

Univerzita Karlova  
Lékařská fakulta v Plzni



## HABILITAČNÍ PRÁCE

**Základní výzkum oocyty a časného embryonálního vývoje jako základ  
pro hodnocení endokrinně-disrupčního efektu polutantů na lidskou  
reprodukcí**

Basic study of oocyte and early embryonic development towards the  
assessment of the endocrine-disrupting effect of pollutants on human  
reproduction

Ing. Jan NEVORAL, Ph.D.

Plzeň, 2018

## **Prohlášení**

Prohlašuji, že předkládaná habilitační práce s názvem „Základní výzkum oocyту a časného embryonálního vývoje jako základ pro hodnocení endokrinně-disrupčního efektu polutantů na lidskou reprodukci“ je jedinečným textem vytvořeným mnou samým, sloužícím jako komentář k souboru původních prací publikovaných v recenzovaných časopisech nebo časopisech s faktorem impaktu, doplněná o přehledové články typu review publikovaných obdobně. V procesu publikace vědeckých dat a při sepisování prvo-autorských publikací jsem postupoval v souladu s obecně přijímanými etickými zásadami vědecké činnosti a kritérii jednotlivých periodik. Projekty a granty, jimiž bylo řešení vědecké problematiky podporováno, jsou řádně citovány v jednotlivých publikacích.

V Plzni dne 8. 11. 2018

.....  
Jan NEVORAL

## **Poděkování**

Děkuji svým blízkým za skvělé zázemí. Děkuji kolegům-přátelům, za pomoc a společnou práci; především však proto, že se mi stali skvělými přáteli. Jmenovitě děkuji vážené trojici reprodukční medicíny: prof. Jaroslavu Petrovi, prof. Peterovi Šutovskému a prof. Mileně Králíčkové.

## Seznam použitých zkratek

3-MPST	3-Mercaptopyruvate sulfurtransferase	EGF	Epidermal growth factor
5hmC	Hydroxymethylcytosine	FDA	US Food and Drug Administration
5meC	5-methylcytosine	FSH	Follicle stimulating hormone
AKAPs	A-kinase anchoring proteins	GABARAP	GABA type A receptor- associated protein
AKT	Protein Kinase B	GC	Guanylate cyclase
APC/C	Anaphase promoting complex/cyclosome	GDF9	Growth differentiation factor 9
ART	Assisted reproductive technologies	GV	Germinal vesicle
AURKB/C	Aurora kinase B/C	GVBD	Germinal vesicle breakdown
BPA/S/F/AF	Bisphenol A/S/F/AF	H1/2/3/4	Histone 1/2/3/4
CaM	Calmodulin	H <sub>2</sub> S	Hydrogen sulfide
CaMKII	Calmodulin-dependent kinase II	HA	Hyaluronic acid
cAMP	Cyclic adenosine 3',5'- monophosphate	ICSI	Intracytoplasmic sperm injection
CBS	Cystathionine $\beta$ -synthase	IP3	Inositol 1,4,5- trisphosphate
CDC25	Cell division cycle 25 phosphatase	IP3K	IP3-Kinase
CDK1	Cyclin-dependent kinase 1	IP3R	IP3 receptor
cGMP	Cyclic guanosine 3',5'- monophosphate	IVF	<i>In vitro</i> fertilization
COC	Cumulus-oocyte Complex	K4/9/16/27	lysine 4/9/16/27
CSE	Cystathionine $\gamma$ -lyase	LC3 $\alpha$	Microtubule-associated protein 1 light chain 3 $\alpha$
CSF	Cytostatic factor	LH	Luteinising hormone
DMRs	Differentially methylated regions	MAPK	Mitogen-activated protein kinase
DNMTs	DNA methyltransferases	MDM2	Mouse double minute 2 homolog, E3 ubiquitin protein- ligase
EFSA	European Food Safety Authority	MEK	MAPK ERK kinase
EGA	Embryonic genome activation	MII	metaphase II
		MOFS	Multi-oocyte follicle syndrome
		MPF	M-Phase/maturation promoting factor
		MZT	Maternal-to-zygotic transition

ncRNAs	Non-coding RNAs
NO	Nitric oxide
NORs	Nucleolus organizes regions
NOS	Nitric oxide synthase
NPBs	Nucleolus precursor bodies
p62/SQSTM1	Sequestosome 1
PAWP	Postacrosomal sheath WW-domain binding protein
PCOS	Polycystic ovary syndrome
PGCs	Primordial germ cells
PINK1	PTEN-induced putative kinase 1
PKA	cAMP-dependent protein kinase
PKC	Ca <sup>2+</sup> -dependent protein kinase
PKG	cGMP-dependent protein kinase
PLCζ	Phospholipase C theta
PLK1	Polo-like kinase 1
POFS	Premature ovarian failure syndrome
PTM	post-translational modification
RyR	Ryanodine receptor
SNX6	Sorting nexin 6
SOAF	Sperm oocyte-activating factors
SUV39H1	Suppressor of variegation 3-9 homolog 1, histone-lysine N-methyltransferase
TDG	thymine DNA glycosylase
VCP	Valosin containing protein

## Obsah

1. Literární přehled.....	9
1.1. Gametogeneze .....	9
1.2. Zrání oocyty a kumulární expanze .....	10
1.2.1. Regulační faktory zrání oocyty .....	10
1.2.2. Úloha gasotransmiterů v regulaci meiotického zrání .....	13
1.3. Oplození a pre-implantační embryonální vývoj .....	14
1.3.1. Molekulární regulace oplození a časného embryonálního vývoje.....	15
1.3.2. Milníky časného embryonálního vývoje.....	16
1.3.3. Epigenetické změny embryonálního chromatinu .....	18
1.3.4. Mitofágie a heteroplazmie .....	21
1.4. Ženská infertilita.....	22
1.4.1. Stárnutí oocyty a selhávání časného embryonálního vývoje jako příčina infertility .....	22
1.4.2. Endokrinní disruptory jako příčina infertility .....	23
1.5. Využití zvířecích modelů pro hodnocení endokrinních disruptorů .....	25
2. Materiál a metody.....	27
2.1. Biomonitoring endokrinních disruptorů v lidské folikulární tekutině .....	27
2.1. Získávání, <i>in vitro</i> zrání a oplození prasečích oocytů .....	27
2.2. Hodnocení kumulární expanze.....	28
2.3. <i>In vitro</i> zrání a ošetření oocytů žab <i>Xenopus laevis</i> .....	29
2.4. Laboratorní chov myší a expozice endokrinními disruptory .....	29
2.5. Hodnocení samičí reprodukce <i>in vivo</i> .....	30
2.6. Izolace a kultivace myších oocytů .....	30
2.7. Imunocytochemie, konfokální mikroskopie a analýza obrazu .....	31
2.8. Elektroforéza a western blot.....	32
2.9. Statistická analýza .....	32
3. Výsledky.....	34
3.1. Úloha gasotransmiterů v regulaci zrání a stárnutí oocytů žab <i>Xenopus laevis</i> a prasete .....	34
3.2. Kumulární expanze jako ukazatel kvality oocytů .....	35
3.3. Epigenetické změny v procesu oplození oocyty a časném embryonálním vývoji prasete .....	35
3.4. Hodnocení endokrinních disruptorů prostřednictvím popsanych ukazatelů kvality oocytů .....	36
4. Diskuze a perspektiva.....	37
5. Použitá literatutra .....	39

## Anotace

Fyziologické procesy gametogeneze, oplození a gametogeneze zůstávají na buněčné a molekulární úrovni dosud neúplně poznané. Řada příčin idiopatické infertility spočívá právě v molekulárních mis-regulacích zrajícího oocyty a/nebo časného embryonálního vývoje. Tyto molekulární změny jsou často vyvolány environmentálními polutanty z řad endokrinních disruptorů, které ve své velmi nízké koncentraci a soustavné expozici simulují hormonální akci. Pro relevantní posouzení rizika jednotlivých endokrinních disruptorů a návrh řešení takového problému je nezbytné odhalit jejich molekulární cíle na základě dostatečné znalosti biologie gamet a embryí.

Předložená habilitační práce předkládá soubor publikovaných a zde komentovaných originálních prací, zaměřených na popis biologie oocyty, resp. kumulo-oocytárního komplexu (COC), a časných embryí, za použití medicínských modelů myši, prasete a žáby *Xenopus laevis*. Základnímu studiu jsou věnovány podkapitoly výsledků zaměřené na buněčnou signalizaci gasotransmiterů sulfanu ( $H_2S$ ), popř. oxidu dusnatého (NO), ve zrajících oocytech (i). Toto studium probíhalo v kontextu kumulární expanze COC, přičemž metody pro jeho objektivní měření byly dále vyvíjeny pro nepřímé hodnocení kvality oocyty (ii). Součástí základního výzkumu oocyty a embryí bylo rovněž studium epigenetických regulací, s akcentem na klíčovou  $NAD^+$ -dependentní histon deacetylázu SIRT1 (iii). Poznatky, prezentované v těchto třech dílčích podkapitolách, byly využity pro hodnocení biologické akce endokrinního disruptoru bisfenolu S (BPS); výsledky tohoto úsilí jsou shrnuty a komentovány ve čtvrté podkapitole výsledků (iv).

Navzdory pokročilému hodnocení vlivu endokrinních disruptorů na reprodukci člověka stále vyvstává potřeba soustavného základního studia, za použití vhodných kombinací biomedicínských modelů. Vhodnou molekulou s rozsáhlou buněčnou signalizací představuje SIRT1, společně s proteinovými substráty epigenetické (histonový kód, histon metyltransferázy/demetylázy) a/nebo ne-epigenetické povahy (faktory buněčného dělení, DNA poškození, autofágie mitochondrií). Rozluštění úlohy SIRT1 v oocytech a embryích představuje vhodný ukazatel narušení fyziologie buňky endokrinními disruptory, avšak modulace jeho aktivity rovněž představuje možnosti, jak negativní dopady environmentálního stresu eliminovat. Mimoto, studium procesů, jako utváření histonového kódu, epigenetická re-programace gamet během oplození a autofágie mitochondrií spermie po oplození představuje potenciál pro odhalení příčin některých chorob, např. mitochondriálních. Nabízí se rovněž intenzivní využití poznatků buněčného dělení a diferenciace v současné době stále se rozvíjejících oborech reprodukční medicíny, tj. postupy asistované reprodukce (ART) a/nebo onkofertilita.

## Summary

The molecular signaling through gametogenesis, fertilization, and early embryonic development still remains unclear. Many cases of idiopathic infertility imply of several molecular misregulations of mature oocyte and/or early embryonic development. Accordingly, environmental pollutants, including very low doses of endocrine disruptors, frequently affect the molecular regulation of these processes and, therefore, represent significant risk for human reproduction health. Basic study of signal pathways in the oocyte and embryos is required for the risk assessment and designs for endocrine disruptor elimination.

With respect to aforementioned goals of recent approach, this thesis is commented compilation of original article and reviews, focused on the biology of oocyte, cumulus-oocyte complex (COC), early embryos, using medical biomodels, such as mouse, pig, and clawed frogs *Xenopus laevis*. The chapter „Results“ includes the basic research of gasotransmitters hydrogen sulfide (H<sub>2</sub>S) and nitric oxide (NO) in mature oocytes (i). Based on COCs isolation and usage, cumulus expansion study and its measurement were developed as a valuable biomarker of oocyte quality (ii). Hereafter, epigenetic regulation with the emphasis to NAD<sup>+</sup>-dependent histone deacetylase SIRT1 was a significant part of the basic research of female reproduction (iii). Finally, own observations and knowledge were utilized for the assessment of the biological impact of bisphenol S (BPS), an ubiquitous endocrine disruptor (iv).

Although advanced approaches of oocyte quality assessment are available, necessity of continuous basic research of gametes and embryos, using appropriate biomodels, are obvious. SIRT1, followed by the study of up/down-stream epigenetic factors (histone methyltransferases) and substrates (core histones and histone code), as well as non-epigenetic factors (cell cycle control, DNA damage response, autophagy of mitochondria), represent potent molecule with comprehensive molecular action and physiological importance. The deciphering of the SIRT1 role in oocyte and embryo offers the mighty tool for endocrine disruptor risk elucidation. Moreover, the modulation of SIRT1 activity is a possible way of a rescue of endocrine disruptor-affected oocytes and/or embryos and an elimination of the pressure of environmental pollutants. In addition to endocrine disruptors, the basic study of histone code establishment, epigenetic reprogramming of gametes during fertilization followed by sperm mitophagy could be a trend in the seeking of failure causes, *e. g.* mitochondrial diseases. In any case, achieved knowledge of oocyte/embryo biology will be available for recently developed approaches to reproductive medicine, such as assisted reproductive technologies (ART) and/or oncofertility.



## 1. Literární přehled

### 1.1. Gametogeneze

Tvorba pohlavních buněk, gamet, začíná již během embryonálního vývoje diferenciací primordiálních zárodečných buněk (primordial germ cells, PGCs). PGCs myši osídlují tzv. gonadální lištu (gonadal ridge) poměrně brzy, v embryonální (E) den E7.5 – 14.5 vývoje. V E14.5 dochází k diferenciaci pohlavních buněk a budoucích gonád dle pohlaví. Během prenatalního vývoje dochází k intenzivnímu meiotickému dělení buněk, které se postupně diferencují v spermatogonie a oogonie. S ohledem na téma habilitační práce bude v následujícím textu pojednáno především o samičích pohlavních buňkách a přeměně oogonií v zralé oocyty.

Oogonie se během embryonálního vývoje mitoticky dělí a diferencují od somatických buněk, které každou oogonii začnou obklopot. Také tyto buňky se diferencují a vznikají z nich buňky *corona radiata* a granulózní buňky vejconosného hrbolku (*cumulus oophorus*). Souhrnně se tyto buňky označují jako kumulární buňky a společně s dalšími buňkami folikulárními tvoří základ funkční jednotky ovária - folikulu. Takto obklopené oogonie zahajují v embryonálním ováriu, popř. časně po narození, buněčné dělení specifické pro gamety – meiotické dělení. Oogonie tak vstupují do meiózy I., chromatin podlehne rekombinaci pomocí crossing overu během profáze I a v diktyotene je meiotické dělení fyziologicky zablokováno. Tento 1. meiotický blok přetrvává u člověka několik let až do dosažení puberty a menarche.

Popsané změny zárodečných buněk probíhají ve folikulu různého stádia vývoje, a tedy v celém kontextu folikulogeneze, která byla intenzivně studována již dříve mnohými autory na různých zvířecích modelech<sup>1-3</sup>. Hormonální akce gonadotropinů stimuluje kohortu folikulů (tzv. recruitment) k růstu<sup>4</sup>, trvajícím u člověka cca 85 dní. Několik folikulů se vyvíjí v tzv. folikulární vlně, kterou lze arteficiálně ovlivnit hormonální stimulací za účelem superovulace. Fyziologicky však folikulární vlna končí ovulací jednoho dominantního (Graafova) folikulu, zatímco ostatní folikuly, včetně oocytů v nich uložených, podléhají atrézii.

Současně s růstem folikulu dochází k růstu oocytu, který během této fáze zvětší svůj objem cca 20x do výsledné velikosti 115 – 120  $\mu\text{m}$  u prasete<sup>5,6</sup>,  $\sim 85 \mu\text{m}$  u myši<sup>7</sup> a  $\sim 110 \mu\text{m}$  u člověka<sup>8</sup>. Během růstu dochází k intenzivní translaci, syntéze proteinů a tvorbě buněčných organel. Výsledkem je plně dorostlý oocyt, který obsahuje cca 100,000 mitochondrií, pro oocyt specifická a pro oplození nezbytná kortikální granula, glykoproteinový obal *zona pellucida*, dále 0,5 – 1,75 ng mRNA<sup>9</sup> a  $\sim 30$  ng proteinů (myši oocyt)<sup>10</sup>. Dostatečné spektrum organel, RNAs a proteinů v adekvátním množství rozhoduje o tzv. meiotické kompetenci oocytu, tedy schopnosti prolomit 1. meiotický blok a znovu zahájit meiotické dělení. Protože je množství mRNAs a proteinů určeno až pro oplození a časný embryonální vývoj, rozhoduje růst oocytu také o vývojové kompetenci oocytu.

Jakmile je oocyt hormonálně stimulován k meiotickému dělení, dochází k jeho progresi, kdy je po několika hodinách meiotické dělení opět zablokováno, tentokrát v metafázi 2. meiotického dělení. Progres meiotického dělení, ohraničeného 1. a 2. meiotickým blokem, je označováno jako meiotické zrání oocyty.

## 1.2. Zrání oocyty a kumulární expanze

Důvodem zrání gamet, včetně oocytů, jsou adekvátní změny chromatinu vedoucí k jeho redukci diploidní sady chromozómů na haploidní. Těmto změnám odpovídá také stav chromatinu, který mění svojí dekondenzovanou podobu ve vysoce kondenzovaný heterochromatin. V důsledku těchto změn ustává genová exprese a plně dorostlý oocyt, předurčený k zrání, je transkripčně inaktivní. Chromatin tohoto oocyty se nachází ve stádiu tzv. zárodečného váčku (*germinal vesicle*, GV). Chromatin tohoto stádia je stále obklopen jadernou membránou, která reaguje na stimulaci meiotického zrání svým rozpadem (*germinal vesicle breakdown*, GVBD). Následuje další kondenzace a formování chromatinu do metafázních chromozómů. Tyto chromozómy podléhají segregaci a nabývají tvaru tzv. metafázní destičky (*metaphase plate*) ve stádiu metafáze 2. meiotického dělení. Protože je po celou dobu chromatin silně kondenzovaný a geny nejsou transkribovány, pro úspěšné zrání, oplození a časný embryonální vývoj je oocyt odkázán na již nasyntetizované mRNAs a proteiny. K vlastní genové expresi dojde až po oplození a reaktivaci genomu embrya ve stádiu 2 buněk u myši, 4-8 buněk u prasete a člověka.

Zrání oocyty a příslušné změny chromatinu se odehrávají *in vivo* ve folikulu, obklopené folikulárními buňkami *corona radiata* a *cumulus oophorus*. Tyto buňky komunikují během růstu oocyty a folikulu prostřednictvím výběžků těchto buněk, procházejících *zonou pellucidou*. Mimoto, zrající oocyt je doprovázen adekvátními změnami těchto buněk, které se projevují tzv. kumulární expanzí.

Kumulární expanze spočívá v syntéze extracelulární matrix, přesněji v syntéze glykosaminoglykanů do extracelulárního prostoru kumulárních buněk, dominantně nesulfatovaného glykosaminoglykanu hyaluronové kyseliny (HA). V důsledku zvětšování mezibuněčných prostorů dochází také v přerušení mezerovitých spojů mezi oocytem a buňkami *corona radiata*. Protože tyto buňky představují pro oocyt spíše inhibiční faktor meiotického zrání, je gonadotropiny stimulovaná kumulární expanze nutným předpokladem znovu zahájení meiotického zrání oocyty, které bezprostředně následuje.

### 1.2.1. Regulační faktory zrání oocyty

Hormonální stimulace gonadotropiny folikuly stimulujícího hormonu (FSH) a luteinizačního hormonu (LH) vede k recruitmentu folikulů, resp. k ovulaci dominantního folikulu. Oocyt se však musí spolehnout na parakrinní regulaci uvnitř folikulu, protože pouze folikulární buňky disponují receptory pro

gonadotropiny. Po stimulaci folikulárních buněk gonadotropiny dochází k produkci růstových faktorů, jako GDF-9 (Growth differentiation factor-9) a EGF (Epidermal growth factor), které podporují další folikulární růst a s ním i růst oocyty<sup>11–13</sup>. Oocyt soustavně komunikuje s obklopujícími buňkami *corona radiata*, které produkují malé signální molekuly druhých posílů, jako je cAMP a cGMP. Tyto molekuly prostupují skrz mezerovitá mezibuněčná spojení typu gap junction do oocyty a brání jeho spontánnímu meiotickému dělení předtím, kdy oocyt je plně dorostlý a disponuje meiotickou a vývojovou kompetencí.

Následná signalizace LH vede k indukci kumulární expanze buněk *cumulus oophorus* a *corona radiata*. V důsledku syntézy a rostoucího množství HA a dalších glykosaminoglykanů dochází k zvětšení mezibuněčného prostoru mezi folikulárními buňkami. V důsledku tohoto fenoménu dochází rovněž k přerušení mezibuněčného spojení mezi buňkami *corona radiata* a oocytem. Výsledkem je přerušení toku inhibičních faktorů meiotického zrání a tak k GVBD a znovu zahájení meiotického zrání (shrnutí v Nevoral *et al.*)<sup>14</sup>.

Mezi klíčové inhibiční faktory meiotického zrání je molekula druhého posla cAMP. S přítomností cAMP souvisí vysoká aktivita cAMP-dependentní kinázy PKA v kumulárních buňkách i oocyty<sup>15</sup>. Hladina cAMP je výsledkem aktivity enzymu adenylát-cyklázy, odpovědné za syntézu cAMP<sup>16</sup>, a fosfodiesteráz štěpících vazbu cAMP<sup>17</sup>. Adekvátní změny enzymové aktivity a přerušení spojů gap junction mezi *corona radiata* a oocytem vedou k poklesu hladiny cAMP v oocyty, která přetrvává po celou dobu meiotického zrání<sup>18,19</sup>.

