

Univerzita Karlova
Přírodovědecká fakulta

Studijní program: Reprodukční a vývojová biologie



Bc. Iveta Valentová

**NAD⁺-dependentní histon deacetyláza SIRT1 v procesu oogeneze, oplození a časného
embryonálního vývoje**

**NAD⁺-dependent histone deacetylase SIRT1 in the process of oogenesis, fertilization
and early embryonic development**

Diplomová práce

Vedoucí diplomové práce: doc. Ing. Jan Nevoral, Ph.D.

Praha, 2022

Prohlášení:

Prohlašuji, že jsem závěrečnou práci zpracovala samostatně a že jsem uvedla všechny použité informační zdroje a literaturu. Tato práce ani její podstatná část nebyla předložena k získání jiného nebo stejného akademického titulu.

V Praze, 22. 4. 2022

Podpis

Poděkování:

Na tomto místě bych ráda poděkovala svému školiteli **doc. Ing. Jan Nevoralovi, Ph.D.**, v první řadě za vedení mé práce, ochotnou pomoc a veškerý čas, který mi věnoval. Dále pak za nadšení a přátelskou atmosféru, kterou je Laboratoř reprodukční medicíny prostoupena. Poděkovat bych také chtěla celému týmu laboratoře, zvláště pak mým kolegyním MSc. Ladan Monsef a MVD. María Iniesta-Cuerda, PhD., za jejich empatii, rady a praktickou pomoc. V neposlední řadě bych ráda poděkovala své rodině, partnerovi a přátelům za obrovskou podporu během celého mého studia.

Abstrakt

SIRT1 je histon deacetyláza ze skupiny sirtuinů ovlivňující své epigenetické a ne-epigenetické cíle. Lze předpokládat, že dosud známé substráty SIRT1 se zapojují do regulace gametogeneze a časného embryonálního vývoje. Byly stanoveny hypotézy, že SIRT1 je přítomen v oocytech a časných embryích a že zde sehrává fyziologickou úlohu v procesech zrání oocytů, oplození a raného embryonálního vývoje. Pro ověření hypotéz byl vytvořen myší model kondicionální knock-out linie produkující *Sirt1*-deficientní oocyty. Oocyty a embrya byla podrobena analýze SIRT1, jeho vybraných substrátů a adekvátních markerů pomocí imunocytochemie. Zjistili jsme, že se přítomnost SIRT1 podílí na kvalitě oocytů prostřednictvím modulace histonového kódu chromatinu a stabilizace dělicího vřeténka. Dále pak čistě maternální původ SIRT1 přítomného v obou pronukleích zygot. V neposlední řadě jsme odhalili nezanedbatelný vliv SIRT1 na časný embryonální vývoj, a to pravděpodobně především díky podílu na aktivaci embryonálního genomu. Dosažené výsledky potvrzují hypotézu, že SIRT1 je přítomen v oocytech a embryích, převážně v blízkosti chromatinu. Z výsledků vyplývá, že SIRT1 představuje maternální faktor určující kvalitu oocytu a je nezbytný pro aktivaci embryonálního genomu.

Klíčová slova: oocyt, oplození, časný embryonální vývoj, blastocysta, sirtuin1, SIRT1, histon, tubulin

Abstract

SIRT1 is a histone deacetylase from the sirtuin family that affects epigenetic and non-epigenetic targets. We can assume that the known SIRT1 substrates are involved in the regulation of gametogenesis and early embryonic development. Our hypotheses say SIRT1 is present in oocytes and early embryos and it plays a physiological role in oocyte maturation, fertilization and early embryonic development. A mouse model of a conditional knock-out line producing *Sirt1*-deficient oocytes was developed to verify our hypotheses. Oocytes and embryos were analyzed for SIRT1, its selected substrates and other markers by immunocytochemistry. We found out that the presence of SIRT1 contributes to oocyte quality through modulation of the chromatin histone code and stabilization of the spindle. Furthermore, the purely maternal origin of SIRT1 presents in both zygote pronuclei. Last but not least we discovered a significant effect of SIRT1 on early embryonic development, probably mainly due to its role in the activation of the embryonic genome. The results confirm our hypothesis that SIRT1 is present in oocytes and embryos mainly around chromatin. The results show that SIRT1 is a maternal factor determining oocyte quality and it is necessary for the embryonic genome activation.

Keywords: oocyte, fertilization, early embryonic development, blastocyste, sirtuin1, SIRT1, histone, tubulin

Obsah

| | | |
|-------|---|----|
| 1 | Seznam zkratek | 6 |
| 2 | Úvod..... | 7 |
| 3 | Literární přehled..... | 8 |
| 3.1 | Oogeneze | 8 |
| 3.2 | Raný embryonální vývoj | 12 |
| 3.3 | Sirtuiny a úloha SIRT1 ve fyziologii reprodukce..... | 15 |
| 3.3.1 | Lokalizace SIRT1 v oocytech a časných embryích | 17 |
| 3.3.2 | Vybrané substráty SIRT1..... | 18 |
| 3.3.3 | SIRT1 germ-line knock-out..... | 20 |
| 4 | Cíle..... | 22 |
| 5 | Metody a materiál | 23 |
| 5.1 | Zvířata..... | 23 |
| 5.2 | Izolace oocytů/embryí | 24 |
| 5.3 | Partenogenetická aktivace | 25 |
| 5.4 | In vitro kultivace..... | 26 |
| 5.5 | In vitro fertilizace | 26 |
| 5.6 | Imunocytochemie | 26 |
| 5.7 | Diferenciální barvení blastocyst | 27 |
| 5.8 | Mikroskopie a analýza obrazu..... | 27 |
| 5.9 | Statistické zpracování dat | 28 |
| 6 | Výsledky | 29 |
| 6.1 | Přítomnost SIRT1 v oocytech a raných embryích..... | 29 |
| 6.2 | Popis myšího kondicionálního <i>Sirt1</i> knock-out modelu..... | 31 |
| 6.3 | Určení kvality oocytů na základě epigenetických substrátů SIRT1 | 33 |
| 6.4 | Určení kvality oocytů na základě neepigenetických substrátů | 34 |
| 6.5 | Vývojový potenciál embryí hemizygotního samce | 36 |
| 6.6 | SIRT1 v IVF embryích | 40 |
| 6.7 | Vývojový potenciál partenogenetických embryí | 41 |
| 7 | Diskuze | 43 |
| 8 | Závěr | 51 |
| 9 | Literatura..... | 52 |

1 Seznam zkratek

| | | |
|------|----------------------------------|--|
| ART | Assisted Reproductive Technology | Techniky asistované reprodukce |
| BSA | Bovine Serum Albumine | Hovězí sérový albumin |
| CDX2 | Caudal-type Homeobox-2 | Homeoboxový protein kaudálního typu |
| cKO | Conditioning Knock-out | Kondicionální knock-out |
| EGA | Embryonic Genome Activation | Aktivace embryonálního genomu |
| FoxO | Forkhead Box O | |
| FSH | Follicle Stimulating Hormone | Folikul stimulační hormon |
| GnRH | Gonadotropin Stimulating Hormone | Gonadotropin stimulující hormon |
| GV | Germinal Vesicle | Zárodečný váček |
| GVBD | Germinal Vesicle Breakdown | Rozpad zárodečného váčku |
| hCG | Human Chorionic Gonadotropin | Lidský choriový gonadotropin |
| HFT | Human Tubal Fluid | Lidská tubulární tekutina |
| IVF | <i>In vitro</i> Fertilization | <i>In vitro</i> fertilizace |
| IVM | <i>In vitro</i> Maturation | <i>In vitro</i> maturace |
| IVO | <i>In vivo</i> Ovulation | <i>In vivo</i> ovulovaný |
| LH | Luteinizing Hormone | Luteinizační hormon |
| MI | Metaphase I | Metafáze I |
| MII | Metaphase II | Metafáze II |
| NSN | Non-surrounded Nucleolus | Chromatin neobklopující jadérko |
| NGS | Normal Goat Serum | |
| OCT4 | Octamer-binding protein 4 | Oktamer vázající transkripční faktor 4 |
| PA | Parthenogenetic Activation | Partenogenetická aktivace |
| PBS | Phosphate Buffered Saline | Fosfátový pufr |
| PFA | Paraformaldehyde | Parafolmaldehyd |
| PGCs | Primordial Germ Cells | Primordiální zárodečné buňky |
| PMSG | Pregnant Mare Serum Gonadotropin | |
| PVA | Polyvinyl-alcohol | Polyvinyl-alkohol |
| ROS | Reactive Oxygen Species | Volné kyslíkové radikály |
| SN | Surrounded Nucleolus | Chromatin obklopující jadérko |

2 Úvod

Techniky asistované reprodukce (ART, Assisted Reproductive Technology) jsou dnes hojně využívány jak u hospodářských zvířat, tak v lidské medicíně. Úspěšnost těchto technik je však často nekonzistentní a těžko předvídatelná. Častá příčina idiopatické infertility se může skrývat v neobeznámených buněčných a molekulárních mechanismech tvorby a zrání gamet, případně časného embryonálního vývoje. Odhalení těchto mechanismů by mohlo přispět k zlepšení přístupů v ART během přípravy a kultivace gamet a vzniknuvších embryí. Také je někdy nutné během ART provádět selekci jak gamet, tak následně embryí vhodných k implantaci. Otázkou ovšem zůstává, na základě jakých ukazatelů je vhodné tuto selekci provádět. V poslední době se vedle genetických stále častěji klade důraz na další faktory zejména epigenetické.

Zrání oocytů a raná embryogeneze je řízena složitou sítí mechanismů. Dochází zde k vytvoření velmi specifické buňky, jakou je oocyt. Následně po průniku spermie vzniká nový organismus, který je nejprve závislý na zásobách nashromážděných v oocyту, ale postupně se embryo stává na maternálních faktorech nezávislé a aktivuje vlastní genom. Do těchto zásadních změn se nezanedbatelně zapojují i mechanismy regulující epigenetické a další cíle.

Sirtuiny jsou rodinou vysoce evolučně konzervovaných NAD⁺-dependentních histon deacetyláz. Jsou stále častěji studovány v řadě oblastí pomáhajících odhalit fungování organismů včetně reprodukce. Ze členů rodiny sirtuinů patří k jednomu z nejvíce studovaných sirtuin 1 (SIRT1). Tento sirtuin se podílí na řadě biologických procesů, a to skrze svou zřejmě širokou síť epigenetických i ne-epigenetických substrátů. Ve většině těchto procesů má protektivní účinek jako například při ochraně před stárnutím nebo oxidačním stresem.

Pokud porozumíme mechanismům, kterými se hlavní hráči zapojují do procesů gametogeneze a raného embryonálního vývoje, můžeme zlepšit jednak přístupy v ART ale i další metody související s lidským zdravím a reprodukcí.

3 Literární přehled

3.1 Oogeneze

Samičí pohlavní buňka savců zvaná oocyt je jednou z největších buněk těla. U člověka má průměr cca 120 μm a u myši dosahuje průměru okolo 70 μm (Griffin et al., 2006). Oocyt vzniká procesem oogeneze, který u savců začíná ještě v prenatálním stadiu a fakticky je oogeneze dokončena až po oplodnění vyloučením druhého pólóvého tělíška.

Předchůdci samčích i samičích pohlavních buněk jsou primordiální zárodečné buňky (PGCs, Primordial Germ Cells), které se oddělují od somatické linie v poměrně časně fázi embryonálního vývoje. Vznikají v oblasti extraembryonální dutiny žloutkového vaku a entodermální výstelky zadní části primitivního střeva. Jejich přesný původ je ovšem kvůli obtížné odlišitelnosti od somatických buněk stále nejistý.

PGCs dále migrují (u člověka během 3. - 6. týdne vývoje, u myši během 8. - 10. embryonálního dne) podél dorsálního mesenteria zadního střeva do genitální lišty (shrnutí v Baldock et al. 2015). Genitální lišta je předchůdce gonády a je tvořena převážně mezenchymem, epitelialními buňkami coelomu a buňkami mesonefrického původu (shrnutí v Pipre et al. 2016). Zde se vlivem exprese specifických genů uložených na gonozómech diferencují PGCs na samičí oogonie nebo samčí spermatogonie. Později se po dostatečném nárůstu populace prekurzorů pohlavních buněk vyvíjí i genitální lišta. V závislosti na pohlaví je konečným stádiem jejího vývoje ovarium v případě samice či testes v případě samce.

Již během migrace se PGCs intenzivně mitoticky dělí. Proliferace následně již oogonií pokračuje u člověka až do 5. měsíce prenatálního vývoje, kdy dosahují svého početního maxima (u člověka asi 7 milionů). Následně se jejich počet opět redukuje prostřednictvím apoptózy až do porodu jedince (u člověka 700 tis. - 2 mil.). Tato redukce pokračuje i během postnatálního života až do období pohlavní zralosti, kdy počet oocytů činí u člověka pouze 400 tisíc a z tohoto počtu pouze přibližně 500 během života ženy dosáhne stadia ovulace.

Aby se z diploidní oogonie stal haploidní oocyt, musí ve svém vývoji podstoupit meiózu zahrnující redukční dělení. Karyokineze je následována cytokyze, která je v případě oocytu asymetrická. Z jedné vstupní buňky vzniká pouze jeden oocyt s haploidní sadou chromozómů a pólóvá tělíška. Již během fáze dělení (u člověka mezi 3. a 7. měsícem prenatálního vývoje) některé oogonie postupně zvětšují svůj objem a stávají se primárními oocyty. Ty poté vstupují do profáze I meiotického dělení.

První meiotické dělení je dělením redukčním. Profázi I je možné rozdělit na několik částí. Ve fázi leptotene chromozómy postupně kondenzují a začínají se tvořit jejich homologní páry. V druhé fázi zygotene jsou spárované homologní chromozómy těsně spojeny pomocí synaptonemálního komplexu, čímž tvoří takzvaná bivalenta. Během následující fáze pachytene dochází ke komplikovanému a evolučně velmi významnému procesu crossing-over. Během tohoto procesu dochází k vzájemné výměně částí genetické informace mezi jednotlivými homologními chromozómy. S další fází zvanou diplotene dochází k rozrušení synaptonemálního komplexu. Bivalenta zůstávají spojena pouze v místech překřížení, která se nazývají chiasmata. Poslední fází profáze I je diakineze, kdy probíhá silná kondenzace chromozómů a rozpadá se jaderný obal. Meióza následně může pokračovat do metafáze I.

Během oogeneze však probíhá profáze I pouze do stadia diplotene, v němž dochází k prvnímu meiotickému bloku. U člověka začíná tento proces mezi 3. a 7. měsícem vývoje a pokračuje ještě v období po porodu. Při vývoji myši jsou 5. den po narození již všechny zbývající oocyty právě ve stadiu diplotene profáze I (Behringer et al., 2014). S prvním meiotickým blokem je meióza zastavena a oocyt přechází do klidového stadia zvaného diktyotenní, ve kterém setrvává až do doby před případnou ovulací v období pohlavní zralosti. Relativně zvětšené jádro oocytu typické pro toto období se nazývá zárodečný váček (GV, germinal vesicle). Ve stadiu GV je možné rozlišit dvě různé konfigurace chromatinu. První uskupení tvoří více rozptýlený chromatin neobklopující jadérko (NSN, non-surrounded nucleolus) a je typické vysokou transkripční aktivitou charakteristickou pro rostoucí oocyt. Následuje druhá konfigurace obklopující jadérko (SN, surrounded nucleolus), kde je chromatin kondenzovanější a transkripční aktivita utlumena (Bouniol-Baly et al., 1999).

Kolem těchto oocytů se diferencuje vrstva plochých epitelových buněk zvaných buňky folikulární. Celé toto uspořádání se nazývá primordiální folikul. Oocyty, které se nestaly součástí primordiálního folikulu, zanikají. Stejně tak některé primordiální folikuly degradují i během postnatálního vývoje. U myši se jejich počet redukuje přibližně na polovinu před 3. - 5. týdnem věku (Behringer et al., 2014). Zbylé primordiální folikuly v této podobě zůstávají až do období před ovulací, v případě člověka i desítky let.

Do období puberty většinou žena vstupuje mezi 10. a 13. rokem života a během několika dalších let pohlavně dozrává. V případě samice myši je možné hovořit o nástupu puberty kolem 30. dne života, kdy je možné pozorovat tzv. vaginal opening (Nevoral et al., 2021). U samic myši dochází k pohlavní zralosti v závislosti na konkrétním kmeni myši v 6. týdnu života (Behringer et al., 2014). Po nástupu puberty a s tím spojenou první menstruací (menarché), začínají folikuly cyklicky dozrávat. Toto dozrávání je výsledkem

estrálního (u člověka menstruačního) cyklu, jehož délka se liší u jednotlivých druhů savců a do určité míry i u jedinců téhož druhu. Je ovlivněna environmentálními faktory a hladinou hormonů v krvi. U člověka trvá cyklus ženy průměrně 28 dní, u samic myši se opakuje přibližně po 4 dnech.

Díky zvýšené hladině gonadotropinů v krvi začíná skupina několika primordiálních folikulů odpovídat na stimul růstových faktorů (recruitment folikulů). Tyto folikuly vstupují do procesu folikulogeneze, který v případě zdárného průběhu končí vytvořením Graafova folikulu a ovulací v něm obsaženého oocyty. Do této folikulární vlny trvající několik desítek dní vstupuje více folikulů, než kolik odpovídá příslušné ovulaci (u člověka např. 15 - 20 folikulů). Zbylé folikuly fyziologicky zanikají během procesu atrezíí.

První fází folikulogeneze je fáze preantrální zahrnující vývoj od primordiálního přes primární až po sekundární folikul. Tato fáze trvá u člověka 290 dní. Folikulární buňky obklopující oocyt mění svůj tvar na kubický, čímž vzniká primární folikul. Somatické buňky dále proliferují. Z primárního folikulu se stává folikul sekundární, který již obsahuje více vrstev folikulárních buněk. Do bezprostřední blízkosti oocyty se dostávají buňky kumulární, které dále diferencují na buňky *corona radiata* a granulární buňky vejconosného hrbolku (*cumulus oophorus*).

