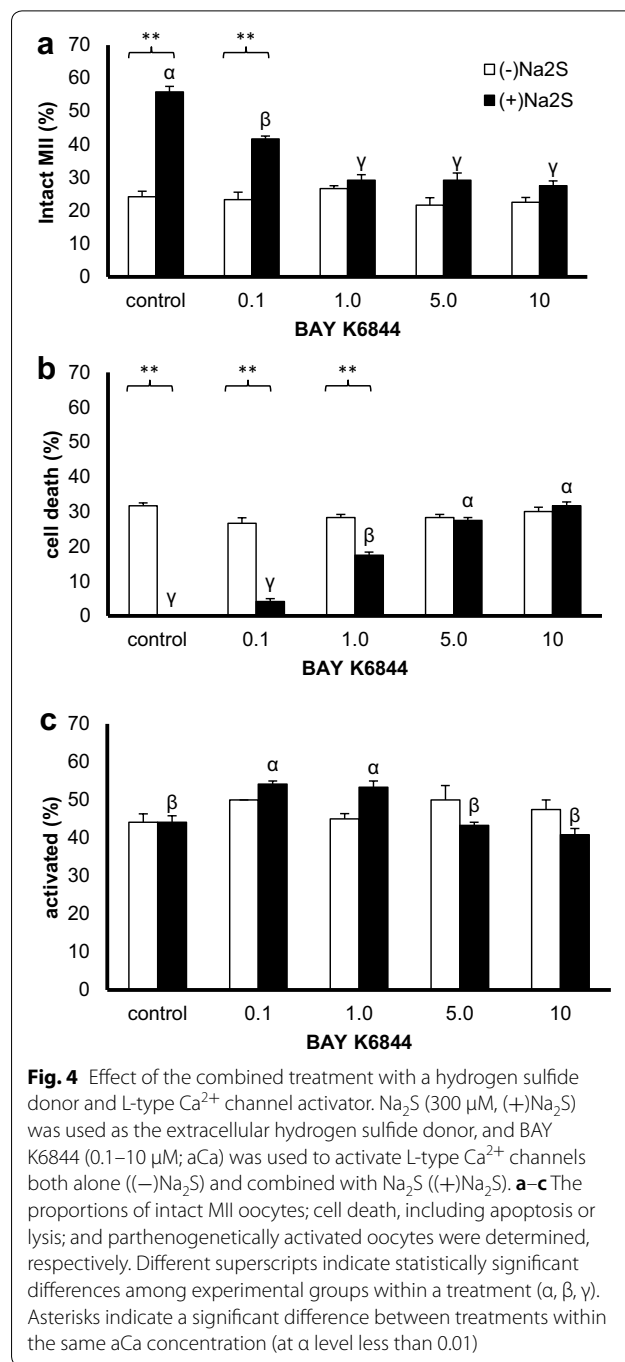
donor treatment ($(+)Na_2S$), Ca^{2+} channel activation suppressed the protective effect of hydrogen sulfide on MII oocytes (Fig. 4a). Additionally, the reduced occurrence of oocyte apoptosis or lysis (i.e., cell death, Fig. 4b) induced by hydrogen sulfide was reversed by addition of the Ca^{2+} channel activator. Our evidence suggests that hydrogen sulfide exerts its ageing-preserving effect through the suppression of Ca^{2+} channels. Our findings are in

accordance with the observed intracellular Ca^{2+} elevations that accompany oocyte ageing [18]. On the other hand, the modulatory effect of hydrogen sulfide on Ca^{2+} channels is somewhat inconsistent, as hydrogen sulfide is known to activate T-type Ca^{2+} channels in neurons [19]. Therefore, the effect of hydrogen sulfide on Ca^{2+} ion channels in spermatozoon and/or embryos requires further study.



Conclusions

Hydrogen sulfide supplementation represents a possible method of protecting against undesired phenotypic changes in oocytes (Fig. 5). Our observations indicate



that hydrogen sulfide is able to activate the K^+_{ATP} channel and inhibit the L-type Ca^{2+} channel. To the best of our knowledge, S-sulfhydration of cysteine thiols in proteins is a likely molecular mechanism for the effects of hydrogen sulfide in gametes and embryos. Further study

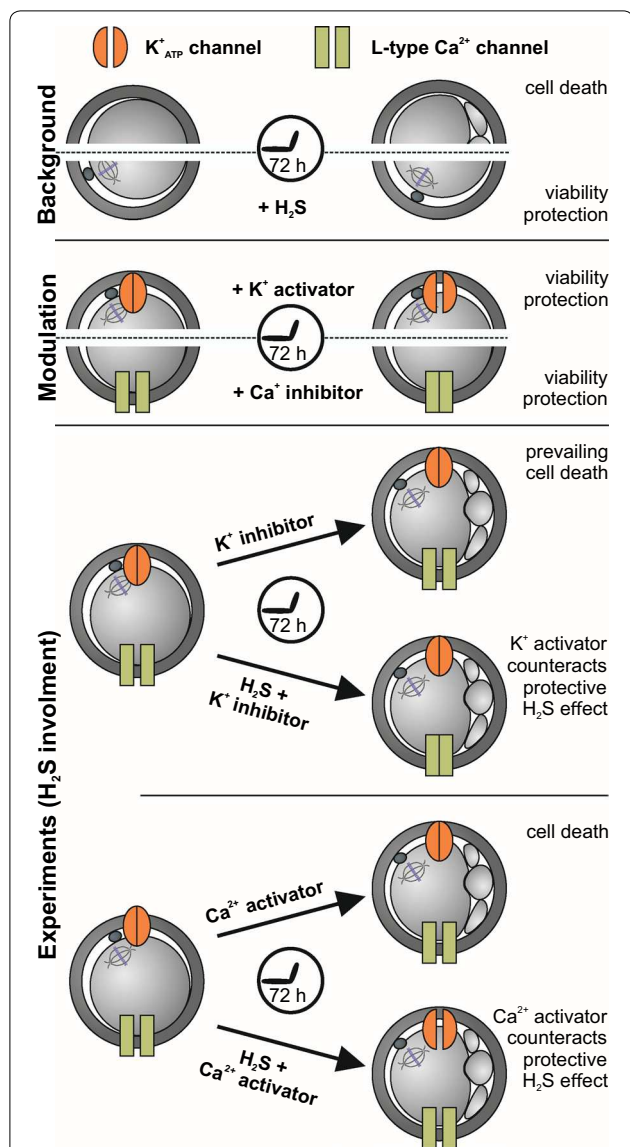


Fig. 5 Graphical summary of oocyte ageing and the involvement of hydrogen sulfide through the modulation of ion channels. Hydrogen sulfide (H₂S) treatment protects oocytes against cell death when fragmented or lytic oocytes are observed (background). Modulators of K⁺_{ATP} and Ca²⁺ channels (activator and inhibitor, respectively) show hydrogen sulfide-like rescue effects (modulation). Therefore, we experimentally tested the crosstalk of K⁺_{ATP}/Ca²⁺ ion channels and hydrogen sulfide when the beneficial effect of hydrogen sulfide was reversed using increasing concentration of K⁺_{ATP} inhibitor or Ca²⁺ channel activator (experiments). Based on our findings, we concluded that K⁺_{ATP}/Ca²⁺ channels are molecular targets of hydrogen sulfide in aged oocytes

and understanding of the action of hydrogen sulfide is necessary for translation to ART, which still include many undefined factors and have variable success rates.