Současně s poklesem koncentrace inhibičních faktorů dochází k uvolnění jiného druhého posla, iontů  $Ca^{2+}$ . K uvolnění iontů do cytoplazmy dochází z intracelulárních depozit endoplazmatického retikula a mitochondrií, prostřednictvím inositol-trifosfátových (IP3R) a ryanodinových receptorů (RyR) sloužících jako iontové kanály<sup>20,21</sup>. Zvýšená intracytoplazmatická koncentrace  $Ca^{2+}$  je náhlá a časově omezená, nicméně nezbytná pro GVBD a re-iniaci meiotického dělení<sup>22</sup>. Přítomnost  $Ca^{2+}$  v ooplazmě vede k aktivaci kalmodulinu (CaM) a následně kalmodulin-dependentní kinázy (CaMKII); naopak s poklesem  $Ca^{2+}$  dochází k rychlému potlačení aktivity CaMKII. Tyto dynamické změny vedou k inhibici dalších protein-kináz meiotického dělení, čímž se CaMKII stává důležitým faktorem úspěšného zrání oocyty<sup>23</sup>. Hospodaření s  $Ca^{2+}$  prostřednictvím iontových kanálů představuje další rozměr vývojové kompetence oocyty, dosažené během jeho zrání: syntéza IP3R a RyR ve zrajícím oocyty rozhoduje o schopnosti reagovat na aktivační stimul během oplození<sup>24</sup>.

Vedle molekulární akce malých molekul druhých posílů jsou klíčovým fenoménem v modulaci aktivity enzymů post-translační modifikace (PTMs) proteinů. Často se uplatňující PTM je fosorylace, regulovaná řadou kináz a fosfatáz. Mezi popsané enzymy s touto aktivitou během meiotického zrání patří PLK1 (Polo-like kinase 1)<sup>25</sup>, AURKB/AURKC (Aurora kinase B, resp. C)<sup>26,27</sup> a CDC25B fosfatáza (Cell division

cycle 25B)<sup>28</sup>. Tyto faktory, v součinnosti s předchozími zmíněnými, jsou nadřazeny aktivitě stěžejního faktoru progresu meiotického zrání - M-fázi/zrání podporujícího faktoru (MPF)<sup>28,29</sup>.

MPF nabývá podoby heterodimeru, který v oocytech sestává z katalytické podjednotky cyklin-dependentní kinázy 1 (CDK1) a regulační podjednotky cyklinu B. Nicméně, důležitou komponentou MPF je Greatwall (GWL) kináza, jejíž funkce a význam byly v oocytu popsány relativně nedávno<sup>30–32</sup>. V nezralém GV oocytu je doména p34 kinázy CDK1 inhibičně fosforylována na threoninu Thr14 a tyrozinu Tyr15. Přestože dochází soustavně k tvorbě heterodimeru CDK1-cyklin B během růstu oocytu, jedná se o pre-enzym (pre-MPF), jehož fosforylační stav a inaktivita je udržován pomocí kináz WEE1 a MYT1<sup>33,34</sup>. Navzdory nulové aktivitě rozhoduje množství pre-MPF o nabytí tzv. meiotické kompetence<sup>16</sup>. pre-MPF setrvává v této podobě až do momentu výše popsaných změn, tj. hormonální akce LH, parakrinní regulace růstovými faktory, poklesu cAMP, nárůstu Ca<sup>2+</sup> iontů v cytoplazmě a vzrůstu aktivity CaMKII, a nakonec aktivace CDC25B odpovědné za defosforylaci CDK1<sup>15,18,20,23,29</sup>.

Během aktivace MPF dochází k další modulaci jeho aktivity prostřednictvím PTMs, přesněji fosforylace cyklinu B na serinových zbytcích Ser94 a Ser96, jak bylo identifikováno v oocytech *Xenopus laevis*<sup>37</sup>. Mezi substráty MPF je CDC25, která zprostředkovává autokatalytickou aktivaci MPF a prudký nástup jeho aktivity<sup>38,39</sup>. Aktivní MPF je dále odpovědný za fosforylaci histonů a kondenzaci chromozómů<sup>40</sup>, za fosforylaci jaderných laminů a jejich depolymeraci<sup>41</sup>, která se manifestuje rozpadem jaderné membrány a GVBD<sup>42</sup>.

Dynamika MPF během zrání nabývá poklesu během anafáze I a telofáze I<sup>42</sup>. Tento pokles je nutný pro přechod z meiózy I do meiózy II, segregaci chromozómů a vydělení 1. pólocytu<sup>43</sup>. Pokles aktivity MPF spočívá v degradaci katalytické podjednotky MPF - cyklinu B, pomocí polyubiquitinace anafázi-podporujícím komplexem/cyklozómem (APC/C) a následné proteolýzy v proteasomu S26<sup>44,45</sup>. Díky této klíčové úloze, odpovědné za specifickou dynamiku MPF, jsou tyto nadřazené regulační faktory, paradoxně deaktivující MPF během meiózy, nezbytné pro úspěšné dokončení meiotického zrání. Aktivita MPF následně opět vzrůstá a dosahuje maxima v metafázi II, kde se podílí na udržení 2. meiotického bloku<sup>46–48</sup>.

Aby chromozómy mezi meiózou I a II neztratily svůj silně kondenzovaný charakter, navzdory poklesu aktivity MPF, je zapotřebí dalšího klíčového faktoru meiotického zrání – Mitogeny aktivující protein kinázy (MAPK), a jeho nadřazených regulátorů MEK a Mos<sup>49–51</sup>. Signální kaskáda Mos-MEK-MAPK, společně se substrátem p90<sup>sk</sup> (ribosomal S6 protein kinase)<sup>52</sup>, se tak podílí na modulaci cytoskeletu dělicího vřeténka, tolik důležitého asymetrické vydělení 1. pólového tělíska během redukčního dělení<sup>52–55</sup>. V důsledku aktivní MAPK<sup>56</sup>, v součinnosti s dalšími výše zmíněnými faktory<sup>57–59</sup>, tak nenastává interfáze v přechodu redukčního a ekvačního meiotického dělení ani nedochází k replikaci

DNA a zahájení mitotického dělení. Aktivita MAPK přetrvává až do dosažení metafáze II, kde se s MPF podílí na udržování 2. meiotického bloku<sup>55,60</sup>.

Meiotické zrání oocytů je spontánně zablokováno v metafázi II. Mimo zmíněných MPF a MAPK je za udržování 2. meiotického bloku spolu odpovědný cytostatický faktor CSF<sup>61</sup>. Také úloha CSF spočívá v regulaci klíčového MPF, sice potlačením aktivity APC/C a proteolytické degradace jeho regulační podjednotky cyklinu B<sup>60</sup>.

Dosud zmiňované kinázy, které regulují iniciaci a průběh meiotického zrání, nejsou jedinými enzymy odpovědnými za PTMs oocytárních proteinů. Za významnou skupinu enzymů, modifikujících širokou škálu proteinů, lze považovat histon deacetylázy, rozdělené do 5 tříd (I – IV). Unikátní postavení v této široké rodině proteinů zaujímají NAD<sup>+</sup>-dependentní histon deacetylázy (III. třídy), též zvané sirtuiny (SIRT, Sir2)<sup>62</sup>. Tato skupina zahrnuje několik různých proteinů, SIRT1 – SIRT7, s obdobným mechanismem účinku, avšak mnohdy s různou subcelulární lokalizací<sup>63–65</sup>. Všechny sirtuiny vykazují deacetylační schopnost, SIRT4 a SIRT6 mimoto také mono(ADP-ribosyl) transferázou aktivitu<sup>66–70</sup>.

Jedinečnost této skupiny spočívá ve spektru substrátů těchto histon deacetyláz: ty zahrnují a) epigenetické cíle, tj. lysinová (K) rezidua histonů H1 (H1K26), H3 (H3K9ac, H3K18ac, H3K57ac) a H4 (H4K16ac), b) ne-histonové substráty<sup>62,70,71</sup>. Deacetylace histonů vede k utichání genů a stabilizaci genomu. Ne-epigenetické substráty zahrnují proteiny, které následně nepřímo vedou k dalším modifikacím histonů. Mezi tyto cíle patří histon metyltransferáza SUV39H1 a E3-ubiquitin ligáza MDM2<sup>72,73</sup>. Ne-histonové substráty zahrnují rovněž proteiny ze skupiny transkripčních faktorů<sup>74,75</sup>. Obecně jsou sirtuiny považovány za esenciální a příznivě působící proteiny s protektivními účinky, přirozeně aktivované kalorickou restrikcí a genotoxickým stresem. Poznání jejich role ve fyziologii oocytu však zůstávají velmi sporé<sup>76–78</sup>.

### 1.2.2. Úloha gasotransmiterů v regulaci meiotického zrání

Unikátní signální roli druhých posílů a současně faktorů, odpovědných za specifické PTMs, sehrávají malé plynné molekuly oxidu dusnatého (NO) a sulfanu (H<sub>2</sub>S). Souhrnně jsou tyto molekuly, se schopností transdukce buněčného signálu, označovány jako gasotransmitery.

Fyziologická produkce NO je zprostředkována NO-syntázami (NOS), katalyzující konverzi L-argininu na citrulin a NO<sup>79,80</sup>. NOS existuje ve třech izoformách kódovaných samostatnými geny: endoteliální NOS (eNOS), neuronová NOS (nNOS) a indukovatelná NOS (iNOS). Zatímco jsou eNOS a nNOS Ca<sup>2+</sup>-dependentní a produkují jen malé množství NO během krátké doby nanejvýše několika minut<sup>80,81</sup>, činnost iNOS je nezávislá na Ca<sup>2+</sup> iontech a produkuje stabilně 100 – 1000x více NO během několika

hodin<sup>82,83</sup>. Přítomnost všech zmíněných izoform NOS byla detekována v oocytech a kumulárních buňkách prasete<sup>84–86</sup>.

Molekula NO se uplatňuje prostřednictvím regulace aktivity guanylát-cyklázy (GC) a tak produkce cGMP<sup>87</sup>. Vysoká koncentrace cGMP je následně spojována s vysokou aktivitou cGMP-dependenční protein-kinázy (PKG) a 1. meiotickým blokem oocytů<sup>88</sup>. Po uvolnění tohoto bloku a znovu zahájení meiotického zrání se účinek NO uplatňuje prostřednictvím S-nitrosylace cysteinových reziduí proteinů<sup>89</sup>. NO prostřednictvím S-nitrosylace ovlivňuje aktivitu ryanodinových receptorů a tak uvolnění Ca<sup>2+</sup> iontů z intracelulárních depozit<sup>90</sup>. Uvolnění Ca<sup>2+</sup> iontů po působení NO na ryanodinové receptory lze považovat za jeden z mechanismů řízení meiotického zrání a aktivace oocytu prostřednictvím gasotransmiterů<sup>23,24,91</sup>.

Mimo NO sehrává nepostradatelnou roli v regulaci meiotického zrání a kumulární expanze druhý z gasotransmiterů, H<sub>2</sub>S. Také H<sub>2</sub>S je enzymaticky uvolňován přímo v buňkách, sice enzymy CBS (Cystathionine β-synthase), CSE (Cystathionine γ-lyase) a 3-MPST (3-Mercaptopyruvate sulphurtransferase). Všechny tři enzymy byly detekovány v oocytech a kumulárních buňkách prasete<sup>92</sup>. Dosavadní poznání poukazuje na nezbytnost H<sub>2</sub>S v procesu meiotického zrání<sup>92,93</sup>. Sledování protektivního účinku a zlepšené vývojové kompetence oocytu dokonce indikuje skutečnost, že H<sub>2</sub>S je v *in vitro* podmínkách uvolňován nedostatečně, přičemž jeho suplementace skýtá mnohé terapeutické využití. Přestože není mechanismus účinku plně popsán, jako cílové faktory signalizace H<sub>2</sub>S byly potvrzeny klíčové faktory meiotického zrání: MPF a MAPK<sup>92–94</sup>. Předpokládaným mechanismem účinku je, podobně jako v případě NO, PTM cysteinu, zde prostřednictvím S-sulfhydratace<sup>95</sup>. Dosavadní poznatky (dosud nepublikovaná data) nás vedou k domněnce, že H<sub>2</sub>S a NO regulují prostřednictvím PTM aktivitu CDC25C a SIRT1, klíčové molekuly meiotického zrání, resp. epigenetických a ne-epigenetických regulací.

Uvolňování gasotransmiterů přímo v oocytech enzymy, které tvoří transkripční i proteinovou výbavu oocytu<sup>85,96</sup>, stejně jako schopnost gasotransmiterů post-translačně modifikovat proteiny oocytu, přináší možnosti jejich uplatnění také v procesu oplození a následného pre-implantačního embryonálního vývoje. Nicméně, transfer poznatků by měl respektovat jistou evoluční variabilitu a skutečnost, že gasotransmitery NO a H<sub>2</sub>S zjevně působí poněkud odlišným mechanismem v oocytech žab *Xenopus laevis*<sup>97,98</sup> (vlastní, dosud nepublikovaná data), nežli v oocytech prasete<sup>92,93,99</sup>.

### 1.3. Oplození a pre-implantační embryonální vývoj

Proces oplození vyžaduje patřičné změny gamet, které se během gametogeneze stávají oplození schopné. Mimo oocytu, jehož meiotická a vývojová kompetence byla popsána výše, jsou rovněž nezbytné adekvátní změny spermie. K těmto změnám dochází nejen během spermiogeneze ve varleti

a nadvarleti, ale rovněž bezprostředně před oplozením během pasáže samičím reprodukčním traktem. Tyto změny zahrnují kapacitaci spermie, která je nezbytným předpokladem interakce obou pohlavních buněk. Pouze kapacitované spermie jsou, díky hyaluronidáze (např. PH-20) a její adekvátní manifestaci na membráně spermie<sup>100,101</sup>, schopné penetrovat obal kumulárních buněk po expanzi a syntéze HA do extracelulárního prostoru. Dalším klíčovým dějem je akrozomální reakce, ke které dochází v horní části vejcovodu, bezprostředně před vazbou spermie na glykoproteiny *zony pellucidy*<sup>102,103</sup>. Ve vazbě spermie na *zonu pellucidu* sehrávají důležitou roli glykoproteiny ZP1-4 oocyty jako receptory pro ligandy spermie<sup>104-106</sup>. V širším slova smyslu je tento moment považován za počátek procesu oplození. Oplození je tedy spojeno s dvojitou exocytózou: i) exocytóza akrozómu spermie a uvolnění enzymů, které umožňují spermii proniknout k oocyty. Mimoto dochází k obnažení proteinů vnitřní akrozomální membrány, např. zmíněné hyaluronidázy PH-20 či dalších vazebných partnerů, které zde slouží pro vazbu spermie na *zonu pellucidu*<sup>107</sup>. Současně dochází k re-lokalizaci ligandu IZUMO1, předurčeného pro vazbu spermie na folátový receptor oocyty popsáný jako JUNO<sup>108-110</sup>. Cytoplazmatická membrána spermie následně fúzuje s oolemou. Po splynutí obou gamet nastává druhá exocytóza, ii) exocytóza kortikálních granul (také kortikální reakce), organel specifických pro oocyt a lokalizovaných ve zralém oocyty bezprostředně pod ooplazmou.

Změny oocyty po oplození probíhají velmi progresivně a jsou předpokladem pro penetraci pouze jedné spermie, tzv. polyspermií bloku. Výše zmíněná exocytóza kortikálních granul je následována ztvrdnutím *zony pellucidy* (*zona pellucida* hardening). Za ztvrdnutí je odpovědná proteolýza zonálního proteinu ZP2. Tato změna však zabraňuje polyspermii nedostatečně a je zapotřebí dalších mechanismů. Za ten lze považovat uvolnění receptoru JUNO z oolemy do ooplazmy<sup>110</sup>; ztráta receptoru tak neumožňuje navázání dalších spermií a jejich fúzi s oocytem. Protože jsou tyto mechanismy vysoce koordinované, dochází snadno k jejich poškození v důsledku vnitřních i vnějších vlivů, jako je věk<sup>111</sup>, resp. expozice environmentálními polutanty<sup>112</sup>. Vícečetná penetrace mnohdy vede k progresu časného embryonálního vývoje<sup>113</sup>, avšak je neslučitelná s vývojem post-implantačním; selhávání polyspermií bloku je tak jednou z příčin idiopatické infertility.

### 1.3.1. Molekulární regulace oplození a časného embryonálního vývoje

Pozorovatelný fenotyp oplození má svoji molekulární podstatu, kterou lze označit za aktivaci oocyty. Aktivace oocyty časově následuje a částečně se překrývá s vytvořením polyspermií bloku (tj. kortikální reakce, ztvrdnutí *zony pellucidy*, uvolnění JUNO). Tuto aktivaci indukuje spermie, která přináší komplex faktorů označovaných jako SOAF (Sperm oocyte-activating factors). Tyto faktory zahrnují řadu proteinů, jejichž kompletní výčet dosud není znám. Dobře popsáným SOAF je však fosfolipáza PLC $\zeta$ , která je bezprostředně po fúzi spermie a oocyty inkorporována do oolemy oocyty.



Zde PLC $\zeta$  produkuje ze substrátu oocytárních membránových fosfolipidů signální molekulu inositol-1,4,5-trifosfát (IP3). Navázání tohoto druhého posla na receptory IP3R, lokalizované na endoplazmatickém retikulu oocyty, vede k prudkému vyplavení intracelulárního Ca<sup>2+</sup> do cytoplazmy oocyty<sup>21,114</sup>. Dalším známým faktorem spermie, který indukuje oscilaci Ca<sup>2+</sup> v ooplazmě, je protein PAWP (Postacrosomal sheath WW-domain binding protein)<sup>115,116</sup>. Elevace intracytoplazmatické koncentrace Ca<sup>2+</sup> má za následek aktivaci CaMKII a Ca<sup>2+</sup>-dependentní protein kinázy (PKC)<sup>23,114,117</sup>, naopak vyvolává snížení aktivity faktorů, odpovědných za udržení 2. meiotického bloku: MPF, Mos-MEK-MAPK a CSF<sup>50,118–120</sup>.

Oscilace iontů v ooplazmě se však netýká pouze Ca<sup>2+</sup>. Recentní publikace referují o prudkém poklesu cytoplazmatické koncentrace Zn<sup>2+</sup> iontů<sup>121</sup>, které se podílí na udržení MII bloku zralého oocyty<sup>122</sup>. Tento pokles je spojen s exocytózou kortikálních granul a uvolněním Zn<sup>2+</sup> iontů do extracelulárního prostoru, čímž se Zn<sup>2+</sup> ionty stávají součástí polyspermní bariéry<sup>123</sup>. V návaznosti na toto zjištění byla popsána přítomnost a fyziologická úloha Zn<sup>2+</sup> iontů ve spermiu, které mění svoji subcelulární redistribuci v závislosti na kapacitačním stavu spermie<sup>124</sup>. Zn<sup>2+</sup> tak lze považovat za molekulu s různou fyziologickou úlohou s ohledem na maternální vs. paternální původ. V případě paternálního původu lze Zn<sup>2+</sup> považovat za další faktor ne-proteinového původu, který přichází se spermií do oocyty a indukuje jeho aktivaci.

Aktivace oocyty je předpoklad pro dokončení meiotického dělení oocyty, vydělení druhého pólového tělíska a vytvoření samičího prvojádra. Současně hlavička spermie podléhá tzv. dekondezaci. Četné disulfidické můstky protaminů, které tvoří proteinovou složku chromatinu spermie, jsou redukovány S-glutathionem (GSH) a dalšími přirozenými redukčními agens oocyty. Redukce protaminů je nezbytná pro jejich nahrazení oocytárními histony (histone-protamine exchange) v paternálním chromatinu. Pro dekondezaci je nezbytná fosforylace laminů jaderné membrány spermie, která je regulována oocytární PKC<sup>125</sup>. Výsledkem pokračující dekondezace je samčí prvojádro. Tyto dynamické změny probíhají v jednobuněčné zygotě během několika hodin u savčích biomedicínských modelů stejně jako u člověka. Již diploidní zygota představuje maximálně totipotentní buňku, jako jediná v celém procesu ontogeneze jedince. Nicméně, ještě 4-buněčné embryo sestává z blastomer, ze kterých lze vytvořit čtyři samostatné klony<sup>126</sup>.

### 1.3.2. Milníky časného embryonálního vývoje

Dosud rozdílně probíhající změny maternálního a paternálního chromatinu, tj. dokončení meiotického dělení, resp. dekondezace hlavičky spermie, pokračují vcelku synchronně tvorbou maternálního a paternálního prvojádra<sup>127</sup>. Tvorba prvojader je počátkem komplexního procesu zvaného „maternal-to-zygotic transition (MZT), který vede k změnám embryonálního chromatinu s cílem aktivace



embryonálního genomu (embryonic genome activation, EGA). Až poté lze embryo považovat za plně autonomní v genové expresi a nezávislé na maternální zásobě transkriptů a proteinů<sup>128</sup>.

Geneze prvojader zahrnuje kompletaci jaderné membrány, interagující s Golgiho komplexem a cytoskeletem zygoty<sup>129,130</sup>. Součástí kompletace jaderné membrány je tvorba a inkorporace pórů nukleární membrány (nuclear pore complexes, nucleoporins). Pro tvorbu nukleárních pórů slouží maternální prekursor oocyty zvané *annulate lamellae*<sup>129</sup>. Posledním krokem biogeneze nukleární membrány provajder je inkorporace laminů (lamin A, B)<sup>131</sup>, jako cytoskeletární opory nukleární membrány, pomocí lamin-vázajících proteinů nexinu 6 (Sorting nexin 6, SNX6) a proteinů A-kinase anchoring proteins (AKAPs)<sup>132,133</sup>. Jakmile je tvorba prvojader dokončena, maternální a paternální DNA podléhá S-fázi, následně dochází k syngamii prvojader, kondenzaci chromozómů a k prvnímu mitotickému dělení<sup>134</sup>.