Během této růstové fáze zvětšuje svůj objem i oocyt, který stále setrvává v prvním meiotickém bloku. Pro dokončení meiozy a zdárný následný vývoj je třeba syntéza velkého množství proteinů, mRNA molekul a nových organel. S tím souvisí i změna v transkripci vyvíjejícího se oocyty. Zatímco u oocyty v primordiálních folikulech je transkripce jen stěží zaznamatelná, u oocyty obsaženého v primárním folikulu je naopak míra transkripce značná. Syntéza RNA oocyty v této fázi je 200x vyšší než v běžných somatických buňkách a díky současné masivní translaci obsahuje oocyt až 50x více proteinů. Během růstové fáze dochází také k vytvoření kortikálních granulí nezbytných pro zamezení polyspermie při oplození a specifického glykoproteinového obalu oocyty zvaný *zona pellucida*.

Ve zdárném vývoji folikulu je zásadní těsná komunikace mezi oocytem a okolními folikulárními buňkami. Bylo zjištěno, že folikulární buňky u lidských oocyty vysílají dlouhé tenké výběžky, které se díky některým invaginacím cytoplazmatické membrány oocyty (oolemy) přibližují i do bezprostředního okolí jádra oocyty. Prostřednictvím mezerových spojů (gap junction) tak oocyty komunikují s řadou jeho organel (Makabe et al., 2006). Díky těmto spojením může oocyt hrát aktivní roli v regulaci jednotlivých fází vývoje folikulu a podporovat proliferaci folikulárních buněk (Eppig, 2001). Stejně tak vyvíjející se oocyt, který sám nemá receptory pro gonadotropiny, je závislý na parakrinní signalizaci okolních buněk

folikulu pomocí růstových faktorů a dalších signálních molekul. Tato signalizace stimuluje oocyt k růstu, ale také zabraňuje jeho předčasnému vstupu do další fáze meiotického dělení.

Během růstové fáze se primární folikul postupně mění na folikul sekundární. Následně kumulární buňky produkují velké množství extracelulární matrix, čímž se zvětšují mezibuněčné prostory a ve folikulu vzniká dutinka. Tento jev se nazývá kumulární expanze. V důsledku toho také dochází k přerušení těsného spojení oocyta a buněk corona radiata, a tím k odstranění jejich inhibičního vlivu na obnovení meiozy. Dochází k rozpadu zárodečného váčku (GVBD, germinal vesicle breakdown) a oocyt obnovuje meiozu.

Celá tato výše popsaná preantrální fáze folikulogeneze je nezávislá na folikul stimulačním hormonu (FSH). FSH receptory jsou folikulárními buňkami exprimovány právě až během této doby. Následuje antrální fáze vývoje folikulu, který je již schopný odpovídat na stimulaci FSH a stává se tak součástí menstruačního cyklu. Gonadotropin stimulující hormon (GnRH) uvolňovaný z hypotalamu vede k sekreci FSH z adenohipofýzy. Na něj reagují granulární buňky produkcí estradiolu, který opět ovlivňuje adenohipofýzu a její produkci luteinizačního hormonu (LH) nezbytného pro ovulaci. Folikulární buňky výrazně proliferují a mezibuněčné prostory postupně splývají v *antrum folliculi* a plní se folikulární tekutinou. Granulózní buňky se zde již nemnoží, exprimují receptory pro LH a také velké množství steroidních hormonů, naopak buňky kumulární LH receptory neprodukují a pokračují v proliferaci (Eppig, 2001)

Během náboru folikulů je rekrutováno větší množství folikulů, než skutečně dospěje k ovulaci. Během folikulárního vývoje dochází k masivní selekci a většina dříve rekrutovaných folikulů zaniká procesem atrezie (subordinantní folikuly). Druhově specifický počet folikulů nejlépe odpovídající stimulaci FSH pokračuje ve vývoji (dominantní folikuly). Princip této selekce spočívá v tom, že pro udržení růstu folikulu, který je z vyvíjející se skupiny největší, stačí nejmenší koncentrace FSH. Zároveň tento dominantní folikul produkuje více estrogenů, jimiž zpětnovazebně snižuje sekreci FSH a tím zhoršuje podmínky pro ostatní menší folikuly. Původně náhodné malé rozdíly mezi folikuly se zvětšují a nakonec postupně dozrává určitý počet folikulů nazývaných Graafovy. Extracelulární matrix vysoce expandujících kumulárních buněk dominantních folikulů je tvořena hyaluronovou kyselinou a dalšími převážně glykoproteiny.

Až v Graafově folikulu obnovuje oocyt meiotickou aktivitu a dokončuje první meiotické dělení. Vznikají dvě nestejně velké buňky - sekundární oocyt nesoucí naprostou většinu cytoplazmy a první pólóvé tělíčko, které se z pravidla již dále nedělí. K prvním

znakům meiotické obnovy patří kondenzace chromatinu, jež předchází samotnému GVBD. Tato kondenzace ukončuje masivní transkripci typickou pro předcházející fázi růstu oocyty. Následné meiotické zrání oocyty již probíhá bez transkripce. Genové exprese od tohoto okamžiku až do aktivace embryonálního genomu je závislá na post-transkripční regulaci již dříve nesyntetizovaných mateřských mRNA (Chen et al., 2011). Dále je započato druhé meiotické dělení pokračující až do metafáze II, kdy nastává druhý meiotický blok. V tomto stavu trvajícím minuty až hodiny setrvává oocyt až do případného oplodnění samčí spermií. Toto načasování nacházíme u naprosté většiny savčích druhů s výjimkou psovitých šelem, jejichž oocyty ovulují již ve stadiu primárního oocyty a k meiotickému zrání dochází až následně během průchodu vejcovodem (Reynaud et al., 2009).

Po uplynutí 37 - 40 hodin od začátku prudkého nárůstu koncentrace LH v krvi, který vede k výše popsanému zrání oocyty, dochází k ovulaci. Stěna Graafova folikulu se ztenčuje a následně praská. Oocyt obklopený buňkami *cumulus oophorus* je společně s folikulární tekutinou vypuzen z ovaria do vejcovodu. Ovulace člověka zahrnuje jeden, výjimečně dva oocyty. U myši je ovulováno 8 - 12 oocytů najednou. Ovulovaný oocyt má čirou cytoplazmu a těsně pod buněčnou membránou se nacházejí kortikální granula. Chromozómy v metafázi druhého meiotického dělení se nacházejí v blízkosti pólového tělíska uloženého v periviteliním prostoru. Granulózní buňky na vnější straně folikulu zůstávají v ovariu a spolupodílejí se na vzniku žlutého tělíska, které produkuje progesteron a slouží k udržení počátečních fází březosti. Pokud v bezprostředně následujícím časovém období po ovulaci nedojde k oplodnění oocyty spermií, oocyt spontánně zaniká při sestupu vejcovodem do dělohy.

3.2 Raný embryonální vývoj

Ke kontaktu spermie a oocyty dochází v ampulární části vejcovodu, kam pronikne pouze několik stovek z původních milionů ejakulovaných spermií. Úspěšnost oplodnění závisí na omezené životnosti spermie v samičím pohlavním traktu a načasováním jejího setkání s oocytem procházejícím vejcovodem. U myši dochází k asynchronnímu oplození v řádu několika hodin po kopulaci. Oocyty nejsou oplozeny všechny naráz, a z toho důvodu nedochází k prvnímu dělení jednotlivých embryí ve stejnou dobu.

Spermie nejprve aktivně pronikají mezi kumulárními buňkami obklopujícími oocyt. Po kontaktu se *zona pellucida* spermie spouští akrozomální reakci, jejímž výsledkem je rozpad akrozomálního váčku spermie. Akrozomální váček obsahuje řadu proteáz, glykosidáz, lipáz a dalších látek usnadňujících průnik spermie skrz *zona pellucida*.

Po té, co se ekvatoriální část spermie obnažená po akrozomální reakci dostane až k oolemmě (cytoplazmatické membráně oocyty), dochází ke kontaktu receptorů a jejich ligandů na obou membránách. Účastníku tohoto kontaktu je celá řada. Za klíčový je považován spermatický ligand IZUMO1 a jeho oocytární receptor JUNO (Bianchi & Wright, 2014). Důsledkem tohoto kontaktu je fúze membrán oocyty a spermie, která tak celá včetně bičíku vniká do oocyty. Vniknutí spermie do oocyty spouští sérii oscilací hladiny Ca^{2+} v jeho cytoplazmě. To dále vede k bezprostřednímu zabránění polyspermie pomocí kortikální reakce. Dochází k exocytóze kortikálních granulí, která je následována ztvrdnutím *zona pellucida* (*zona pellucida* hardening). Pro efektivnější zabránění vzniku polyspermie dochází také po oplození k uvolnění receptoru JUNO z povrchu oocyty. Oocyt následně díky impulzu Ca^{2+} iontů znovuobnovuje meiotické dělení (shrnutí v Yeste et al. 2017).

Po úspěšném vniknutí spermie do oocyty vzniká zygota. Ta nejprve obsahuje dvě haploidní prvojádra (pronuklea). Samčí prvojádru vzniká dekonzenzací hlavičky spermie. Během zrání spermie je většina jejich histonů vyměněna za protaminy, které zaručují větší kompaktnost a tudíž ochranu samčí DNA (Oliva, 2006). Netýká se to ale veškeré samčí DNA, asi 10 - 15% u lidí a 5 - 10% u myši zůstává vázána histony (Jung et al., 2017; Jukam et al., 2018). Po fúzi gamet je nutné protaminy z haploidní samčí DNA odstranit a nahradit opět histony. Přesný mechanismus tohoto procesu není ještě zcela přesně pochopen, je ale velmi rychlý, což značí, že se jedná o aktivní proces (Abdalla et al., 2009). Dochází zde k masivní demetylaci otcovského genomu a následně výměně protaminů za hyperacetylované mateřské histony (shrnutí v Li et al. 2013). Samičí prvojádru se utváří po dokončení druhého meiotického dělení a po vydělení druhého pólového tělíška. Tyto procesy probíhají srovnatelně u člověka i myši prvních několik hodin po oplození. Dále probíhá u obou prvojader replikace DNA a následná syngamie prvojader. Po kondenzaci chromozómů během mitotického dělení vzniká již dvoubuněčné embryo tvořené buňkami s diploidní sadou chromozómů.

Dalšími mitotickými děleními, která probíhají v rychlém sledu za sebou bez zásadnějšího zvětšení objemu buněčné hmoty původního oocyty, vznikají čím dál menší blastomery. Tento děj se nazývá rýhování. U člověka probíhá rýhování s frekvencí zhruba jednoho dělení každé blastomery za den. Po dobu rýhování je embryo stále obklopeno vrstvou *zona pellucida*. V té se následně (u člověka cca 5. den po oplození) tvoří otvor, skrze který se embryo procesem zvaným „hatching“ dostává ven.

Z počátku jsou blastomery stejně jako zygota totipotentní a mají potenciál dát vzniknout všem liniím buněk. Tento vysoký vývojový potenciál je obecně u savců zachován

překvapivě dlouhou dobu (Saiz & Plusa, 2013), u myši až do stádia 8 buněk (Baldock et al., 2015). Ani u lidských embryí v osmibuněčném stadiu nebyly pozorovány markery specifické pro trofoblast. První známka diferenciacie je patrná až během kompaktace embrya, kdy se začíná exprimovat E-kadherin (shrnuto v Niakan et al. 2012). Existují ovšem důkazy, že o osudu buněk je rozhodnuto podstatně dříve. Bylo zjištěno, že jednotlivé blastomery se vzájemně liší ve vazbě specifických transkripčních faktorů na DNA, a to již ve stádiu 4 buněk (White et al., 2016). Rozdíly v transkriptomu blastomer byly pozorovány již po prvním dělení zygoty (Shi et al., 2015). Tato polarizace může ovlivnit rozdílný osud a vývojový potenciál jednotlivých dceřiných buněk (Edwards & Hansis, 2005; Piotrowska-Nitsche et al., 2005).

Během stále trvajících mitotického dělení probíhá proces kompaktace, při němž se původně kulaté buňky zplošťují a tvoří jednolitou masu. Takto vzniklá morula však začne brzy vytvářet mezibuněčné prostory, jejichž splynutím se uvnitř moruly tvoří procesem zvaným kavítace dutina vyplněná tekutinou – blastocel. Z původní moruly vzniká dutá blastocysta.

Již dříve (u myši ve stadiu 16 - 32 buněk (Baldock et al., 2015)) se v morule formuje vnější a vnitřní buněčná masa, která se dále polarizuje. Přibližně kolem stádia 32 buněk se buňky umístěné na vnitřní straně moruly mění na embryoblast (u myši cca 12 buněk), jenž je pluripotentní a dává v budoucnu vzniknout vlastnímu embryu (Baldock et al., 2015). Z buněk umístěných na straně vnější se stává trofoblast, ze kterého vzniká placenta. U myšího embrya obsahujícího 64 - 80 a 80 - 100 buněk je poměr trofoblastu a embryoblastu přibližně 2:1 (Behringer et al., 2014).

Jako jeden z markerů pro rozpoznání trofoblastu je využíván specifický transkripční faktor caudal-type homeobox-2 (CDX2). Ten je exprimován od stádia 8 buněk a nachází se ve všech blastomerách moruly. Zde se překrývá se specifickými markery vnitřní buněčné masy, jako je, mimo jiné, octamer-binding protein 4 (OCT4). Postupem času se ve stádiích střední a pozdní blastocysty exprese CDX2 omezuje pouze na buňky trofoblastu a extraembryonálního ektodermu následně od trofoblastu odvozeného (Saiz & Plusa, 2013). OCT4 naopak nalézáme specificky v buňkách embryoblastu a v jeho pozdějších strukturách.

Pro zdárný vývoj embrya je zásadní aktivace embryonálního genomu (EGA, Embryonic Genom Activation). Maternální transkripty, kterými byl během vývoje vybaven oocyt, se po znovuoobnovení meiózy stávají nestabilními a během časného embryonálního vývoje jsou postupně spotřebovány, popř. aktivně degradovány. Pro další úspěšný vývoj embrya je nezbytné, aby byly nahrazeny transkripty vlastního embryonálního genomu. Načasování EGA je druhově velmi specifické. U myši byla zaznamenána první slabá vlna

transkripce již v S-fázi jednobuněčného embrya, a to převážně v samčím pronukleu (Aoki et al., 1997). Tato minoritní vlna se zdá nezbytná pro přípravu vlny hlavní (Abe et al., 2018). K hlavní vlně přechodu k embryonální transkripci dochází u myši již v pozdním stadiu 2 buněk (cca 27 hod. po fertilizaci), oproti tomu u řady ostatních savců následuje až o pár buněčných cyklů později. V případě lidských embryí byly popsány tři vlny EGA, přičemž poslední a nejvýznamnější z nich nastává ve stadiu 6 - 10 buněk a je pravděpodobně analogická k aktivaci dvoubuněčného embrya myši (Vassena et al., 2011). Načasování lidského EGA je podobné jako u jiných savců a tudíž zřejmě typičtější než EGA myši (Jukam et al., 2018)

Tyto komplikované procesy zahrnující celou řadu dramatických změn jsou regulovány složitou sítí mechanismů. Jejich úkolem je zajistit přechod od extrémně diferencovaných gamet k časným embryím dávajícím vzniknout celému novému organismu. Za jednu z kandidátních skupin regulačních proteinů je možné považovat NAD^+ -dependentní histon deacetylázy, sirtuiny.

3.3 Sirtuiny a úloha SIRT1 ve fyziologii reprodukce

Skupinu proteinů rodiny Sir2, zvanou také jako sirtuiny, nalézáme napříč organismy od kvasinek až po savce. Obecně se jedná o evolučně velmi konzervovanou skupinu (shrnutí Vaquero 2009). Proteiny této rodiny byly popsány jako Sir2p (Silencing Information Regulator 2 protein) u kvasinek jako senzory stresu a podpora adaptace na nové podmínky (Ivy et al., 1986). Tyto enzymy provádějí deacetylaci a ADP-rybosylaci celé řady substrátů také u vyšších organismů včetně savců a člověka (shrnutí v Vaquero 2009). Jejich hlavním kofaktorem je NAD^+ (Johnson & Imai, 2018), přičemž sirtuiny za přítomnosti acetylovaného lyzínového substrátu katabolizují molekulu NAD^+ na aktivovanou ADP-ribózu. To má za následek deacetylaci substrátu a novou sloučeninu O-acetyl-ADP-ribózu (Sauve & Schramm, 2003). Aktivace sirtuinů je možná několika různými mechanismy, mezi které patří zvýšení poměru NAD^+ a NADH (Imai et al., 2000).

U savců známe sedm členů rodiny sirtuinů zvaných SIRT1-7. Každý zástupce této skupiny má v somatických buňkách specifickou lokalizaci. Rozlišujeme sirtuiny jaderné, mezi které patří SIRT1, SIRT6 a SIRT7, a sirtuiny mitochondriální. Jaderné sirtuiny se v somatických buňkách podílejí na epigenetické modifikaci a regulaci transkripčních faktorů. V mitochondriích se nacházejí SIRT4 a SIRT5. Stejně tak je zde lokalizován i SIRT3, který byl ale za stresových podmínek detekován i v jádře. Mitochondriální sirtuiny se podílí na regulaci detoxikačních enzymů metabolických drah a volných kyslíkových radikálů (ROS,

Reactive Oxygen Species). Poslední z rodiny sirtuinů SIRT2 se nachází primárně v cytoplazmě, byl však rovněž detekován v jádře somatických buněk během G2/M fáze buněčného cyklu.

Obecně jsou sirtuiny spojované s řízením dlouhověkosti a procesu stárnutí (Sato et al., 2013; Donlon et al., 2018; Tian et al., 2019). Se syndromem předčasného stárnutí u myších modelů je spojen pokles právě SIRT1 (Cheng et al., 2003). Jelikož dochází s rostoucím věkem samice ke snižování reprodukčního potenciálu (např. menopauza u žen kolem 50 let), jsou považovány ovaria za orgány velmi senzitivní ke stárnutí (Vazquez et al., 2020). V souladu s tímto předpokladem jsou sirtuiny považovány za klíčové regulátory ovariální rezervy (Vazquez et al., 2020). Rovněž role sirtuinů ve vývoji oocytů byla zaznamenána napříč mnoha savčími druhy včetně myši (Kawamura et al., 2010) a člověka (Zhao et al., 2016), a lze tak jednoznačně předpokládat jejich klíčovou úlohu v ustanovení a udržení kvality oocytu, vývojové kompetence, schopnosti oplození a časného embryonálního vývoje.