Abbreviations

aCa: the activator of L-type Ca²⁺ channels (BAY K8644); ART: assisted reproductive technology; iK_{ATP}: the K⁺_{ATP} channel blocker (glibenclamide); H₂S: hydrogen sulfide; K⁺_{ATP}: ATP-sensitive K⁺ ion channels; MII: metaphase II (2nd meiotic division); Na₂S: Na₂S·9H₂O, sodium sulfide nonahydrate.

Authors' contributions

JN, TZ and KH interpreted the data and drafted the manuscript. MS and PH carried out statistical analysis. AP participated in data interpretation. JP conceived the study, performed experiments and drafted the manuscript. All authors read and approved the final manuscript.

Author details

¹ Biomedical Center, Faculty of Medicine in Pilsen, Charles University, alej Svobody 1655/76, Pilsen, Czech Republic. ² Department of Histology and Embryology, Faculty of Medicine in Pilsen, Charles University, Pilsen, Czech Republic. ³ Institute of Animal Science, Uhřetves, Prague 10, Czech Republic. ⁴ Faculty of Science, Charles University, Prague, Czech Republic.

Acknowledgements

Not applicable.

Competing interests

The authors declare that they have no competing interests.

Availability of data and materials

Not applicable.

Consent for publication

Not applicable.

Ethics approval and consent to participate

Not applicable.

Funding

This work was supported by the National Agency of Agriculture Sciences (NAZV QJ1510138) and the Czech Ministry of Agriculture (MZeRO 0718); JN MS and PH were supported by the Charles University Research Fund (Progres Q39) and the National Sustainability Program I (NPU I) Nr. LO1503 provided by the Ministry of Education, Youth and Sports of the Czech Republic.

Publisher's Note

Springer Nature remains neutral with regard to jurisdictional claims in published maps and institutional affiliations.

Received: 29 March 2018 Accepted: 27 September 2018

Published online: 05 October 2018

References

- Miao Y-L, Kikuchi K, Sun Q-Y, Schatten H. Oocyte aging: cellular and molecular changes, developmental potential and reversal possibility. *Hum Reprod Update*. 2009;15:573–85.
- Petrová I, Sedmíková M, Petr J, Vodková Z, Pytloun P, Chmelíková E, et al. The roles of c-Jun N-terminal kinase (JNK) and p38 mitogen-activated protein kinase (p38 MAPK) in aged pig oocytes. *J Reprod Dev*. 2009;55:75–82.
- Krejčová T, Smelcova M, Petr J, Bodart J-F, Sedmíková M, Nevoral J, et al. Hydrogen sulfide donor protects porcine oocytes against aging and improves the developmental potential of aged porcine oocytes. *PLoS One*. 2015;10:e0116964.
- Jeseta M, Petr J, Krejčová T, Chmelíková E, Jílek F. In vitro ageing of pig oocytes: effects of the histone deacetylase inhibitor trichostatin A. *Zygote*. 2008;16:145–52.
- Nevoral J, Petr J, Gelaude A, Bodart J-F, Kucerova-Chrpova V, Sedmíková M, et al. Dual effects of hydrogen sulfide donor on meiosis and

- cumulus expansion of porcine cumulus-oocyte complexes. *PLoS One*. 2014;9:e99613.
6. Nevoral J, Krejčová T, Petr J, Melicharova P, Vyskocilova A, Dvorakova M, et al. The role of nitric oxide synthase isoforms in aged porcine oocytes. *Czech J Anim Sci*. 2013;58:453–9.
 7. Tang G, Wu L, Liang W, Wang R. Direct stimulation of KATP channels by exogenous and endogenous hydrogen sulfide in vascular smooth muscle. *Mol Pharmacol*. 2005;68:1757–64.
 8. Tang G, Zhang L, Yang G, Wu L, Wang R. Hydrogen sulfide-induced inhibition of L-type Ca^{2+} channels and insulin secretion in mouse pancreatic beta cells. *Diabetologia*. 2013;56:533–41.
 9. Mustafa AK, Gadalla MM, Sen N, Kim S, Mu W, Gazi SK, et al. H₂S signals through protein S-sulfhydration. *Sci Signal*. 2009;2:ra72.
 10. Meng G, Zhao S, Xie L, Han Y, Ji Y. Protein S-sulfhydration by hydrogen sulfide in cardiovascular system. *Br J Pharmacol*. 2018;175:1146–56.
 11. Nevoral J, Žalmanová T, Zámotná K, Kott T, Kučerová-Chrpová V, Bodart J-F, et al. Endogenously produced hydrogen sulfide is involved in porcine oocyte maturation in vitro. *Nitric Oxide*. 2015;51:24–35.
 12. Nevoral J, Bodart J-F, Petr J. Gasotransmitters in gametogenesis and early development: holy trinity for assisted reproductive technology—a review. *Oxid Med Cell Longev*. 2016;2016:1730750.
 13. Peers C, Bauer CC, Boyle JP, Scragg JL, Dallas ML. Modulation of ion channels by hydrogen sulfide. *Antioxid Redox Signal*. 2012;17:95–105.
 14. Dongó E, Beliczai-Marosi G, Dybvig AS, Kiss L. The mechanism of action and role of hydrogen sulfide in the control of vascular tone. *Nitric Oxide*. 2017. <https://doi.org/10.1016/j.niox.2017.10.010>
 15. Liang W, Chen J, Mo L, Ke X, Zhang W, Zheng D, et al. ATP-sensitive K^{+} channels contribute to the protective effects of exogenous hydrogen sulfide against high glucose-induced injury in H9c2 cardiac cells. *Int J Mol Med*. 2016;37:763–72.
 16. Kimura Y, Dargusch R, Schubert D, Kimura H. Hydrogen sulfide protects HT22 neuronal cells from oxidative stress. *Antioxid Redox Signal*. 2006;8:661–70.
 17. Ali MY, Whiteman M, Low C-M, Moore PK. Hydrogen sulphide reduces insulin secretion from HIT-T15 cells by a KATP channel-dependent pathway. *J Endocrinol*. 2007;195:105–12.
 18. Premkumar KV, Chaube SK. Nitric oxide signals postovulatory aging-induced abortive spontaneous egg activation in rats. *Redox Rep*. 2015;20:184–92.
 19. Fukami K, Kawabata A. Hydrogen sulfide and neuronal differentiation: focus on Ca^{2+} channels. *Nitric Oxide*. 2015;46:50–4.

Ready to submit your research? Choose BMC and benefit from:

- fast, convenient online submission
- thorough peer review by experienced researchers in your field
- rapid publication on acceptance
- support for research data, including large and complex data types
- gold Open Access which fosters wider collaboration and increased citations
- maximum visibility for your research: over 100M website views per year

At BMC, research is always in progress.