V dalším vývoji embryonálního chromatinu zastupuje důležitou roli biogeneze jádérka<sup>135-137</sup>. Také pro tvorbu jádérka existují prekursory maternálního původu, přítomné v ooplasmě, protože k této tvorbě dochází před manifestací embryonálního genomu (tj. před EGA). Tyto prekursory jsou označovány jako „nucleolus precursor bodies“ (NPBs), sestávající z denzních sférických struktur tvořených fibrilami<sup>138</sup>. NPBs interagují s chromozómy v místech NORs (nucleolus organizes regions). Následuje tvorba retikulárního jádérka (reticulated nucleolus), které se již podobá jádérku somatické buňky. Další vývoj jádérka a proměna ve fibrilo-retikulární jádérko je známkou aktivity ribozomálních genů, resp. EGA. Aktivita a změny NPBs a NORs jsou nezbytné pro tvorbu ribozomálních podjednotek, které jsou v jádérku kódovány a vyžadovány pro progresivní proteosyntézu vyvíjejícího se embrya. Vzhledem k momentu EGA jsou všechna jádérka zygoty a embrya před EGA považována za maternální<sup>138-141</sup>.

Popsané molekulární změny jádra vedou k úspěšné EGA. Nicméně, EGA nabývá dvou podob: minoritní (minor EGA) a majoritní (major EGA)<sup>142,143</sup>. Zatímco minoritní EGA probíhá na paternálním genomu, který je demetylován aktivně a rychleji, majoritní EGA postihuje také maternální genom a představuje mohutnou manifestaci embryonálního genomu. K EGA dochází ve stádiu 2C u myšího embrya, 4-8C u embrya prasete a člověka, 8-16C u embrya skotu a člověka<sup>144-147</sup>. Výsledkem správné genové aktivity je další embryonální vývoj, první diferenciace blastomer ve stádiu 8C na buňky<sup>148</sup>, které později dají základ embryoblastu a alternativně trofektodermu, dále formace blastocysty, její expanze a nakonec uvolnění z obalu *zony pellucidy* (tzv. hatching). Právě toto stádium je předurčeno pro transfer do těla matky v případě asistované reprodukce, a proto jsou výše zmíněné procesy embryonálního vývoje, adekvátně probíhající alternativně v podmínkách *in vitro*, klíčové pro reprodukční medicínu a úspěšnou léčbu infertility.

### 1.3.3. Epigenetické změny embryonálního chromatinu

Mimo morfologicky patrnou genuzi prvojader prochází chromatin zygoty dynamickým změnám také na úrovni molekulární. Epigenetické změny maternálního i paternálního chromatinu terminálně diferencovaných gamet představují naprosto klíčový proces pro další vývoj embrya, tj. dediferenciaci terminálně diferencovaných a transkripčně inaktivních gamet v totipotentní zygotu (tj. MZT), reaktivaci genomu v embryu (embryonic genome activation, EGA) a dosažení správného genového imprintingu (differentially methylated regions, DMRs)<sup>134</sup>.

Epigenetické modifikace, v důsledku odpovědné za genovou expresi, probíhají na třech úrovních: i) nekódující RNAs (ncRNAs), které degradují mRNA a inhibují translaci. Tyto ncRNAs jsou maternálního původu a pochází z oocyty, stejně tak je ale přináší do oocyty spermie, která tímto reguluje oplození i progres dalšího embryonálního vývoje. ii) Metylace DNA prostřednictvím tvorby 5-metylcytosinu (5meC). iii) Post-translační změny (PTMs) histonů a tvorba tzv. histonového kódu. Správně proběhlé epigenetické změny jsou nezbytné pro pre- i post-implantační embryonální vývoj<sup>149–151</sup>. Nicméně, některé inadekvátní změny v epigenetických regulacích jsou slučitelné s vývojem embrya a dalším životem jedince. Tyto změny však mohou vážně ohrožovat zdraví jedince (Beckwith-Wiedemannův syndrom, civilizační choroby atd.)<sup>152,153</sup> a/nebo se dokonce přenášet do dalších generací prostřednictvím tzv. transgenerační dědičnosti<sup>154,155</sup>. Epigenetické regulace jsou velmi citlivé na nežádoucí vlivy vnějšího prostředí, včetně environmentálních polutantů, které mnohdy fungují v subtoxických dávkách právě epigenetickým módem mechanismu účinku<sup>156</sup>. Studium epigenetických změn proto představuje důležitý nástroj pro hodnocení těchto vlivů a hledání způsobů, jak negativní vlivy kompenzovat.

Množina ncRNAs zahrnuje long non-coding (lnc) RNAs, small non-coding (snc) RNAs a microRNAs, dále siRNA odpovědné za RNA interferenci a piwiRNA, interagující s piwi proteiny<sup>157–159</sup>. Maternální ncRNAs jsou syntetizovány přímo v oocyty oocyty<sup>160</sup> i v kumulárních buňkách<sup>161</sup>. Protože je popsán transport RNAs z kumulárních buněk do oocyty<sup>162</sup>, lze oba tyto zdroje považovat za klíčové maternální regulátory oplození a časného embryonálního vývoje tohoto druhu<sup>163</sup>. Také embryo produkuje vlastní ncRNAs<sup>164</sup>, jejichž úloha je předpokládána rovněž v buněčné diferenciaci časného embrya<sup>165</sup>. Syntéza ncRNAs podléhá komplexní enzymatické katalýze, za klíčové enzymy lze považovat DROSHA a DICER<sup>166,167</sup>. V oocytech hlodavců byla popsána pro oocyt specifická izoforma (DICER<sup>o</sup>)<sup>168</sup>.

Důležitým zdrojem ncRNAs pro časnou zygotu je spermie, která tímto přináší do oocyty epigenetický nástroj paternálního původu, určený pro regulaci oplození a embryonálního vývoje<sup>163</sup>. Úloha těchto ncRNAs spočívá v zajištění transkriptomické homeostázy v oocyty po oplození a během časného embryonálního vývoje. Tímto jsou ncRNAs klíčové pro správný průběh MZT s dalším dopadem na úspěšný embryonální vývoj a narození zdravého jedince<sup>163,169</sup>.

Mimo samotné přítomnosti nekódujících nukleových kyselin je dalším epigenetickým nástrojem, odvozeným od nukleových kyselin, jejich modifikace. Dosud ne plně popsanou úlohu sehrává modifikace RNAs, např. metylace cytosinu a adeninu, hydroxymethylace a formylace cytosinu<sup>170,171</sup>. Avšak klíčovým epigenetickým nástrojem je modifikace DNA je přítomnost a metabolismus 5-methylcytosinu (5meC)<sup>172</sup>. Za tuto modifikaci, v lokusech bohatých na cytosin (CpC), jsou odpovědné DNA metyl transferázy (DNMTs)<sup>173–175</sup>, které katalyzují adici metylové skupiny z donoru S-adenosyl-1-methionin na cytosin vlákna DNA. DNMTs tak tvoří metylované lokusy DNA *de novo* (DNMT3, DNMT3L) během buněčné diferenciace, během *de novo* genového imprintingu během gametogeneze a lyonizace inaktivního X chromozómu<sup>176–178</sup>. Jiná DNMT (DNMT1) se váže na hemimetylovanou dvoušroubovici DNA a tak udržuje metylovaný status během buněčného cyklu, kdy metyluje tyto lokusy na dceřinném vlákně dle mateřské předlohy<sup>175</sup>. K demethylaci DNA dochází excíí metylované báze a nahrazením nemetylovaným cytosinem anebo prostřednictvím enzymatické demethylace za tvorby hydroxymethylcytosinu (5hmC), následně další oxidací 5-formylcytosinu a 5-carboxylcytosinu<sup>179</sup>. Enzymy, katalyzující demethylaci, přísluší rodině TET dioxygenase, následované akcí thymine DNA glycosylase (TDG)<sup>180,181</sup>, přičemž tato molekulární mašinerie sehrává pro reprodukci klíčovou úlohu v celogenomové demethylaci ve dvou okamžicích ontogeneze: i) demethylace prvojader zygoty a ii) o několik dní později v demethylaci PGCs (shrnuto v Hájková *et al.*)<sup>182</sup>.

Vysoce metylovaná DNA pohlavních buněk krátce po oplození oocyty podléhá demethylaci. Demethylace paternálního prvojádra po oplození a během časného embryonálního vývoje probíhá výrazně rychleji než v případě maternálního genomu<sup>183,184</sup>. Navzdory dlouho přijímanému dogmatu, že demethylace paternálního prvojádra probíhá aktivně, zatímco demethylace maternální DNA je pasivní (dilution)<sup>185</sup>, je dnes dokázáno, že enzymaticky katalyzována je demethylace obou prvojader, byť s rozdílnou rychlostí<sup>186,187</sup>. Demethylace DNA v zygotě a časném embryu však není totální a zůstává zde bazální hladina DNA metylace v podobě lokusů DMRs, odpovědné za monoalelickou genovou expresi během embryonálního vývoje<sup>188</sup>.

Metylační stav embryonální DNA během časného embryonálního vývoje opět narůstá, kdy metylace DNA představuje nástroj buněčné diferenciace, byť se jedná o rozlišení embryoblastu a trofektodermy<sup>189,190</sup>. Během dalšího post-implantačního vývoje embrya a osídlování budoucích gonád progenitory gamet (tj. PGCs) dochází v těchto PGCs k opětovné demethylaci<sup>177,191,192</sup>. Důsledkem je vymazání epigenetické paměti, včetně genového imprintingu, v zárodečných pohlavních buňkách. Následně dochází k opětovnému nárůstu metylace DNA tak, jak dochází k dělení a diferenciaci PGCs, včetně znovu-ustanovení genového imprintingu v DMRs<sup>192–194</sup>.

Změny metylace DNA jsou doprovázeny a úzce spjaty s PTMs jaderných histonů, jejichž dynamika do velké míry kopíruje demethylaci a metylaci DNA. Histony a jejich PTMs, jako metylace, acetylace či

ubiquitinace lyzinů (K), metylace argininů, fosforylace serinů (Ser)/threoninů (Thr), tvoří tzv. histonový kód. U nižších organismů, jako jsou kvasinky či octomilka (*Drosophila sp.*) nahrazuje histonový kód úlohu metylace DNA, která zde zcela chybí anebo se uplatňuje jen v omezené míře<sup>195,196</sup>. Mezi nejčastěji a nejlépe prostudované dílčí PTMs histonového kódu patří metylace a acetylace histonů H3 a H4. Methylace těchto histonů je zpravidla spjata s genovou represí, tvorbou heterochromatinu a stabilitou DNA. Di- a/nebo trimethylace histonů (H3K9me2/3, H3K27me3) jsou tak pozitivně korelovány s DNA metylací a nabývají velmi podobné dynamiky během oplození, časného embryonálního vývoje a celogenomové demethylace<sup>182,191</sup>. Výjimečnou PTM je metylace H3 na lysinu K4 (H3K4me2), která je překvapivě spojena s opačnou podobou chromatinu – euchromatin, genová exprese a tak i citlivost DNA k poškození<sup>197,198</sup>. Tak dochází, s demethylací histonových markerů pro heterochromatin, k nárůstu H3K4me3 v genových promotorech<sup>151</sup>. Tyto změny jsou totiž ve většině případů způsobeny acetylací histonů, která nahrazuje metylaci stejných lyzinových reziduí<sup>199–201</sup>.

Histonový kód, ve své známé podobě, nabývá během embryonálního vývoje dynamiky, s ohledem na metylační status DNA. Podobně, jako v případě 5mC, je také histonový kód asymetrický, tzn. odlišný v chromatinu maternálního a paternálního původu. Vzhledem k širšímu sortimentu modifikací jednotlivých histonů je tato asymetrie patrnější a pozorovatelná dle více molekulárních markerů. Nicméně, za dobře popsané a sledovatelné znaky histonového kódu, který v embryu podléhá nápadné asymetrii, lze považovat acetylaci a metylaci histonu H3 na témže lyzinovém reziduu K9 (H3K9me2/3, resp. H3K9Ac)<sup>73,202–204</sup>.

Změny histonů a tak utváření histonového kódu včetně probíhajících změn probíhají pod kontrolou řady enzymů: histon metyl transferázy, demethylázy, acetyl transferázy, histon deacetylázy, ubiquitin ligázy, kinázy a další (shrnuto v Nevoral and Sutovsky)<sup>134</sup>. Mimo proteinů existuje pádný předpoklad, že také ncRNAs původem ze spermií jsou zapojeny do regulace časného embryonálního vývoje prostřednictvím modulace histonového kódu<sup>205,206</sup>.

Aktivita zmíněných faktorů, utvářejících a udržujících histonový kód, odpovídá a předchází dynamice změn histonových PTMs. Zvláštní postavení během oplození a časného embryonálního vývoje má ve výčtu těchto regulačních faktorů skupina histon deacetyláz (SIRT, sirtuiny)<sup>134</sup>. SIRT1 představuje univerzální protein se schopností přímo deacetylovat jaderný histon H3 na lysinu K9 (H3K9ac) v prvojádrech zygoty. Nepřímá regulace, prostřednictvím MDM2 E3-ubiquitin ligázy, vede ke zvýšené metylaci téhož lysinového rezidua (H3K9me2/3)<sup>73</sup>. Tyto změny zjevně vedou k úspěšnějšímu embryonálnímu vývoji a vyšší kvalitě blastocyst<sup>207,208</sup>.

Jemná rovnováha všech zmíněných enzymů, odpovědných za příslušné změny epigenetického kódu, je nezbytným předpokladem úspěšného oplození, tvorby prvojader a dalšího embryonálního vývoje, včetně klíčového momentu embryonálního vývoje: EGA.

#### 1.3.4. Mitofágie a heteroplazmie

Ihned po penetraci spermie do oocyty je spuštěna autofágie paternálních mitochondrií<sup>209</sup>. Tento fenomén, označovaný jako mitofágie, je příčinou skutečnosti, že mitochondrie, a s nimi také mitochondriální DNA (mtDNA), se dědí striktně po maternální linii.

Mitofágie v somatických buňkách i gametách je založena na degradaci prostřednictvím označení ubiquitin-proteasomálním systémem (UPS), tvorbě agregozómu a endocytóze mitochondrií. Mitofágie tak představuje jeden z tzv. makroautofagických procesů, odpovědných za degradaci dvou-membránových organel. Ve fyziologii buňky představuje proces mitofágie nezastupitelné místo v životním cyklu mitochondrií, jejichž populace se tímto udržuje životaschopná, zejména s ohledem na přirozeně se vyskytující velké množství mutací mtDNA. Mitofágie představuje potenciální signální kaskádu, jejíž znalost lze implikovat do medicínské praxe v případech, kdy jsou poruchy mitofágie spojeny s patogenezi<sup>210</sup>.

Za klíčový mechanismus, spouštějící mitofági, je považována signalizace dvou proteinů: PARKIN (E3 ubiquitin ligáza) a jeho aktivátoru Ser/Thr kinázy PINK1 (PTEN-induced putative kinase 1)<sup>211,212</sup>. PARKIN v tomto případě sehrává úlohu E3 ubiquitin ligázy, ubiquitinující membránové proteiny mitochondrie a předurčující je pro proteasomální degradaci<sup>213</sup>. Alternativně je mitofágie indukovaná receptory FUNDC1, NIX a BNIP3, které indukují mitofági PINK1-PARKIN-independentní cestou<sup>214</sup>. Tyto receptory interagují, nezávisle na PARKIN-dependentní signalizaci, s LC3 $\alpha$  (Microtubule-associated protein 1 light chain 3 $\alpha$ ) a zprostředkovávají tvorbu autofagozómu<sup>215</sup>. LC3 $\alpha$  je mimoto deacetylován SIRT1<sup>216</sup>, čímž se tato histon deacetyláza stává důležitým faktorem mitofágie<sup>217,218</sup>. Takto vzniklý autofagozóm fúzuje s lysozómem za vzniku autolysozómu, kde je mitochondrie zcela degradována.

Obecné principy mitofágie lze jen částečně uplatnit v mitofági paternálních mitochondrií spermií (sperm mitophagy). Přestože také v zygotě jsou do mitofágie zapojeny klíčové regulátory PINK1 a PARKIN<sup>219</sup>, představuje mitofágie vysoce specifický systém řízený oocytem, který je namířen pouze proti mitochondriím spermie. Tato skutečnost vyžaduje faktory odpovědné za označení mitochondrií spermií. Mezi těmito faktory byl popsán ubiquitin vázající protein p62/SQSTM1 (sequestosome 1)<sup>220</sup>. Po proniknutí spermie do oocyty podléhají mitochondrie, rozpoznané na základě přítomnosti SQSTM1, formaci autofagozómu pomocí GABARAP (GABA type A receptor-associated protein). Mimo SQSTM1 a GABARAP, za další potenciální faktor, odpovědný za specifickou degradaci mitochondrií spermií v zygotě, lze označit valosin containing protein (VCP)<sup>221</sup>. Ko-inhibice těchto faktorů vede k perzistujícím mitochondriím ve 2 a 4-buněčných embryích prasete<sup>220</sup>, kde dochází za fyziologických podmínek k progresivní mitofági již ve stádiu zygoty<sup>222</sup>.

Dalším potenciálním mechanismem, kterým je mitofágie v reprodukci regulována, jsou post-translační modifikace odpovědných faktorů. Takto byla popsána S-sulfhydratace PARKIN a její nezbytnost pro funkci tohoto proteinu<sup>223</sup>. Nedostatečná produkce gasotransmiteru H<sub>2</sub>S a/nebo porucha S-

sulfhydratované domény PARKIN lze považovat za jednu z příčin poruch mitofágie také v reprodukčních procesech. Narušení procesu mitofágie po oplození je možnou příčinou stavu jedince zvaného heteroplazmie, kdy jsou v buňkách přítomny dva a více genotypy mtDNA<sup>224</sup>. Pokud heteroplazmie vykazuje klinické příznaky, dochází k projevům tzv. mitochondriálních chorob, postihujících nejčastěji nervovou soustavu. Často je však heteroplazmie doprovázena nespecifickými klinickými projevy, které se mohou projevit ve formě snížené reprodukce anebo úplné infertility<sup>225</sup>.

#### 1.4. Ženská infertilita

Výše zmíněné procesy popisují optimální situaci, která vede k vzniku nového jedince. Existuje však mnoho případů, kdy jsou fyziologické procesy narušeny, které poté vedou k projevům neplodnosti – infertilitě. Tento pojem u člověka představuje stav, kdy u páru v reprodukčním věku po min. jednom roce pravidelného nechráněného styku nedojde ke graviditě. Z biologického hlediska je infertilitou situace, kdy dochází k poškození reprodukčních funkcí, odpovědných za produkci oplození schopných gamet. Biologický úhel pohledu se zdá být přísnější, i přes svoji vágnější formulaci, než ten medicínský, protože neumožňuje kompenzaci biologického nedostatku v čase, nýbrž popisuje stav, který je v daném okamžiku neslučitelný s počtím nového jedince.

Ženská infertilita je popsána prostřednictvím mnoha syndromů. Za nejčtenější a nejlépe prostudované primární poruchy ovárií lze považovat PCOS (Polycystic ovary syndrome), POFS (Premature ovarian failure sndrome) a MOFS (Multi-oocyte follicle sndrome)<sup>226–228</sup>. Právě u těchto syndromů lze předpokládat příčiny, které na molekulární úrovni poškozují také samotný oocyt, a tak jsou postupy ART v takových případech nevyhnutelné<sup>229,230</sup>. Patologické změny na buněčné a molekulární úrovni lze považovat za čtenou příčinu idiopatické infertility. Z tohoto důvodu probíhá intenzivní výzkum nejen těchto příčin, ale také změn, ke kterým v poškozeném oocytu dochází, a způsobů, jež by negativní změny zvrátily<sup>231–233</sup>.

##### 1.4.1. Stárnutí oocyty a selhávání časného embryonálního vývoje jako příčina infertility

Ovulovaný oocyt, který prodělal úspěšné meiotické zrání a je zablokovan v 2. meiotickém bloku metafáze II, je předurčen k oplození, v podmínkách *in vivo* v dutině vejcovodu. Oplození schopnost oocyty je časově omezená a klesá s prodlužující se dobou od ovulace k oplození. Během této doby dochází k funkčním změnám oocyty, které jsou označovány jako stárnutí. Stárnutí oocyty je provázeno cytoplazmatickými změnami, jako je pokles faktorů odpovědných za udržení meiotického bloku (MPF, MAPK, CSF) a nárůstu aktivity Ca<sup>2+</sup>-dependentních enzymů (CaMKII, PKC), který následuje vzrůst intracelulární koncentrace Ca<sup>2+</sup> iontů. Změny stárnoucích oocyty stochasticky vedou k manifestaci tří možných fenotypů: spontánní partenogenetická aktivace oocyty, apoptóza (s projevem tzv.



fragmentace oocyty) nebo lýza oocyty<sup>234–236</sup>. Tyto změny nastávají v časovém horizontu prvních dní po ovulaci a představují osud oocyty v případě, kdy nedojde k oplození. Aktivovaný oocyt rovněž podléhá po čase apoptóze či lýze, a tak je stárnoucí oocyt, bez ohledu na fenotyp, předurčen k vstřebání v průběhu sestupu do děložní dutiny.