Z výše uvedených sirtuinů lze považovat za klíčový protein této rodiny SIRT1, který se podílí na řadě fyziologických procesů napříč organismy. Je znám pro svůj protektivní účinek vůči stárnutí a oxidativnímu stresu. Studován je také z hlediska reprodukce, kde se pravděpodobně nemalou měrou podílí na zrání gamet a embryonálním vývoji.

Savčí SIRT1 je homologem kvasinkového proteinu Sir2. Jedná se o homotrimer o přibližné velikosti 350 kDa (Vaquero et al., 2004). V somatických buňkách se podílí na celé řadě regulačních procesů, jako je umlčování genů, udržování heterochromatinu a oprava poškození DNA (shrnuto v Vazquez et al., 2020). Úloha SIRT1 byla popsána v celé řadě orgánů, jako jsou játra, mozek, slinivka, tuková tkáň či kosterní svalstvo. Účastní se také regulace metabolismu lipidů a glukózy, sekrece inzulínu a činnosti imunitního systému (shrnuto v Kratz et al. 2021).

Byla také doložena schopnost SIRT1 ochránit buňky proti oxidačnímu stresu a to například pomocí přímé deacetylace transkripčních faktorů FoxO (Forkhead box O) (Chang & Guarente, 2014; Tatone et al., 2015). Molekulární signalizace SIRT1 zahrnuje i SIRT3, který se podílí mimo jiné na odstraňování důsledků oxidačního stresu v mitochondriích (Brenmoehl & Hoeflich, 2013). SIRT1 může zřejmě tedy zabránit abnormální mitochondriální funkci například během stárnutí oocytů (Xing et al., 2021). Bylo zjištěno, že mnohé antioxidanty, jako je kofein, resveratrol, kvercetin nebo melatonin, mají pozitivní vliv na zachování kvality oocytů při postovulačním stárnutí. Tento jejich účinek je spojován mimo jiné právě se

zvýšením exprese SIRT1 (T. Zhang et al., 2016; Wang et al., 2017; Yang et al., 2018; Liang et al., 2018). Samotná uměle zvýšená exprese SIRT1 ve zralých oocytech je schopna zabránit řadě morfologických změn typických pro stárnutí jako je fragmentace, aktivace nebo degenerace, patrně prostřednictvím potlačení produkce a/nebo hromadění ROS (Reactive Oxygen Species) (Xing et al., 2021).

SIRT1 sehrává úlohu v reprodukci, je nezbytný pro vývoj a funkci placenty a proto jeho množství s graviditou roste (shrnuto v Kratz et al. 2021). Naopak v případě ovariálního karcinomu či endometriózy je SIRT1 nedostatek (Taquchi et al., 2014; Mvunta et al., 2017). V samičí i samčí reprodukci je SIRT1 spojen se stárnutím a v řadě prací se uvádí, že se jedná o protektivní faktor, jehož nedostatek způsobí předčasné reprodukční selhání vedoucí k subfertilitě či infertilitě (Coussens et al., 2008; Valerio et al., 2018). Jakkoliv známe význam SIRT1 pro fertilitu, méně je známo o zapojení SIRT1 v gametogenezi a časném embryonálním vývoji, kde se o skutečné plodnosti často rozhoduje.

3.3.1 Lokalizace SIRT1 v oocytech a časných embryích

Transkribovaná RNA SIRT1 byla detekována ve všech tkáních těla, obzvláště pak ve varlatech a vaječnicích (McBurney et al., 2003). Samotné zrání oocytů a následný embryonální vývoj provázejí nápadné změny v lokalizaci SIRT1. Během prvního meiotického bloku ve stadiu GV byl pozorován SIRT1 převážně v oblasti zárodečného váčku, a to jak v konformaci NSN, tak SN. Během znovuoobnovení meiózy se signál poukazující na SIRT1 přesunul do ooplazmy. Zatímco během stadia MI byl signál SIRT1 pouze velmi slabý, u stadia MII byl pozorován vzor kopírující dělicí vřeténko metafáze II (Nevoral et al., 2019). To může vést k domněnce, že SIRT1 reguluje dělicí vřeténko MII. Pokud jsou oocyty v prvním meiotickém bloku inkubovány s inhibitory SIRT1, dochází až k dvojnásobnému selhání znovuoobnovení meiózy. Oocyty, které přeci jenom dosáhnou stadia MII, mají zvýšený výskyt abnormálního dělicího vřeténka a nesprávného rozchodu chromozómů (Di Emidio et al., 2014).

SIRT1 byl také detekován v různých stádiích raného embryonálního vývoje od zygot přes dvoubuněčná embrya až po buňky blastocyst (McBurney et al., 2003). SIRT1 se zde zřejmě zaměřuje na selektivní umlčování zygotického genomu během aktivace embryonálního genomu, kde neovlivňuje geny pro raný vývoj embrya nezbytné (Adamkova et al., 2017). Po oplodnění byl nalezen SIRT1 v samčích i samičích pronukleích zygot prasat, zatímco v cytoplazmě jej téměř nenalezneme (Adamkova et al., 2017). Obecně byl SIRT1

v embryonálních buňkách lokalizován v jádrech, a to ale mimo oblasti, kde se nachází heterochromatin. Stejně tak nebyl pozorován v oblasti jádérka (McBurney et al., 2003).

3.3.2 Vybrané substráty SIRT1

Jedním z možných substrátů SIRT1 jsou lyzinové zbytky na histonech. U somatických buněk byla zjištěna jeho schopnost odstranit acetylovou skupinu z lyzinových zbytků hned několika histonů. Histon H1 může deacetylovat na lyzinu K26, histon H3 na lyzinu K9 a histon H4 na lyzinu K8 a K16 (Vaquero et al., 2004). Bylo popsáno, že pokles acetylace histonů H3 a H4 obecně doprovází zrání savčích oocytů (Kim et al., 2003).

Modifikace histonu H3 jsou spojovány s kontrolou genové exprese (shrnutí v Vaquero et al., 2007). Právě acetylace histonu H3 na lyzinu K9 (H3K9ac) je jedním z důležitých cílů SIRT1 ve vztahu k reprodukci (Vaquero et al., 2004). Pokud je SIRT1 inhibován pomocí iRNA, dochází ke globální hyperacetylaci H3K9 v lidských buňkách (Vaquero et al., 2004). Vzhledem k známým substrátům SIRT1 dříve popsaných v různých typech buněk považujeme SIRT1 za důležitý regulátor zrání oocytů a oplodnění.

Během růstu oocytu se totiž úroveň H3K9ac postupně zvyšuje a v největší míře je tato modifikace zaznamenána ve stadiu GV (Kageyama et al., 2007). V konečné fázi zrání oocytu a v MII fázi je ale většina H3K9 deacetylována (J. Huang et al., 2017). Proto není v ovulovaných oocytech (stadium MII) acetylace H3K9 snadno detekovatelná (J. C. Huang et al., 2007). Přesto byly nalezeny rozdíly v hladině H3K9ac u oocytů těsně po ovulaci a u oocytů, které podstoupily postovulační stárnutí. U stárnoucích oocytů byla hladina acetylace H3K9 vyšší (Xing et al., 2021). Stejně tak byla vyšší úroveň H3K9ac popsána u lidských oocytů zrajících *in vitro* oproti oocytům zrajícím *in vivo* (Jia Huang et al., 2012). To může být způsobeno tím, že SIRT1 ve stárnoucích oocytech ubývá (J. C. Huang et al., 2007) a již není schopen zabránit acetylaci H3K9. Tomu odpovídá i fakt, že umělým zvýšením exprese SIRT1 byl růst H3K9ac inhibován (Xing et al., 2021). Stejně tak aktivátory a inhibitory SIRT1 snižují, respektive zvyšují acetylaci H3K9 v mateřském i otcovském prvojádře prasečí zygoty (Adamkova et al., 2017). Tato epigenetická značka bývá spojována se zvýšenou mírou transkripce a rozvolnění chromatinu. Je tedy pravděpodobné, že její zvýšené zastoupení v transkripčně neaktivních fázích oocytu může mít nepříznivý vliv na kompaktnost chromatinu během dokončení meiotického dělení a během prvních dělení embrya těsně po oplodnění. Pravděpodobné je také ovlivnění následné aktivace embryonálního genomu (Xing et al., 2021). Během M fázi buněčného cyklu preimplantačních embryí nebyla deacetylace histonu H3 zaznamenána (Kim et al., 2003).

SIRT1 může histonové substráty ovlivňovat i nepřímo prostřednictvím jiných enzymů. Příkladem může být zvyšování hladiny H3K9me3 pomocí methyltransferázy SUV39H1 (Bosch-Presegué et al., 2011). Funkce této methyltransferázy je závislá na acetylaci v katalytické SET doméně (na lysinovém zbytku K266). Tím, že SIRT1 deacetyluje tento lysinový zbytek methyltransferázy SUV39H1, zvyšuje její aktivitu, čímž je zvýšen i podíl H3K9me3 (Vaquero et al., 2007). Role H3K9me3 je důležitá mimo jiné v soudržnosti chromatid při segregaci chromozómů (Guenatri et al., 2004). Ztráta SIRT1 výrazně ovlivňuje SUV39H1-dependentní H3K9me3 a zhoršuje lokalizaci heterochromatinového proteinu 1, který je zásadní pro tvorbu heterochromatinu (Vaquero et al., 2007). Zvyšování podílu heterochromatinu je stěžejní i pro samičí meiózu. Aktivace SIRT1 během meiózy koreluje se zvýšenou hladinou H3K9me3, což naznačuje v oocytech podobný vztah jako v somatických buňkách (Nevoral et al., 2019). Regulace H3K9me3 probíhá v oogenezi nejspíše během profáze I, kdy je SIRT1 lokalizován v jádře (Nevoral et al., 2019).

Také bylo popsáno, že zvýšení H3K9me3 řízené pomocí SIRT1 hraje důležitou roli ve vývoji preimplantačního embrya. SIRT1 se hromadí v pronukleích savčí zygoty a podporuje metylaci H3K9, což je obecně spojováno se zvýšenou životaschopností buňky (Vaquero et al., 2007; Adamkova et al., 2017). Aktivace SIRT1 pomocí jeho aktivátorů resveratrolu a BML-278 vedla k vyšší metylaci H3K9me3 a zároveň podporovala dynamiku tvorby blastocyst (Adamkova et al., 2017).

Dalším histonovým substrátem SIRT1 uváděným v souvislosti s reprodukcí je histon H4 acetylovaný na lysinu 16 (H4K16ac). V somatických buňkách je acetylace histonu H4 obecně spojována s aktivní transkripcí (shrnutí v Zentner & Henikoff, 2013). Předpokládá se, že acetylace H4K16 je jedním z klíčových epigenetických regulátorů jak v somatických, tak v zárodečných buňkách (Ma & Schultz, 2013). H4K16ac může rovněž sloužit jako značka rozpoznávaná určitými transkripčními faktory (shrnutí v Vaquero et al. 2007). Bývá také spojován s opravou DNA, kde umožňuje rozvolněním chromatinu snazší dostupnost reparačních mechanismů (shrnutí v Vaquero et al. 2007). Acetylace H4K16 je udržována v somatických buňkách během mitózy jako epigenetická značka stavu genové exprese pro dceřiné buňky (Kruhlak et al., 2001). Hyperacetylace H4K16 v nich ovšem vede k narušení tvorby kompaktního chromatinu (shrnutí v Vaquero et al. 2007). Dosud je přijímán fakt, že H4K16ac je specifickým substrátem pro sirtuiny (Vaquero et al., 2007). Ztráta SIRT1 pomocí RNAi má za následek hyperacetylaci H4K16 v lidských buňkách (Vaquero et al., 2004). Na

druhou stranu existují důkazy, že se na deacetylaci acH4K16 mohou podílet i další histon deacetylázy (Ma & Schultz, 2013).

Ve fázi GV je H4K16 acetylovaný a během *in vivo* maturace tak zůstává až do stádia MII. Během maturace *in vitro* ovšem často H4K16 podléhá deacetylaci (Franciosi et al., 2012). Pokud ale dojde během zrání oocyty k hyperacetylaci H4K16, například v důsledku nedostatečné funkce některých deacetyláz, má tento fakt zásadní dopad na vývoj oocyty. Dochází ke zhoršené funkci kinetochoru, zvýšení výskytu aneuploidií (zřejmě v důsledku nedostatečné kondenzace), nepřesného uspořádání metafázní destičky a následné chybné segregace chromozómů (Ma & Schultz, 2013). To má většinou za následek sníženou vitalitu oocytů a zánik raných embryí (Akiyama et al., 2006). Tyto problémy ovšem nepostihují všechny oocyty vystavené snížení deacetylace, což vede k domněnce, že oocyty mají alternativní robustní mechanismy k zajištění správné segregace chromozómů (Ma & Schultz, 2013). Další deacetylace histonu H4 nebyla zaznamenána během vývoje preimplantačního embrya v M-fázi buněčného cyklu (Kim et al., 2003).

Některé možné substráty SIRT1 mohou být také nehistonové povahy. Jako jeden z těchto substrátů se jeví α -tubulin acetylovaný na lysinu 40 (K40). Takto acetylovaný tubulin je spojován se stabilitou mikrotubulů dělicího vřeténka (Janke & Montagnac, 2017). Neporušené dělicí vřeténko je nezbytné pro přesnou distribuci chromozómů během meiózy a také při dělení zygoty (X. Zhang et al., 2017). Na deacetylaci α -tubulin se mohou podílet i některé histon deacetylázy (X. Li et al., 2017; K. Zhang et al., 2017) Byla popsána lokalizace SIRT1 kolem dělicího vřeténka v MII oocytech (T. Zhang et al., 2016; Nevoral et al., 2019). U oocytů, které ale podstoupily postovulační stárnutí, toto spojení vymizelo (T. Zhang et al., 2016). Také bylo pozorováno výrazně větší množství defektů dělicího vřeténka u oocytů inkubovaných s inhibítorem sirtuinů nikotinamidem (T. Zhang et al., 2016). Pokud byla u oocytů podstupujících postovulační stárnutí vyvolána nadměrná exprese SIRT1, bylo většině defektů dělicího vřeténka zabráněno (Xing et al., 2021). Rovněž ale bylo pozorováno snížení takto acetylovaného α -tubulinu při inkubaci oocytů se specifickým aktivátorem SIRT1 BML-278 (Nevoral et al., 2019). Naopak při inhibici SIRT1 pomocí sirtinolu byla acetylace α -tubulinu zvýšena (Nevoral et al., 2019).

3.3.3 SIRT1 germ-line knock-out

Knock-out v obou alelách pro SIRT1 vede u myši k zvýšenému výskytu abnormálního vývoje, retardace růstu a časně embryonální letalitě (McBurney et al., 2003). Samci i samice,

kteří se přeci jen dožijí pohlavní dospělosti, jsou sterilní (McBurney et al., 2003). U samic byla zachována folikulogeneze, nedocházelo ovšem k ovulaci (McBurney et al., 2003). Tato skutečnost je zřejmě způsobena hormonální nedostatečností. Nicméně po hormonální stimulaci nebyla u samic myši *Sirt1*^{-/-} z histologického hlediska pozorována žádná podstatná dysfunkce při zrání oocytů (Coussens et al., 2008). Stejně tak nebyl zaznamenán podstatný rozdíl v počtu oocytů, které byly po hormonální stimulaci produkovány mezi knock-out samicemi a hemizygotními jedinci (*Sirt1*^{+/-}) (Coussens et al., 2008).

Samci měli výrazně sníženou koncentraci spermií oproti wild-type (wt) a jejich spermie byly prakticky nepohyblivé a vykazovaly abnormální tvar (McBurney et al., 2003; Coussens et al., 2008). Také histologická analýza varlat a cauda epididymis *Sirt1*^{-/-} samců prokázala snížený počet různých vývojových stadií spermií a zmenšené semenotvorné kanálky (Coussens et al., 2008). U myši s deficitem SIRT1 je rovněž patrný nárůst poškození DNA ve zralých spermiích, což může být jedním z důvodů snížení počtu spermií u těchto jedinců (Coussens et al., 2008). Účinek chybějícího SIRT1 na samčí zárodečné buňky byl pozorován již 15. den embryonálního vývoje (Coussens et al., 2008).

Pokud byly gamety obou pohlaví *Sirt1*^{-/-} využity pro oplození metodou IVF spolu se spermiemi nebo oocyty jedince s funkčním *Sirt1* genem, byl u vzniklých embryí pozorován snížený vývojový potenciál. Tato embrya méně často dosahovala stadia dvoubuněčného embrya a po transferu náhradním matkám se rodí méně živých mláďat než u kontrol (Coussens et al., 2008). Pomocí metod *in vitro* fertilizace (IVF) je rovněž možno získat životaschopného jedince pocházejícího z gamet knock-out rodičů (Coussens et al., 2008).

Při vytvoření bodové mutace v místě nezbytném pro katalytickou aktivitu SIRT1 byl pozorován rozdílný fenotyp u myších samic a samců. Zatímco samice si zachovaly plodnost, samci s touto mutací byli sterilní (Seifert et al., 2012). Z toho vyplývá, že tedy minimálně u mladých jedinců je katalytická aktivita SIRT1 nutná k plodnosti samců, ale nikoliv samic. Nabízí se otázka, zda je aktivita SIRT1 potřebná s přibývajícím věkem samice, případně jestli je zde možná kompenzace jinými sirtuiny (Vazquez et al., 2020).

Vzhledem k detekovatelnosti SIRT1 v gonádách dospělých jedinců a současně k vysoké embryonální letalitě knock-out jedinců se jeví pravděpodobné, že SIRT1 hraje významnou roli v raném embryonálním vývoji, jehož defekt se může projevit až později během vývoje (McBurney et al., 2003). V této práci studujeme SIRT1 jako maternální faktor nutný pro vývoj oocytů a oplození. Současně testujeme úlohu paternálního SIRT1 v procesu časného embryonálního vývoje.

4 Cíle

Cílem práce je ověřit následující hypotézy:

- H1: SIRT1 je přítomen v oocytech a raných embryích
- H2: SIRT1 sehrává fyziologickou úlohu při zrání oocytů, oplození a v raném embryonálním vývoji

Za tímto účelem byly stanoveny dílčí cíle. Prvním z dílčích cílů je ověřit na myším modelu přítomnost SIRT1 v nezralých a zralých oocytech, zygotách, dvoubuněčných embryích a blastocystách, a to pomocí imunocytochemického barvení. Dalším cílem je popsat reprodukční fenotyp modelu kondicionálního knock-outa. Z tohoto důvodu je popisována kompetence k donošení a porodu mláďat a zdatnost těchto mláďat v *in vivo* systému.