Learn more biomedcentral.com/submissions



Manuscript Number: THERIO-D-18-00532

Title: Surface sperm cell ubiquitination directly impaired blastocyst formation rate after intracytoplasmic sperm injection in pig

Article Type: Original Research Article

Keywords: sperm cells; pig; extracellular ubiquitin; blastocyst; cryopreservation; FACS

Corresponding Author: Mr. Aleš Petelák,

Corresponding Author's Institution: Charles University, Faculty of Science

First Author: Aleš Petelák

Order of Authors: Aleš Petelák; Vladimir Krylov, PhD

Abstract: The effect of extracellular sperm ubiquitination was examined from many aspects and the majority of existing studies negatively correlated the amount of highly ubiquitinated sperm cells in the sample with the ejaculate quality and the fertilization success rate. In the present study, we compared an early embryonic development up to blastocyst stage in the pig using defined two sperm cell populations sorted by flow cytometry (FACS) based on the rate of the extracellular ubiquitination. This novel approach allows studying the direct effect of extracellular ubiquitin (eUb), which is a marker for epididymal recognition and degradation of defective sperm cells. We further examined the hypothesis that eUb could be recognized directly in the ooplasm. In the porcine model, the significance of results might be seriously affected by a high variability among sperm cell doses from individual boars as well as by the variability among separate sample collections. To overcome this obstacle, we used cryopreserved sperm cells from a single dose. Comparison of an early embryonic development employing intracytoplasmic sperm cell injection (ICSI) with cryopreserved (frozen/thawed, F/T) and fresh sperm cells did not reveal significant difference regarding blastocyst formation rate. We also observed no difference in the male and female pronuclei formation and the first zygote cleavage after fertilization of oocytes with high or non-ubiquitinated sperm cells sorted by FACS. However, results of the early embryonic development to the blastocyst stage showed the difference between both experimental groups (16.67% of blastocysts in non-ubiquitinated group vs. 6.20% of blastocyst in the high-ubiquitinated group, $P < 0.001$). We further confirmed the negative effect of eUb by the masking of Ub epitopes with the appropriate primary antibody in fresh sperm cells prior to ICSI. This procedure improved the blastocyst formation rate from 14.19% in the untreated group to 24.03% concerning antibody masked sperms ($P < 0.01$). We conclude our results support a generally accepted hypothesis concerning the negative correlation of the presence of eUb on the sperm cell membrane and developmental competence of fertilized oocytes. However, experiments with masking Ub antibody indicate the direct negative effect of the membrane ubiquitin rather than

sperm cell quality on the early embryonic development to the blastocyst stage, at least in the porcine model.

1 Title: Surface sperm cell ubiquitination directly impaired blastocyst formation rate after
2 intracytoplasmic sperm injection in pig

3 Authors: Ales Petelak *, Vladimir Krylov

4 Affiliation:

5 Charles University in Prague, Faculty of Science, Vinicna 7, 128 44, Prague 2, Czech Republic.

6 *Corresponding author:

7 phone: +420221951782, fax: +420221951758, e-mail: petelak@natur.cuni.cz

8

9 Abstract

10 The effect of extracellular sperm ubiquitination was examined from many aspects and the majority of
11 existing studies negatively correlated the amount of highly ubiquitinated sperm cells in the sample
12 with the ejaculate quality and the fertilization success rate. In the present study, we compared an
13 early embryonic development up to blastocyst stage in the pig using two defined sperm cell
14 populations sorted by flow cytometry (FACS) based on the rate of the extracellular ubiquitination.
15 This novel approach allows studying the direct effect of extracellular ubiquitin (eUb), which is a
16 marker for epididymal recognition and degradation of defective sperm cells. We further examined
17 the hypothesis that eUb could be recognized directly in the ooplasm. In the porcine model, the
18 significance of results might be seriously affected by a high variability among sperm cell doses from
19 individual boars as well as by the variability among separate sample collections. To overcome this
20 obstacle, we used cryopreserved sperm cells from a single dose. Comparison of an early embryonic
21 development employing intracytoplasmic sperm cell injection (ICSI) with cryopreserved
22 (frozen/thawed, F/T) and fresh sperm cells did not reveal significant difference regarding blastocyst
23 formation rate. We also observed no difference in the male and female pronuclei formation and the
24 first zygote cleavage after fertilization of oocytes with high or non-ubiquitinated sperm cells sorted
25 by FACS. However, results of the early embryonic development to the blastocyst stage showed the
26 difference between both experimental groups (16.67% of blastocysts in non-ubiquitinated group vs.
27 6.20% of blastocyst in the high-ubiquitinated group, $P < 0.001$). We further confirmed the negative
28 effect of eUb by the masking of Ub epitopes with the appropriate primary antibody in fresh sperm
29 cells prior to ICSI. This procedure improved the blastocyst formation rate from 14.19% in the
30 untreated group to 24.03% concerning antibody masked sperms ($P < 0.01$). We conclude our results
31 support a generally accepted hypothesis concerning the negative correlation of the presence of eUb
32 on the sperm cell membrane and developmental competence of fertilized oocytes. However,
33 experiments with masking Ub antibody indicate the direct negative effect of the membrane ubiquitin
34 rather than sperm cell quality on the early embryonic development to the blastocyst stage, at least in
35 the porcine model.

36 Keywords

37 sperm cells, pig, extracellular ubiquitin, blastocyst, cryopreservation, FACS

38 1 Introduction

39 The ubiquitin-proteasome system (UPS) is involved in the regulation of many cellular processes,
40 particularly protein degradation (proteolysis), membrane receptor internalization, antigen
41 presentation, transcription or apoptosis [1]. However, the role of UPS in reproduction was also
42 reported, including the regulation of oogenesis, follicle growth, spermatogenesis and sperm
43 maturation in the epididymis. UPS also plays an essential role in fertilization and subsequent
44 embryonic development, placenta formation and many other processes [2,3].

45 The ubiquitin-proteasome pathway is evolutionarily conserved and mediates the proteolytic
46 degradation of damaged, misfolded or unnecessary proteins in 26S proteasome, lysosome or
47 autophagosome [4]. Ubiquitin (Ub) is an 8.5 kDa protein consisting 76 amino acid residues. Seven
48 lysine residues in its sequence are capable to bind other Ub molecules, thereby create variable
49 polyubiquitin chains. The structure of these chains then determines further routing of Ub modified
50 proteins. Interaction of ubiquitin and its substrate is divided into three steps: 1. formation of the
51 thioester bond between Ub and ubiquitin-activating enzyme (E1) in the reaction requiring ATP
52 hydrolysis; 2. binding of the activated Ub to a ubiquitin-conjugating enzyme (E2) which is mostly
53 already coupled with ubiquitin ligase (E3); 3. binding of step two complex to the target protein or to
54 the lysine residue in the polyUb chain. There is more than one enzyme involved in each step. While
55 only a few enzyme variants exist for Ub-activating enzymes, tens of E2 enzymes and hundreds of Ub-
56 ligases (E3 enzymes) have been described. These variants are further regulated by phosphorylation
57 [5], specific inhibitors and other factors, such as cytoplasmic localization or subsequent regulation by
58 deubiquitinating enzymes. The structure, interconnections and importance of UPS regulation net
59 resemble the complexity of the kinase/phosphatase system in a cell regulation [6].