K stárnutí oocyty dochází alternativně v podmínkách *in vitro*, v případě získávání zralých oocytů punkcí folikulu pro účely *in vitro* oplození. V těchto podmínkách však nedochází k manifestaci zmíněných změn, protože jsou oocyty během několika hodin použity pro *in vitro* oplození metodou konvenční kokultivace se spermii anebo intracytoplazmatické injekce spermií do oocyty (ICSI). Nicméně, cytoplazmatické změny v oocyty probíhají, byť bez okamžitých zjevných příznaků. Tyto změny totiž mohou rozhodnout o kvalitě zygoty a úspěšnosti dalšího embryonálního vývoje (vyjádřeno např. parametrem „blastocyst rate“). Z tohoto důvodu je žádoucí studium stárnoucích oocytů, jeho příčin a možnosti optimalizace *in vitro* podmínek.

Stárnutí oocyty lze navodit v podmínkách *in vitro* tzv. prodlouženou kultivací. Této kultivaci jsou experimentálně vystaveny oocyty prasete a/nebo myši po dobu 24 – 72 hod. Během této doby lze studovat dílčí signální dráhy a hodnotit význam jejich zapojení dle incidence nežádoucích fenotypů (partenogenetická aktivace, fragmentace anebo lýza oocyty). Takto byla dosud ověřena role řady významných faktorů, mnohdy klíčových rovněž pro meiotické zrání, oplození a časný embryonální vývoj: růstové faktory<sup>235</sup>, kinázy<sup>118,234</sup> a/nebo histon deacetylázy<sup>237</sup> včetně skupiny sirtuinů<sup>77,238</sup>. S ohledem na signalizaci a protektivní účinek gasotransmiterů během meiotického zrání byly také ve stárnoucích oocytech studovány plynné molekuly NO a H<sub>2</sub>S<sup>94,239</sup>.

Protože je úloha NO známá v aktivaci oocyty a průběhu časného embryonálního vývoje<sup>97,99,240,241</sup>, není překvapením, že je tento gasotransmitter zapojen také do regulace stárnutí oocytů<sup>239,242</sup>. V případě NO je jeho protektivní účinek nejednoznačný<sup>243–245</sup>; NO je v tkáních a tělních tekutinách markerem zánětlivé reakce<sup>246</sup>, avšak jeho fyziologická produkce je nezbytná pro řadu biologických dějů na úrovni buněk i tkání<sup>247</sup>. Také dosavadní poznatky o prospěšnosti NO ve stárnoucích oocytech nejsou jednotné. Bylo tak zjištěno, že pozitivní účinek má jak donor NO, tak inhibice jeho enzymatického uvolňování<sup>93</sup>. Role H<sub>2</sub>S je v procesu stárnutí o poznání přehlednější. Přestože i zde lze očekávat potenciální toxický účinek, je přítomnost H<sub>2</sub>S v koncentracích adekvátních buněčné signalizaci nezbytná pro udržení viability buněk, včetně oocytů<sup>94</sup>. Molekulárním mechanismem účinku se zdá být, podobně jako v somatických buňkách<sup>248,249</sup>, regulace Ca<sup>2+</sup> a K<sub>ATP</sub> kanálů a bilance iontů v oocytech<sup>236</sup>.

#### 1.4.2. Endokrinní disruptory jako příčina infertility

Za vážnou příčinu idiopatické neplodnosti jsou v současné době považovány endokrinní disruptory<sup>250</sup>. Tyto látky lze označit za polutanty životního prostředí, které se vyskytují často ve velmi nízkých

koncentracích, které nepůsobí toxicky, avšak jejich molekulární účinek postihuje endokrinní systém<sup>251</sup>. Do široké skupiny endokrinních disruptorů patří komponenty plastických hmot (bisfenoly)<sup>252</sup>, pesticidy (DDT, pyretroidy, vinclozolin)<sup>253,254</sup>, zpomalovače hoření (organofosfáty)<sup>255</sup> a další.

Pro endokrinní disruptory jsou společné následující vlastnosti: i) trvalé zatížení životního prostředí průmyslovou výrobou a použitím těchto látek, často v obalových materiálech přicházející do styku s potravinami; ii) soustavná expozice lidské populace velmi nízkými, subtoxickými dávkami; iii) nelineární (také nemonotónní) efekt působení, často se projevující silnějším efektem nižších dávek než dávek vyšších; iv) postižena je hormonální soustava exponovaného jedince, na úrovni buňky často specifické receptory hormonů, kdy endokrinní disruptor simuluje přítomnost hormonu, v) často se negativní vliv endokrinních disruptorů uplatňuje a amplifikuje v expozičních oknech během specifických stádií ontogeneze a gametogeneze, vi) mnohdy paradoxní efekt kombinace endokrinních disruptorů, kdy jejich interakce vede ke kompenzaci dílčích efektů<sup>250,251,256,257</sup>.

Lidská populace je exponována endokrinními disruptory různým způsobem: velmi častým způsobem v případě obalových materiálů je příjem *per os*, s přijímanou potravou a/nebo nápoji. Endokrinní disruptory se stávají součástí bytového prachu a jsou inhalovány. Rozsáhlý příjem disruptoru může probíhat transdermální expozicí. Po expozici lze očekávat trojí způsob molekulárního mechanismu endokrinního disruptoru v organismu: genetický, také genotoxický, efekt, který postihuje zápis genetické informace v buňkách; tento efekt se uplatňuje především v toxických dávkách disruptoru<sup>258,259</sup>. Alternativním mechanismem účinku je negenomické působení endokrinních disruptorů, kde jsou mnohdy postiženy receptory buněk apod.<sup>260</sup> Za neblahý efekt pro potomky exponované generace, dojde-li k postižení linie pohlavních buněk, je odpovědný epigenetický efekt<sup>261</sup>. Mezi velmi rozšířené endokrinní disruptory současnosti, přijímané orálně i trans-dermálně, uplatňující se výše popsanými způsoby molekulární akce, patří bisfenoly.

Bisfenoly jsou širokou skupinou látek používaných v obalových materiálech, epoxydových pryskyřicích, polykarbonátech, termopapírech a dalších produktech každodenní spotřeby. Zatížení bisfenoly je pečlivě monitorováno, protože negativní účinek bisfenolu A (BPA) je dobře znám již řadu let. Z tohoto důvodu byly odpovědnými úřady (EFSA, FDA) stanoveny přijatelné hodnoty denního příjmu (TDI, *tolerable daily intake*). V některých výrobcích, jako jsou dětské lahve a hračky, bylo použití BPA zcela zakázáno. I jinde však dochází k soustavné eliminaci BPA, avšak na úkor použití alternativních komponent s podobnými fyzikálními a chemickými vlastnostmi: bisfenoly S, AF, F, popř. další. Za nejčtenější alternativu lze označit BPS. Pro podobnost této látky s eliminovaným BPA byl očekáván obdobný biologický efekt BPS na reprodukční vlastnosti. Opravdu byl zjištěn negativní účinek BPS na *in vitro* zrající oocyty prasete<sup>262</sup> a kvalitu oocytů<sup>263</sup> a embryí (nepublikovaná data) myši po expozici *in vivo*. Rovněž negativní vliv BPS na reprodukční funkce samců byl popsán<sup>264</sup>.



Pro studium molekulárního mechanismu je zapotřebí biologických modelů založených na systémech *in vitro* a *in vivo* expozice. Pro odhad skutečného rizika v lidské populaci a pro transfer poznatků do reprodukční medicíny je zapotřebí kombinace biologických modelů.

#### 1.5. Využití zvířecích modelů pro hodnocení endokrinních disruptorů

Odhad expozice člověka vybranými endokrinními disruptory probíhá na základě soustavného biomonitoringu široké populace. Je vhodné využít výstupy biomonitoringu, tedy odhad příjmu a farmakokinetiky vybraného disruptoru, jako vstupní informaci pro experimentální práci na biologických modelech.

Často jsou pro studium polutantů životního prostředí, včetně endokrinních disruptorů, používány modely hlodavců, tedy laboratorní myši a potkani. Tyto modely umožňují testovat zmíněné látky po *in vivo* expozici a tak vhodně simulovat způsob, kterým se disruptor do těla dostává (per os, transdermálně, inhalačně), dále farmakokinetiku polutantu v organismu a následně sledovat systémovou odpověď organismu na expozici endokrinním disruptorem. Experimentálně tak lze navodit expozici akutní (dny) nebo chronickou (týdny, popř. měsíce). Hlodavci navíc umožňují expozici *in utero*<sup>265</sup> a/nebo post-natální během mléčné výživy F1 generace<sup>266</sup>. Společným znakem pro tyto modely je přímá expozice matky a analýza reprodukčních funkcí potomků. Tyto modely umožňují expozici zárodečných buněk v časných stádiích gametogeneze.

Zejména myší model translaktační expozice představuje unikátní nástroj pro hodnocení vlivu bisfenolů na kojence z následujících důvodů: i) mateřské mléko, s případným obsahem bisfenolu/ů, představuje pro kojence výhradní potravu, ii) bisfenoly jsou liposolubilní a mateřský tuk zde slouží jako vehikulum, iii) kojenci jsou extrémně senzitivní vůči vlivu polutantů a endokrinních disruptorů, iv) kojení a příjem mateřského mléka je pro kojence citlivé expoziční okno vzhledem ke gametogenezi<sup>267</sup>, v) mimo mateřského mléka, kojenci jsou exponováni také prostřednictvím polykarbonátových kojeneckých lahví a plastových hraček<sup>268,269</sup>.

Data biomonitoringu lze hodnotně využít také pro *in vitro* expozice oocytů, kdy naměřené hodnoty endokrinních disruptorů ve folikulární tekutině lze pro experimentální účely simulovat odpovídajícím dávkováním disruptoru do kultivačního média. Pro tyto účely lze vhodně využít model prasečího oocytu, který umožňuje dobře hodnotit průběh meiotického zrání a současně ověřit poznatky dosažené na *in vivo* modelu myši. Prasečí oocyt je během zrání, obdobně jako lidský oocyt uzavřený ve folikulu, obklopený kumulárními buňkami a expanzi těchto buněk lze zahrnout do parametrů hodnocených v testování endokrinního disruptoru<sup>270</sup>. Dozrálý oocyt ošetřený během *in vitro* zrání lze následně oplodnit či partenogeneticky aktivovat a tím hodnotit vývojovou kompetenci oocytu (dosud nepublikovaná data).

Mimo simulace zrání oocytů *in vitro* je stejně hodnotným nástrojem *in vitro* oplození. Pro tento účel je vhodné využít model bovinních oocytů a embryí, které nepodléhají masivní incidenci polyspermií oplození, jako je tomu v případě prasečích oocytů. Proto nám bovinní model umožňuje genetické analýzy embryí a tak detailnější hodnocení vývojové kompetence oocyty po jeho ošetření během zrání. Bisfenoly mnohdy postihují dělicí vřeténko<sup>262,263,271</sup> a tak jsou předpokládánou příčinou aneuploidie (často trizómie). Prostřednictvím epigenetického vlivu mohou endokrinní disruptory negativně zasáhnout do genového imprintingu. Výsledkem takového poškození je mnohdy časná embryonální úmrtnost. V případech, kdy jsou defekty slučitelné se životem, vede špatná segregace chromozómů k chorobám, jako je Downův syndrom (trizómie 21. chromozómu), Patauův syndrom (trizómie 14. chromozómu), popř. Prader-Williho syndrom či Angelmanův syndrom v případě chromozomálních delecí, či Beckwithův-Wiedemannův syndrom v případě poruch epigenetického imprintingu. Dopad BPA na epigenetické změny a možné defekty genového imprintingu byly již popsány<sup>272,273</sup> a tak lze podobný efekt očekávat také u dalších endokrinních disruptorů včetně analogů BPA.

Kombinace biomonitoringu, *in vivo* expozice myši a *in vitro* expozice prasečích oocytů, popř. *in vitro* oplození prasečích a/nebo bovinních oocytů, se zdá být vhodným designem pro komplexní hodnocení endokrinních disruptorů. Kombinace jednotlivých modelů a jejich výhod umožňuje relevantní odhad rizika pro lidskou populaci a reprodukční zdraví. Pro popis molekulárního účinku endokrinních disruptorů je klíčový adekvátní výběr biologických markerů, k čemuž je nezbytné základní studium biologie oocyty, procesu oplození a embryonálního vývoje. Pouze znalost cílových struktur, které jsou endokrinně disruptivním efektem postiženy, dovoluje nalézt způsob/y, které negativní efekty endokrinních disruptorů eliminují. Pro ověřování takových způsobů je opět zapotřebí použití několika biologických modelů. Jen kombinace znalosti biologie buněk a využití více biomedicinských modelů může vést k vývoji postupů prevence a eliminace negativních efektů na lidskou reprodukci, náležitě opatřených duševní ochranou.

## 2. Materiál a metody

### 2.1. Biomonitoring endokrinních disruptorů v lidské folikulární tekutině

Biomonitoring byl zaměřen na vyjádření reálné expozice ženské populace bisfenolům. Studie biomonitoringu endokrinních disruptorů v lidské folikulární tekutině (hFF) byla provedena v souladu s platnou legislativou. Studie byla schválena místní Etickou komisí (Fakultní nemocnice Brno). Pacientky stvrdily poučení podpisem informovaného souhlasu.

*Sběr vzorků hFF:* vzorky hFF byly získány ve spolupráci s Centrem asistované reprodukce Fakultní nemocnice v Brně, od pacientek podstupujících léčbu asistovanou reprodukcí. Folikulární tekutina byla získána punkcí ovariálních folikulů po odpovídající hormonální stimulaci za účelem odběru oocytů pro *in vitro* oplození. Folikulární tekutina, jako vedlejší produkt odběru oocytů, byla po punkci a odběru oocytů skladována za standardních podmínek při teplotě  $-20^{\circ}\text{C}$  do dalšího použití, s vyloučením plastových obalů pro skladování.

*Příprava vzorků a analýza bisfenolů:* vzorky hFF byly analyzovány za účelem detekce a kvantifikace těchto bisfenolů: BPA, BPS, BPF, BPAF. Volné bisfenoly byly z odpovídajících glukuronidů uvolněny  $\beta$ -glukuronidázou a podrobeny derivatizaci 1-methylimidazol-2-sulfonyl chloridem. Izotopicky značené standardy BPA a BPS byly použity jako interní kontroly. Takto připravené vzorky byly analyzovány pomocí hmotnostního spektrometru (Dionex Ultimate 3000-Amazon SL, Bruker Daltonics).

### 2.1. Získávání, *in vitro* zrání a oplození prasečích oocytů

*In vitro zrání oocytů:* prasečí oocyty byly získávány z ovárií *post mortem*, na místních jatkách v Českém Brodě (Jatky Český Brod, spol. s r. o.), Příbrami (Jatky Příbram, spol. s r. o.) a Plzni (Jatky Plzeň, spol. s r. o.). Ovária pocházela z 8 – 10 měsíčních, dosud necyklujících, prasniček plemene Landrace x České bílé ušlechtilé. Ovária byla do dvou hodin od odběru dopravena do laboratoře ve fyziologickém roztoku při teplotě  $35 - 39^{\circ}\text{C}$ . Kumulo-oocytární komplexy (COCs) byly získávány aspirací injekční stříkačkou a jehlou (20G) z folikulů o průměru 3 – 5 mm. COCs byly manipulovány a oplachovány v modifikovaném Tyrodeho roztoku, pufrovaném HEPES a obsahující 0,01% polyvinyl alkohol (TL-HEPES-PVA). Pouze COCs s plně dorostlými nezralými oocyty ( $\sim 120 \mu\text{m}$  v průměru), ve stádiu zárodečného váčku, byly vybrány pro další použití. Následovalo *in vitro* zrání (též *in vitro* maturace) v modifikovaném maturačním médiu na bázi tissue culture medium (mTCM; Gibco, Life Technologies, UK), doplněném o 0,1% PVA, D-glukózu (3,05 mM), pyruvát sodný (0,91 mM), L-cystein (0,57 mM), luteinizační hormon (LH; 0,5  $\mu\text{g}/\text{ml}$ ; Sigma-Aldrich, USA), folikuly stimulující hormon (FSH; 0,5  $\mu\text{g}/\text{ml}$ ; Sigma), epidermální růstový faktor (EGF; 10  $\text{ng}/\text{ml}$ ; Sigma), prasečí folikulární tekutinu (10% v/v), penicilin G (75  $\mu\text{g}/\text{ml}$ ) a streptomycin (50  $\mu\text{g}/\text{ml}$ ). COCs byly kultivovány v 0,5 ml tohoto média v *in vitro* podmínkách řízené atmosféry ( $39^{\circ}\text{C}$ , 5%  $\text{CO}_2$ ), umístěné v 4-jamkových Petriho miskách po dobu 44 hod. *In vitro* dozralé

COCs byly využity pro další experimenty (hodnocení kumulární expanze, *in vitro* oplození, prodloužená kultivace, imunocytochemie a konfokální mikroskopie, western blot).

*In vitro oplození a produkce embryí:* po *in vitro* maturaci COCs byly kumulární buňky corona radiata odstraněny pomocí 0,1% hyaluronidázy a dozrálé oocyty s extrudovaným pólovým tělískem byly použity pro *in vitro* oplození v modifikovaném médiu pufovaném Tris (mTBM) s přídatkem 0,2 % bovinního sérového albumin (BSA; A7888, Sigma). Oocyty byly umístěny do 100 $\mu$ L kapky překryté minerálním olejem v Petriho misce. Kančí spermie, určené pro *in vitro* oplození, byly opláchnuty ve fosfátovém pufru (PBS) s 0,1% PVA pomocí centrifugy (1500 rpm, 5 min.). Spermie byly následně resuspendovány v mTBM médiu v koncentraci 2,5 – 5 x 10<sup>7</sup>/ml. 1  $\mu$ l suspence bylo přidáno do mTBM s oocyty, kde výsledná koncentrace dosahovala 2,5 - 5 x 10<sup>5</sup>/ml. Oocyty byly ko-inkubovány se spermii 5 – 6 hod. Při 39°C a 5% CO<sub>2</sub>. Oplozené oocyty byly následně přemístěny do 100  $\mu$ l kapky média PZM3, s přídatkem 0,4 % BSA (A6003; Sigma). Oplozené oocyty byly následně kultivovány *in vitro* po dobu 22 hod. za účelem izolace jednobuněčných zygot. Blastocysty byly získávány po další *in vitro* kultivaci za srovnatelných podmínek v celkové délce 144 hod.

*Prodloužená kultivace a stárnutí oocytů:* alternativně k *in vitro* oplození byly zralé oocyty vystaveny prodloužené kultivaci v mTCM médiu. Po 72 hod. byl vyhodnocen výsledek prodloužené kultivace dle manifestace stárnutí oocytů: partenogenetické aktivace, programované buněčné smrti anebo lýzy.

*Farmakologické ošetření oocytů/embryí:* za účelem studia zrání nebo stárnutí oocytů docházelo k farmakologickému ošetření zrajících oocytů přídatkem donoru H<sub>2</sub>S (Na<sub>2</sub>S\*9H<sub>2</sub>O), resp. inhibitorů H<sub>2</sub>S-uvolňujících enzymů (oxamová kyselina, D,L-propargylglycin,  $\alpha$ -ketoglutarová kyselina), do kultivačního média mTCM. Oplozené oocyty byly ošetřovány aktivátory (resveratrol, BML-278) nebo inhibitory SIRT1 (nikotinamid, sirtinol), přídatkem do kultivačního média PZM3.

## 2.2. Hodnocení kumulární expanze

Kvalita *in vitro* dozrálých oocytů prasete byla hodnocena podle intenzity expanze kumulárních buněk corona radiata, obklopujících oocyt a tvořící COC. Pro hodnocení bylo využito subjektivní metody (vizuální skórování), objektivní metody (měření plochy) a analytické metody (měření obsahu hyaluronové kyseliny - HA). Tyto metody byly navzájem porovnány.

*Vizuální skórování:* COCs expandované *in vitro* byly klasifikovány podle dříve publikovaných kritérií (Vanderhyden 1990). Podle těchto kritérií byly rozlišovány 4 stupně kumulární expanze: 0 – žádná expanze, 1 – minimální expanze, 2 – expanze několika vrstev kumulárních buněk, 3 – kompletní expanze mimo buněk corona radiata, 4 – kompletní expanze včetně buněk corona radiata.

*Měření plochy expandovaných COCs:* pomocí stereomikroskopu a monochromatické kamery byly získávány fotografie v průběhu celé *in vitro* kultivace v intervalu 8 hod. Fotografie byly podrobeny

analýze obrazu v programu NIS Elements (Laboratory Imaging, Česká republika). Hodnoty plochy expandovaných COCs byly vztaženy k maximální expanzi po 44 hod. *in vitro* kultivace a vyjádřeny relativně.

*Měření obsahu hyaluronové kyseliny (HA):* v rámci studia kumulární expanze byla vyvinuta metoda měření obsahu HA zadržené v extracelulární matrix kultivovaných COCs. Skupina 25 COCs po 44 hod. *in vitro* kultivace byla opláchnuta ve fosfátovém pufru (PBS) s 0,1 % PVA. Následně byly COCs inkubovány v objemu 0,5 ml s 2 IU/ml lyázy ze *Streptomyces hyalurolyticus* (H1136, Sigma) přes noc při teplotě 39°C. Množství HA bylo vyjádřeno v µg/ml HA odečtené dle digestovaných standardů sodné soli HA.

### 2.3. *In vitro* zrání a ošetření oocytů žab *Xenopus laevis*

Experimenty, založené na použití oocytů žab *Xenopus laevis*, probíhaly na partnerském pracovišti prof. Jeana-Francoise Bodarta na Université de Lille, Francie. Samice žab byly drženy v účelovém zařízení Université de Lille v souladu s evropskou legislativou (86/609/EEC) a se souhlasem místní etické komise (Comité d’Ethique en Expérimentation Animale Nord-Pas-De-Calais, CEEA 07/2010).