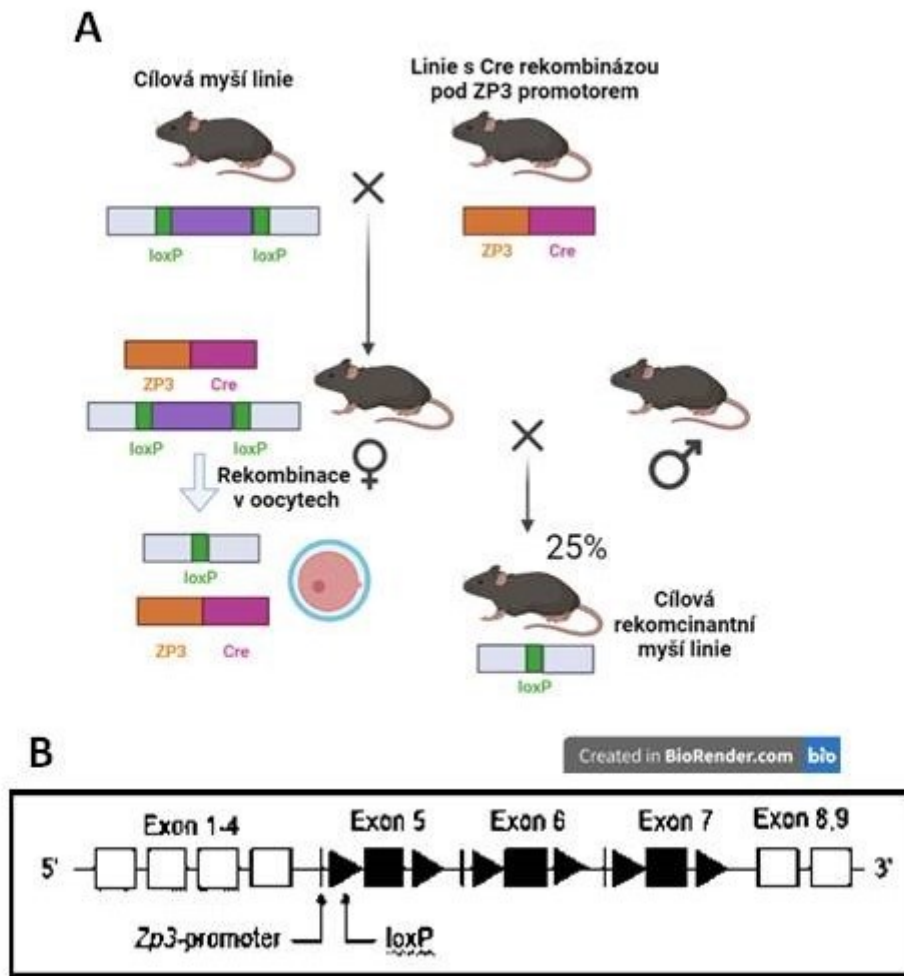
Pro ověření druhé hypotézy je potřeba popsat úlohu SIRT1 v oplození a raném embryonálním vývoji a indentifikovat mechanismy signalizace v raném embryu. Z tohoto důvodu jsou zkoumány epigenetické i neepigenetické substráty v oocytech a raných embryích. Také je popisován vývojový potenciál embryí vznikajících *in vitro*, a to pomocí partenogenetické aktivace nebo *in vitro* fertilizace.

5 Metody a materiál

5.1 Zvířata

Experimenty prováděné na zvířatech chovaných v souladu se Zákonem č. 246/1992 Sb. na ochranu zvířat proti týrání v akreditovaném uživatelském zařízení Lékařské fakulty v Plzni. Jako modelový organismus byla zvolena myš domácí (*Mus musculus*). Bylo pracováno s outbredním kmenem ICR a dále s inbredním kmenem C57BL/6. Myši byly chovány v podmínkách s fotoperiodou 12L:12D, teplotou 21 ± 1 °C, 60% vlhkostí a volným přístupem k vodě a potravě.

Z důvodu časté embryonální letality u knock-out modelu, byl ke studiu dané problematiky využit myší model kondicionální knock-out linie. K získání tohoto experimentálního modelu bylo užito Cre-Lox systému (Obr. č. 1A). V genomu jednoho rodiče byly mezi loxP místa umístěny exony 5-7 SIRT1 (Obr. č. 1B). Takto upravený genotyp byl darován prof. J. Auwerx (Mouchiroud et al., 2013). V genomu druhého rodiče se nacházela Cre rekombináza pod promotorem genu pro *zona pellucida* 3 (ZP3), který je specificky exprimován v oocytech (Jackson Laboratories; C57BL/6-Tg(Zp3-cre)93Knw/J, #003651). Zkřížením těchto jedinců byly získány samice kondicionálního knock-outa *Sirt1^{loxPloxP};Zp3-Cre* (cKO), u jejichž oocytů došlo k rekombinaci a gen pro SIRT1 byl z genomu oocytů vystřižen. Tyto samice sloužily následně jako donorky oocytů, případně jako matky hemizygotních samců. Jako kontroly k cKO oocytům byly využity oocyty Cre negativních samic.



Obrázek č. 1 Schéma získání modelu pomocí Cre-Lox systému.

A: Křížení jedinců s vloženými loxP místy kolem části genu pro SIRT1 a s Cre rekombinázou pod ZP3 promotorem. Získání donorek oocytů. **B:** Znárodnění vystřižených exonů 5 - 7 v genu pro SIRT1

5.2 Izolace oocytů/embryí

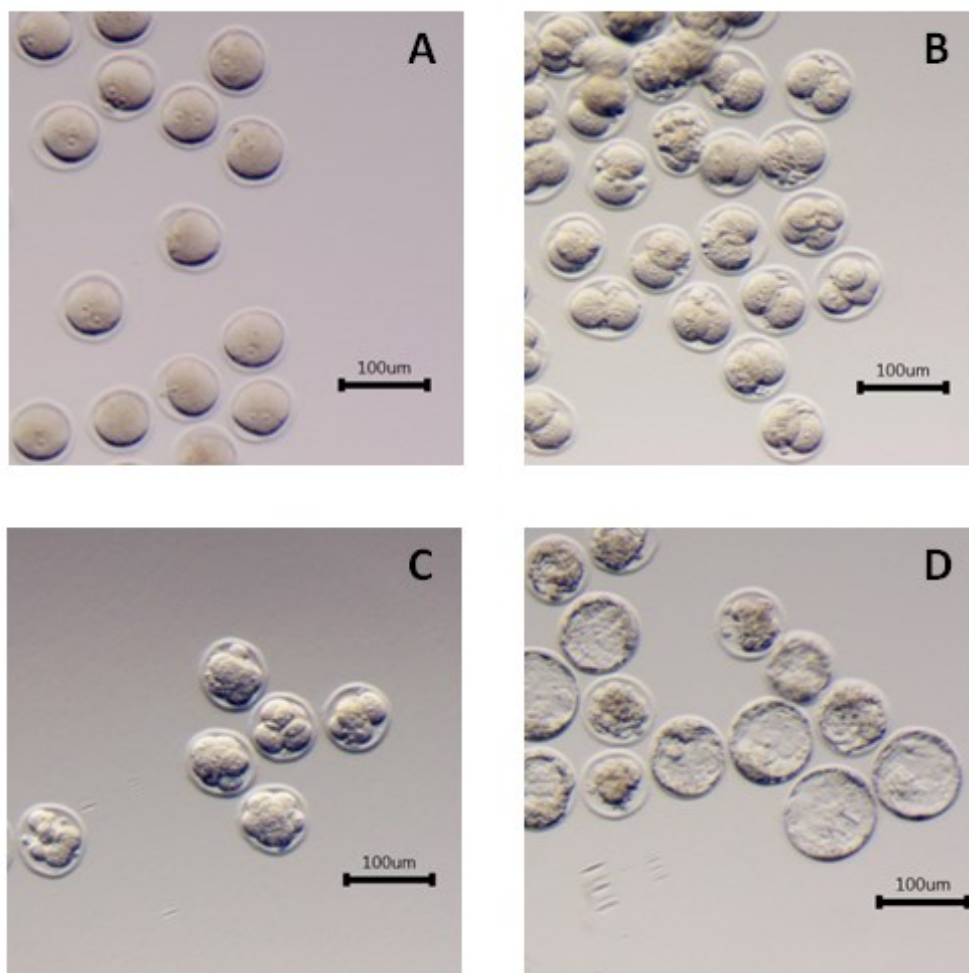
Samice ve věku 8 - 14 týdnů byly injekčně stimulovány pomocí intraperitoneální (*i.p.*) aplikace PMSG (Pregnant Mare Serum Gonadotropin). V případě izolace plně dorostlých nezralých oocytů byly myši usmrceny cervikální dislokací 46 – 48 hodin po aplikaci PMSG. *Post mortem* byla izolována ovaria, z nichž byly v M2 médiu (M7167, Merck Millipore, USA) pomocí jehel získány oocyty. Byly vybrány kvalitní oocyty ve stádiu zárodečného vaku (GV, germinal vesicle), které byly následně použity pro analýzy nebo dále *in vitro* maturovány (IVM, *in vitro* maturation).

Pro získání *in vivo* ovulovaných zralých oocytů (IVO, *in vivo* ovulation) byla použita *i.p.* stimulace hCG (Human Chorionic Gonadotropin) 46 – 48 hodin po injekci PMSG. Dále 14 – 16 hodin po injekci hCG následovala izolace vejcovodů *post mortem*. Z ampully vejcovodu byly izolovány kumulo-oocytární komplexy. Oocyty byly zbaveny kumulárních

buněk pomocí 0,1% hyaluronidázy a následně opláchnuty v M2 médiu. Takto připravené oocyty byly následně použity k *in vitro* oplození (IVF, *in vitro* fertilization) nebo partenogenetické aktivaci (PA, parthenogenic activation), případně použity pro analýzy.

5.3 Partenogenetická aktivace

U některých IVO oocytů byla provedena partenogenetická aktivace. Oocyty byly inkubovány v modifikovaném mediu EmbryoMaxTM KSOM Mouse Embryo (EMD-D, Millipore, USA) doplněném o 0,1% hovězí sérový albumin (BSA, Bovine Serum Albumine) 4,5 μ l EGTA, 120 μ l SrCl₂ a 1,5 μ g/ml cytochalasin B při teplotě 37 °C a 5% CO₂. Pro získání partenogenetických zygot trvala inkubace 8h, pro získání dvoubuněčných embryí 24h a pro získání blastocyst 96h (Obr. č. 2).



Obrázek č. 2 Embrya wt po PA inkubovaná *in vitro*.

A: Zygoty s prvojádry, 8h po PA; **B:** Dvoubuněčná embrya, 24h po PA; **C:** Moruly a rané blastocysty 48h po PA; **D:** Blastocysty, 96h po PA;

5.4 In vitro kultivace

Hormonálně stimulované samice (viz výše) ve věku 8 – 12 týdnů byly zapuštěny v *in vivo* podmínkách samci ve věku 14 týdnů. Následující ráno po usmrcení samic cervikální dislokací byly jednobuněčné zygoty z pohlavního traktu vypláchnuty. Následovala kultivace embryí v *in vitro* podmínkách v modifikovaném médiu EmbryoMax KSOM Mouse Embryo (MR-121-D; Millipore, USA) obohaceném o 0,1% BSA po dobu 72 hodin až do dosažení stadia blastocysty.

5.5 In vitro fertilizace

Pro některé experimenty byla využita metoda IVF. Samci ve věku 14 týdnů byli usmrceni cervikální dislokací. *Post mortem* byly následně z *cauda epididymis* izolovány spermie. V médiu lidské tubulární tekutiny (HTF, Human Tubal Fluid) obohaceném o 0,4% BSA (mHTF) spermie kapacitovaly po dobu alespoň 1 hodiny při teplotě 37 °C a 5% CO₂.

Mezitím byly samice ve věku 8 – 12 týdnů, které byly pro získání IVO oocytů již dříve stimulovány *i.p.* PMSG a hCG (viz výše), usmrceny cervikální dislokací. Následně byly *post mortem* izolovány z ampully vejcovodu kumulo-oocytární komplexy. Ty byly dále inkubovány společně s kapacitovanými spermii o koncentraci 10x 10⁶ spermii/ml po dobu 5 a půl hodiny v médiu mHTF při teplotě 37 °C a 5% CO₂. Poté byly předpokládané zygoty kultivovány v médiu EmbryoMax KSOM Mouse Embryo (MR-121-D; Millipore, USA) doplněného o 0,1% BSA až do stadia blastocysty.

5.6 Imunocytochemie

Pro účely imunocytochemie byly GV a IVO oocyty, zygoty i embrya fixovány ve fosfátovém pufru (PBS, Phosphate Buffered Saline) s 4% paraformaldehydem (PFA) a 0,1% polyvinyl-alkoholem (PVA) po dobu 30 min při laboratorní teplotě.

Po fixaci byly oocyty (případně embrya) opláchnuty ve třech kapkách roztoku 1% BSA v PBS s přidaným Tween 20 užívaným pro zablokování nespecifických vazebných míst. Dále byl použit pro permeabilizaci roztok PBS s přidaným 0,04% Triton X-100 a 0,3% Tween 20 po dobu 15 minut. Následoval oplach v dalších třech kapkách 1% BSA v PBS s přidaným Tween 20 a 15 minutové blokování nespecifických vazeb v témže roztoku. Pokusný materiál byl dále inkubován s primární protilátkou ředěnou 1:200. Jednalo se o protilátky: anti-SIRT1 (ab104833; Abcam, UK), anti-acetylated α -tubulin (ab24610; Abcam, UK), anti-H3K9me2/3 (ab184677; Abcam, UK), anti-H4K16ac (ab7766; Abcam,

UK). Inkubace probíhala 1 hodinu za laboratorní teploty. Následovalo promytí v roztoku pro blokování ve 4 kapkách po 15 minutách. Dále byl materiál inkubován se sekundární protilátkou goat anti-mouse (AlexaFluor GAM-488, ab150117), resp. goat anti-rabbit (AlexaFluor GAR-647, ab150083) konjugovanou s fluoresceinem ředěnou 1:200 po dobu 1 hodiny při laboratorní teplotě. Po dvou 15 minutových oplaších v roztoku pro blokování následovala inkubace 15 minut s Faloidinem konjugovaným s fluoresceinem (1:200; Thermo Fisher Scientific, USA) pro zviditelnění β -aktinu. Následoval ještě jeden 15 minutový oplach. Následně byly oocyty (nebo embrya) montovány mezi podložní a krycí sklo pomocí Vectashield media s 4'6'-diamidino-2-phenylindole (DAPI; Vector Laboratories Inc., USA) pro zviditelnění DNA.

5.7 Diferenciální barvení blastocyst

Pro rozlišení embryoblastu a trofoblastu blastocysty bylo použito diferenciální barvení. Blastocysty byly fixovány v PBS s 4% PFA, 0,04% Triton X-100 a 0,3% Tween po dobu 15 minut při teplotě 37 °C.

Dále byla embrya inkubována v roztoku PBS-NaN₃ s 3% NGS (Normal Goat Serum) a 0,5% Triton X-100 při teplotě 37 °C po dobu jedné a půl hodiny za soustavného míchání pro zablokování nespecifických vazebných míst. Následně byla embrya inkubována přes noc se specifickými protilátkami anti-OCT4 (ab210458; Abcam, UK) ředěné 1:50 a anti-CDX2 (bs-1620R; Bioss, UK) ředěné 1:100 v roztoku 1% BSA při teplotě 4 °C. Po inkubaci byla embrya omyta ve třech kapkách PBS-PVA po 10 minutách při teplotě 37 °C za soustavného míchání. Následně byly blastocysty montovány mezi podložní a krycí sklo pomocí Vectashield media s 4'6'-diamidino-2-phenylindole (DAPI; Vector Laboratories Inc., USA) pro zviditelnění DNA.

5.8 Mikroskopie a analýza obrazu

Snímky pro analýzu výstupu z imunologického barvení byly pořízeny na konfokálním mikroskopu Olympus IX83 (Olympus, Německo) s pomocí počítačového softwaru VisiView (Visitron Systems GmbH, Germany). Snímky byly dále analyzovány v programu ImageJ (NIH, Bethesda, CA, USA). Byla měřena intenzita signálu příslušných barevných kanálů fluoresceinů. Získané hodnoty byly následně vztaženy k negativní kontrole.