60 Most of the UPS activity is localized in the cytoplasm; however, in certain cases, the UPS activity plays
61 an important role also in the extracellular space. Regarding reproduction, the sperm-borne 26S
62 proteasome plays an important role, during fertilization. After its release from the acrosome, the 26S
63 proteasome cleaves the extracellular ubiquitinated protein ZPC and facilitates sperm cell penetration
64 through the zona pellucida [7]. A similar mechanism was also described in sea urchin [8] or ascidians,
65 where the sperm cell ensures not only the proteasome for the cleavage of the sperm cell receptor on
66 the vitelline membrane but also its ubiquitination by the specific sperm-borne E3 ligase [9].

67 In the present study, we analyzed the effect of eUb bound to the outer sperm membrane on the
68 fertilization and subsequent early development of porcine embryos up to the blastocyst stage.
69 Defective sperm cells are ubiquitinated during their maturation in the epididymis [10] by so far
70 unknown mechanism. However, all above-mentioned enzymes necessary for the protein

71 ubiquitination and other UPS components were observed to be actively transported to the
72 epididymal fluid via epididymosomes or apical blebs [11,12]. Eventually, the number of defective
73 sperm cells is reduced during epididymal passage by phagocytosis, or they are disintegrated and
74 liquefied [3].

75 Despite the epididymal selection, a certain percentage of ubiquitinated sperm cells is present in the
76 ejaculate and their amount correlates with the quality parameters such as the percentage of the
77 morphological defects, the incidence of double-strand DNA breaks, lower motility and viability and
78 reduce the success rate of a subsequent fertilization. The level of Ub-marked sperm cells in the
79 ejaculate has been successfully validated as a quality marker for several mammalian species and also
80 for human [13].

81 Our hypothesis assumes the existence of a mechanism that could recognize strongly ubiquitinated
82 sperm cells after the penetration into the ooplasm. This recognition would lead to subsequent sperm
83 cell degradation and prevention of development of the potentially defective embryo. The principle of
84 this mechanism could lie in the regulation by means of proteasomal and autophagosomal
85 protein/organelle degradation, similarly to the degradation of paternal mitochondria [4].

86 We investigated this hypothesis by fertilization of porcine oocytes using ICSI with FACS sorted sperm
87 cells based on the extracellular ubiquitination and subsequent analyzing of pronuclei formation and
88 early embryonic development up to blastocyst stage. To eliminate a high variability among different
89 boar ejaculates [14] we combined FACS with subsequent sperm cryopreservation and ICSI which
90 allow to use the same sperm sample for all performed experiments.

91 2 Material and methods

92 2.1 Preparation of oocytes

93 Porcine ovaries from prepubertal gilts were collected at the local slaughterhouse and transported to
94 the laboratory at 38 °C. Thereafter, the antral follicles (3–6 mm in diameter) were isolated from the
95 ovaries by dissection. Follicles without any signs of atresia were selected for the subsequent isolation
96 of oocytes cultivated in 0.5 ml of M199 (Medium 199, 0.36 mM sodium pyruvate, 0.57 mM L-
97 cysteine, 5 µg/ml LH from ovine pituitary, 5 µg/ml FSH from porcine pituitary (Sigma-Aldrich, USA), 4
98 mg/ml GPOBS – growth protein of bovine serum (Sevapharma, Prague, Czech Republic) and 1 µl/ml
99 gentamicin (Gibco, UK)) at 38.5 °C in a humidified atmosphere of 5% CO₂ in air for 44–48 hours. After
100 this period, the cumulus cells were removed from oocytes by pipetting after a previous short
101 incubation in 0.1% hyaluronidase (Sigma-Aldrich, USA) dissolved in M199 to the final concentration

102 50 µg/ml. Presence of the first polar body (metaphase II oocytes) was checked and only groups with
103 the maturation success rate higher than 80% were used.

104 2.2 Preparation of sperm cell suspension

105 20 ml of sperm cell suspension (insemination dose) was centrifuged for 5 min at 700 x g and the
106 supernatant was aspired to leave approx. 1 ml of the original solution. Sediment was then
107 resuspended and sorted on Percoll gradient (700 x g for 15 min) consisting of 5 ml of 40% Percoll (GE
108 Healthcare Biosciences AB, Sweden) underlaid with 2 ml of 80% Percoll. Dulbecco's phosphate
109 buffered saline (DPBS, Gibco, UK) was used instead of standard PBS for the Percoll dilution. After
110 centrifugation, the spermatozoa pellet was resuspended with DPBS+0.01% polyvinyl alcohol (PVA,
111 Sigma-Aldrich, USA) to a final concentration 1×10^8 spermatozoa/ml.

112 2.3 Antibody staining

113 Blocking of spermatozoa prior to Ab staining (30 min) was performed in 5% normal goat serum (5%
114 NGS, Sigma-Aldrich, USA) in DPBS. After 5 min centrifugation at 350 x g, the supernatant was
115 removed and the pellet resuspended in 0.5 ml of 1% NGS with primary antibody (Ubiquitin Antibody,
116 NBP2-30132, Novus Biologicals, USA) diluted 1/100 and incubated for 45 min at 17 °C. Spermatozoa
117 were then washed twice with 1% NGS and incubated for 60 min in 1% NGS with secondary antibody
118 (Goat-anti-rabbit IgG FITC, NB7182, Novus Biologicals, USA) diluted 1/200. After staining, cells were
119 washed and resuspended in Solusem® (Varkens K.I. Nederland, Netherlands), the standard extender
120 routinely used by insemination doses producer.

121 2.4 Ubiquitin masking

122 Masking of extracellular ubiquitin was performed similarly to the primary antibody staining. Only 0.5
123 ml of spermatozoa suspension was used for 30 min blocking. After centrifugation and pellet
124 resuspension in 0.5ml 1% NGS, 50 µl of suspension were transferred into two microtubes and the
125 primary antibody (Ubiquitin Antibody, NBP2-30132, Novus Biologicals, USA) was added (1/100) to
126 one tube. Both tubes were incubated for 45 min at 17 °C.

127 From each tube, 10 µl of the suspension was added to 200 µl of modified Tris-buffered medium
128 (mTBM, MilliQ water with 113.1 mM NaCl₂, 3 mM KCl, 20 mM Trizma base, 5 mM glucose, 5 mM
129 sodium pyruvate, 2 mM CaCl₂ x 2H₂O and 1 mM caffeine, bovine serum albumin in concentration 2
130 µg/ml and 14.1 nM phenol red, Sigma-Aldrich, USA). The resulting sperm cell concentration in mTBM
131 was 5×10^6 sperm/ml. The spermatozoa were capacitated in an incubator (temperature 38.5 °C, 5%
132 CO₂ atmosphere) for 20 to 30 min. 10 µl of capacitated sperm cell suspension was subsequently used
133 for ICSI procedure.

134 2.5 FACS

135 To distinguish spermatozoa from non-cell debris, cells were stained for 15 min with Hoechst 33342
136 (Sigma-Aldrich, USA) in the final concentration 1 µg/ml. The sperm cell suspension was then filtered
137 through a 40 µm mesh. A Polychromatic high-speed cell sorter BD-Influx (BD Biosciences, USA)
138 equipped with lasers (355, 488 nm) was employed using DPBS as a sheath fluid. The standard nozzle
139 was applied for both groups during passage through the FACS. Sorted spermatozoa were deflected
140 into 1.5 ml microtubes containing 700 µl extender Solusem®. The data were acquired using BD
141 FACSDiva Software (BD Biosciences, USA).