Ovariální fragmenty byly chirurgicky vyjmuty ze samic *Xenopus laevis* po anestézii (tricaine methane sulfonate). Ovariální tkáň byla následně umístěna do média ND96<sup>98</sup>, s obsahem kolagenázy A (1mg/ml; Roche), po dobu 30 min. Následovala manuální disekce plně dorostlých oocytů (stádia VI) z folikulů pomocí tenkých pinzet a stereomikroskopu. Takto izolované oocyty byly skladovány několik hodin při teplotě 14°C do použití v experimentu. Zrání oocytů bylo indukováno přidavkem progesteronu (4µg/ml; Sigma). Během zrání oocytů došlo k jejich ošetření donory gasotransmiterů H<sub>2</sub>S nebo NO, alternativně byly zrající oocyty ošetřeny inhibitory enzymů fyziologicky uvolňujících tyto gasotransmitery. Oocyty byly takto kultivovány 16 hod. při teplotě 19°C a progres meiotického zrání byl zaznamenán podle přítomnosti bílé skvrny na animálním pólu oocytu.

Z dozrálých oocytů byly připraveny vzorky pro proteomickou analýzu a skladovány v -20°C do použití v laboratoři partnerského pracoviště anebo laboratořích Biomedicínského centra v Plzni.

### 2.4. Laboratorní chov myší a expozice endokrinními disruptory

*Legislativa:* experimenty na laboratorních myších byly provedeny v souladu se Zákonem č. 246/1992 Sb., na ochranu zvířat proti týrání, v akreditovaném uživatelském zařízení Lékařské fakulty v Plzni a se scháleným projektem pokusu (MSMT-11925/2016-3).

*Chov myší:* laboratorní myši outbredního kmene ICR byly nakupovány ve věku 4 nebo 8 týdnů ze společnosti Velaz spol. s r. o. (Praha, Česká republika). Ihned po nákupu byly myši náhodně rozděleny do experimentálních skupin a před započítáním expozice min. 1 týden aklimatizovány. Myši byly drženy

ve standardních podmínkách v polysulfonátových nádobách ve zvěřinci Biomedicínského centra (Lékařská fakulta v Plzni), s fotoperiodou 12L : 12D, při teplotě  $21 \pm 1$  °C a relativní vlhkosti vzduchu 60%. Myši byly krmeny ad libitum dietou prostou fytoestrogenů (Altromin, 1814P; Velaz) a napájeny sterilní vodou ze skleněných lahví s kovovým pítkem.

*In vivo expozice endokrinními disruptory:* experimentální myši byly podrobeny chronické (4 týdny) anebo akutní (7 dní) expozici bisfenolem S (BPS). V obou případech byly zvoleny následující dávky BPS: 0, 0.001, 0.1, 10 a 100 ng . g ž. h.<sup>-1</sup> . den<sup>-1</sup> (BPS1 – BPS4). BPS byl administrován prostřednictvím napájecí vody v případě chronické expozice, resp. prostřednictvím 50% glycerolu per os v případě chronické expozice. Expozice zahrnovala kontrolní skupinu ošetřenou vehikulem.

*Sběr vzorků:* experimentální myši byly pro účely izolace ovárií usmrčeny cervikální dislokací. Ovária byla následně zpracována pro další experimenty (izolace oocytů, western blot). V případě chronické expozice BPS bylo izolováno krevní serum za účelem měření hormonálního profilu.

*Hormonální profilování:* Krevní sérum bylo podrobena analýze hormonů LH, FSH a 17β-estradiolu. Hladiny LH a FSH byly analyzovány pomocí Milliplex MAP kitu (HPTP1MAG-66K; Millipore, Merck, USA). 17β-estradiol byl analyzován pomocí ELISA kitu (Abcam, UK).

## 2.5. Hodnocení samičí reprodukce *in vivo*

*Hodnocení citlivosti k hormonální stimulaci:* myši byly po ukončení chronické expozice hormonálně stimulovány za účelem hodnocení citlivosti k hormonální stimulaci. Myši byly ošetřeny i. p. 5 IU gonadotropinem séra březích klisen (PMSG). Po 48 hod. byly myši dále ošetřeny i. p. injekcí 5 IU humánním choriovým gonadotropinem (hCG). 16 hod. po injekci hCG byly izolovány *in vivo* dozrálé oocyty výplachem vejcovodů post mortem. Oocyty byly podrobeny kvantitativní analýze a následně byly použity pro další experiment (imunocytochemie, konfokální mikroskopie a analýza obrazu).

*In vivo fertilization assay:* pro hodnocení schopnosti oplození *in vivo* byly myši, ošetřené PMSG a hCG dle výše zmíněného schématu, zapouštěny prověřeným samcem následně po injekci hCG. V den E1,5 embryonálního vývoje byla vypláchnuta dvoubuněčná embryo z vejcovodů post mortem. Embrya byla podrobena kvantitativní analýze a následně použita pro další experiment (imunocytochemie, konfokální mikroskopie a analýza obrazu).

## 2.6. Izolace a kultivace myších oocytů

*Získávání a in vitro zrání oocytů:* pro účely základního studia biologie myšího oocytu byly získávány nezralé myší oocyty ve stádiu zárodečného vajíčku. Pro maximalizaci zisku oocytů byly myši administrovány i. p. 5 IU PMSG. 46 – 48 hod. po injekci byly izolovány ovária post mortem. Tkáň ovárií byla mechanicky destruována pomocí injekčních jehel (27G) v manipulačním médiu M2 (M7167,

Sigma). Spontánní zrání oocytů během manipulace bylo blokováno přidavkem 3-isobutyl-1-methylxantinu (IBMX) do média M2. Plně dorostlé oocyty (s průměrem ~95 μm), prosté kumulárních buněk a s viditelným zárodečným váčkem byly použity pro *in vitro* zrání v kultivačním médiu M16 (M7292, Sigma) po dobu 16 hod. v podmínkách řízené atmosféry (37°C, 5% CO<sub>2</sub>).

*Farmakologické ošetření oocytů:* za účelem studia zrání oocytů docházelo k farmakologickému ošetření přidavkem aktivátoru SIRT1 (BML-278), přidavkem do kultivačního média M16. Pro potřeby studia dynamiky α-tubulinu byly dozrálé oocyty kultivovány 45 min. v přítomnosti inhibitoru depolymerace α-tubulinu (taxol).

## 2.7. Imunocytochemie, konfokální mikroskopie a analýza obrazu

Pro účely studia meiotického zrání byly po ukončení kultivace prasečí a myší oocyty/embrya fixovány a dále zpracovány metodou imunocytochemie, konfokální mikroskopie a analýzy obrazu.

*Fixace a permeabilizace:* pro vizualizaci cytoskeletárních a cytoplazmatických faktorů byly oocyty fixovány pomocí 4% PFA-PVA (4% PFA a 0.1% PVA v PBS) po dobu 30 min. při laboratorní teplotě. Následovala permeabilizace v PBS obsahujícím 0.04% Triton X-100 a 0.3% Tween 20, po dobu 15 min.

*Alternativní fixace a permeabilizace:* pro vizualizaci post-translačních modifikací histonů byly oocyty před fixací permeabilizovány v 0.03% Tween 20 v PBS-PVA po dobu 20 sec. Následovala fixace v 4% PFA-PVA s přidavkem 0.04% Triton X-100 a 0.3% Tween 20, po dobu 15 min. při 37°C. Poté byla provedena permeabilizace v PBS obsahujícím 0.04% Triton X-100 a 0.3% Tween 20, po dobu 15 min.

*Alternativní ošetření chromatinu:* pro vizualizaci metylovaného cytosinu byly fixované (4% PFA a 0.1% PVA v PBS) a permeabilizované (0.04% Triton X-100 a 0.3% Tween 20) oocyty/embrya ošetřeny 1M HCl po dobu 30 min., neutralizovány v TRIS-HCl po dobu 10 min. a inkubovány v přítomnosti 0.25% (w/v) trypsinu 1 min. při 37°C.

*Inkubace s primární a sekundární protilátkou:* po blokování oocytů/embryí v roztoku BPS-TX-100-1% BSA po dobu 15 min. byly pro detekci vybraných faktorů použity specifické myší/králičí mono-/polyklonální protilátky. Koktejl dvou vybraných protilátek by připraven v blokovacím roztoku ředěním 1 : 200. Po 1hod. inkubaci byly oocyty/embrya opláchnuty v blokovacím roztoku (4x 15 min.) a inkubovány s koktejlem sekundárních anti-myších/anti-králičích protilátek konjugovaných s fluoresceiny (AlexaFluor 488/AlexaFluor 647; Abcam, UK) po dobu 1 hod., v ředění 1 : 200. Následoval oplach oocytů/embryí (4x 15 min.), během něhož došlo k obarvení β-aktinu pomocí inkubace s phalloidinem (1:200) po dobu 15 min. Následně byly připraveny mikroskopické preparáty pomocí média Vectashield obsahující 4'6'-diamidino-2-phenylindole (DAPI; Vector Laboratories Inc., Burlingame, CA, USA).



*Konfokální mikroskopie:* preparáty byly podrobeny snímání na konfokálním mikroskopu se spinning diskem (Olympus, Německo), za použití 100x objektivu a laserů s příslušnou vlnovou délkou odpovídajících použitým fluoresceinům (DAPI, AlexaFluor 488, phalloidin-594, AlexaFluor 647).

*Analýza obrazu:* analýza nasnímaných fotografií proběhla v programu ImageJ (NIH, Bethesda, USA). Signál fluoresceinu, příslušící sledovanému proteinu, byl hodnocen dle parametru „Integrated density“ a vztažen k průměru kontrolních oocytů/embryí. V případě analýzy subcelulární lokalizace dvou vybraných proteinů bylo využito kolokalizační analýzy pomocí modulu JACoP (Just Another Co-localisation Plugin) dle dříve publikovaného postupu (Bolte and Cordelieres<sup>54</sup>). Součástí analýzy oocytů bylo hodnocení úspěšnosti zrání dle vizualizace DAPI (chromatin) a vyjádření četnosti následujících stádií meiotického zrání: GV – stadium zárodečného váčku (germinal vesicle), MI – metafáze 1. meiotického dělení, a MII – metafáze 2. meiotického dělení.

## 2.8. Elektroforéza a western blot

*Příprava vzorků:* oocyty prasete/žab *Xenopus laevis*/myši byly po izolaci lyzovány v Laemmliho loading pufru obsahujícího Triton-X-100 (0.003%, v/v) SDS (0.001%, v/v), obohaceného o inhibitory proteáz Complete Mini Protease Inhibitor Cocktail (Roche, Švýcarsko). Vzorky byly povařeny při 97°C po dobu 5 min. a skladovány do dalšího použití.

*Elektroforéza:* pro separaci proteinů byla použita SDS polyakrylamidová gelová elektroforéza s použitím komerčně dostupných gradientových 4-12% gelů.

*Western blot:* proteiny byly následně blotovány na PVDF membránu pomocí Trans-Blot Turbo™ Transfer System (Bio-Rad Laboratories, Steenvoorde, France). Poté následovala blokáce membrány 1% roztokem BSA v TBS-T (Trisem pufovaný roztok s přísadkou 0.5% Tween-20) po dobu 1 hod. při laboratorní teplotě. Membrána byla následně inkubována s roztokem specifické myši nebo králíčí, mono- nebo polyklonální, protilátky (1: 1 000), přes noc při teplotě 4°C. Následoval oplach v TBS-T a inkubace s anti-myší, resp. anti-králíčí protilátkou (1 : 15 000) konjugovanou s křenovou peroxidázou, po dobu 1 hod. při laboratorní teplotě. Takto označené proteiny byly na membráně vizualizovány pomocí chemiluminiscenčního kitu ECL Select Western Blotting Detection Reagent (GE Healthcare Life Sciences, Amersham, UK) a ChemiDoc™ MP System (Bio-Rad Laboratories, Steenvoorde, France).

## 2.9. Statistická analýza

Získané výsledky pozorování byly analyzovány v programu SAS 9.0 (SAS Institute, Cary, NC, USA) nebo Statistica Cz 12 (StatSoft, Inc., Tulsa, OK, USA). Po testu normality rozdělení následovala pro obecné porovnání kvantitativních parametrů mezi experimentálními skupinami Kruskal-Wallisova ANOVA. Pro testování četností byl použit Chí-kvadrát test. V případě zjištěných diferencí byly tyto rozdíly dale



testovány pomocí Mann-Whitney U testu s Bonferroniho korekcí nebo Fisherova testu s Bonferroniho korekcí. Hodnota  $\alpha = 0.05$  byla považována za hranici statistické signifikace.

### 3. Výsledky

#### 3.1. Úloha gasotransmiterů v regulaci zrání a stárnutí oocytů žab *Xenopus laevis* a prasete

Gasotransmitery H<sub>2</sub>S a NO, plynné molekuly se schopností přenosu buněčného signálu, jsou zapojeny do řady fyziologických procesů včetně reprodukce. Z tohoto důvodu probíhalo intenzivní studium těchto molekul v procesech zrání oocytů živočišných modelů prasete a žab *Xenopus laevis*. Mimo zrání oocytů byla studována úloha v procesu tzv. stárnutí oocytu za účelem zlepšení kvality zralého oocytu pro účely dalšího použití, jako je *in vitro* oplození a *in vitro* produkce embryí. Výsledky tohoto úsilí byly publikovány v časopisech s impakt faktorem (Nevoral *et al.*<sup>91,93,96,236,239</sup>, Gelaude *et al.*<sup>98</sup>, Krejčová *et al.*<sup>94</sup>, Dvořáková *et al.*<sup>274</sup>, tj. přílohy 3.1.1 – 3.1.8) a duševní vlastnictví bylo ošetřeno prostřednictvím užitečných vzorů a patentů.

Následující výčet původních prací dokladuje úlohu gasotransmiteru H<sub>2</sub>S a NO v regulaci zrání oocytů prasete<sup>93,96</sup> (příloha 3.1.1 a 3.1.2) a žab *Xenopus laevis*<sup>98</sup> (příloha 3.1.3). Byl prokázán pozitivní efekt suplementace kultivačního média donorem H<sub>2</sub>S na kvalitu a oplození schopnost prasečích oocytů zrajících v podmínkách *in vitro*<sup>93</sup>. Mimoto, fyziologická úloha enzymatického uvolňování H<sub>2</sub>S v prasečích oocytech je nezbytná pro úspěšnost zrání oocytů. Tento efekt je zprostředkován regulací klíčových kináz meiotického zrání – MPF a MAPK<sup>96</sup>. Pro účely reálného využití pozitivního efektu gasotransmiteru H<sub>2</sub>S byl studován efekt přirozeného donoru H<sub>2</sub>S S-allyl cysteinu na prasečí oocyty zrající *in vitro*<sup>274</sup> (příloha 3.1.4). Mimo H<sub>2</sub>S byla popsána esenciální role gasotransmiteru NO. Bylo zjištěno, že adekvátní signalizace NO je nezbytná pro cytoplazmatickou kvalitu oocytů žab *Xenopus laevis*, stejně jako pro správnou morfogenezi dělicího vřeténka zralého oocytu<sup>98</sup>.

Mimo zmíněného zrání oocytů byla studována úloha gasotransmiterů v procesu stárnutí s cílem eliminovat jeho negativní dopad na kvalitu oocytu *in vitro*. Bylo zjištěno, že inhibice enzymů uvolňujících NO vede k potlačení programované buněčné smrti a lýze oocytů<sup>239</sup> (příloha 3.1.5). Naopak H<sub>2</sub>S, jehož protektivní účinek byl prokázán již ve zrajících oocytech, se ukázal být gasotransmiterem s protektivním účinkem na kvalitu oocytů stárnoucích *in vitro*<sup>94</sup> (příloha 3.1.6). Další experimentální práci bylo nepřímě ověřeno, že molekulární mechanismus H<sub>2</sub>S spočívá v aktivaci K<sup>+</sup><sub>ATP</sub> iontových kanálů a inhibici Ca<sup>2+</sup> kanálů ve stárnoucích oocytech<sup>236</sup> (příloha 3.1.7).

Poznatky, dosažené základním studiem gasotransmiterů v oocytech zvířecích modelů, představují způsob zlepšení kvality lidských oocytů, využívaných v postupech asistované reprodukce. Gasotransmitery a jejich fyziologická produkci v buňkách tak lze považovat za relevantní markery kvality oocytů. Přestože další studium je nutné pro využití v klinické praxi, dílčí poznatky byly patentovány. Přínos tohoto studia pro léčbu neplodnosti jsou shrnuty v práci Nevoral *et al.*<sup>91</sup> (příloha 3.1.8).

### 3.2. Kumulární expanze jako ukazatel kvality oocytů

Vedle gasotransmitterů, jako ukazatelů kvality oocytů, lze pro toto hodnocení využít fyziologického fenoménu expanze kumulárních buněk *corona radiata* a folikulárních buněk, bezprostředně obklopujících oocyt. Kumulární expanze nastává přirozeně v podmínkách *in vivo* uvnitř folikulu, v důsledku hormonální regulace, bezprostředně před ovulací kumulo-oocytárních komplexu. Stejně tak dochází ke kumulární expanzi v podmínkách *in vitro*, kde dochází ke kultivaci oocytů i s přilehlými folikulárními buňkami. Z podstaty mezibuněčné signalizace mezi oocytem a těmito buňkami lze považovat intenzitu kumulární expanze za marker kvality oocytu zrajícího uvnitř kumulo-oocytárního komplexu.

Pro tento účel byla vypracována rešerše, která byla publikována v recenzovaném časopise (Nevoral *et al.*, tj. příloha 3.2.1)<sup>14</sup>. Publikovaný přehled literatury přinesl teoretické možnosti kvantifikace kumulární expanze. Na základě takto kompilovaných poznatků a závěrů proběhlo další studium dynamiky kumulární expanze prasečích kumulo-oocytárních komplexů v podmínkách *in vitro*. Na pozadí tohoto studia byla vyvíjena metoda měření kumulární expanze pomocí kvantifikace hyaluronové kyseliny, hlavního produktu extracelulární matrix expandovaného komplexu. Původní výsledky dynamiky a metody měření kumulární expanze byly publikovány v časopise s impakt faktorem (Zámstná *et al.*, tj. příloha 3.2.2)<sup>270</sup>. Takto vyvinutá a optimalizovaná metoda byla použita pro hodnocení úlohy parakrinních faktorů v procesu zrání a kumulární expanze prasečích kumulo-oocytárních komplexů kultivovaných *in vitro* (Blaha *et al.*<sup>276</sup>, resp. příloha 3.2.3; Blaha *et al.*, under review).

### 3.3. Epigenetické změny v procesu oplození oocytu a časném embryonálním vývoji prasete

Cennými ukazateli kvality oocytu a embrya po oplození tohoto oocytu jsou proběhnuvší epigenetické změny, zahrnující metylaci DNA a histonů. Důležitým faktorem těchto změn je SIRT1, NAD<sup>+</sup>-dependentní histon deacetyláza s množstvím substrátů. Regulace aktivity těchto substrátů prostřednictvím SIRT1 vede přímo k deacetylaci histonů a/nebo k nepřímé regulaci faktorů, které spolu-utvářejí histonový kód prostřednictvím metylace. Tyto epigenetické modifikace, favorizující metylaci chromatinu, vedou jeho stabilizaci a ochraňují oocyt a embryo proti negativním faktorům vnějšího prostředí.

Původní výsledky tohoto studia vedly k publikaci pozorování protektivní úlohy SIRT1 v embryích prasete (Adámková *et al.*, tj. příloha 3.3.1)<sup>73</sup>. Zjištění bylo ošetřeno aplikací americké patentové přihlášky za účelem duševního vlastnictví aplikace zjištění v praktickém využití pro biotechnologické postupy v asistované reprodukci. Význam, který představuje studium regulace epigenetických změn na zvířecích modelech pro léčbu lidské infertility, byly shrnuty a publikovány prostřednictvím kapitoly

v knize „Animal Models and Human Reproduction“ (Nevoral and Sutovsky, 2017, eds. G. Constantinescu and H. Schatten, Willey Publishing, tj. příloha 3.3.2)<sup>134</sup>.

Vedle substrátů, vedoucích k regulaci histonového kódu, bylo dosaženo poznatků o ne-histonových substrátech SIRT1 v oocytech myši. Zjištění poukazuje na dvojí způsob, kterým SIRT1 reguluje zrání oocyty: i) epigenetický molekulární mechanismus, který akceleruje změny chromatinu zralého oocyty ve prospěch chromatin-protektivní metylace histonů, a ii) ne-epigenetický způsob regulace SIRT1, který je zjevně schopen deacetylovat tubulin dělicího vřeténka zralého oocyty, jako nezbytného předpokladu pro úspěšné oplození a časný embryonální vývoj (Nevoral *et al.*, under review).