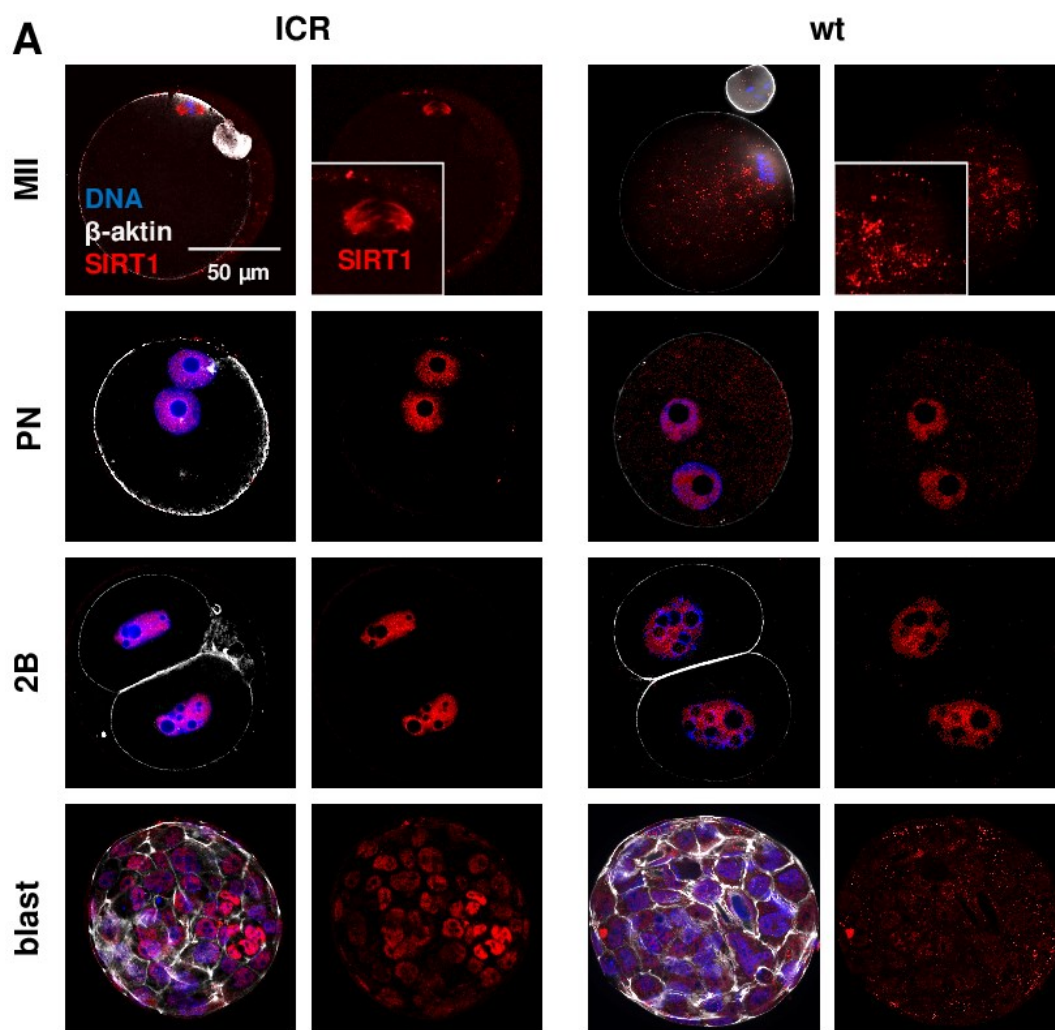
5.9 Statistické zpracování dat

Po sběru dat z minimálně tří nezávislých experimentů proběhla statistická analýza. U dat byla testována normalita rozložení pomocí Shapirova-Wilkova testu. V případě normálního rozložení dat byl pro ověření statisticky významných rozdílů použit parametrický test ANOVA. V případě, že data nebyla normálně rozdělena, jsme využili jeho neparametrickou obdobu - Kruskalův-Wallisův test. V případě signifikantního zjištění byla data podrobena post hoc testům (pro normální rozdělení dat Tukeyho testu a pro nenormální rozdělení Dunnovu testu). V případě, že data byla nespojitá, byla testována prostřednictvím kontingenční tabulky a Chí kvadrát testu. Pro analýzu dat z diferenciálního barvení byl použit test „2 way ANOVA“. Pro statistickou analýzu a následné grafické znázornění byl použit program GraphPad Prism 8.1.1 (GraphPad Software Inc., San Diego, CA, USA).

6 Výsledky

6.1 Přítomnost SIRT1 v oocytech a raných embryích

Již dříve byla popsána lokalizace SIRT1 v oocytech myši (Nevoral et al., 2019). Zde jsme chtěli porovnat lokalizaci SIRT1 v oocytech a embryích outbredního myšího kmene ICR použitého dříve a imbredního kmene C57BL/6. Kmen C57BL/6 je díky nepřítomnosti Cre rekombinázy v této práci uvažován jako kmen divokého typu (wt, wild type) a užíván jako kontrola. SIRT1 byl detekován pomocí imunocytochemického barvení a porovnány zde byly oocyty ve stadiu MII, zygoty (PN), dvoubuněčná embrya (2B) a blastocyty (blast) obou kmenů (Obr. č. 3A). Ze srovnání vyplývá obdobná distribuce SIRT1 v embryích, kde se SIRT1 nacházel v pronukleích a následně v jádrech blastomer. Rozdíl nalézáme v MII oocytech C57BL/6 (wt), které postrádaly signál SIRT1 poblíž dělicího vřeténka přítomný u ICR oocytů. Obecně jsme SIRT1 našli asociovaný s chromatinem.

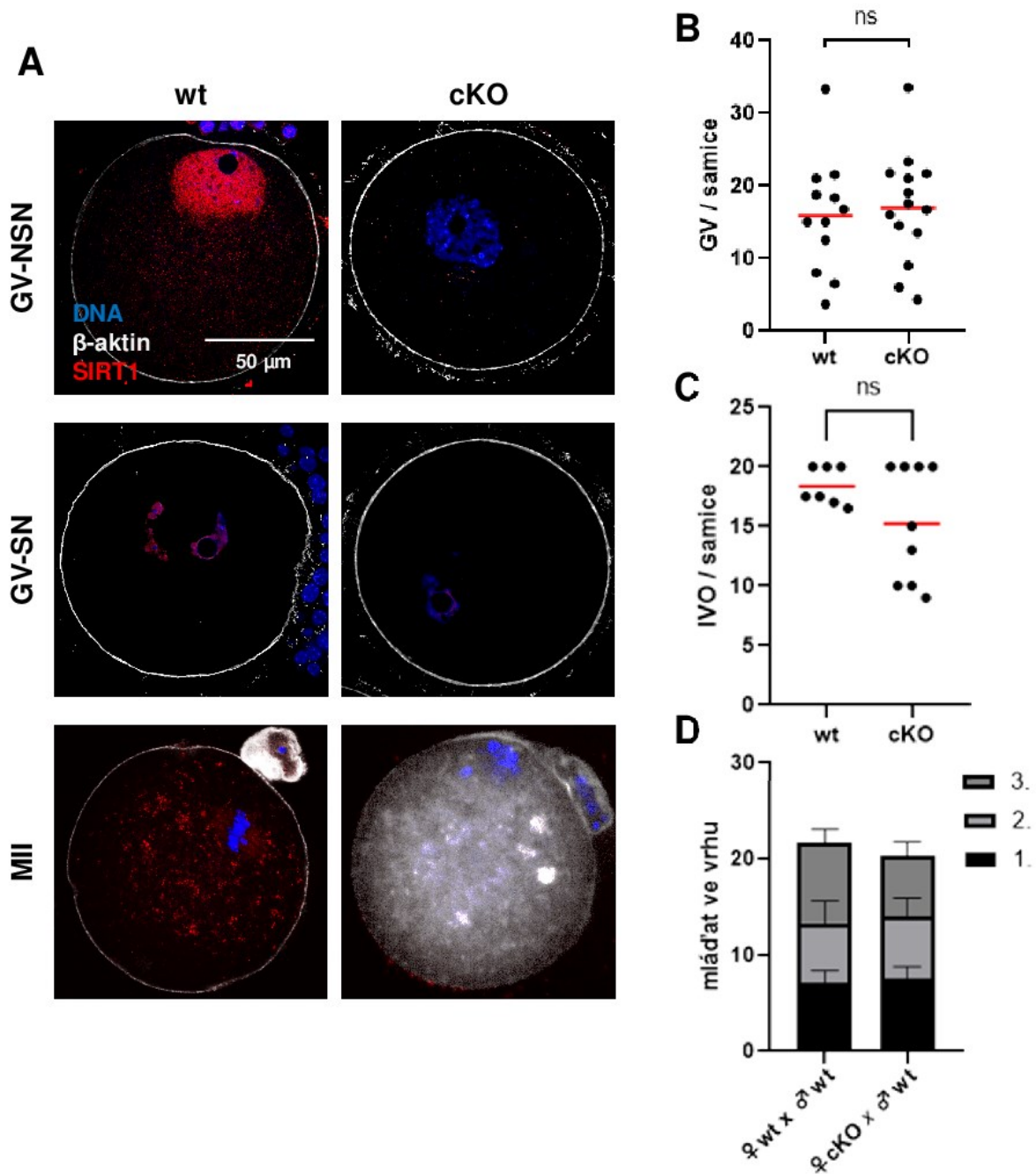


Obrázek č. 3 Porovnání oocytů a PA embryí kmene ICR a C57BL/6 (wt).

A: Porovnání lokalizace a přítomnosti SIRT1 v oocytech a raných embryích myšičího kmene ICR a C57BL/6 (wt): MII - oocyt ve stádiu metafáze druhého meiotického dělení; PN - zygota 8 hodin po PA oocytu; 2B - embryonální stádium dvou buněk 24h po PA; blast - embryonální stádium blastocysty 96h po PA; značené protilátkami proti SIRT1 (červená), jaderné barvení DAPI (modrá), barvení β -aktinu faloidinem (šedá);

6.2 Popis myšního kondicionálního *Sirt1* knock-out modelu

Vzhledem k zvýšené letalitě knock-out modelů pro SIRT1 (McBurney et al., 2003) byl pro studium jeho role v gametách a raných embryích vytvořen jako model kondicionální knock-out (cKO). Tím bylo dosaženo možnosti exprese *Sirt1* ve všech tkáních s absencí právě jen v rostoucích oocytech. Na úrovni translace byla přítomnost SIRT1 ověřena pomocí imunocytochemie v oocytech – stadia GV (NSN a SN) a MII (Obr. č. 4A). V nezralých oocytech byl SIRT1 zaznamenán výhradně v zárodečném váčku. Ve zralých oocytech byl SIRT1 více rozptýlen v cytoplazmě. Dále došlo k porovnání počtu získaných oocytů od samic wt a cKO. V počtu izolovaných oocytů ve stadiu GV odebraných z ovarí samic po hormonální stimulaci PMSG nebyl pozorován signifikantní rozdíl (Obr. č. 4B). Stejně tak se nelišil počet oocytů ve stadiu MII získaných po stimulaci ovulace PMSG-hCG (Obr. č. 4C). Následně byly také tyto samice zapuštěny wt samci a byl sledován počet narozených mláďat. Ani zde nebyl pozorován rozdíl mezi wt a cKO samicemi v počtu narozených mláďat (Obr. č. 4D).

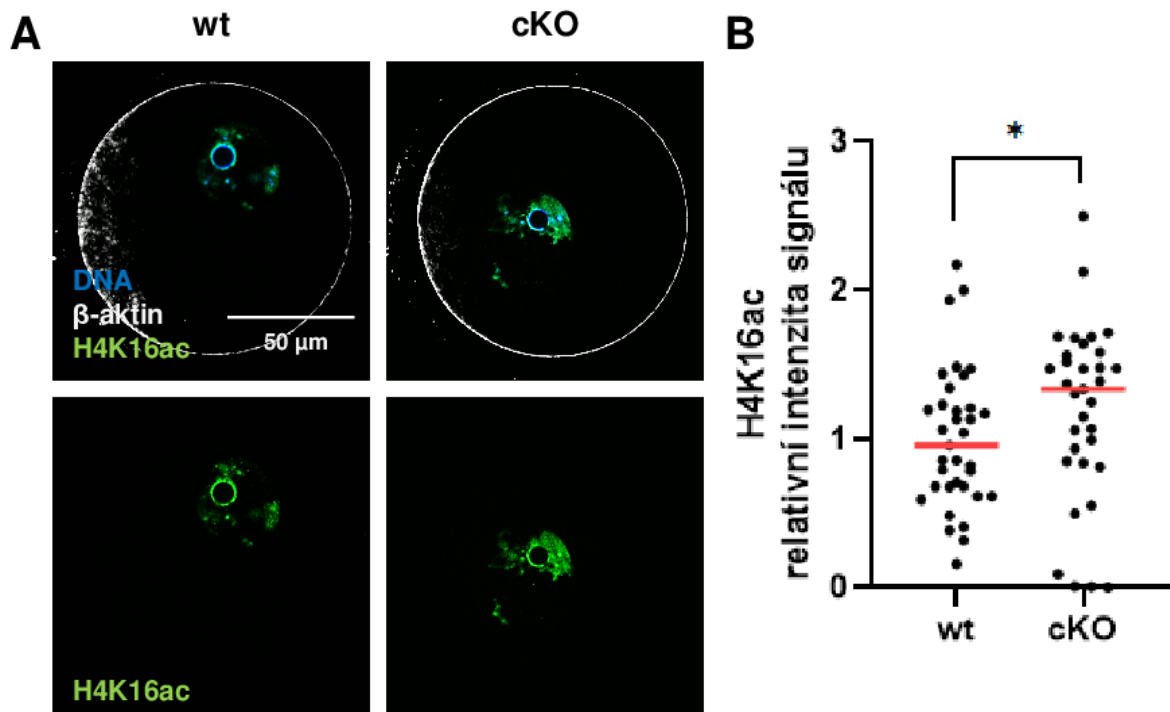


Obrázek č. 4 Porovnání wt a cKO.

A: Porovnání lokalizace a přítomnosti SIRT1 v oocytech wt a cKO donorek: GV - NSN - oocyt ve stádiu zárodečného váčku, chromatin neobklopuje jádérko; GV - SN - oocyt ve stádiu zárodečného váčku, chromatin obklopuje jádérko; MII - oocyt ve stádiu metafáze druhého meiotického dělení; značené protilátkami proti SIRT1 (červená), jaderné barvení DAPI (modrá), barvení β-aktinu faloidinem (šedá); **B:** Graf znázorňující počet oocytů ve stádiu GV získaných z ovarí samic po hormonální stimulaci PMSG u samic wt a cKO; **C:** Graf znázorňující počet ovulovaných oocytů po hormonální stimulaci PMSG-hCG u samic wt a cKO; **D:** Graf znázorňující počet mláďat narozených v prvních třech vrzích wt a cKO samic po zapuštění wt samcem;

6.3 Určení kvality oocytů na základě epigenetických substrátů SIRT1

Pro porovnání epigenetické kvality wt a *Sirt1*-deficientních oocytů byla vybrána acetylace histonu H4 na lysinu K16 (H4K16ac), jednoho ze substrátů SIRT1, který dobře odráží jeho deacetylační aktivitu. Tato histonová modifikace je spojována s transkripční aktivitou (shrnuto v Zentner & Henikoff 2013), která je před znovu zahájením meiózy utlumena z důvodu kondenzace chromatinu (Bouniol-Baly et al., 1999). Proto byla acetylace H4K16 studována pomocí imunocytochemického barvení na oocytech ve fázi GV (Obr. č. 5A). Kvantitativní analýza intenzity signálu ukázala, že míra acetylace H4K16 je vyšší u *Sirt1*-deficientních než u wt oocytů (*: $P \leq 0,05$) (Obr. č. 5B).

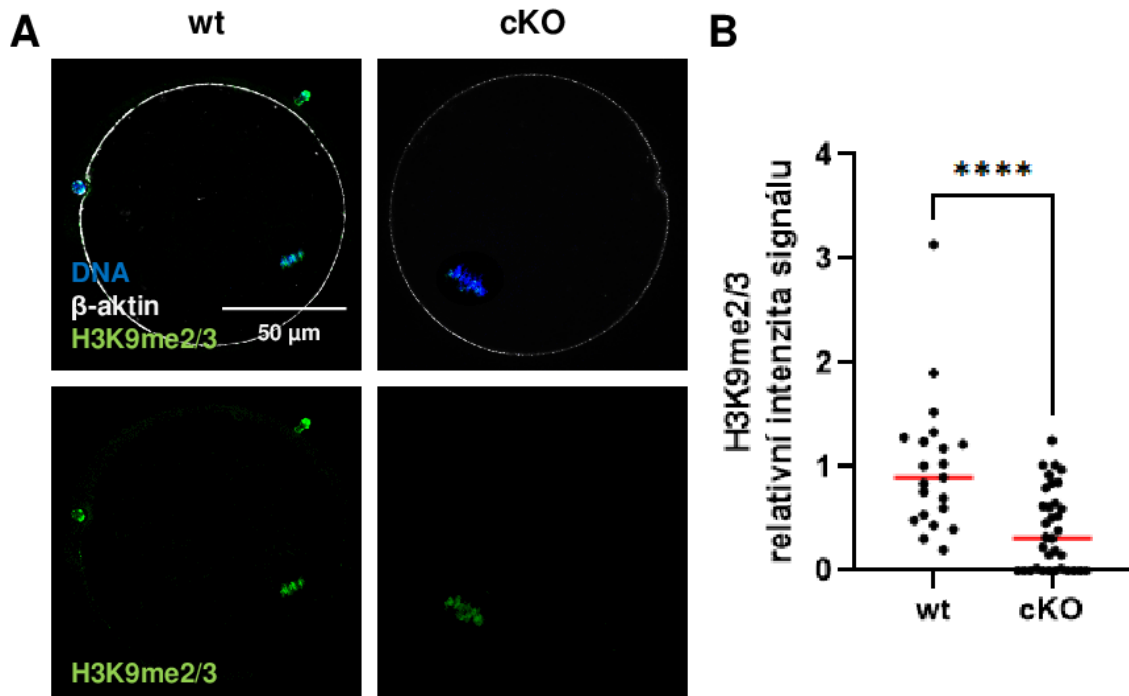


Obrázek č. 5 *H4K16ac* v GV oocytech wt a cKO.

A: Reprezentativní obrázky oocytů ve stadiu GV wt a cKO donorek barvené protilátkami proti H4K16ac (zelená), jaderné barvení DAPI (modrá), barvení β -aktinu faloidinem (šedá); **B:** Graf znázorňující rozdíl relativní intenzity signálu H4K16ac GV oocytů wt a cKO donorek (*: $P \leq 0,05$);

Di-/trimetylace histonu H3 na lysinu K9 (H3K9me2/3) byla vybrána jako epigenetická modifikace stabilizující chromatin, která je ovlivněna SIRT1 nepřímo deacetylací H3K9 a také případnou regulací metyl transferáz. Význam H3K9me2/3 se projevuje zejména během segregace chromozómů, kdy je žádoucí maximální kondenzace chromatinu (Guenatri et al., 2004). Míra metylace byla proto studována pomocí imunocytochemie v IVO oocytech (Obr. č. 6A). Následně byl signál H3K9me2/3 kvantifikován a výsledky ukazují, že míra

metylace je výrazně nižší u SIRT1-deficientních než u wt oocytů (****: $P \leq 0,0001$) (Obr. č. 6B).