142 Sperm cells were sorted in two groups based on the high and specific difference in eUb level
143 detected by anti eUb antibody. The first one contained low ubiquitinated spermatozoa (low eUb
144 level) and in the second group, there were spermatozoa with the strong fluorescent signal (high eUb
145 level). This procedure has been described in detail in our previous publication [15].

146 2.6 Cryopreservation of FACS sorted sperm cells

147 Collection medium containing sorted sperm cells was centrifuged for 5 min at 700 x g, the
148 supernatant was discarded, and the pellet was gently resuspended in 200 µl of fraction A of the
149 freezing medium (20% (v/v) of egg yolk diluted in MilliQ water, 0.3 M lactose monohydrate). The
150 suspension was slowly cooled in a refrigerator to 5 °C over a 2-hour period and 200 µl of freezing
151 medium fraction B (fraction A with 0.82 M glycerol and 8.3 mM SDS) was added. The 50 µl glass
152 capillaries (Drummond Scientific, USA) were filled with approximately 30 µl of suspension in cold
153 room (tempered to 5 °C), the suspension was aligned to the capillary center and Bunsen torch was
154 used to seal the ends. Capillaries were horizontally placed on a plastic holder situated 5 cm above the
155 liquid nitrogen (LN) surface in a tank for 10 min before they were immersed into LN and then stored.

156 Before ICSI, the sperm cell suspension was thawed in 37 °C water bath for 3 min and then
157 immediately added to a microtube containing 250 µl mTBM, incubated for 20 min and used.

158 After 20 min incubation in mTBM-ICSI at 38 °C, sperm cell motility was evaluated using standard
159 Bürker chamber. To determine spermatozoa concentration and motility, two independent
160 measurements were performed, counting 200 sperm cells in each replicate. Immotile spermatozoa
161 were assessed as non-viable.

162 2.7 ICSI

163 ICSI procedure was performed into metaphase II oocytes in M2 medium (Sigma-Aldrich, USA)
164 microdrops on the preheated stage using an inverted microscope (Nikon Eclipse, Nikon, Japan)
165 equipped with a mechanical micromanipulator (Narishige, Japan) and the piezo-drive unit (Prime

166 Tech, Japan). For micromanipulation, 10 μ l drops of M2 medium and 5 μ l drops of PVP medium (Cook
167 Medical, Australia) were placed separately in the bottom of Petri dish and covered by mineral oil.
168 Sperm cells (final concentration 5×10^5 cells/ml) were slowed in PVP solution and immobilized by tail
169 cutting with the edge of injection capillary. Capillaries with an outer diameter from 8 to 10 μ m were
170 used for injection and oocytes were penetrated at the three o'clock position while the position of the
171 polar body was at one or five o'clock. In experiments with proteasome inhibitor, MG132 (1 mg
172 dissolved in 96% ethanol, Sigma-Aldrich, USA) was added to M2 microdrops (final concentration 10
173 μ M) prior ICSI; to control group, the equivalent amount of pure ethanol was added.

174 2.8 Embryo cultivation

175 After ICSI, the oocytes were transferred into 500 μ l PZM3 medium [16] in 4-well dish and cultured
176 (38.5 $^{\circ}$ C, 5% CO₂) for a further 18h (for pronuclei evaluation) or seven days (for development to
177 blastocysts, with steady evaluation of cell count and medium change on the third day). In
178 experiments with MG132, inhibitor (1 mg dissolved in 96% ethanol) was added to PZM3 (final
179 concentration 10 μ M) prior ICSI and the equivalent amount of pure ethanol was added to control
180 group. Thereafter, fertilized oocytes were cultivated for 18 hours. Before subsequent cultivation,
181 zygotes were washed in three microdrops PZM3 and cultivated in 500 μ l PZM3 to the seventh day.

182 2.9 Statistical analysis

183 Statistical analysis and graphs were carried out using the GraphPad Software 7.04 (San Diego, CA,
184 USA). All data are expressed as the weighted arithmetic mean \pm standard error of the mean. Data
185 were analyzed by paired Student t-test if compared groups passed D'Agostino & Pearson normality
186 test. Mann-Whitney test and Wilcoxon test were used for other groups, for details see figure
187 captions. Values were considered statistically significant when $P < 0.05$.

188 3 Results and discussion

189 Several studies demonstrated the convincing negative correlation between the number of
190 extracellularly ubiquitinated sperm cells and the overall quality of ejaculate [13,17]. Moreover, it was
191 shown that defective sperm cell morphology or other abnormalities are coupled with the higher
192 membrane ubiquitination [18,19]. However, until now, there is no study evaluating the direct effect
193 of membrane ubiquitination on the fertilization rate and the early embryonic development.

194 Considering the enormous heterogeneity of sperm cell doses coming from different boars, we
195 established a method concerning FACS sorting and subsequent cryopreservation of sperm cells
196 labelled with anti-Ub Ab [15]. This technique ensures that the sperm cells for the series of
197 experiments could be collected from one or from few boars. Fig. 1 shows the comparison of the

198 blastocyst formation rate after ICSI using fresh or cryopreserved (frozen/thawed) sperm cells. The
199 embryonic development to the blastocyst stage was mildly but insignificantly impaired in F/T sperm
200 cells group. Utilization of ICSI method was indispensable because sperm cells are incapable to
201 penetrate through the zona pellucida in the presence of a proteasome inhibitor MG132 [7] or fuse
202 with the oocyte membrane after the incubation with an antibody against ubiquitin [20]. Another
203 reason for using ICSI is the theoretical requirement of only one sperm cell per oocyte in the
204 fertilization medium. This is important especially for the FACS sorting producing small but
205 homogenous cell populations based on the presence or absence of eUb [15].

206 Firstly, we examined the effect of extracellular ubiquitination using FACS sorted sperm cells on the
207 formation of both (male and female) pronuclei and the first cleavage 18 hours after ICSI. We
208 observed no difference between experimental groups (high and no extracellular sperm cell
209 ubiquitination) (Fig. 2). Similarly, there was also no difference in the percentage of oocytes with
210 intact or partially decondensed sperm cell in the ooplasm.

211 On the other hand, the blastocyst formation rate was significantly lower (6.20%, SEM=2.16) in the
212 group with high membrane ubiquitination than in the group consisting of non-ubiquitinated sperm
213 cells (16.67%, SEM=2.00) (Fig. 3). This result represents the first direct evidence of differential
214 embryonic development to the blastocyst stage regarding the membrane ubiquitination state of
215 individual sperm cells originated from the same insemination dose. On the other hand, the number
216 of cells forming the blastocysts was similar in both experimental groups (53 cells, SEM=3.4 in a non-
217 ubiquitinated group and 58 cells, SEM=2.9 in blastocysts produced with highly ubiquitinated sperm
218 cells respectively; t. test P value: 0.2). The potential objection that the worst embryonic development
219 could be caused directly by the anti-Ub antibody bound to the sperm cell membrane was disproved
220 since antibody was not further detected after extensive washing, freezing and thawing steps in the
221 cryopreservation medium preceding the ICSI (results not shown).