#### 3.4. Hodnocení endokrinních disruptorů prostřednictvím popsaných ukazatelů kvality oocytů

Dříve popsané změny zrajícího oocyty, zahrnující molekulární markery oplození schopného oocyty a úspěšného embryonálního vývoje, stejně jako morfologie a míra expanze kumulo-oocytárního komplexu, byly využity pro hodnocení polutantů prostředí. Mezi tyto polutanty v současné době patří bisfenoly – látky označované jako endokrinní disruptory. Studium jejich efektu a mechanismu účinku je nezbytným předpokladem eliminace endokrinních disruptorů z prostředí a jejich negativních dopadů na reprodukci člověka. Kombinace *in vitro* studie prasečího modelu a *in vivo* studie myšičího modelu přinesla zjištění, že subtoxické dávky bisfenolu S (BPS), jedné z nejčtenějších komponenty plastických hmot, negativně ovlivňují kvalitu oocytů prostřednictvím inadekvátní stimulace estrogenových receptorů a proteinů zapojených do eliminace oxidativního stresu. Jak bylo vlastními experimenty zjištěno (přílohy 3.4.1 – 3.4.3), výsledkem těchto molekulárních změn je zejména poškození dělicího vřeténka zralého oocyty a poruchy segregace chromozómů během redukčního dělení meiózy<sup>262,263</sup> (příloha 3.4.1 a 3.4.2). Mimo nežádoucích cytoskeletárních změn bylo rovněž zjištěno, a z notné části již publikováno<sup>263</sup>, že dochází k neadekvátním změnám metylace DNA a histonů stejně jako k expresi faktorů (SIRT1), které tyto změny ovlivňují. Tyto negativní změny jsou spojeny s aneuploidemi oocyty a následnou časnou embryonální odumrtí anebo výskytem genetických poruch plodu a jedince (shrnuto v Žalmanová *et al.*<sup>252</sup>, tj. příloha 3.4.3).

#### 4. Diskuze a perspektiva

Gametogeneze, oplození a časný embryonální vývoj představují klíčové fyziologické procesy pro vznik nového jedince a zachování druhu. Selhávání těchto procesů mnohdy není doprovázeno klinickými příznaky ani zdravotními komplikacemi. Protože se však jedná o procesy, které jsou regulovány vysoce sofistikovaně a mnohdy bez kompenzačních mechanismů v případě výpadku dílčích signálních drah, jedná se o velmi citlivý systém k negativním vlivům prostředí. Reprodukce je tak mnohdy postižena bez vědomí jedince, u kterého je diagnostikována infertilita až v momentě snahy o početí. Infertilita je pak indikací k použití technik asistované reprodukce (ART, Assisted reproductive technologies), které však mnohdy i tak selhávají. Z těchto důvodů je nezbytné základní studium gametogeneze a embryogeneze stejně jako aktuální testování látek s negativním či potenciálně negativním účinkem. Mezi tyto látky patří endokrinní disruptory, které postihují hormonální bilanci organismu a tak buněčnou signalizaci gamet a embrya.

Vzhledem k složitosti a komplexnosti procesů gametogeneze a embryogeneze stále vyvstává potřeba základního studia gamet a embryí. Pro transfer poznatků do humánní reprodukční medicíny je ovšem zapotřebí kombinace biomedicínských modelů, jako jsou laboratorní hlodavci, prase a skot, vhodně doplněné o klinická sledování v lidské reprodukční gynekologii. Uplatnění výsledků komplexního výzkumu je nezbytné v problematice environmentálních polutantů i zvýšené úspěšnosti ART.

Získané poznatky představují rovněž možnost pokroku ART v oblasti tzv. onkofertility. Protektivní postupy onkofertility představují možnost početí vlastního dítěte pacientům (v reprodukčním věku nebo dokonce dětským pacientům), kteří podstupují onkologickou léčbu, téměř bez výjimky devastující pro pohlavní buňky<sup>277</sup>. Postupy ART jsou v tomto specifické a navzdory ojedinělým pozitivním výsledkům<sup>278–280</sup> se mnohdy nikoliv rutinní postupy stále potýkají s limitující úspěšností<sup>281,282</sup>. Metody, jako *in vitro* kultivace folikulů, *in vitro* zrání oocytů, vývoj kryokonzervace oocytů s ohledem na úspěšnost následného embryonálního vývoje či transplantace předem odebrané a konzervované tkáně, vyžadují intenzivní výzkum molekulární signalizace buněčného cyklu, DNA poškození a epigenetických změn. Zejména oocyty v tomto představují nejen cílovou buňku pro ochranu fertility, ale také unikátní model pro studium buněčného cyklu a chromozomálních aberací.

Potřeba ART v reprodukční medicíně však představuje jisté, v současné době dosud těžko odhadnutelné, riziko pro zdraví potomků takto vzniklých. Dosud je jen málo známo o projevech početí pomocí ART, avšak existující pozorování či experimentální práce poukazují na riziko zvýšené incidence civilizačních onemocnění a poruch učení<sup>283–285</sup>. Jednou z předpokládaných příčin může být zpomalená či zcela narušená mitofágie po *in vitro* oplození oocyty metodou ICSI (Intracytoplasmic sperm injection)<sup>286</sup>. Další riziko představuje dárcovství ooplazmy, a tedy cílené vytváření heteroplazmie,

s cílem zlepšit životaschopnost oplozovaného oocyty. Je tak potřebné odpovědět na otázku, do jaké míry postupy ART zvyšují riziko mitochondriálních, popř. dalších asociovaných, chorob<sup>224</sup>.

Ze zmíněných důvodů lze za klíčové považovat zejména studium v oblasti post-translačních modifikací regulačních proteinů, faktorů odpovědných za fúzi gamet a polyspermní blok, autofágie mitochondrií spermie a dynamiky epigenetických změn včetně regulačních faktorů modulujících epigenetický kód. Z pohledu prevence i řešení případného problému pomocí ART se jeví NAD<sup>+</sup>-dependentní histon deacetylázy (SIRT1-7). Enzymy rodiny sirtuinů cílí v buňkách na široké spektrum substrátů, které není v gametách a embryích dosud plně popsáno. Buněčná signalizace sirtuinů tak představuje potenciální cíl pro aplikace a rozvoj reprodukční medicíny.

Z popsaných důvodů bude na pracovišti Biomedicínského centra Lékařské fakulty v Plzni pokračovat studium SIRT1 v oocytech a embryích laboratorních zvířat. Výzkum SIRT1 bude zahrnovat popis jeho post-translačních modifikací a zapojení gasotransmiteru H<sub>2</sub>S do modulace jeho aktivity v reprodukčních procesech. Úloha SIRT1 v procesech oogeneze, oplození a časného embryonálního vývoje bude studována na základě komplexního hodnocení histonového kódu a aktivity enzymových substrátů (tj. ne-histonových cílů).

Vedle ne-histonových cílů v signalizaci SIRT1, vedoucích k nepřímé modulaci epigenetického (histonového) kódu, budou studovány ne-histonové cíle, zaměřené na regulaci mitofágie po oplození. Tato snaha vychází ze skutečnosti, že SIRT1 indukuje mitofágiu v somatických buňkách<sup>216,217,287</sup>; disfunkce SIRT1 je tak možnou příčinou heteroplazmie a mitochondriálních chorob. Toto studium bude probíhat rovněž v kontextu technik asistované reprodukce, kdy použití ART postihuje dynamiku mitofágie a zvyšuje tak riziko heteroplazmie.

## 5. Použitá literatutra

1. Hoage, T. R. & Cameron, I. L. Folliculogenesis in the ovary of the mature mouse: A radioautographic study. *Anat. Rec.* **184**, 699–709 (1976).
2. Evans, A. C. & Rawlings, N. C. Effects of treatment with LH and FSH between 8 and 12 weeks of age on ovarian follicular development and puberty in heifers. *Theriogenology* **44**, 725–40 (1995).
3. Morbeck, D. E., Esbenshade, K. L., Flowers, W. L. & Britt, J. H. Kinetics of follicle growth in the prepubertal gilt. *Biol. Reprod.* **47**, 485–91 (1992).
4. McGee, E. A. & Hsueh, A. J. W. Initial and Cyclic Recruitment of Ovarian Follicles <sup>1</sup>. *Endocr. Rev.* **21**, 200–214 (2000).
5. Motlik, J., Crozet, N. & Fulka, J. Meiotic competence in vitro of pig oocytes isolated from early antral follicles. *J. Reprod. Fertil.* **72**, 323–8 (1984).
6. McGaughey, R. W., Montgomery, D. H. & Richter, J. D. Germinal vesicle configurations and patterns of polypeptide synthesis of porcine oocytes from antral follicles of different size, as related to their competency for spontaneous maturation. *J. Exp. Zool.* **209**, 239–54 (1979).
7. Wassarman, P. M. & Josefowicz, W. J. Oocyte development in the mouse: An ultrastructural comparison of oocytes isolated at various stages of growth and meiotic competence. *J. Morphol.* **156**, 209–235 (1978).
8. Wolf, J. P., Ji, Y. Z., Bomsel, M. & Jouannet, P. [Evolution of cytoplasmic and membrane parameters during human oocyte maturation]. *Contracept. Fertil. Sex.* **24**, 539–42
9. Olds, P. J., Stern, S. & Biggers, J. D. Chemical estimates of the RNA and DNA contents of the early mouse embryo. *J. Exp. Zool.* **186**, 39–46 (1973).
10. Schultz, R. M. & Wassarman, P. M. Biochemical studies of mammalian oogenesis: Protein synthesis during oocyte growth and meiotic maturation in the mouse. *J. Cell Sci.* **24**, 167–94 (1977).
11. Cakmak, H., Franciosi, F., Zamah, A. M., Cedars, M. I. & Conti, M. Dynamic secretion during meiotic reentry integrates the function of the oocyte and cumulus cells. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **113**, 2424–2429 (2016).
12. Prochazka, R., Blaha, M. & Nemcova, L. Signaling pathways regulating FSH- and amphiregulin-induced meiotic resumption and cumulus cell expansion in the pig. *REPRODUCTION* **144**, 535–546 (2012).
13. Prochazka, R., Blaha, M. & Němcová, L. Significance of epidermal growth factor receptor signaling for acquisition of meiotic and developmental competence in mammalian oocytes<sup>†</sup>. *Biol. Reprod.* **97**, 537–549 (2017).

14. Nevoral, J. *et al.* Cumulus Cell Expansion, Its Role in Oocyte Biology and Perspectives of Measurement: A Review. *Sci. Agric. Bohem.* **45**, (2014).
15. Eppig, J. J. Maintenance of meiotic arrest and the induction of oocyte maturation in mouse oocyte-granulosa cell complexes developed in vitro from preantral follicles. *Biol. Reprod.* **45**, 824–30 (1991).
16. Liang, C.-G. *et al.* Cyclic adenosine 3',5'-monophosphate-dependent activation of mitogen-activated protein kinase in cumulus cells is essential for germinal vesicle breakdown of porcine cumulus-enclosed oocytes. *Endocrinology* **146**, 4437–44 (2005).
17. Dekel, N. & Beers, W. H. Development of the rat oocyte in vitro: inhibition and induction of maturation in the presence or absence of the cumulus oophorus. *Dev. Biol.* **75**, 247–54 (1980).
18. Dekel, N. Regulation of oocyte maturation. The role of cAMP. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* **541**, 211–6 (1988).
19. Kovo, M. *et al.* An active protein kinase A (PKA) is involved in meiotic arrest of rat growing oocytes. *Reproduction* **132**, 33–43 (2006).
20. Carroll, J., Swann, K., Whittingham, D. & Whitaker, M. Spatiotemporal dynamics of intracellular [Ca<sup>2+</sup>]<sub>i</sub> oscillations during the growth and meiotic maturation of mouse oocytes. *Development* **120**, 3507–17 (1994).
21. Macháty, Z., Funahashi, H., Day, B. N. & Prather, R. S. Developmental changes in the intracellular Ca<sup>2+</sup> release mechanisms in porcine oocytes. *Biol. Reprod.* **56**, 921–30 (1997).
22. Miyata, K., Nakano, T., Kuroda, R. & Kuroda, H. Development of calcium releasing activity induced by inositol trisphosphate and cyclic ADP-ribose during in vitro maturation of sea urchin oocytes. *Dev. Growth Differ.* **48**, 605–613 (2006).
23. Fan, H.-Y. *et al.* Involvement of calcium/calmodulin-dependent protein kinase II (CaMKII) in meiotic maturation and activation of pig oocytes. *Biol. Reprod.* **69**, 1552–64 (2003).
24. Wang, L., White, K. L., Reed, W. A. & Campbell, K. D. Dynamic Changes to the Inositol 1,4,5-Trisphosphate and Ryanodine Receptors during Maturation of Bovine Oocytes. *Cloning Stem Cells* **7**, 306–320 (2005).
25. Solc, P. *et al.* Multiple requirements of PLK1 during mouse oocyte maturation. *PLoS One* **10**, e0116783 (2015).
26. Solc, P. *et al.* Aurora kinase A drives MTOC biogenesis but does not trigger resumption of meiosis in mouse oocytes matured in vivo. *Biol. Reprod.* **87**, 85 (2012).
27. Nguyen, A. L. *et al.* Genetic Interactions between the Aurora Kinases Reveal New Requirements for AURKB and AURKC during Oocyte Meiosis. *Curr. Biol.* **28**, (2018).
28. Oh, J. S., Han, S. J. & Conti, M. Wee1B, Myt1, and Cdc25 function in distinct compartments of the mouse oocyte to control meiotic resumption. *J. Cell Biol.* **188**, 199–207 (2010).



29. Motlík, J. & Kubelka, M. Cell-cycle aspects of growth and maturation of mammalian oocytes. *Mol. Reprod. Dev.* **27**, 366–375 (1990).
30. Li, Y.-H. *et al.* Greatwall Kinase Is Required for Meiotic Maturation in Porcine Oocytes. *Biol. Reprod.* **89**, 53 (2013).
31. Yamamoto, T. M. *et al.* Regulation of Greatwall kinase during *Xenopus* oocyte maturation. *Mol. Biol. Cell* **22**, 2157–64 (2011).
32. Hara, M. *et al.* Greatwall kinase and cyclin B-Cdk1 are both critical constituents of M-phase-promoting factor. *Nat. Commun.* **3**, 1059 (2012).
33. Taieb, F., Thibier, C. & Jesus, C. On cyclins, oocytes, and eggs. *Mol. Reprod. Dev.* **48**, 397–411 (1997).
34. Palmer, A., Gavin, A. C. & Nebreda, A. R. A link between MAP kinase and p34cdc2/cyclin B during oocyte maturation: p90rsk phosphorylates and inactivates the p34cdc2 inhibitory kinase Myt1. *EMBO J.* **17**, 5037–5047 (1998).
35. Norbury, C. & Nurse, P. Animal Cell Cycles and Their Control. *Annu. Rev. Biochem.* **61**, 441–468 (1992).
36. Christmann, L., Jung, T. & Moor, R. M. MPF components and meiotic competence in growing pig oocytes. *Mol. Reprod. Dev.* **38**, 85–90 (1994).
37. Izumi, T. & Maller, J. L. Phosphorylation of *Xenopus* cyclins B1 and B2 is not required for cell cycle transitions. *Mol. Cell. Biol.* **11**, 3860–7 (1991).
38. Karaïskou, A., Cayla, X., Haccard, O., Jesus, C. & Ozon, R. MPF Amplification in *Xenopus* Oocyte Extracts Depends on a Two-Step Activation of Cdc25 Phosphatase. *Exp. Cell Res.* **244**, 491–500 (1998).
39. Lincoln, A. J. *et al.* Cdc25b phosphatase is required for resumption of meiosis during oocyte maturation. *Nat. Genet.* **30**, 446–449 (2002).
40. Arion, D., Meijer, L., Brizuela, L. & Beach, D. cdc2 is a component of the M phase-specific histone H1 kinase: evidence for identity with MPF. *Cell* **55**, 371–8 (1988).
41. Lüscher, B., Brizuela, L., Beach, D. & Eisenman, R. N. A role for the p34cdc2 kinase and phosphatases in the regulation of phosphorylation and disassembly of lamin B2 during the cell cycle. *EMBO J.* **10**, 865–75 (1991).
42. Motlik, J., Pavlok, A., Kubelka, M., Kalous, J. & Kalab, P. Interplay between CDC2 kinase and MAP kinase pathway during maturation of mammalian oocytes. *Theriogenology* **49**, 461–9 (1998).
43. Hampl, A. & Eppig, J. J. Analysis of the mechanism(s) of metaphase I arrest in maturing mouse oocytes. *Development* **121**, 925–33 (1995).
44. Peters, J.-M. The anaphase-promoting complex: proteolysis in mitosis and beyond. *Mol. Cell* **9**,

- 931–43 (2002).
45. Yi, Y.-J. *et al.* Proteolytic activity of the 26S proteasome is required for the meiotic resumption, germinal vesicle breakdown, and cumulus expansion of porcine cumulus-oocyte complexes matured in vitro. *Biol. Reprod.* **78**, 115–26 (2008).
  46. Ohashi, S. *et al.* Analyses of mitogen-activated protein kinase function in the maturation of porcine oocytes. *Biol. Reprod.* **68**, 604–9 (2003).
  47. Thibier, C. *et al.* In Vivo Regulation of Cytostatic Activity in *Xenopus* Metaphase II-Arrested Oocytes. *Dev. Biol.* **185**, 55–66 (1997).
  48. Colas, P. & Guerrier, P. The oocyte metaphase arrest. *Prog. Cell Cycle Res.* **1**, 299–308 (1995).
  49. Kishimoto, T. More than G1 or G2 arrest: Useful starfish oocyte system for investigating skillful MAP kinase. *Biol. Cell* **96**, 241–244 (2004).
  50. Sensui, N., Yoshida, M. & Tachibana, K. Role of Mos/MEK/ERK cascade and Cdk1 in Ca<sup>2+</sup> oscillations in fertilized ascidian eggs. *Dev. Biol.* **367**, 208–215 (2012).
  51. Sun, Q. Y., Breitbart, H. & Schatten, H. Role of the MAPK cascade in mammalian germ cells. *Reprod. Fertil. Dev.* **11**, 443–50 (1999).
  52. Fan, H.-Y. *et al.* Characterization of ribosomal S6 protein kinase p90<sup>rsk</sup> during meiotic maturation and fertilization in pig oocytes: mitogen-activated protein kinase-associated activation and localization. *Biol. Reprod.* **68**, 968–77 (2003).
  53. Verlhac, M. H., de Pennart, H., Maro, B., Cobb, M. H. & Clarke, H. J. MAP kinase becomes stably activated at metaphase and is associated with microtubule-organizing centers during meiotic maturation of mouse oocytes. *Dev. Biol.* **158**, 330–40 (1993).
  54. Yu, L.-Z. *et al.* MEK1/2 Regulates Microtubule Organization, Spindle Pole Tethering and Asymmetric Division During Mouse Oocyte Meiotic Maturation. *Cell Cycle* **6**, 330–338 (2007).
  55. TONG, C. *et al.* Effects of MEK inhibitor U0126 on meiotic progression in mouse oocytes: microtubule organization, asymmetric division and metaphase II arrest. *Cell Res.* **13**, 375–383 (2003).
  56. Villa-Diaz, L. G. & Miyano, T. Activation of p38 MAPK During Porcine Oocyte Maturation<sup>1</sup>. *Biol. Reprod.* **71**, 691–696 (2004).
  57. Balboula, A. Z. *et al.* Haspin kinase regulates microtubule-organizing center clustering and stability through Aurora kinase C in mouse oocytes. *J. Cell Sci.* **129**, 3648–3660 (2016).
  58. Tung, J. J. & Jackson, P. K. Emi1 Class of Proteins Regulate Entry into Meiosis and the Meiosis I to Meiosis II Transition in *Xenopus* Oocytes. *Cell Cycle* **4**, 478–482 (2005).
  59. George, O., Johnston, M. A. & Shuster, C. B. Aurora B Kinase Maintains Chromatin Organization During the MI to MII Transition in Surf Clam Oocytes. *Cell Cycle* **5**, 2648–2656 (2006).

60. Madgwick, S. & Jones, K. T. How eggs arrest at metaphase II: MPF stabilisation plus APC/C inhibition equals Cytostatic Factor. *Cell Div.* **2**, 4 (2007).
61. Schmidt, A., Rauh, N. R., Nigg, E. A. & Mayer, T. U. Cytostatic factor: an activity that puts the cell cycle on hold. *J. Cell Sci.* **119**, 1213–1218 (2006).
62. Bosch-Presegué, L. & Vaquero, A. Sirtuin-dependent epigenetic regulation in the maintenance of genome integrity. *FEBS J.* **282**, 1745–1767 (2015).
63. Vaquero, A. The conserved role of sirtuins in chromatin regulation. *Int. J. Dev. Biol.* **53**, 303–322 (2009).
64. Zhao, H. C. *et al.* Role of Sirt3 in mitochondrial biogenesis and developmental competence of human in vitro matured oocytes. *Hum. Reprod.* **31**, 607–622 (2016).
65. Yuan, Q. *et al.* SIRT2 regulates microtubule stabilization in diabetic cardiomyopathy. *Eur. J. Pharmacol.* **764**, 554–561 (2015).
66. Imai, S., Armstrong, C. M., Kaeberlein, M. & Guarente, L. Transcriptional silencing and longevity protein Sir2 is an NAD-dependent histone deacetylase. *Nature* **403**, 795–800 (2000).
67. Jeong, S. M., Lee, A., Lee, J. & Haigis, M. C. SIRT4 Protein Suppresses Tumor Formation in Genetic Models of Myc-induced B Cell Lymphoma. *J. Biol. Chem.* **289**, 4135–4144 (2014).
68. Lombard, D. B. *et al.* Mammalian Sir2 Homolog SIRT3 Regulates Global Mitochondrial Lysine Acetylation. *Mol. Cell. Biol.* **27**, 8807–8814 (2007).
69. Michishita, E. *et al.* SIRT6 is a histone H3 lysine 9 deacetylase that modulates telomeric chromatin. *Nature* **452**, 492–496 (2008).
70. Vazquez, B. N. *et al.* SIRT 7 promotes genome integrity and modulates non-homologous end joining DNA repair. *EMBO J.* **35**, 1–16 (2016).
71. Vaquero, A. *et al.* Human SirT1 interacts with histone H1 and promotes formation of facultative heterochromatin. *Mol. Cell* **16**, 93–105 (2004).
72. Bosch-Presegué, L. *et al.* Stabilization of Suv39H1 by SirT1 is part of oxidative stress response and ensures genome protection. *Mol. Cell* **42**, 210–23 (2011).
73. Adamkova, K. *et al.* SIRT1-dependent modulation of methylation and acetylation of histone H3 on lysine 9 (H3K9) in the zygotic pronuclei improves porcine embryo development. *J. Anim. Sci. Biotechnol.* **8**, 83 (2017).
74. Hori, Y. S., Kuno, A., Hosoda, R. & Horio, Y. Regulation of FOXOs and p53 by SIRT1 Modulators under Oxidative Stress. *PLoS One* **8**, e73875 (2013).
75. Cheng, H.-L. *et al.* Developmental defects and p53 hyperacetylation in Sir2 homolog (SIRT1)-deficient mice. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **100**, 10794–9 (2003).
76. Han, L. *et al.* Sirt6 depletion causes spindle defects and chromosome misalignment during meiosis of mouse oocyte. *Sci. Rep.* **5**, 15366 (2015).