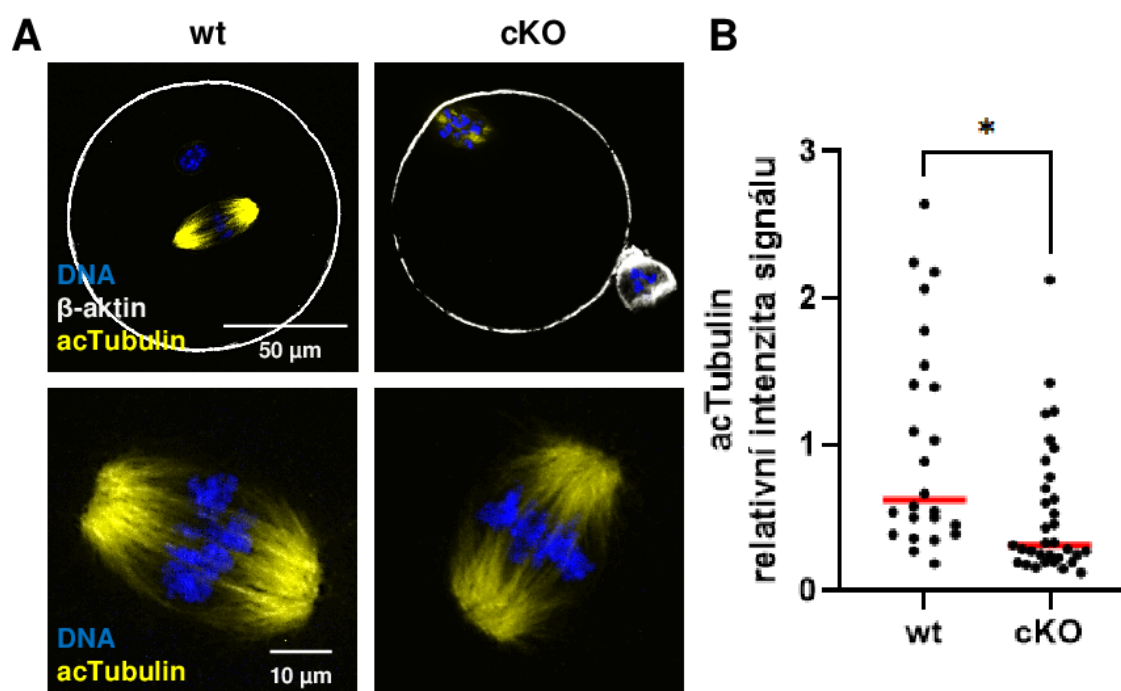


Obrázek č. 6 H3K9me2/3 v IVO wt a cKO donorek.

A: Reprezentativní obrázky IVO oocytů wt a cKO donorek barvené protilátkami proti H3K9me2/3 (zelená), jaderné barvení DAPI (modrá), barvení β -aktinu faloidin (šedá); **B:** Graf znázorňující rozdíl relativní intenzity signálu H3K9me2/3 IVO oocytů wt a cKO donorek (****: $P \leq 0,0001$);

6.4 Určení kvality oocytů na základě neepigenetických substrátů

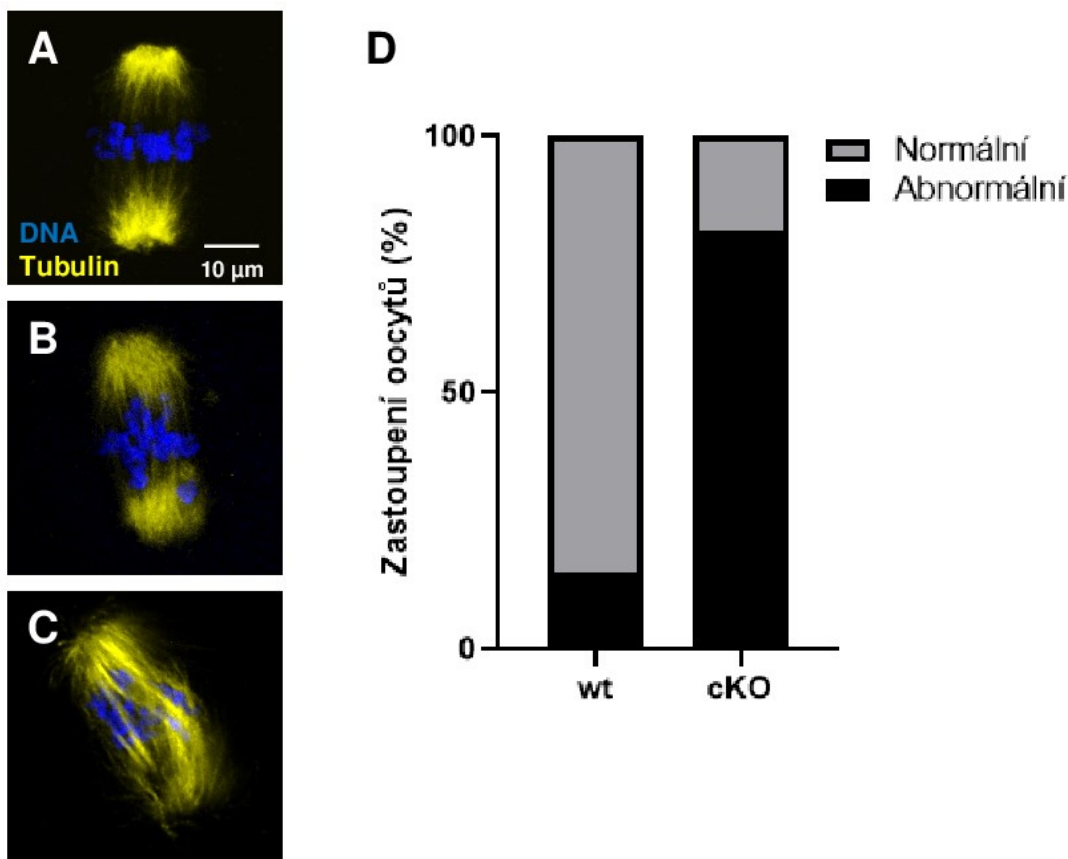
Dále jsme chtěli ověřit předpoklad, že SIRT1 ovlivňuje stabilitu dělicího vřeténka. Jako marker stability dělicího vřeténka byl určen acTubulin (Janke & Montagnac, 2017). Acetylace tubulinu byla detekována pomocí imunocytochemického barvení IVO oocytů (Obr. č. 7A). Shledali jsme sníženou intenzitu signálu acTubulinu, ze které usuzujeme na sníženou acetylaci tubulinu dělicího vřeténka u *Sirt1*-deficientních oocytů (*: $P \leq 0,05$) (Obr. č. 7B).



Obrázek č. 7 *acTubulin v IVO wt a cKO.*

A: Reprezentativní obrázky IVO oocytů wt a cKO donorek, barvené protilátkami proti acTubulinu (žlutá), jaderné barvení DAPI (modrá), barvení β-aktinu faloidinem (šedá); **B:** Graf znázorňující rozdíl relativní intenzity signálu acTubulinu IVO oocytů wt a cKO donorek (*: $P \leq 0,05$);

Dále bylo jako marker kvality IVO oocytů hodnoceno uspořádání metafáze II, která se jeví jako esenciální pro zdárný vývoj embrya po oplození. Bylo určeno procentuální zastoupení IVO oocytů s normálním metafázním postavením (Obr. č. 8A) a procento oocytů abnormálních. Jako abnormální byly hodnoceny oocyty s nepřesným uspořádáním chromozómů (Obr. č. 8B) a/nebo s abnormálním dělicím vřeténkem (Obr. č. 8C). Byl zjištěn větší podíl abnormálních metafází II v *Sirt1*-deficientních IVO oocytech než ve wt oocytech (Obr. č. 8D).



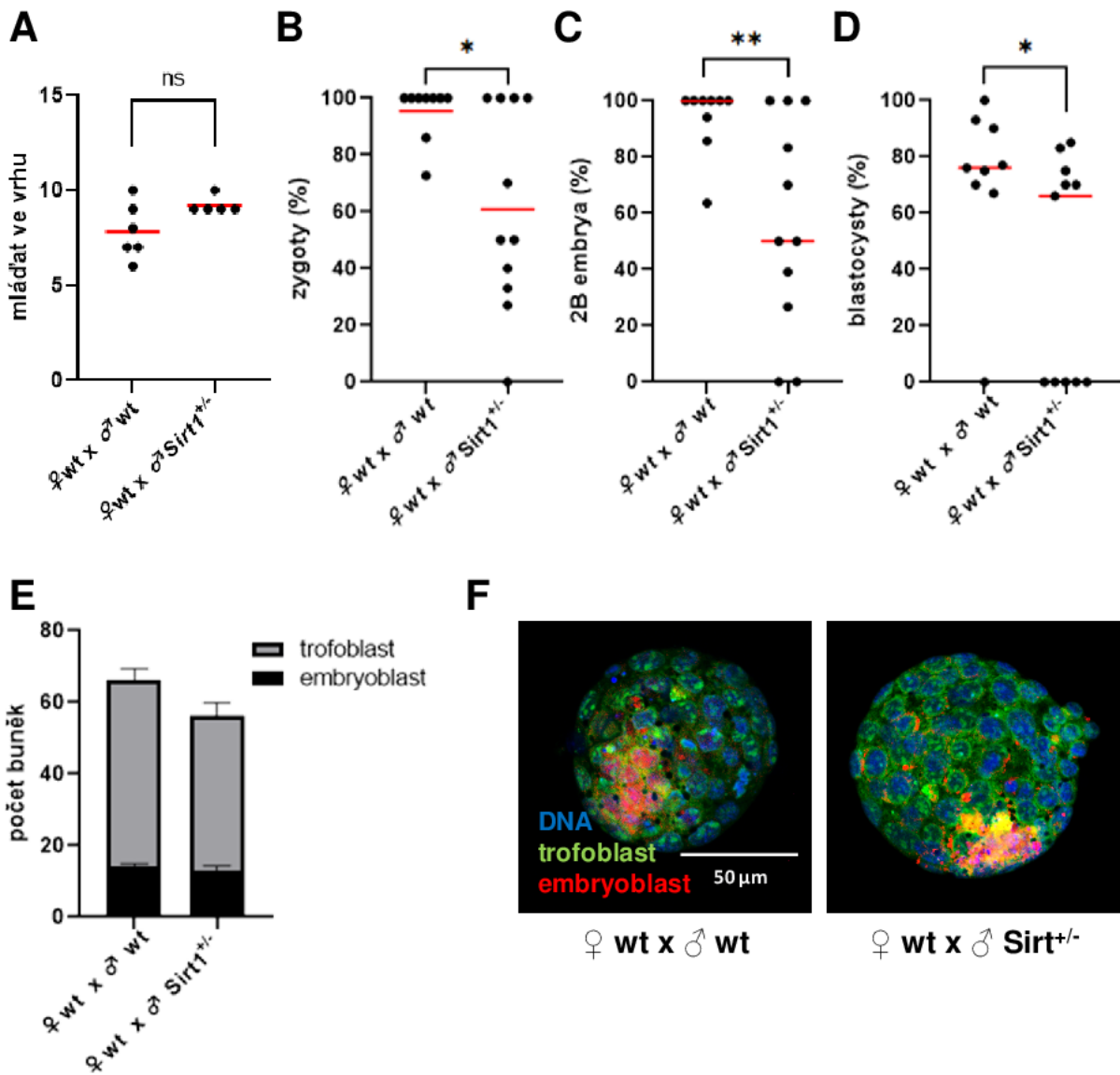
Obrázek č. 8 Hodnocení metafáze II IVO oocytů wt a cKO donorek.

Reprezentativní obrázky IVO oocytů barvených protilátkami proti Tubulinu (žlutá) a jaderným barvením DAPI (modrá) hodnocených jako: **A:** normální metafázní postavení; **B:** nepřesné uspořádání chromozómů; **C:** abnormální dělicí vřeténko; **D:** Graf znázorňující procentuální zastoupení abnormálního metafázního postavení IVO oocytů wt a cKO donorek, hodnoceno chí kvadrát testem (*: $P \leq 0,05$);

6.5 Vývojový potenciál embryí hemizygotního samce

V dřívějších pracích je uváděn vliv SIRT1 na vývoj a kvalitu spermií (McBurney et al., 2003). V této části jsme se pokusili popsat, jaký vliv má chybějící samčí alela *Sirt1* na vývojový potenciál embryí. Za tímto účelem byly použity wt samice zapaštěné samci hemizygotními pro *Sirt1* (*Sirt1*^{+/-}). Těchto zapaštění bylo využito ke sledování počtu mláďat ve vrhu a následně také k výplachu zygot a jejich kultivaci do stádia blastocysty. Jedním z ukazatelů vypovídajících o kvalitě blastocyst je počet blastomer a také počet buněk tvořících konkrétně embryoblast a trofoblast (Fouladi-Nashta et al., 2005). Z toho důvodu jsme hodnotili blastocysty na základě diferenciálního barvení embryoblastu a trofoblastu (Obr. č. 9F). Na úrovni počtu mláďat nebyl zaznamenán rozdíl mezi skupinami zapaštěnými wt a *Sirt1*^{+/-} samci (Obr. č. 9A). Po zapaštění *Sirt1*^{+/-} samci bylo vypláchnuto menší procento zygot než po zapaštění wt samci (*: $P \leq 0,05$) (Obr. č. 9B). Z těchto zygot se po *in vitro*

kultivaci (IVC) dostalo do stadia dvoubuněčné embrya (2B) rovněž menší procento zygot *Sirt1*^{+/-} samců než wt samců (*: $P \leq 0,01$) (Obr. č. 9C). Stejně tak bylo dosaženo nižšího procentuálního zastoupení blastocyst zplozených *Sirt1*^{+/-} samcem než embryí wt samce (*: $P \leq 0,05$) (Obr. č. 9D). Po hodnocení počtu blastomer podílejících se na embryoblastu a trofoblastu jsme také nenašli žádný významný rozdíl (Obr. č. 9E).

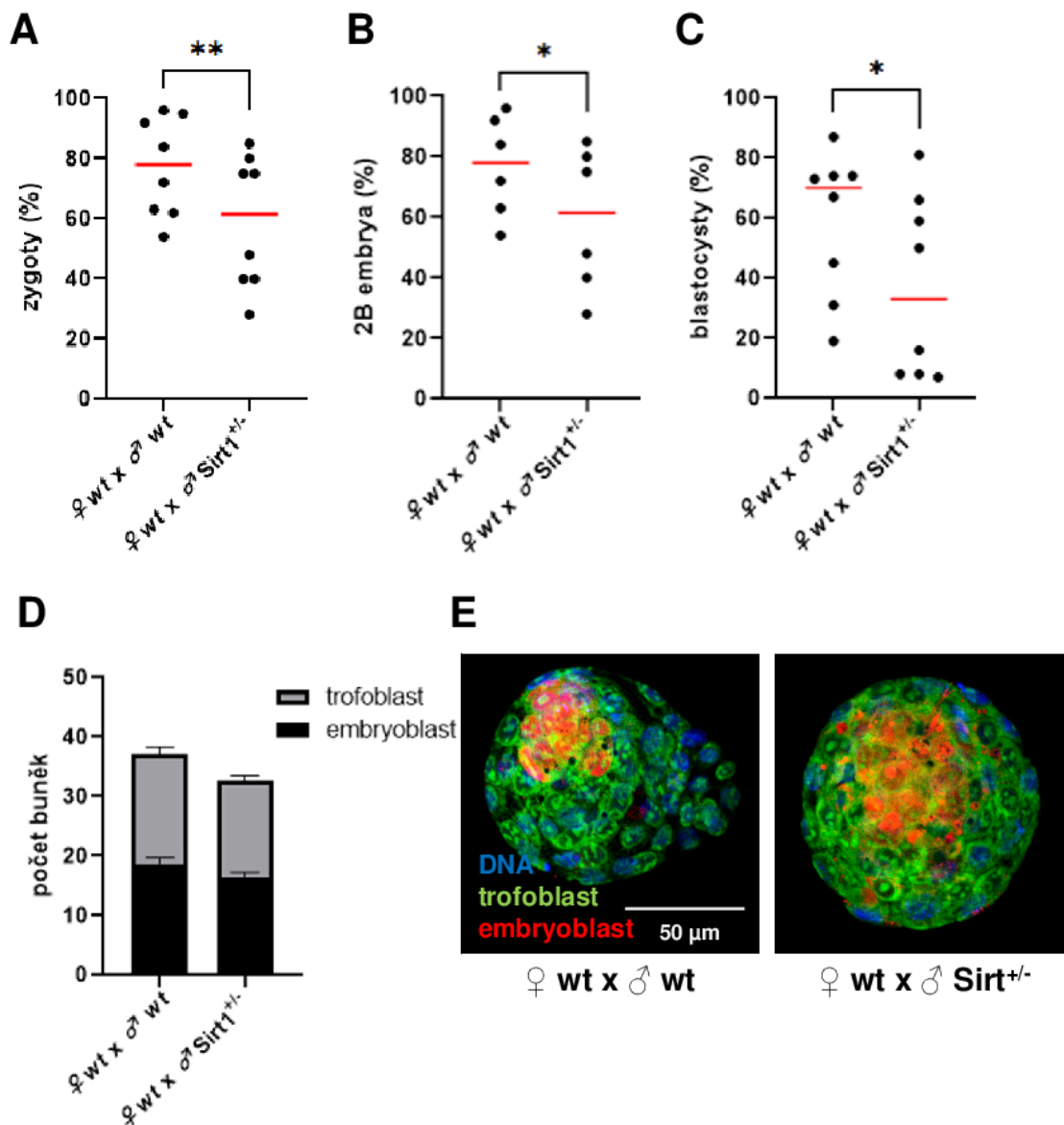


Obrázek č. 9 Vývojový potenciál IVC embryí hemizygotního samce.