222 To examine the negative selection role of the proteasomal complex in the early embryonic
223 development employing the high or non-ubiquitinated sperm cells, embryos were transiently
224 cultivated with the proteasome inhibitor MG132 18 hours after fertilization. We hypothesized that in
225 the presence of inhibitor, there would be no difference between high and non-ubiquitinated sperm
226 cells regarding the blastocyst formation rate. However, proteasome complex plays an important role
227 also in the regulation of cleavage and even its temporary inhibition deteriorated the results of early
228 embryonic development by approximately 50%. This effect was observed not only in both
229 experimental groups using FACS sorted sperm cells but also in a control group of oocytes fertilized
230 with unsorted F/T sperm cells (results not shown).

231 Another technique to prove a direct effect of eUb is the masking of Ub epitopes using an appropriate
232 antibody in the sample of fresh unsorted sperm cells. We observed a statistically significant
233 improvement in the blastocyst formation rate in oocytes fertilized with Ub masked sperm cells
234 (24.03%, SEM=4.23) if compared with the untreated sample (14.19, SEM=3.18) (Fig. 4).
235 Unfortunately, we could not use FACS sorted and cryopreserved sperm cells for this experiment.
236 Since sperm cells are highly sensitive to freezing stress they rapidly lost viability after thawing [21–
237 23] and during the subsequent incubation with the masking Ub antibody.

238 We clearly demonstrate the difference in the early embryonic development regarding defined sperm
239 cell populations sorted according to the extent of extracellular ubiquitination. Described results may
240 have been caused simply by the poor quality of high ubiquitinated sperm cells. However, considering
241 the fact that the use of masking Ub antibody improved the early embryonic development we put
242 emphasis on the direct effect of the eUb on the sperm cell fitness through some still unknown Ub-
243 based selection mechanism in the oocyte rather than the membrane ubiquitination would
244 necessarily correlate with the sperm cell quality based on the blastocyst formation rate.

245 4 Acknowledgements

246 The authors would like to thank professor Jaroslav Petr (Institute of Animal Science, Czech Republic)
247 for assistance with ovaries collection and the Czech University of Life Sciences for technical support.
248 This study was funded by the Charles University program SVV 260435 and 20604315 PROGRES Q43.

249 5 References

- 250 [1] Glickman MH, Ciechanover A. The Ubiquitin-Proteasome Proteolytic Pathway: Destruction for
251 the Sake of Construction 2002. doi:10.1152/physrev.00027.2001.
- 252 [2] Bebington C, Doherty FJ, Fleming SD. The possible biological and reproductive functions of
253 ubiquitin. *Hum Reprod Update* 2001;7:102–11. doi:10.1093/humupd/7.1.102.
- 254 [3] Sutovsky P. Ubiquitin-dependent proteolysis in mammalian spermatogenesis, fertilization,
255 and sperm quality control: Killing three birds with one stone. *Microsc Res Tech* 2003;61:88–
256 102. doi:10.1002/jemt.10319.
- 257 [4] Sutovsky P. Review: Sperm–oocyte interactions and their implications for bull fertility, with
258 emphasis on the ubiquitin–proteasome system. *Animal* 2018;12:1–12.
259 doi:10.1017/S1751731118000253.
- 260 [5] Gao M, Karin M. Regulating the Regulators: Control of Protein Ubiquitination and Ubiquitin-
261 like Modifications by Extracellular Stimuli. *Mol Cell* 2005;19:581–93.
262 doi:10.1016/J.MOLCEL.2005.08.017.
- 263 [6] Thompson SJ, Loftus LT, Ashley MD, Meller R. Ubiquitin-proteasome system as a modulator of
264 cell fate. *Curr Opin Pharmacol* 2008;8:90–5. doi:10.1016/j.coph.2007.09.010.
- 265 [7] Zimmerman SW, Manandhar G, Yi Y-J, Gupta SK, Sutovsky M, Odhiambo JF, et al. Sperm
266 Proteasomes Degrade Sperm Receptor on the Egg Zona Pellucida during Mammalian
267 Fertilization. *PLoS One* 2011;6:e17256. doi:10.1371/journal.pone.0017256.
- 268 [8] Yokota N, Sawada H. Sperm proteasomes are responsible for the acrosome reaction and
269 sperm penetration of the vitelline envelope during fertilization of the sea urchin
270 *Pseudocentrotus depressus*. *Dev Biol* 2007;308:222–31. doi:10.1016/J.YDBIO.2007.05.025.
- 271 [9] Sawada H, Sakai N, Abe Y, Tanaka E, Takahashi Y, Fujino J, et al. Extracellular ubiquitination
272 and proteasome-mediated degradation of the ascidian sperm receptor. *Proc Natl Acad Sci U S*
273 *A* 2002;99:1223–8. doi:10.1073/pnas.032389499.
- 274 [10] Sutovsky P, Moreno R, Ramalho-Santos J, Dominko T, Thompson WE, Schatten G. A putative,
275 ubiquitin-dependent mechanism for the recognition and elimination of defective
276 spermatozoa in the mammalian epididymis. *J Cell Sci* 2001;114:1665–75.
- 277 [11] Baska KM, Manandhar G, Feng D, Agca Y, Tengowski MW, Sutovsky M, et al. Mechanism of
278 extracellular ubiquitination in the mammalian epididymis. *J Cell Physiol* 2008;215:684–96.
279 doi:10.1002/jcp.21349.

- 280 [12] Sullivan R, Frenette G, Girouard J. Epididymosomes are involved in the acquisition of new
281 sperm proteins during epididymal transit. *Asian J Androl* 2007;9:483–91. doi:10.1111/j.1745-
282 7262.2007.00281.x.
- 283 [13] Sutovsky P. New Approaches to Boar Semen Evaluation, Processing and Improvement. *Reprod*
284 *Domest Anim* 2015;50:11–9. doi:10.1111/rda.12554.
- 285 [14] Ciereszko A, Ottobre JS, Glogowski J. Effects of season and breed on sperm acrosin activity
286 and semen quality of boars. *Anim Reprod Sci* 2000;64:89–96.
- 287 [15] Petelak A, Krylov V. Cryopreservation of fluorescence activated cell sorted boar spermatozoa
288 based on extracellular ubiquitination. *Czech J Anim Sci* 2016;61:310–6. doi:10.17221/27/2015-
289 CJAS.
- 290 [16] Yoshioka K, Suzuki C, Tanaka A, Anas IM-K, Iwamura S. Birth of Piglets Derived from Porcine
291 Zygotes Cultured in a Chemically Defined Medium1. *Biol Reprod* 2002;66:112–9.
292 doi:10.1095/biolreprod66.1.112.
- 293 [17] Rawe VY, Olmedo SB, Benmusa A, Shiigi SM, Chemes HE, Sutovsky P. Sperm ubiquitination in
294 patients with dysplasia of the fibrous sheath. *Hum Reprod* 2002;17:2119–27.
- 295 [18] Hodjat M, Akhondi MA, Al-Hasani S, Mobaraki M, Sadeghi MR. Increased sperm ubiquitination
296 correlates with abnormal chromatin integrity. *Reprod Biomed Online* 2008;17:324–30.
- 297 [19] Zhang J, Su J, Hu S, Zhang J, Ding R, Guo J, et al. Correlation between ubiquitination and
298 defects of bull spermatozoa and removal of defective spermatozoa using anti-ubiquitin
299 antibody-coated magnetized beads. *Anim Reprod Sci* 2018;192:44–52.
300 doi:10.1016/J.ANIREPROSCI.2018.01.018.
- 301 [20] Wang H, Song C, Duan C, Shi W, Li C, Chen D, et al. Effects of ubiquitin-proteasome pathway
302 on mouse sperm capacitation, acrosome reaction and in vitro fertilization. *Chinese Sci Bull*
303 2002;47:127–32. doi:10.1360/02tb9029.
- 304 [21] Martinez-Alborcia MJ, Valverde A, Parrilla I, Vazquez JM, Martinez EA, Roca J. Detrimental
305 effects of non-functional spermatozoa on the freezability of functional spermatozoa from
306 boar ejaculate. *PLoS One* 2012;7:e36550. doi:10.1371/journal.pone.0036550.
- 307 [22] Knox RV. Artificial insemination in pigs today. *Theriogenology* 2016;85:83–93.
308 doi:10.1016/J.THERIOGENOLOGY.2015.07.009.
- 309 [23] White IG. Lipids and calcium uptake of sperm in relation to cold shock and preservation: a