77. Zhang, T. *et al.* SIRT1, 2, 3 protect mouse oocytes from postovulatory aging. *Aging (Albany, NY)*. **8**, 685–96 (2016).
78. Wang, H., Jo, Y., Oh, J. S. & Kim, N. Quercetin delays postovulatory aging of mouse oocytes by regulating SIRT expression and MPF activity. **8**, 38631–38641 (2017).
79. Kwon, N. S. *et al.* L-citrulline production from L-arginine by macrophage nitric oxide synthase. The ureido oxygen derives from dioxygen. *J. Biol. Chem.* **265**, 13442–5 (1990).
80. Lamas, S., Marsden, P. A., Li, G. K., Tempst, P. & Michel, T. Endothelial nitric oxide synthase: molecular cloning and characterization of a distinct constitutive enzyme isoform. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **89**, 6348–52 (1992).
81. Bredt, D. S. *et al.* Cloned and expressed nitric oxide synthase structurally resembles cytochrome P-450 reductase. *Nature* **351**, 714–8 (1991).
82. Nathan, C. Nitric oxide as a secretory product of mammalian cells. *FASEB J.* **6**, 3051–64 (1992).
83. Xie, Q. W. *et al.* Cloning and characterization of inducible nitric oxide synthase from mouse macrophages. *Science* **256**, 225–8 (1992).
84. Hattori, M. A., Nishida, N., Takesue, K., Kato, Y. & Fujihara, N. FSH suppression of nitric oxide synthesis in porcine oocytes. *J. Mol. Endocrinol.* **24**, 65–73 (2000).
85. Chmelíková, E. *et al.* Nitric oxide synthase isoforms and the effect of their inhibition on meiotic maturation of porcine oocytes. *Zygote* **18**, 235–244 (2010).
86. Ding, W. *et al.* Cell-specific expression and immunolocalization of nitric oxide synthase isoforms and soluble guanylyl cyclase  $\alpha 1$  and  $\beta 1$  subunits in the ovary of fetal, neonatal and immature pigs. *Anim. Reprod. Sci.* **131**, 172–80 (2012).
87. Bellamy, T. C., Wood, J. & Garthwaite, J. On the activation of soluble guanylyl cyclase by nitric oxide. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **99**, 507–510 (2002).
88. Zhang, M. *et al.* Atrial natriuretic peptide negatively regulates follicle-stimulating hormone-induced porcine oocyte maturation and cumulus expansion via cGMP-dependent protein kinase pathway. *Theriogenology* **64**, 902–16 (2005).
89. Iwakiri, Y. S-nitrosylation of proteins: a new insight into endothelial cell function regulated by eNOS-derived NO. *Nitric oxide Biol. Chem.* **25**, 95–101 (2011).
90. Xu, L., Eu, J. P., Meissner, G. & Stamler, J. S. Activation of the cardiac calcium release channel (ryanodine receptor) by poly-S-nitrosylation. *Science* **279**, 234–7 (1998).
91. 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).
92. Nevoral, J. *et al.* Endogenously produced hydrogen sulfide is involved in porcine oocyte maturation in vitro. *Nitric Oxide* **51**, 24–35 (2015).

93. Nevoral, J. *et al.* Dual effects of hydrogen sulfide donor on meiosis and cumulus expansion of porcine cumulus-oocyte complexes. *PLoS One* **9**, e99613 (2014).
94. Krejcová, T. *et al.* Hydrogen sulfide donor protects porcine oocytes against aging and improves the developmental potential of aged porcine oocytes. *PLoS One* **10**, e0116964 (2015).
95. Zhao, K. *et al.* S-sulphydration of MEK 1 leads to PARP-1 activation and DNA damage repair. *PLoS One* **15**, 792–800 (2014).
96. Nevoral, J. *et al.* Endogenously produced hydrogen sulfide is involved in porcine oocyte maturation in vitro. *Nitric Oxide - Biol. Chem.* **51**, (2015).
97. Jeseta, M. *et al.* Nitric oxide-donor SNAP induces *Xenopus* eggs activation. *PLoS One* **7**, e41509 (2012).
98. Gelaude, A. *et al.* Nitric Oxide Donor s -Nitroso- n -Acetyl Penicillamine (SNAP) Alters Meiotic Spindle Morphogenesis in *Xenopus* Oocytes. *J. Cell. Biochem.* **116**, (2015).
99. Petr, J. *et al.* Parthenogenetic activation of pig oocytes using pulsatile treatment with a nitric oxide donor. *Reprod. Domest. Anim.* **45**, 493–9 (2010).
100. Aitken, R. J. & Nixon, B. Sperm capacitation: a distant landscape glimpsed but unexplored. *Mol. Hum. Reprod.* **19**, 785–793 (2013).
101. Morin, G., Lalancette, C., Sullivan, R. & Leclerc, P. Identification of the bull sperm p80 protein as a PH-20 ortholog and its modification during the epididymal transit. *Mol. Reprod. Dev.* **71**, 523–34 (2005).
102. La Spina, F. A. *et al.* Mouse sperm begin to undergo acrosomal exocytosis in the upper isthmus of the oviduct. *Dev. Biol.* **411**, 172–182 (2016).
103. Jin, M. *et al.* Most fertilizing mouse spermatozoa begin their acrosome reaction before contact with the zona pellucida during in vitro fertilization. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **108**, 4892–6 (2011).
104. Hoodbhoy, T. & Dean, J. Insights into the molecular basis of sperm–egg recognition in mammals. *Reproduction* **127**, 417–422 (2004).
105. Bokhove, M. & Jovine, L. in *Current topics in developmental biology* **130**, 413–442 (2018).
106. Raj, I. *et al.* Structural Basis of Egg Coat-Sperm Recognition at Fertilization. *Cell* **169**, 1315–1326.e17 (2017).
107. Morin, G., Sullivan, R., Laflamme, I., Robert, C. & Leclerc, P. SPAM1 isoforms from two tissue origins are differentially localized within ejaculated bull sperm membranes and have different roles during fertilization. *Biol. Reprod.* **82**, 271–81 (2010).
108. Ohto, U. *et al.* Structure of IZUMO1–JUNO reveals sperm–oocyte recognition during mammalian fertilization. *Nature* **534**, 566–569 (2016).

109. Aydin, H., Sultana, A., Li, S., Thavalingam, A. & Lee, J. E. Molecular architecture of the human sperm IZUMO1 and egg JUNO fertilization complex. *Nature* **534**, 562–565 (2016).
110. Bianchi, E. & Wright, G. J. Izumo meets Juno. *Cell Cycle* **13**, 2019–2020 (2014).
111. Hornak, M. *et al.* Frequency of Aneuploidy Related to Age in Porcine Oocytes. *PLoS One* **6**, e18892 (2011).
112. Zhang, M. *et al.* Melatonin protects oocyte quality from Bisphenol A-induced deterioration in the mouse. *J. Pineal Res.* **62**, e12396 (2017).
113. Ho, P. C., Yeung, W. S., Chan, Y. F., So, W. W. & Chan, S. T. Factors affecting the incidence of polyploidy in a human in vitro fertilization program. *Int. J. Fertil. Menopausal Stud.* **39**, 14–9
114. Yoo, J. G. & Smith, L. C. Extracellular calcium induces activation of Ca(2+)/calmodulin-dependent protein kinase II and mediates spontaneous activation in rat oocytes. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **359**, 854–9 (2007).
115. Aarabi, M. *et al.* Sperm-derived WW domain-binding protein, PAWP, elicits calcium oscillations and oocyte activation in humans and mice. *FASEB J.* **28**, 4434–4440 (2014).
116. Wu, A. T. H. *et al.* PAWP, a Sperm-specific WW Domain-binding Protein, Promotes Meiotic Resumption and Pronuclear Development during Fertilization. *J. Biol. Chem.* **282**, 12164–12175 (2007).
117. Ducibella, T. & Fissore, R. The roles of Ca<sup>2+</sup>, downstream protein kinases, and oscillatory signaling in regulating fertilization and the activation of development. *Dev. Biol.* **315**, 257–279 (2008).
118. Kikuchi, K. *et al.* Maturation/M-phase promoting factor: a regulator of aging in porcine oocytes. *Biol. Reprod.* **63**, 715–22 (2000).
119. Phillips, K. P. *et al.* Inhibition of MEK or cdc2 Kinase Parthenogenetically Activates Mouse Eggs and Yields the Same Phenotypes as Mos<sup>-/-</sup> Parthenogenotes. *Dev. Biol.* **247**, 210–223 (2002).
120. Lu, Q., Smith, G. D., Chen, D.-Y., Han, Z.-M. & Sun, Q.-Y. Activation of protein kinase C induces mitogen-activated protein kinase dephosphorylation and pronucleus formation in rat oocytes. *Biol. Reprod.* **67**, 64–9 (2002).
121. Que, E. L. *et al.* Quantitative mapping of zinc fluxes in the mammalian egg reveals the origin of fertilization-induced zinc sparks. *Nat. Chem.* **7**, 130–9 (2015).
122. Zhao, M.-H., Kim, N.-H. & Cui, X.-S. Zinc depletion activates porcine metaphase II oocytes independently of the protein kinase C pathway. *Vitr. Cell. Dev. Biol. - Anim.* **50**, 945–951 (2014).
123. Tokuhira, K. & Dean, J. Glycan-Independent Gamete Recognition Triggers Egg Zinc Sparks and ZP2 Cleavage to Prevent Polyspermy. *Dev. Cell* **46**, 627–640.e5 (2018).
124. Kerns, K., Zigo, M., Drobnis, E. Z., Sutovsky, M. & Sutovsky, P. Zinc ion flux during mammalian

- sperm capacitation. *Nat. Commun.* **9**, 2061 (2018).
125. Poccia, D. & Collas, P. Nuclear envelope dynamics during male pronuclear development. *Dev. Growth Differ.* **39**, 541–50 (1997).
  126. Chan, A. W. *et al.* Clonal propagation of primate offspring by embryo splitting. *Science* **287**, 317–9 (2000).
  127. Florman, H. & Ducibella, T. Fertilization in mammals. In ‘Knobil and Neill’s Physiology of Reproduction’. 3rd edn.(Ed. JD Neill.) pp. 55–112. (2006).
  128. Kanka, J. Gene expression and chromatin structure in the pre-implantation embryo. *Theriogenology* **59**, 3–19 (2003).
  129. Sutovsky, P., Simerly, C., Hewitson, L. & Schatten, G. Assembly of nuclear pore complexes and annulate lamellae promotes normal pronuclear development in fertilized mammalian oocytes. *J. Cell Sci.* **111 ( Pt 19)**, 2841–54 (1998).
  130. Baur, T., Ramadan, K., Schlundt, A., Kartenbeck, J. & Meyer, H. H. NSF- and SNARE-mediated membrane fusion is required for nuclear envelope formation and completion of nuclear pore complex assembly in *Xenopus laevis* egg extracts. *J. Cell Sci.* **120**, 2895–903 (2007).
  131. Stuurman, N., Heins, S. & Aebi, U. Nuclear Lamins: Their Structure, Assembly, and Interactions. *J. Struct. Biol.* **122**, 42–66 (1998).
  132. González-Granado, J. M. *et al.* Sorting nexin 6 enhances lamin a synthesis and incorporation into the nuclear envelope. *PLoS One* **9**, e115571 (2014).
  133. Holaska, J. M., Wilson, K. L. & Mansharamani, M. The nuclear envelope, lamins and nuclear assembly. *Curr. Opin. Cell Biol.* **14**, 357–64 (2002).
  134. Nevoral, J. & Sutovsky, P. *Epigenome Modification and Ubiquitin-Dependent Proteolysis During Pronuclear Development of the Mammalian Zygote: Animal Models to Study Pronuclear Development. Animal Models and Human Reproduction* (2017).  
doi:10.1002/9781118881286.ch17
  135. Ogushi, S. *et al.* The Maternal Nucleolus Is Essential for Early Embryonic Development in Mammals. *Science (80-. )*. **319**, 613–616 (2008).
  136. Kaňka, J. *et al.* Transcriptional activity and nucleolar ultrastructure of embryonic rabbit nuclei after transplantation to enucleated oocytes. *Mol. Reprod. Dev.* **43**, 135–144 (1996).
  137. Kaňka, J., Smith, S. D., Soloy, E., Holm, P. & Callesen, H. Nucleolar ultrastructure in bovine nuclear transfer embryos. *Mol. Reprod. Dev.* **52**, 253–263 (1999).
  138. Laurincik, J. *et al.* Nucleolar ultrastructure and protein allocation in in vitro produced porcine embryos. *Mol. Reprod. Dev.* **68**, 327–34 (2004).
  139. Kopečný, V., Fléchon, J. E., Camous, S. & Fulka, J. Nucleologensis and the onset of transcription in the eight-cell bovine embryo: fine-structural autoradiographic study. *Mol.*



- Reprod. Dev.* **1**, 79–90 (1989).
140. Hyttel, P. *et al.* Nucleolar proteins and ultrastructure in preimplantation porcine embryos developed in vivo. *Biol. Reprod.* **63**, 1848–56 (2000).
  141. Viuff, D. *et al.* Activation of the ribosomal RNA genes late in the third cell cycle of porcine embryos. *Biol. Reprod.* **66**, 629–34 (2002).
  142. Schultz, R. M., Stein, P. & Svoboda, P. The oocyte-to-embryo transition in mouse: past, present, and future†. *Biol. Reprod.* **99**, 160–174 (2018).
  143. Kanka, J., Kepková, K. & Nemcová, L. Gene expression during minor genome activation in preimplantation bovine development. *Theriogenology* **72**, 572–83 (2009).
  144. Graf, A. *et al.* Genome activation in bovine embryos: Review of the literature and new insights from RNA sequencing experiments. *Anim. Reprod. Sci.* **149**, 46–58 (2014).
  145. Wang, H. & Dey, S. K. Roadmap to embryo implantation: clues from mouse models. *Nat. Rev. Genet.* **7**, 185–99 (2006).
  146. Sirard, M.-A. Factors affecting oocyte and embryo transcriptomes. *Reprod. Domest. Anim.* **47 Suppl 4**, 148–55 (2012).
  147. Braude, P., Bolton, V. & Moore, S. Human gene expression first occurs between the four- and eight-cell stages of preimplantation development. *Nature* **332**, 459–461 (1988).
  148. Maître, J.-L. *et al.* Asymmetric division of contractile domains couples cell positioning and fate specification. *Nature* **536**, 344–348 (2016).
  149. Jorgensen, B. G. *et al.* DNA methylation, through DNMT1, has an essential role in the development of gastrointestinal smooth muscle cells and disease. *Cell Death Dis.* **9**, 474 (2018).
  150. Wang, C. *et al.* Reprogramming of H3K9me3-dependent heterochromatin during mammalian embryo development. *Nat. Cell Biol.* **20**, 620–631 (2018).
  151. Liu, X. *et al.* Distinct features of H3K4me3 and H3K27me3 chromatin domains in pre-implantation embryos. *Nature* **537**, 558–562 (2016).
  152. Dagar, V. *et al.* Genetic variation affecting DNA methylation and the human imprinting disorder, Beckwith-Wiedemann syndrome. *Clin. Epigenetics* **10**, 114 (2018).
  153. Thongsroy, J., Patchesung, M. & Mutirangura, A. The association between Alu hypomethylation and severity of type 2 diabetes mellitus. *Clin. Epigenetics* **9**, 93 (2017).
  154. Nilsson, E. *et al.* Environmentally induced epigenetic transgenerational inheritance of ovarian disease. *PLoS One* **7**, e36129 (2012).
  155. Siklenka, K. *et al.* Disruption of histone methylation in developing sperm impairs offspring health transgenerationally. *Science (80-. )*. **350**, aab2006-aab2006 (2015).
  156. Doyle, T. J., Bowman, J. L., Windell, V. L., McLean, D. J. & Kim, K. H. Transgenerational effects



- of di-(2-ethylhexyl) phthalate on testicular germ cell associations and spermatogonial stem cells in mice. *Biol. Reprod.* **88**, 112 (2013).
157. Napoli, C., Lemieux, C. & Jorgensen, R. Introduction of a Chimeric Chalcone Synthase Gene into Petunia Results in Reversible Co-Suppression of Homologous Genes in trans. *Plant Cell* **2**, 279–289 (1990).
  158. Aravin, A. *et al.* A novel class of small RNAs bind to MILI protein in mouse testes. *Nature* **442**, 203–7 (2006).
  159. Aravin, A. A., Hannon, G. J. & Brennecke, J. The Piwi-piRNA pathway provides an adaptive defense in the transposon arms race. *Science* **318**, 761–4 (2007).
  160. Hong, X., Luense, L. J., McGinnis, L. K., Nothnick, W. B. & Christenson, L. K. Dicer1 Is Essential for Female Fertility and Normal Development of the Female Reproductive System. *Endocrinology* **149**, 6207–6212 (2008).
  161. Uhde, K., van Tol, H., Stout, T. & Roelen, B. MicroRNA Expression in Bovine Cumulus Cells in Relation to Oocyte Quality. *Non-Coding RNA* **3**, 12 (2017).
  162. Macaulay, A. D. *et al.* Cumulus Cell Transcripts Transit to the Bovine Oocyte in Preparation for Maturation1. *Biol. Reprod.* **94**, 16 (2016).
  163. Yuan, S. *et al.* Sperm-borne miRNAs and endo-siRNAs are important for fertilization and preimplantation embryonic development. *Development* **143**, 635–647 (2016).
  164. Ohnishi, Y. *et al.* Small RNA class transition from siRNA/piRNA to miRNA during pre-implantation mouse development. *Nucleic Acids Res.* **38**, 5141–51 (2010).
  165. Viswanathan, S. R. *et al.* microRNA expression during trophectoderm specification. *PLoS One* **4**, e6143 (2009).
  166. Nguyen, T. A. *et al.* Functional Anatomy of the Human Microprocessor. *Cell* **161**, 1374–87 (2015).
  167. Lee, Y. *et al.* The nuclear RNase III Drosha initiates microRNA processing. *Nature* **425**, 415–9 (2003).
  168. Flemr, M. *et al.* A retrotransposon-driven dicer isoform directs endogenous small interfering RNA production in mouse oocytes. *Cell* **155**, 807–16 (2013).
  169. Svoboda, P. Long and small noncoding RNAs during oocyte-to-embryo transition in mammals. *Biochem. Soc. Trans.* **45**, 1117–1124 (2017).
  170. Tanpure, A. A. & Balasubramanian, S. Synthesis and Multiple Incorporations of 2'-O-Methyl-5-hydroxymethylcytidine, 5-Hydroxymethylcytidine and 5-Formylcytidine Monomers into RNA Oligonucleotides. *ChemBioChem* **18**, 2236–2241 (2017).
  171. Wu, T. P. *et al.* DNA methylation on N6-adenine in mammalian embryonic stem cells. *Nature* **532**, 329–333 (2016).

172. Wigler, M. H. The inheritance of methylation patterns in vertebrates. *Cell* **24**, 285–6 (1981).
173. Uysal, F., Ozturk, S. & Akkoyunlu, G. DNMT1, DNMT3A and DNMT3B proteins are differently expressed in mouse oocytes and early embryos. *J. Mol. Histol.* **48**, 417–426 (2017).
174. Bestor, T. H. The DNA methyltransferases of mammals. *Hum. Mol. Genet.* **9**, 2395–402 (2000).
175. Giraldo, A. M., DeCourcy, K., Ball, S. F., Hylan, D. & Ayares, D. L. Gene expression of Dnmt1 isoforms in porcine oocytes, embryos, and somatic cells. *Cell. Reprogram.* **15**, 309–21 (2013).
176. Smallwood, S. A. *et al.* Dynamic CpG island methylation landscape in oocytes and preimplantation embryos. *Nat. Genet.* **43**, 811–4 (2011).
177. Kato, Y. *et al.* Role of the Dnmt3 family in de novo methylation of imprinted and repetitive sequences during male germ cell development in the mouse. *Hum. Mol. Genet.* **16**, 2272–80 (2007).
178. Auclair, G., Guibert, S., Bender, A. & Weber, M. Ontogeny of CpG island methylation and specificity of DNMT3 methyltransferases during embryonic development in the mouse. *Genome Biol.* **15**, 545 (2014).
179. Auclair, G. & Weber, M. Mechanisms of DNA methylation and demethylation in mammals. *Biochimie* **94**, 2202–2211 (2012).
180. Kohli, R. M. & Zhang, Y. TET enzymes, TDG and the dynamics of DNA demethylation. *Nature* **502**, 472–479 (2013).
181. Ma, J.-Y. *et al.* Exogenous thymine DNA glycosylase regulates epigenetic modifications and meiotic cell cycle progression of mouse oocytes. *Mol. Hum. Reprod.* **21**, 186–94 (2015).
182. Hajkova, P. Epigenetic reprogramming - taking a lesson from the embryo. *Curr. Opin. Cell Biol.* **22**, 342–350 (2010).
183. Iqbal, K., Jin, S.-G., Pfeifer, G. P. & Szabó, P. E. Reprogramming of the paternal genome upon fertilization involves genome-wide oxidation of 5-methylcytosine. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **108**, 3642–3647 (2011).
184. Wossidlo, M. *et al.* 5-Hydroxymethylcytosine in the mammalian zygote is linked with epigenetic reprogramming. *Nat. Commun.* **2**, 241 (2011).
185. Rougier, N. *et al.* Chromosome methylation patterns during mammalian preimplantation development. *Genes Dev.* **12**, 2108–13 (1998).
186. Guo, H. *et al.* The DNA methylation landscape of human early embryos. *Nature* **511**, 606–610 (2014).
187. Shen, L. *et al.* Tet3 and DNA replication mediate demethylation of both the maternal and paternal genomes in mouse zygotes. *Cell Stem Cell* **15**, 459–471 (2014).
188. Reik, W. & Walter, J. Evolution of imprinting mechanisms: the battle of the sexes begins in the zygote. *Nat. Genet.* **27**, 255–6 (2001).