A: Graf znázorňující počet mláďat ve vrhu po zapuštění wt samice wt a *Sirt1*^{+/-} samcem; **B:** Graf znázorňující procentuální zastoupení zygot získaných po výplachu pohlavního traktu wt samic po zapuštění wt a *Sirt1*^{+/-} samcem (*: $P \leq 0,05$); **C:** Graf znázorňující procentuální zastoupení dvoubuněčných (2B) embryí po kultivaci zygot získaných po výplachu pohlavního traktu wt samic po zapuštění wt a *Sirt1*^{+/-} samcem (*: $P \leq 0,01$); **D:** Graf znázorňující procentuální zastoupení blastocyst vzniknuvších kultivací zygot získaných po výplachu pohlavního traktu wt samic po zapuštění wt a *Sirt1*^{+/-} samcem (*: $P \leq 0,05$); **E:** Graf znázorňující celkový počet buněk a počty buněk tvořících embryoblast a trofoblast blastocyst vzniknuvších kultivací zygot získaných po výplachu

pohlavního traktu wt samic po zapuštění wt a *Sirt1*^{+/-} samcem; **F:** Repräsentativní obrázky blastocyst vzniknuvších kultivací zygot získaných po výplachu pohlavního traktu wt samic po zapuštění wt a *Sirt1*^{+/-} samcem, barvené protilátkami proti markeru trofoblastu CDX2 (zelená), protilátkami proti markeru embryoblastu OCT4 (červená), jaderné barvení DAPI (modrá);

Vzhledem k dříve popsané snížené vitalitě *Sirt1*-deficientních spermií (McBurney et al., 2003), jsme se rozhodli provést toto křížení wt samic a *Sirt1*^{+/-} samců také pomocí metody IVF. Tato metoda umožňuje obejít některé aspekty *in vivo* oplodnění, které mohou znevýhodňovat *Sirt1*-deficientní spermie ještě před samotným oplozením. Hodnocení kvality následně vzniknuvších embryí bylo provedeno pomocí diferenciálního barvení embryoblastu a trofoblastu (Obr. č. 10E). Po provedení IVF jsme zaznamenali menší podíl zygot při užití spermií samců *Sirt1*^{+/-} než wt spermií (*: $P \leq 0,01$) (Obr. č. 10A). Následně vznikl po kultivaci *in vitro* menší podíl dvoubuněčných embryí (2B) ve skupině vzniknuvších ze spermií samce *Sirt1*^{+/-} než wt samce (*: $P \leq 0,05$) (Obr. č. 10B). Také stádia blastocysty dosáhlo méně embryí zplozených spermii *Sirt1*^{+/-} samce než wt samce (*: $P \leq 0,05$) (Obr. č. 10C). Celkový počet buněk a počet buněk tvořících embryoblast a trofoblast takto vzniklých blastocyt byl ovšem v obou skupinách totožný (Obr. č. 10D).

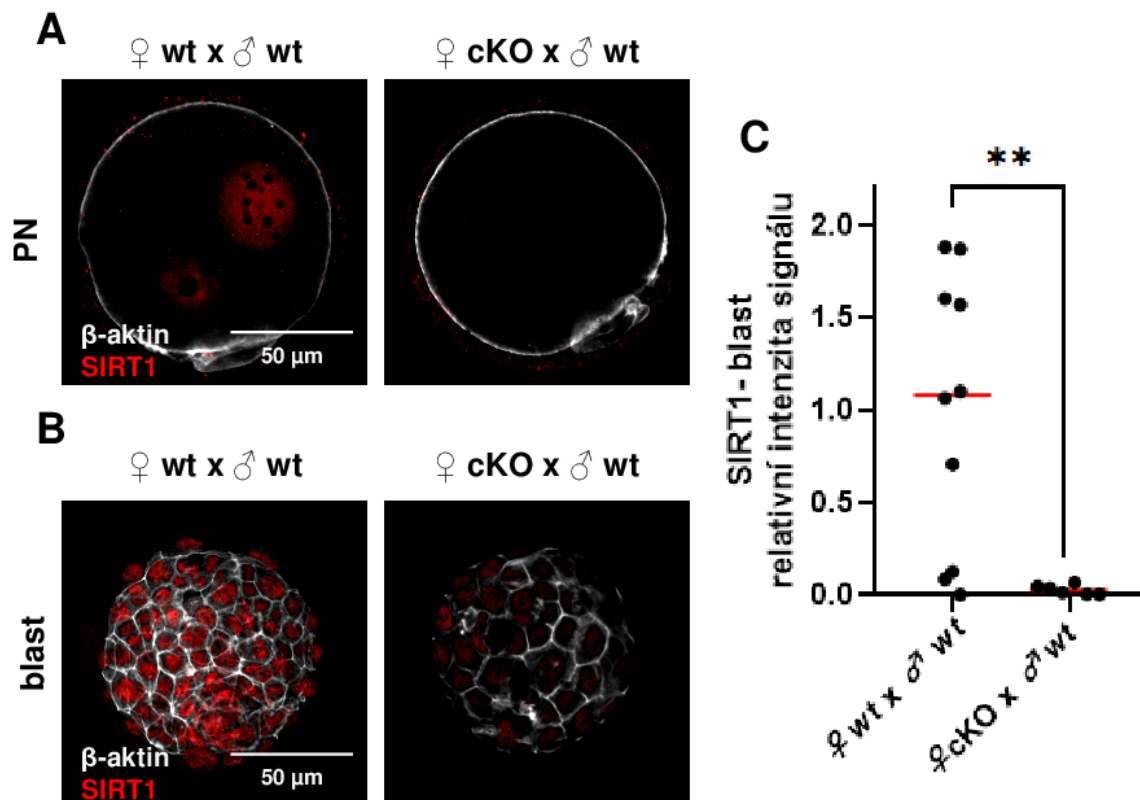


Obrázek č. 10 Vývojový potenciál IVF embryí hemizygotního samce.

A: Graf znázorňující procentuální zastoupení zygot získaných metodou IVF na použití oocytů wt samic a spermií wt samce a Sirt1^{+/-} samce (*: $P \leq 0,01$); **B:** Graf znázorňující procentuální zastoupení dvoubuněčných (2B) embryí po kultivaci zygot získaných metodou IVF na použití oocytů wt samic a spermií wt samce a Sirt1^{+/-} samce (*: $P \leq 0,05$); **C:** Graf znázorňující procentuální zastoupení blastocyst vzniknuvších kultivací zygot získaných metodou IVF na použití oocytů wt samic a spermií wt samce a Sirt1^{+/-} samce (*: $P \leq 0,05$); **D:** Graf znázorňující celkový počet buněk a počty buněk tvořících embryoblast a trofoblast blastocyst vzniknuvších kultivací zygot získaných metodou IVF na použití oocytů wt samic a spermií wt samce a Sirt1^{+/-} samce; **E:** Repräsentativní obrázky blastocyst vzniknuvších kultivací zygot získaných metodou IVF na použití oocytů wt samic a spermií wt samce a Sirt1^{+/-} samce, barvené protilátkami proti markeru trofoblastu CDX2 (zelená), protilátkami proti markeru embryoblastu OCT4 (červená), jaderné barvení DAPI (modrá);

6.6 SIRT1 v IVF embryích

V návaznosti na výše uvedené výsledky jsme se pokusili určit, jak a jestli vůbec se v časném embryonálním vývoji uplatňuje alela *Sirt1* přinášena do vzniklé zygoty spermií. Z toho důvodu jsme za pomoci IVF metody provedli křížení wt resp. cKO samic a wt samců. Ve vzniklých zygotách a následně po kultivaci v blastocystách byl díky imunocytochemickému barvení detekován přítomný SIRT1. Ve wt zygotách jsme zaznamenali signál SIRT1 v obou prvojadrech, oproti tomu v zygotách pocházejících ze *Sirt1*-deficientních oocytů nebyl patrný signál v žádném z prvojader (Obr. č. 11A). Nižší intenzita SIRT1 signálu byla patrná u embryí ze *Sirt1*-deficientních oocytů i po kultivaci do stadia blastocyst (Obr. č. 11B). Tento rozdíl byl následně potvrzen i kvantifikací signálu SIRT1 ve vzniklých blastocystách (*: $P \leq 0,01$) (Obr. č. 11C).

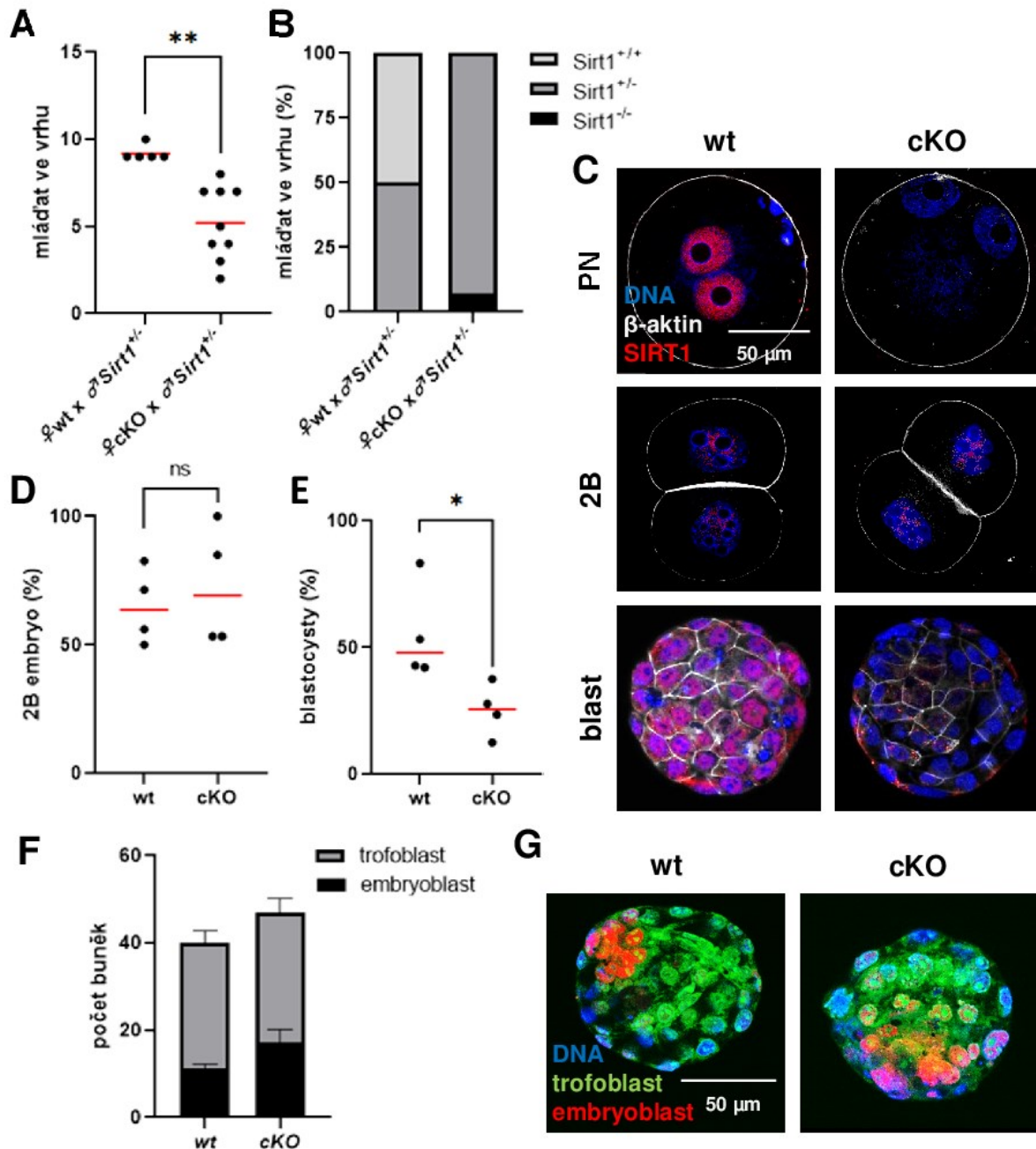


Obrázek č. 11 SIRT1 v IVF embryích.

A: Reprezentativní obrázky zygot vzniklých metodou IVF z oocytů wt a cKO donorek oplodněných spermii wt samce, barvené protilátkami proti SIRT1 (červená), barvení β -aktinu faloidinem (šedá); **B:** Reprezentativní obrázky blastocyst vzniklých kultivací zygot po IVF oocytů wt a cKO donorek spermii wt samce, barvené protilátkami proti SIRT1 (červená), barvení β -aktinu faloidinem (šedá); **C:** Graf znázorňující rozdíl relativní intenzity signálu SIRT1 v blastocystách vzniklých kultivací zygot po IVF oocytů wt a cKO donorek spermii wt samce (*: $P \leq 0,01$);

6.7 Vývojový potenciál partenogenetických embryí

V *in vivo* podmínkách nebyl zaznamenán rozdíl v počtu narozených mláďat po křížení wt resp. cKO samic s wt samci (Obr. č. 4D). Rozdíl jsme zaznamenali až po křížení wt a cKO samic s hemizygotními (*Sirt1*^{+/-}) samci, kdy cKO samice měly mláďat méně (*: $P \leq 0,001$) (Obr. č. 12A). Po určení genotypu takto získaných mláďat se ukázalo, že touto cestou není téměř možné získat *Sirt1*-deficientní jedince (*Sirt1*^{-/-}) (Obr. č. 12B). Abychom mohli studovat *Sirt1*^{-/-} genotyp, bylo nutné přistoupit k partenogenetické aktivaci oocytů cKO samic. Vzniklá embrya jsme nejprve použili k detekci SIRT1 a porovnáním s wt embryi jsme potvrdili průkaznost modelu cKO i u PA embryí (Obr. č. 12C). Dále byla PA embrya *in vitro* kultivována až do stadia blastocysty. Následně byla prověřena jejich kvalita pomocí diferenciálního barvení embryoblastu a trofoblastu (Obr. č. 12G). Procento dvoubuněčných embryí (2B) získaných 24h po PA z počtu aktivovaných oocytů se nelišilo u skupiny wt embryí a skupiny *Sirt1*-deficientních embryí (Obr. č. 12D). Oproti tomu byl zaznamenán rozdíl v dosažení stadia blastocysty 96h po PA. *Sirt1*-deficientní embrya dosahovala tohoto stadia méně často než wt embrya (*: $P \leq 0,05$) (Obr. č. 12E). V celkovém počtu buněk, ani v počtu buněk tvořících embryoblast, resp. trofoblast nebyl skupinami PA embryí zaznamenán rozdíl (Obr. č. 12F).



Obrázek č. 12 Vývojový potenciál PA embryí.

A: Graf znázorňující počet mláďat narozených wt a cKO samic po zapuštění Sirt1^{+/-} samcem (*: $P \leq 0,001$); **B:** Graf znázorňující procentuální zastoupení jednotlivých genotypů ve vrzích mláďat wt a cKO samic po zapuštění Sirt1^{+/-} samcem; **C:** Porovnání lokalizace a přítomnosti SIRT1 PA embryí z oocytů wt a cKO donorek: PN - zygota 8h po PA oocytu; 2B - embryonální stadium dvou buněk 24h po PA; blast - embryonální stadium blastocysty 96h po PA; značené protilátkami proti SIRT1 (červená), jaderné barvení DAPI (modrá), barvení β-aktinu faloidinem (šedá); **D:** Graf znázorňující procento dvoubuněčných (2B) embryí z dříve získaných oocytů wt a cKO donorek 24h po PA; **E:** Graf znázorňující procento embryí, která následně dosáhla stadia blastocysty 96h po PA oocytů wt a cKO donorek (*: $P \leq 0,05$); **F:** Graf znázorňující celkový počet buněk a počty buněk tvořících embryoblast a trofoblast PA blastocyst ve skupinách embryí z oocytů wt a cKO donorek; **G:** Reprezentativní obrázky PA blastocyst wt a cKO, barvené protilátkami proti markeru trofoblastu CDX2 (zelená), protilátkami proti markeru embryoblastu OCT4 (červená), jaderné barvení DAPI (modrá);

7 Diskuze

Sirtuiny jsou skupina enzymů, která je hojně studována pro jejich potenciální využití, mimo jiné, v oblastech zvířecí i lidské reprodukce a pro bližší porozumění gametogenezi a ranému embryonálnímu vývoji (Di Emidio et al., 2014; Adamkova et al., 2017; Tatone et al., 2018; Vazquez et al., 2020).

Dříve popsané myši knock-out modely pro SIRT1 se projevovaly abnormálním vývojem, časnou embryonální letalitou, případně sterilitou narozených jedinců (McBurney et al., 2003). Pro náš účel studia role SIRT1 bylo třeba vytvořit kondicionální knock-out model myši (cKO), kde se nepřítomnost SIRT1 projevuje pouze v oocytech a ve zbytku těla je jeho funkce zachována (Obr. č. 1). Tomuto odpovídá srovnatelné množství získaných zralých i nezralých oocytů po hormonální stimulaci samic wild-type (wt) a cKO (Obr. č. 4B,C). Překvapivě bylo podobného výsledku dosaženo dříve také u „germ-line“ knock-out modelu (Coussens et al., 2008). Ani poté, co byly v našich experimentech samice wt a cKO zapuštěny wt samci, nedošlo k redukci počtu mláďat ve vrhu (Obr. č. 4D). Rozdíl v počtu narozených mláďat nastal, až pokud byly samice wt a cKO pářeny s hemizygotními samci (Obr. č. 12A). Tato pozorování nás vedla k domněnce, že jedna přítomná alela *Sirt1* je schopna kompenzovat ztrátu druhé, zatímco ztráta obou alel má za následek často fatální vývoj, jak již bylo uvažováno dříve (Coussens et al., 2008).

Genotyp zvířete byl nejprve potvrzen na úrovni DNA pomocí metody PCR a nepřítomnost *Sirt1* na transkripční úrovni v oocytech cKO samic byla potvrzena qPCR (vlastní nepublikovaná data). Pro další ověření průkaznosti našeho modelu jsme detekovali SIRT1 v wt oocytech a nepřítomnost SIRT1 v oocytech cKO (Obr. č. 4A). Shodně s dřívějšími zjištěními jsme zaznamenali SIRT1 v zárodečném váčku wt nezralých oocytů (Nevoral et al., 2019). Naopak se nám nedařilo pozorovat lokalizaci SIRT1 kolem dělicího vřeténka u zralých wt oocytů, jak jsme očekávali. Lze předpokládat efekt použitého kmene imbrední myši C57BL/6, kde není lokalizace SIRT1 kolem dělicího vřeténka tak patrná jako u outbredního kmene ICR užitého v předchozích studiích. Skutečně, ve srovnávacím experimentu se u zralých oocytů kmene ICR podařilo lokalizovat SIRT1 kolem dělicího vřeténka, a naopak opakovaně pozorovat slabý signál v oocytech kmene C57BL/6 (Obr. č. 3A). S využitím partenogenetické aktivace jsme v souladu s dřívějšími pracemi (McBurney et al., 2003; Adamkova et al., 2017) zaznamenali SIRT1 v prvojádrech zygot a následně v jádrech buněk dalších stádií raného embryonálního vývoje. Dle očekávání v oocytech cKO a partenogenetických embryích nebyl SIRT1 přítomen (Obr. č. 12C).

Jelikož nebyly patrné rozdíly v počtech získaných nezralých a zralých oocytů ani v počtech narozených mláďat u wt samic a samic cKO (Obr. č. 4B,C,D), rozhodli jsme se zaměřit podrobněji na samotnou kvalitu oocytů těchto samic. V kontextu výše zmíněných údajů nás zajímalo, zda se oocyty těchto samic liší z hlediska epigenetických a ne-epigenetických substrátů. Ty byly vybrány s ohledem na dosud uvažované proteinové cíle SIRT1, jakým jsou histony acetylované na lizinových zbytcích (Vaquero et al., 2004), některé methyltransferázy (Bosch-Presegué et al., 2011) a cytoskeletální struktury (T. Zhang et al., 2016; Nevoral et al., 2019).