310 review. *Reprod Fertil Dev* 1993;5:639–58.

311

*Highlights (for review)

High sperm surface ubiquitination is coupled with the lower developmental competence

Low ubiquitinated FACS sorted sperms allow development of more blastocysts after ICSI

Masking of extracellular ubiquitin with antibody improves blastocyst formation rate

Fig.1 Comparison of blastocyst formation rate after ICSI using fresh (19.29%, n=140) and frozen/thawed (F/T) sperm cells (14.57%, n=199). F/T group does not pass D'Agostino & Pearson normality test, so the difference was analyzed with nonparametric Mann-Whitney test (P=0.72).

Fig.2 Comparison of pronuclei formation and the first cleavage 18 hours after ICSI using low (black bar, n=136) and high (grey bar, n=132) ubiquitinated F/T sperm cells sorted by FACS. No significant difference between experimental groups was found regarding the percentage of incompetent oocytes with intact sperm cell (ISH) and decondensed sperm head (DSH) or developmentally competent oocytes with two pronuclei (2PN) and two-cell stage embryos (2C). All groups pass D'Agostino & Pearson normality test and do not differ significantly (multiple t-test for all group has $P > 0.05$).

Fig.3 Comparison of the early embryonic development up to blastocyst stage 7 days after ICSI using low (black bar, 16.67%, n=132) and high (grey bar, 6.20%, n=129) ubiquitinated F/T sperm cells sorted by FACS ($P < 0.001$).

Fig.4 Effect of masking of Ub epitope on the sperm cell surface on the blastocyst formation rate 7 days after ICSI using fresh unsorted sperm cells incubated with (black bar, 24.03%, n=154) or without (grey bar, 14.19%, n=148) eUb antibody ($P = 0.0087$).