189. Nakanishi, M. O. *et al.* Trophoblast-specific DNA methylation occurs after the segregation of the trophectoderm and inner cell mass in the mouse periimplantation embryo. *Epigenetics* **7**, 173–182 (2012).
190. Manes, C. & Menzel, P. Demethylation of CpG sites in DNA of early rabbit trophoblast. *Nature* **293**, 589–90
191. Nashun, B., Hill, P. W. & Hajkova, P. Reprogramming of cell fate: epigenetic memory and the erasure of memories past. *EMBO J.* **34**, 1296–1308 (2015).
192. Hill, P. W. S. *et al.* Epigenetic reprogramming enables the transition from primordial germ cell to gonocyte. *Nature* **555**, 392–396 (2018).
193. Surani, M. A. & Hajkova, P. Epigenetic Reprogramming of Mouse Germ Cells toward Totipotency. *Cold Spring Harb. Symp. Quant. Biol.* **75**, 211–218 (2010).
194. Leitch, H. G. *et al.* Naive pluripotency is associated with global DNA hypomethylation. *Nat. Struct. Mol. Biol.* **20**, 311–316 (2013).
195. Strahl, B. D. & Allis, C. D. The language of covalent histone modifications. *Nature* **403**, 41–5 (2000).
196. Lyko, F. DNA methylation learns to fly. *Trends Genet.* **17**, 169–72 (2001).
197. Nottke, A. C. *et al.* SPR-5 is a histone H3K4 demethylase with a role in meiotic double-strand break repair. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **108**, 12805–12810 (2011).
198. Chung, H.-R. *et al.* PHF13 is a molecular reader and transcriptional co-regulator of H3K4me2/3. *Elife* **5**, (2016).
199. Yang, Y. *et al.* The Histone Code Regulating Expression of the Imprinted Mouse *Igf2r* Gene. *Endocrinology* **144**, 5658–5670 (2003).
200. Nakayama, J. -i., Rice, J. C., Strahl, B. D., Allis, C. D. & Grewal, S. I. Role of Histone H3 Lysine 9 Methylation in Epigenetic Control of Heterochromatin Assembly. *Science (80-. ).* **292**, 110–113 (2001).
201. Daujat, S. *et al.* Crosstalk between CARM1 methylation and CBP acetylation on histone H3. *Curr. Biol.* **12**, 2090–7 (2002).
202. Yeo, S., Lee, K.-K., Han, Y.-M. & Kang, Y.-K. Methylation changes of lysine 9 of histone H3 during preimplantation mouse development. *Mol. Cells* **20**, 423–8 (2005).
203. Liu, H., Kim, J.-M. & Aoki, F. Regulation of histone H3 lysine 9 methylation in oocytes and early pre-implantation embryos. *Development* **131**, 2269–2280 (2004).
204. Ma, X.-S. *et al.* The Dynamics and Regulatory Mechanism of Pronuclear H3k9me2 Asymmetry in Mouse Zygotes. *Sci. Rep.* **5**, 17924 (2016).
205. Rassoulzadegan, M. *et al.* RNA-mediated non-mendelian inheritance of an epigenetic change in the mouse. *Nature* **441**, 469–474 (2006).

206. Yan, W. Potential roles of noncoding RNAs in environmental epigenetic transgenerational inheritance. *Mol. Cell. Endocrinol.* **398**, 24–30 (2014).
207. Kwak, S.-S., Cheong, S.-A., Yoon, J. D., Jeon, Y. & Hyun, S.-H. Expression patterns of sirtuin genes in porcine preimplantation embryos and effects of sirtuin inhibitors on in vitro embryonic development after parthenogenetic activation and in vitro fertilization. *Theriogenology* **78**, 1597–610 (2012).
208. Kwak, S.-S. *et al.* The effects of resveratrol on porcine oocyte in vitro maturation and subsequent embryonic development after parthenogenetic activation and in vitro fertilization. *Theriogenology* **78**, 86–101 (2012).
209. Sutovsky, P. & Schatten, G. Paternal contributions to the mammalian zygote: fertilization after sperm-egg fusion. *Int. Rev. Cytol.* **195**, 1–65 (2000).
210. Villanueva Paz, M. *et al.* Targeting autophagy and mitophagy for mitochondrial diseases treatment. *Expert Opin. Ther. Targets* **20**, 487–500 (2016).
211. Ordureau, A. *et al.* Quantitative proteomics reveal a feedforward mechanism for mitochondrial PARKIN translocation and ubiquitin chain synthesis. *Mol. Cell* **56**, 360–75 (2014).
212. Koyano, F. *et al.* Ubiquitin is phosphorylated by PINK1 to activate parkin. *Nature* **510**, 162–166 (2014).
213. Nguyen, T. N., Padman, B. S. & Lazarou, M. Deciphering the Molecular Signals of PINK1/Parkin Mitophagy. *Trends Cell Biol.* **26**, 733–744 (2016).
214. Ding, W.-X. & Yin, X.-M. Mitophagy: mechanisms, pathophysiological roles, and analysis. *Biol. Chem.* **393**, 547–64 (2012).
215. Li, W. *et al.* MicroRNA-137 Is a Novel Hypoxia-responsive MicroRNA That Inhibits Mitophagy via Regulation of Two Mitophagy Receptors FUNDC1 and NIX. *J. Biol. Chem.* **289**, 10691–10701 (2014).
216. Liu, C. *et al.* Sirt1 regulates acrosome biogenesis by modulating autophagic flux during spermiogenesis in mice. *Development* **144**, 441–451 (2017).
217. Lee, I. H. *et al.* A role for the NAD-dependent deacetylase Sirt1 in the regulation of autophagy. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **105**, 3374–3379 (2008).
218. Ou, X., Lee, M. R., Huang, X., Messina-Graham, S. & Broxmeyer, H. E. SIRT1 positively regulates autophagy and mitochondria function in embryonic stem cells under oxidative stress. *Stem Cells* **32**, 1183–94 (2014).
219. Rojansky, R., Cha, M.-Y. & Chan, D. C. Elimination of paternal mitochondria in mouse embryos occurs through autophagic degradation dependent on PARKIN and MUL1. *Elife* **5**, (2016).
220. Song, W.-H., Yi, Y.-J., Sutovsky, M., Meyers, S. & Sutovsky, P. Autophagy and ubiquitin–

- proteasome system contribute to sperm mitophagy after mammalian fertilization. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **113**, E5261–E5270 (2016).
221. Sutovsky, P. & Song, W.-H. Post-fertilisation sperm mitophagy: the tale of Mitochondrial Eve and Steve. *Reprod. Fertil. Dev.* **30**, 56–63 (2017).
  222. Sutovsky, P. *et al.* Ubiquitin tag for sperm mitochondria. *Nature* **402**, 371–372 (1999).
  223. Vandiver, M. S. *et al.* Sulfhydrylation mediates neuroprotective actions of parkin. *Nat. Commun.* **4**, 1626 (2013).
  224. Song, W.-H., Ballard, J. W. O., Yi, Y.-J. & Sutovsky, P. Regulation of Mitochondrial Genome Inheritance by Autophagy and Ubiquitin-Proteasome System: Implications for Health, Fitness, and Fertility. *Biomed Res. Int.* **2014**, 1–16 (2014).
  225. Craven, L., Tang, M.-X., Gorman, G. S., De Sutter, P. & Heindryckx, B. Novel reproductive technologies to prevent mitochondrial disease. *Hum. Reprod. Update* **23**, 501–519 (2017).
  226. Cooney, L. G. & Dokras, A. Beyond fertility: polycystic ovary syndrome and long-term health. *Fertil. Steril.* **110**, 794–809 (2018).
  227. Maciejewska-Jeske, M., Szeliga, A. & Męczekalski, B. Consequences of premature ovarian insufficiency on women’s sexual health. *Menopausal Rev.* **17**, 127–130 (2018).
  228. Revelli, A. *et al.* Empty follicle syndrome revisited: definition, incidence, aetiology, early diagnosis and treatment. *Reprod. Biomed. Online* **35**, 132–138 (2017).
  229. Sánchez, F. *et al.* An improved IVM method for cumulus-oocyte complexes from small follicles in polycystic ovary syndrome patients enhances oocyte competence and embryo yield. *Hum. Reprod.* **32**, 2056–2068 (2017).
  230. Chian, R. C., Buckett, W. M., Tulandi, T. & Tan, S. L. Prospective randomized study of human chorionic gonadotrophin priming before immature oocyte retrieval from unstimulated women with polycystic ovarian syndrome. *Hum. Reprod.* **15**, 165–70 (2000).
  231. Trounson, A., Anderiesz, C. & Jones, G. Maturation of human oocytes in vitro and their developmental competence. *Reproduction* **121**, 51–75 (2001).
  232. Clyde, J. M., Gosden, R. G., Rutherford, A. J. & Picton, H. M. Demonstration of a mechanism of aneuploidy in human oocytes using Multifluor fluorescence in situ hybridization. *Fertil. Steril.* **76**, 837–40 (2001).
  233. Chattopadhyay, R. *et al.* Effect of Follicular Fluid Oxidative Stress on Meiotic Spindle Formation in Infertile Women with Polycystic Ovarian Syndrome. *Gynecol. Obstet. Invest.* **69**, 197–202 (2010).
  234. Petrová, I. *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.* **55**, 75–82 (2009).
  235. Petrová, I., Rajmon, R., ... M. S.-C. J. of & 2005, undefined. Improvement of developmental

- competence of aged porcine oocytes by means of the synergistic effect of insulin-like growth factor-1 (IGF-1) and epidermal. *researchgate.net*
236. Nevoral, J. *et al.* Involvement of K<sup>+</sup>ATP and Ca<sup>2+</sup> channels in hydrogen sulfide-suppressed ageing of porcine oocytes. *Biol. Res.* **51**, 38 (2018).
  237. 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* **16**, 145–52 (2008).
  238. Yang, Q. *et al.* Melatonin attenuates postovulatory oocyte dysfunction by regulating SIRT1 expression. *Reproduction* **156**, 81–92 (2018).
  239. Nevoral, J. *et al.* The role of nitric oxide synthase isoforms in aged porcine oocytes. *Czech J. Anim. Sci.* **58**, (2013).
  240. Goud, P. T., Goud, A. P., Diamond, M. P., Gonik, B. & Abu-Soud, H. M. Nitric oxide extends the oocyte temporal window for optimal fertilization. *Free Radic. Biol. Med.* **45**, 453–9 (2008).
  241. Krejčová, T., Petr, J., ... M. K.-C. J. A. & 2009, undefined. Effects of cycloheximide or 6-dimethyl aminopurine on the parthenogenetic activation of pig oocytes using pulsatile treatment with nitric oxide donor. *agriculturejournals.cz*
  242. Premkumar, K. V. & Chaube, S. K. Nitric oxide signals postovulatory aging-induced abortive spontaneous egg activation in rats. *Redox Rep.* **20**, 184–192 (2015).
  243. Ota, H. *et al.* Testosterone Deficiency Accelerates Neuronal and Vascular Aging of SAMP8 Mice: Protective Role of eNOS and SIRT1. *PLoS One* **7**, e29598 (2012).
  244. Huang, D. *et al.* Nitric oxide mediates apoptosis and mitochondrial dysfunction and plays a role in growth hormone deficiency by nivalenol in GH3 cells. *Sci. Rep.* **7**, 17079 (2017).
  245. Corpas, F. J., Barroso, J. B., Palma, J. M. & del Río, L. A. in *Sub-cellular biochemistry* **69**, 283–298 (2013).
  246. Gérard, N., Caillaud, M., Martoriati, A., Goudet, G. & Lalmanach, A.-C. The interleukin-1 system and female reproduction. *J. Endocrinol.* **180**, 203–12 (2004).
  247. Sorokin, A. Nitric Oxide Synthase and Cyclooxygenase Pathways: A Complex Interplay in Cellular Signaling. *Curr. Med. Chem.* **23**, 2559–2578 (2016).
  248. 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.* **68**, 1757–64 (2005).
  249. Tang, G., Zhang, L., Yang, G., Wu, L. & Wang, R. Hydrogen sulfide-induced inhibition of L-type Ca<sup>2+</sup> channels and insulin secretion in mouse pancreatic beta cells. *Diabetologia* **56**, 533–41 (2013).
  250. Colborn, T., vom Saal, F. S. & Soto, A. M. Developmental effects of endocrine-disrupting chemicals in wildlife and humans. *Environ. Health Perspect.* **101**, 378–84 (1993).

251. Vandenberg, L. N. *et al.* Hormones and Endocrine-Disrupting Chemicals: Low-Dose Effects and Nonmonotonic Dose Responses. *Endocr. Rev.* **33**, 378–455 (2012).
252. Žalmanová, T. *et al.* Bisphenol S instead of bisphenol A: A story of reproductive disruption by regrettable substitution - A review. *Czech J. Anim. Sci.* **61**, (2016).
253. Petr, J. *et al.* Pyrethroids cypermethrin, deltamethrin and fenvalerate have different effects on in vitro maturation of pig oocytes at different stages of growth. *Animal* **7**, 134–42 (2013).
254. AL-Hussaini, T. K. *et al.* The effect of follicular fluid pesticides and polychlorinated biphenyls concentrations on intracytoplasmic sperm injection (ICSI) embryological and clinical outcome. *Eur. J. Obstet. Gynecol. Reprod. Biol.* **220**, 39–43 (2018).
255. Carignan, C. C. *et al.* Paternal urinary concentrations of organophosphate flame retardant metabolites, fertility measures, and pregnancy outcomes among couples undergoing in vitro fertilization. *Environ. Int.* **111**, 232–238 (2018).
256. DAI, Y.-E., CHEN, W., QI, H. & LIU, Q.-Q. Effect of bisphenol A on SOCS-3 and insulin signaling transduction in 3T3-L1 adipocytes. *Mol. Med. Rep.* **14**, 331–336 (2016).
257. Muhlhauser, A. *et al.* Bisphenol A Effects on the Growing Mouse Oocyte Are Influenced by Diet 1. *Biol. Reprod.* **80**, 1066–1071 (2009).
258. Smith-Oliver, T. & Butterworth, B. E. Correlation of the carcinogenic potential of di(2-ethylhexyl)phthalate (DEHP) with induced hyperplasia rather than with genotoxic activity. *Mutat. Res.* **188**, 21–8 (1987).
259. Tiwari, D. *et al.* Clastogenic and mutagenic effects of bisphenol A: An endocrine disruptor. *Mutat. Res. Toxicol. Environ. Mutagen.* **743**, 83–90 (2012).
260. Viñas, R. & Watson, C. S. Mixtures of xenoestrogens disrupt estradiol-induced non-genomic signaling and downstream functions in pituitary cells. *Environ. Heal.* **12**, 26 (2013).
261. Skinner, M. K. Endocrine disruptor induction of epigenetic transgenerational inheritance of disease. *Mol. Cell. Endocrinol.* **398**, 4–12 (2014).
262. Žalmanová, T. *et al.* Bisphenol S negatively affects the meiotic maturation of pig oocytes. *Sci. Rep.* **7**, 485 (2017).
263. Nevoral, J. *et al.* Long-term exposure to very low doses of bisphenol S affects female reproduction. *Reproduction* **156**, 47–57 (2018).
264. Ullah, A. *et al.* Bisphenol A and its analogs bisphenol B, bisphenol F, and bisphenol S: Comparative in vitro and in vivo studies on the sperms and testicular tissues of rats. *Chemosphere* **209**, 508–516 (2018).
265. Rahman, M. S. *et al.* Gestational Exposure to Bisphenol A Affects the Function and Proteome Profile of F1 Spermatozoa in Adult Mice. *Environ. Health Perspect.* **125**, 238–245 (2017).
266. Chemek, M., Mimouna, S. Ben, Boughammoura, S., Delbès, G. & Messaoudi, I. Protective role



- of zinc against the toxicity induced by exposure to cadmium during gestation and lactation on testis development. *Reprod. Toxicol.* **63**, 151–160 (2016).
267. Sunyer, J. *et al.* Early exposure to dichlorodiphenyldichloroethylene, breastfeeding and asthma at age six. *Clin. <html\_ent glyph="@amp;" ascii="&"/> Exp. Allergy* **36**, 1236–1241 (2006).
  268. Quitmeyer, A. & Roberts, R. Babies, Bottles, and Bisphenol A: The Story of a Scientist-Mother. *PLoS Biol.* **5**, e200 (2007).
  269. Andaluri, G., Manickavachagam, M. & Suri, R. Plastic toys as a source of exposure to bisphenol-A and phthalates at childcare facilities. *Environ. Monit. Assess.* **190**, 65 (2018).
  270. Zámostná, K. *et al.* A simple method for assessing hyaluronic acid production by cumulus-oocyte complexes. *Czech J. Anim. Sci.* **61**, (2016).
  271. Hunt, P. A. *et al.* Bisphenol a exposure causes meiotic aneuploidy in the female mouse. *Curr. Biol.* **13**, 546–53 (2003).
  272. Wang, T. *et al.* The toxic effects and possible mechanisms of Bisphenol A on oocyte maturation of porcine in vitro. *Oncotarget* **7**, 32554–65 (2016).
  273. Trapphoff, T., Heiligentag, M., El Hajj, N., Haaf, T. & Eichenlaub-Ritter, U. Chronic exposure to a low concentration of bisphenol A during follicle culture affects the epigenetic status of germinal vesicles and metaphase II oocytes. *Fertil. Steril.* **100**, 1758–67.e1 (2013).
  274. Dvořáková, M. *et al.* The antioxidative properties of S-allyl cysteine not only influence somatic cells but also improve early embryo cleavage in pigs. *PeerJ* **2016**, (2016).
  275. Krejčova, T. *et al.* Hydrogen sulfide donor protects porcine oocytes against aging and improves the developmental potential of aged porcine oocytes. *PLoS One* **10**, e0116964 (2015).
  276. Blaha, M., Prochazka, R., Adamkova, K., Nevoral, J. & Nemcova, L. Prostaglandin E2 stimulates the expression of cumulus expansion-related genes in pigs: the role of protein kinase B. *Prostaglandins Other Lipid Mediat.* **130**, (2017).
  277. Dursun, P., Doğan, N. U. & Ayhan, A. Oncofertility for gynecologic and non-gynecologic cancers: fertility sparing in young women of reproductive age. *Crit. Rev. Oncol. Hematol.* **92**, 258–67 (2014).
  278. Demeestere, I. *et al.* Live birth after autograft of ovarian tissue cryopreserved during childhood. *Hum. Reprod.* **30**, 2107–9 (2015).
  279. Dittrich, R. *et al.* Live birth after ovarian tissue autotransplantation following overnight transportation before cryopreservation. *Fertil. Steril.* **97**, 387–390 (2012).
  280. Goossens, E., Van Saen, D. & Tournaye, H. Spermatogonial stem cell preservation and transplantation: from research to clinic. *Hum. Reprod.* **28**, 897–907 (2013).



281. Crha, I. *et al.* Survival and infertility treatment in male cancer patients after sperm banking. *Fertil. Steril.* **91**, 2344–8 (2009).
282. Halászová, N. *et al.* [Fertility preserving methods in women with breast cancer before gonadotoxic therapy]. *Ces. Gynecol.* **82**, 287–292 (2017).
283. DeBaun, M. R., Niemitz, E. L. & Feinberg, A. P. Association of in vitro fertilization with Beckwith-Wiedemann syndrome and epigenetic alterations of LIT1 and H19. *Am. J. Hum. Genet.* **72**, 156–60 (2003).
284. Ecker, D. J. *et al.* Long-term effects of culture of preimplantation mouse embryos on behavior. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **101**, 1595–600 (2004).
285. Westerlund, E. *et al.* Incidence of hypertension, stroke, coronary heart disease, and diabetes in women who have delivered after in vitro fertilization: a population-based cohort study from Sweden. *Fertil. Steril.* **102**, 1096–1102 (2014).
286. Jin, Y.-X. *et al.* Autophagy and ubiquitin-mediated proteolysis may not be involved in the degradation of spermatozoon mitochondria in mouse and porcine early embryos. *Zygote* **24**, 31–41 (2016).
287. Liu, T. *et al.* SIRT1 reverses senescence via enhancing autophagy and attenuates oxidative stress-induced apoptosis through promoting p53 degradation. *Int. J. Biol. Macromol.* **117**, 225–234 (2018).