Figure 1

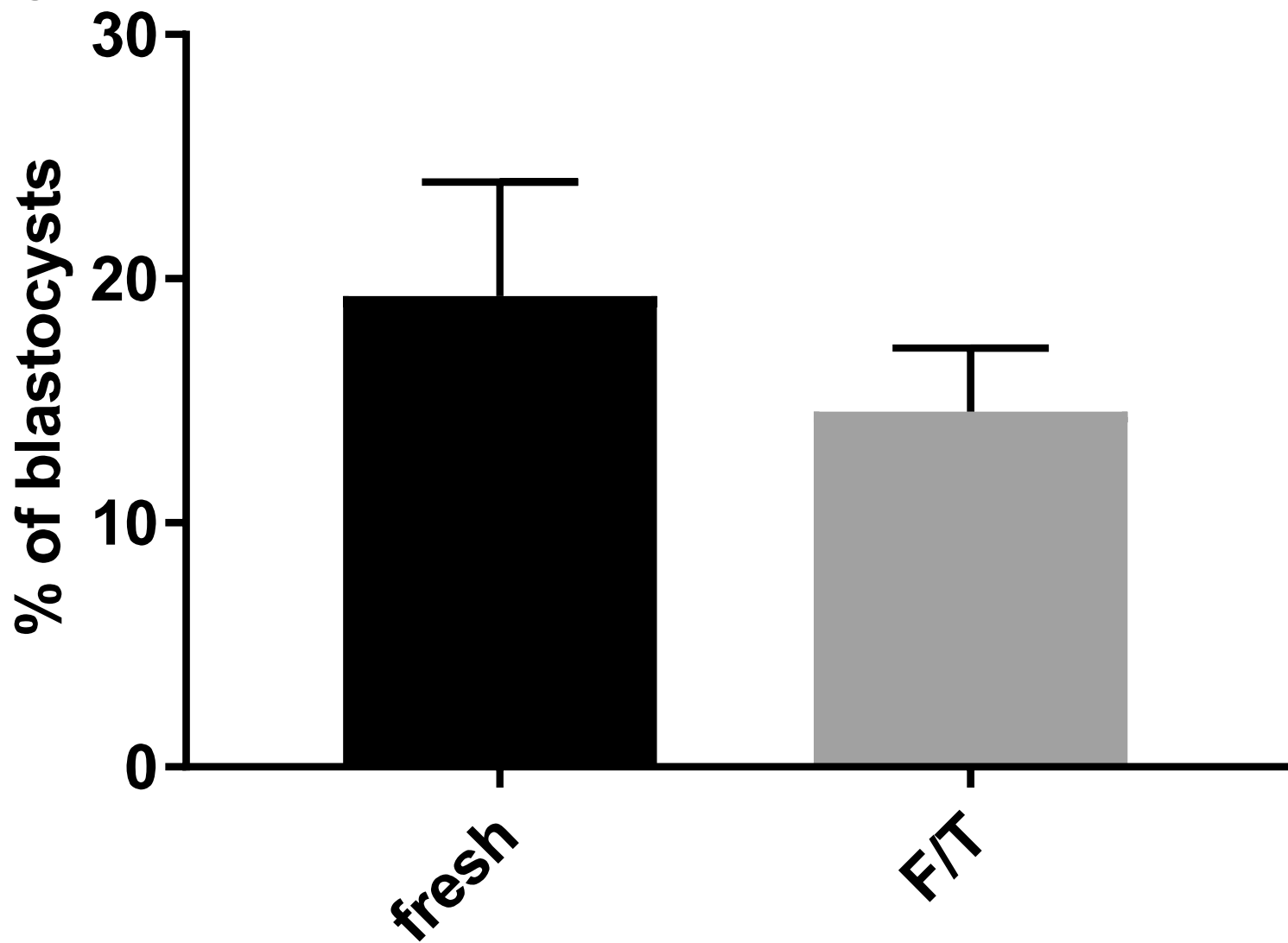


Figure 2

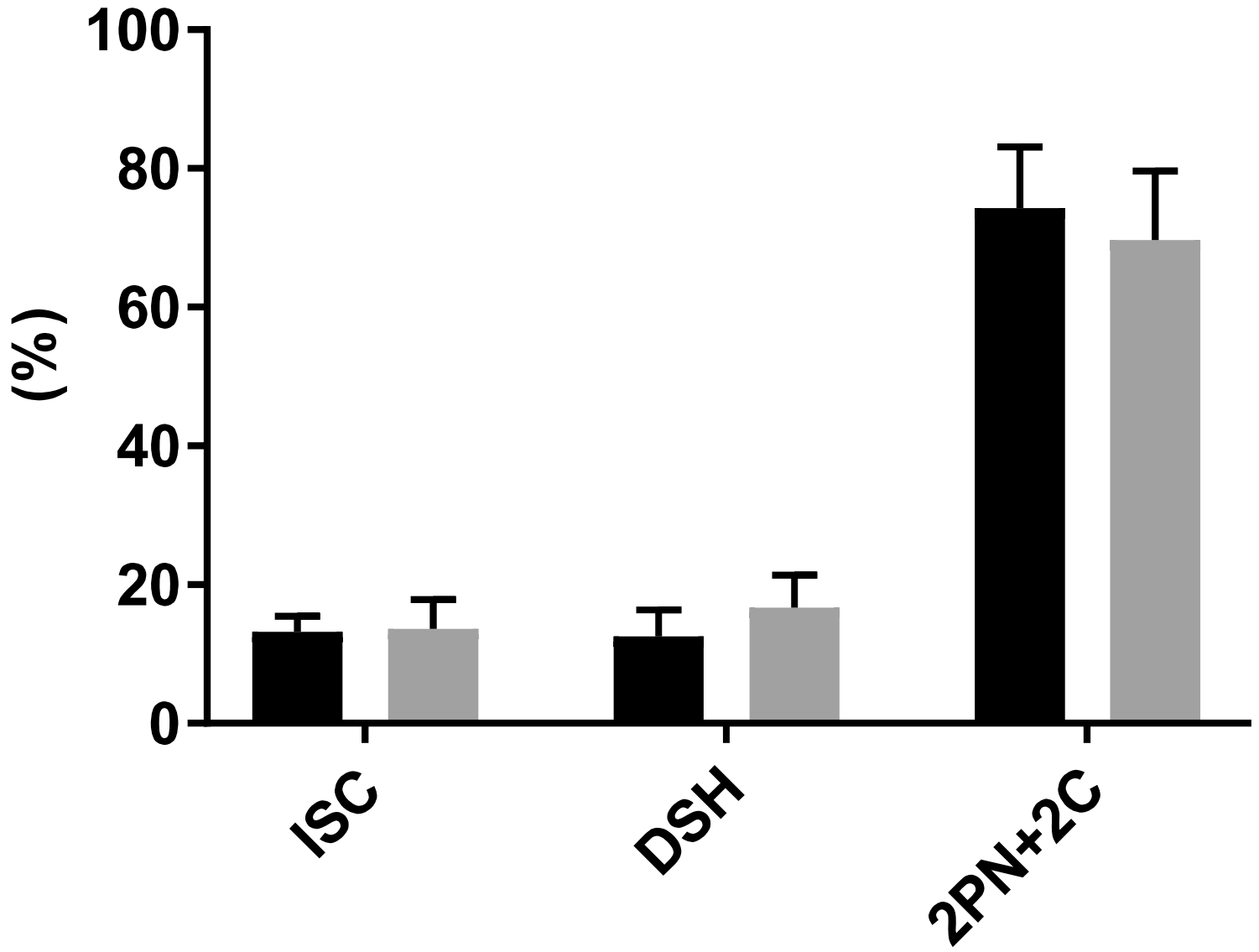


Figure 3

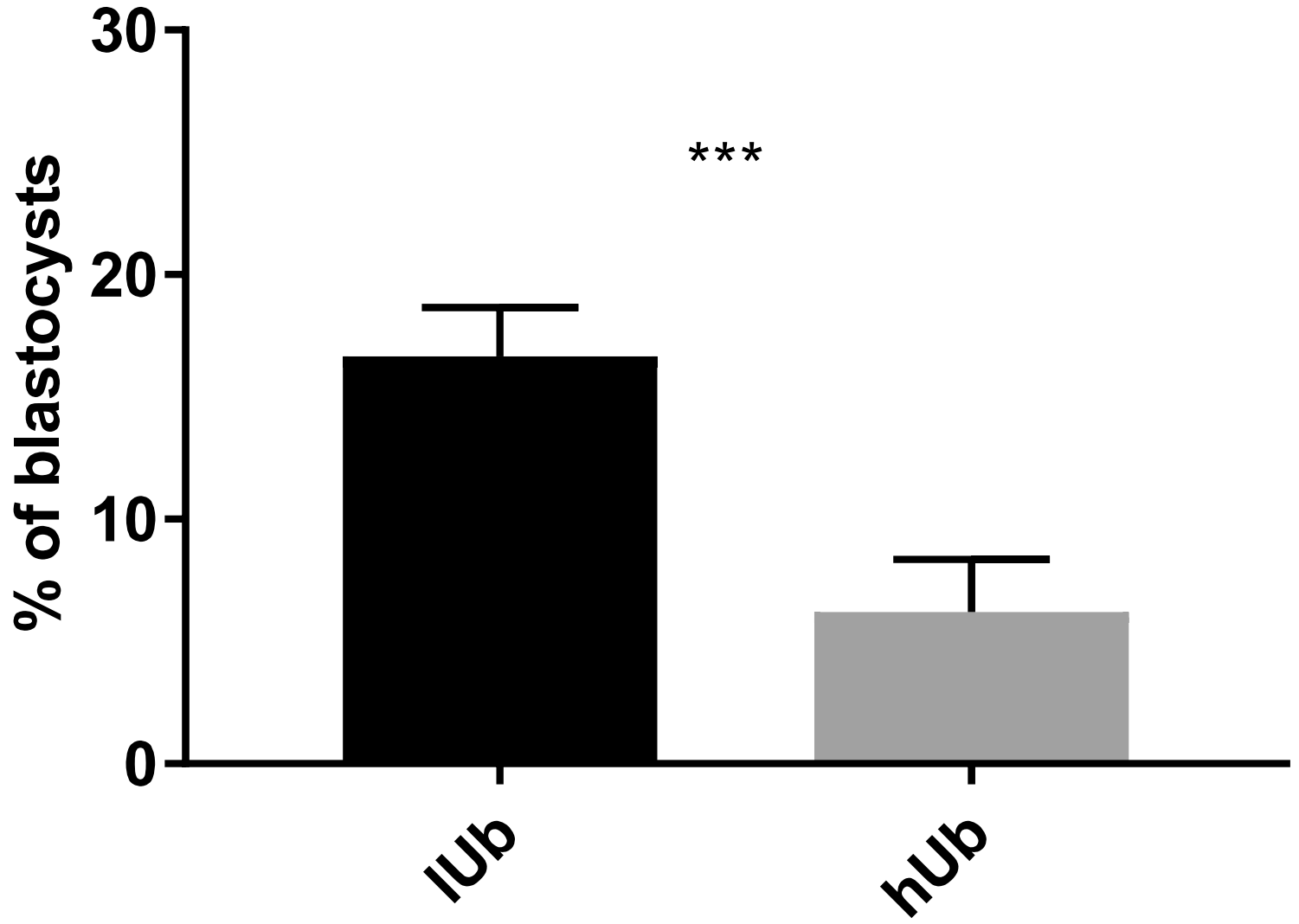


Figure 4