Je známo, že se zráním oocytu dochází k hypoacetylaci histonů a současně k nárůstu jejich metylace (Kim et al., 2003). U těchto epigenetických změn bylo již dříve popsáno působení SIRT1 (Vaquero et al., 2004). Abychom se přesvědčili o kvalitě oocytů z hlediska působení SIRT1 na epigenetické substráty, studovali jsme v nezralých GV oocytech acetylaci histonu H4 na lysinu K16 (H4K16ac) a ve zralých oocytech metylaci histonu H3 na lysinu K9 (Obr. č. 5) a (Obr. č. 6). Jak jsme předpokládali, u *Sirt1*-deficientních oocytů jsme pozorovali hyperacetylaci H4K16 (Obr. č. 5B), což odpovídá i dřívějším zjištěním (Ma & Schultz, 2013). Dále byl dle předpokladů u *Sirt1*-deficientních oocytů pozorován pokles metylace H3K9 (Obr. č. 6B). V dřívějších pracích byl popsán mechanismus ovlivnění této histonové modifikace právě prostřednictvím SIRT1. SIRT1 zde působí nepřímým způsobem na methyltransferázu SUV39H1 a zásadně tak ovlivňuje mimo jiné tvorbu heterochromatinu (Vaquero et al., 2007). Trimetylace (me³) H3K9 je důležitým faktorem pro kondenzaci chromatinu a nastolení transkripčního klidu před znovuoobením meiózy (Andreu-Vieyra et al., 2010). Významně se H3K9me³ podílí také na kohezi sesterských chromatid a segregaci chromozómů (Guenatri et al., 2004). Naopak hyperacetylace histonů je spojována s narušením segregace chromozómů kvůli chybnému sestavení kinetochoru (Robbins et al., 2005). Prozatím není jasné, zda dochází k hypometylaci H3K9 v *Sirt1*-deficientních oocytech jako důsledek přetrvávající acetylace téhož lysinového zbytku anebo k nedostatečné stimulaci histon methyltransferáz. V souladu s pozorovanou epigenetickou kvalitou *Sirt1*-deficientních oocytů lze však očekávat selhání plné kondenzace chromozómů během zrání oocytu (Ma & Schultz, 2013). V souhrnu naše výsledky potvrzují dřívější zjištění, že SIRT1 modifikuje histonový kód směrem k větší chromatinové stabilitě (Nevoral et al., 2019).

O potenciálu oocytu rozhoduje vedle epigenetických znaků i kvalita jeho cytoskeletu, zejména dělicího vřeténka, které odpovídá za zdárnou segregaci chromozómů (X. Zhang et al., 2017). Předpokládáme, že cytoskelet se řadí mezi neepigenetické substráty SIRT1 (Nevoral et al., 2019). Za marker stability dělicího vřeténka je možné považovat α -tubulin

acetylovaný na lysinu 40 (K40; acTubulin) (Janke & Montagnac, 2017). Proto jsme se rozhodli analyzovat acTubulin ve zralých oocytech (Obr. č. 7). Zjistili jsme, že u *Sirt1*-deficientních oocytů dochází k poklesu acetylace tubulinu, z čehož je možno soudit, že dělicí vřeténko je zde méně stabilní. Zároveň se ale podle našich výsledků SIRT1 nepodílí na deacetylaci tubulinu, jak se zdálo z dřívější studie SIRT1 aktivátorů (Nevoral et al., 2019). Přestože některé histon deacetylázy mají souvislost s deacetylací tubulinu (North et al., 2003; X. Li et al., 2017; K. Zhang et al., 2017), není toto pravděpodobně případ SIRT1. Ten se na dynamice mikrotubulů podílí zřejmě nepřímo prostřednictvím dosud neznámého substrátu. Tím by mohla být některá ze savčích α -tubulin acetyltransferáz, mezi které se majoritně řadí ATAT1 (alfa-tubulin acetyltransferáza 1) (shrnutí v Li et al. 2015). Také zde srovnání *Sirt1*-deficientních oocytů s obdobným fenotypem hypoacetylace tubulinu jako u oocytů ošetřených aktivátorem SIRT1 (Nevoral et al., 2019) poukazuje na další možné rozdíly mezi myšími kmeny, které byly pro experimenty použity. Navzdory těmto rozdílům lze konstatovat, že správná funkce SIRT1 pomáhá se stabilizací dělicího vřeténka a k zajištění bezchybného průběhu meiózy. Tento předpoklad byl následně skutečně potvrzen zaznamenáním většího procentuálního zastoupení chybně sestavené metafázní konformace u *Sirt1*-deficientních oocytů (Obr. č. 8B). Toto pozorování je v souladu s již dříve publikovanými výsledky (Di Emidio et al., 2014; T. Zhang et al., 2016; Xing et al., 2021). V důsledku toho by se v této skupině oocytů dalo předpokládat větší zastoupení aneuploidních oocytů. I přes tuto skutečnost existují ve skupině bez SIRT1 oocyty, které si navzdory nepříznivému působení nedostatku SIRT1 dokážou zachovat správné uspořádání dělicího vřeténka a tudíž i zdárně dokončit meiotické dělení. To odpovídá obecné představě o robustních mechanismech zajišťujících kvalitu oocytů, které jsou výsledkem silných selekčních tlaků na udržení reprodukční zdatnosti. Tím by se dala do jisté míry vysvětlit i námi pozorovaná nepřítomnost rozdílu v počtech zralých a nezralých oocytů popsaná výše (Obr. č. 3).

V dřívějších pracích byl popsán zásadní vliv nepřítomnosti SIRT1 na vývoj a funkci spermií (McBurney et al., 2003; Coussens et al., 2008). Také naše probíhající výzkumy naznačují, že u hemizygotních samců (*Sirt1*^{+/-}) je snížena koncentrace, pohyblivost spermií a také jejich morfologie je abnormální (vlastní nepublikovaná data). I přes tyto skutečnosti, které by měly znevýhodňovat *Sirt1*^{+/-} samce, jsme překvapivě nezaznamenali redukci počtu mláďat po zapuštění wt samice (Obr. č. 9A). Proto jsme se rozhodli zjistit, jaký vliv má chybějící samčí alela *Sirt1* na časný vývoj embryí. Pro získání těchto embryí jsme využili jednak výplach pohlavního traktu samice po zapuštění *Sirt1*^{+/-} samcem a dále pak metodu IVF

se spermii *Sirt1*^{+/-} samce. Díky užití metody IVF jsme mohli částečně eliminovat možná znevýhodnění *Sirt1*-deficientních spermií při průchodu samičím pohlavním traktem. Přesto bylo v obou případech dosaženo podobných výsledků, a to nižší procento získaných zygot po zapuštění *Sirt1*^{+/-} samcem, resp. spermii *Sirt1*^{+/-} samce (Obr. č. 9B) a (Obr. č. 10A). Toto zjištění odpovídá již dříve popsanému vlivu sirtuinů na reprodukční schopnosti samců (shrnuto v Tatone et al. 2018). Po následné kultivaci embryí bylo ovšem rovněž po užití obou těchto metod získáno nižší zastoupení dvoubuněčných embryí i blastocyt u embryí zplozených *Sirt1*^{+/-} samcem (Obr. č. 9C), (Obr. č. 9D), (Obr. č. 10B) a (Obr. č. 10C). Tento fakt neodpovídá představě, že zásoba SIRT1 podílející se na prvních stadiích embryonálního vývoje pochází primárně z maternálních zásob uložených v oocytu, jak se již uvádělo dříve (Tatone et al., 2018) a jak ostatně vyplývá i z našeho dalšího pozorování (Obr. č. 11A). Snížený vývojový potenciál embryí *Sirt1*^{+/-} samců může ale také souviset s nedokonalou výměnou histonů za protaminy již během spermiogeneze, která může být způsobena nedostatkem SIRT1 ve spermii (Bell et al., 2014). Obdobně lze předpokládat nižší schopnost oplození spermií vzniklých v semenotvorných kanálcích *Sirt1*^{+/-}, jako nepřímý efekt nedostatečnosti somatického SIRT1 (McBurney et al., 2003; Coussens et al., 2008). V důsledku toho může mít DNA přicházející se spermii sklon k apoptotickému a oxidačnímu poškození (Tatone et al., 2018). Schopnost chránit i samotná embrya proti oxidačnímu stresu byla ostatně již dříve popsána i u SIRT3 (Kawamura et al., 2010), na jehož regulaci se SIRT1 také podílí (Brenmoehl & Hoeflich, 2013). Tyto nedokonalosti by mohly vést k problémům během aktivace embryonálního genomu (viz dále) a ke snížené schopnosti dosáhnout stádia blastocysty i k jejich nižší kvalitě. Kvalitu takto získaných blastocyt jsme ověřovali za pomoci diferenciálního barvení a kvantifikace blastomer podílejících se na tvorbě embryoblastu a trofoblastu. Právě počet buněk tvořících embryoblast je vedle celkového počtu buněk považován za jeden ze stěžejních ukazatelů kvality embrya (Fouladi-Nashta et al., 2005). Nezaznamenali jsme žádné rozdíly v počtu buněk tvořících blastocysty a v počtech buněk podílejících se na tvorbě embryoblastu resp. trofoblastu embrya ani u jedné z užitých metod (Obr. č. 9E) a (Obr. č. 10D). Dalo by se předpokládat upřednostnění *Sirt1*^{+/+} embryí na úkor *Sirt1*^{+/-} embryí, což by odpovídalo dříve uváděným datům o sníženém vývojovém potenciálu *Sirt1*^{+/-} embryí (Coussens et al., 2008). Proti ovšem hovoří námi pozorované genetické zastoupení mláďat narozených wt samičím po zapuštění *Sirt1*^{+/-} samcem, které se neodchylovalo od předpokládaného mendelovského poměru (Obr. č. 12B). Je patrné, že paternální SIRT1 se podílí na kvalitě a fertilizační schopnosti spermií prostřednictvím nedostatečné exprese v zárodečných buňkách během spermiogeneze a/nebo v somatické tkáni

varlete. Na časném vývoji embrya se nedostatečnost SIRT1 příliš nepodílí a lze usuzovat, že monoalelická exprese dokáže vykompenzovat ztrátu homologní alely. Zůstává otázkou, zda pokročilý věk *Sirt1*^{+/-} samců povede k prohloubení reprodukčního fenotypu v souladu s domněnkou, že SIRT1 je faktor spojený s věkem (Donlon et al., 2018; Satoh et al., 2013). Ke konstatování, že *Sirt1*^{+/-} myší linie může posloužit jako vhodný genetický model pro pokročilý paternální věk, je zapotřebí dalších experimentů. (Obr. č. 11A).

Až do aktivace vlastního genomu využívá embryo ve většině případů transkripty a proteiny nahromaděné v oocytu během oogeneze (Wassarman & Kinloch, 1992). Nejinak je tomu i v případě SIRT1, což se nám podařilo prokázat analýzou zygot, pro jejichž přípravu byla užita metoda IVF (Obr. č. 11). Z nepřítomnosti signálu pro SIRT1 v prvojádrech zygot vzniklých po zapuštění *Sirt1*-deficientních oocytů a wt spermii je možné usoudit, že SIRT1 přítomný v samičím i samčím prvojádře wt zygot je čistě maternálního původu. Jeho podíl zde na modulaci pronukleárního histonového kódu byl již dříve popsán (Adamkova et al., 2017). Transkripce *Sirt1* z genomu embrya je předmětem hlavní vlny aktivace embryonálního genomu (viz dále) a nelze ji tedy očekávat v zygotách (Abe et al., 2018). Po kultivaci těchto embryí až do stádia blastocysty jsme nicméně zjistili, že embrya *Sirt1*^{+/-} obsahují výrazně méně SIRT1 než bylo očekáváno, tj. méně než přibližná polovina v porovnání s wt embryi (Obr. č. 11B,C). Toto zjištění stojí proti naší dřívější domněnce, že jedna alela *Sirt1* je schopna kompenzovat ztrátu druhé a zajistit tak bezproblémový vývoj, který jsme pozorovali při srovnání počtu wt a hemizygotních mláďat (Obr. č. 4D) a jejich genotypů (Obr. č. 12B). Na druhou stranu lze uvažovat kompenzační mechanismy v podobě dalších histon deacetyláz s podobnými cílovými substráty (Ma & Schultz, 2013; X. Li et al., 2017; K. Zhang et al., 2017; Vazquez et al., 2020). Mimoto, fyziologická dynamika exprese *Sirt1* a jeho zastupitelnost je v průběhu embryonálního vývoje proměnlivá a nezbytnost SIRT1 lze uvažovat pro tkáň post-implantačního embrya, jakou je placenta (Xiong et al., 2021).

V souvislosti výše zmíněnými údaji o narozených mláďatech je překvapivé, že jsme zaznamenali rozdíly jak u samotných wt a *Sirt1*-deficientních oocytů (např. ve stabilitě dělicího vřetenka), tak u embryí z těchto oocytů pocházejících. Pravděpodobně se zde uplatňuje jeden ze dvou mechanismů: buď jsou embrya, která mají vlivem chybné segregace sklon k aneuploidii, přednostně během vývoje eliminována, nebo se zde uplatňují reparační mechanismy blastocyst a dalších vývojových stadií, která jsou schopna eliminovat aneuploidní blastomery. Oba mechanismy se mohou uplatňovat i paralelně a vedou k sledovanému reprodukčnímu fenotypu, kdy je počet mláďat ve vrhu neovlivněn chybějící alelou *Sirt1*. Mimo prosté životaschopnosti embryí a narozených mláďat ve vrhu je vhodné

uvažovat posun epigenetického kódu. Řada epigenetických značek včetně acetylace a metylace histonů je předmětem intergenerační a transgenerační dědičnosti a ovlivňuje dokonce i vývoj po narození mláděte, resp. i další generace potomků (Xing et al., 2021). Proto by snížená hladina SIRT1 v embryonálním vývoji mohla hrát roli, která nemá vliv na embryonální vývoj, ale projeví se v určitém ohledu až mnohem později během postnatálního života.

Po zapuštění cKO samice hemizygotním samcem došlo k poklesu počtu narozených mláďat (Obr. č. 12A), navíc jsme v genotypu mláďat téměř nenalezli *Sirt1*^{-/-} jedince (Obr. č. 12B). Ve shodě s dřívějšími zjištěními tedy můžeme konstatovat, že genotyp *Sirt1*^{-/-} je ve většině případů letální a tato embrya jsou během embryonálního vývoje eliminována (McBurney et al., 2003). V *in vivo* podmínkách se germ-line knock-out jedinci, kteří se dožijí pohlavní dospělosti, jeví jako sterilní (McBurney et al., 2003). Dříve byla uvedena možnost získat embrya genotypu *Sirt1*^{-/-} pomocí metody IVF, ta však měla snížený vývojový potenciál (Coussens et al., 2008). Vitální, byť sterilní, fenotyp germ-line *Sirt1*^{-/-} jedinců v předchozích studiích lze vysvětlit odlišnou konstrukcí KO, kdy námi použitý model je založen na vystřížení 3 exonů (5, 6 a 7) oproti 2 exonům (5 a 6) v předchozích pracích (McBurney, Seifert). Z výše zmíněných důvodů jsme za účelem studia úlohy SIRT1 v časném embryonálním vývoji v našich experimentech produkovali *Sirt1*-deficientní embrya pomocí partenogenetické aktivace (PA) oocytů cKO donorek (Obr. č. 12).

Partenogenetická aktivace proběhla stejně úspěšně u obou skupin oocytů a ani po prvním dělení buněk nebyly patrné rozdíly u oocytů wt i cKO samic (Obr. č. 12D). Zásadní nepoměr jsme ale zaznamenali ve schopnosti dosáhnout stádia blastocysty (Obr. č. 12E). Podobný výsledek byl dříve popsán i v případě down-regulace dalších sirtuinů (Kwak et al., 2012). Mezi těmito stádii je tedy zřejmě možné hledat zlomový bod, kdy je přítomnost SIRT1 pro další vývoj rozhodující. Jako zásadní se v tomto kontextu jeví fakt, že během prvních embryonálních stádií dochází k aktivaci embryonálního genomu (EGA, Embryonic Genom Activation), což platí napříč živočichy (Vassena et al., 2011). V tomto nanejvýš důležitém procesu může hrát SIRT1 roli svou modulační aktivitou epigenetického kódu, jak bylo publikováno dříve (Adamkova et al., 2017). SIRT1 byl také spolu s některými svými substráty již dříve označen za možný kandidátní faktor podílející se na aktivaci embryonálního genomu (Alda-Catalinas et al., 2020). Skutečně byl *Sirt1* zařazen do skupiny genů, které se začínají transkribovat právě během hlavní vlny EGA (Abe et al., 2018).

Přestože se pouze několik partenogenetických embryí genotypu *Sirt1*^{-/-} vyvinulo do blastocysty, počet blastomer embryblastu a trofoblastu nebyl v porovnání s wt blastocystami

redukován (Obr. č. 12F). Domníváme se tedy, že v tomto období mezi dvoubuněčným embryem a stadiem blastocysty prochází embrya jakýmsi hrdlem lahve, kdy méně početná skupina *Sirt1*-deficientních embryí dokáže kompenzovat nepřítomnost SIRT1 a pokračovat do stádia blastocysty. Tato embrya se poté zdánlivě neliší od wt blastocyst. Protože je však SIRT1 označen za klíčový faktor v procesu implantace embrya (Shirane et al., 2012), zůstává otázkou, jak by si *Sirt1*-deficientní embrya vedla při implantaci a dalším post-implantačním vývoji.

Celkově lze z výsledků našich experimentů zaměřených na časný vývoj embryí usoudit, že se SIRT1 během časného embryonálního vývoje významně podílí na EGA. Do složitého procesu aktivace embryonálního genomu se zapojuje velké množství transkripčních faktorů a enzymů (Abe et al., 2018; Alda-Catalinas et al., 2020). Přesné načasování EGA je druhově specifické, hlavní vlna začíná u myši již ve stadiu dvoubuněčného embrya, což je dříve než u většiny ostatních savců včetně člověka, dále pokračuje v několika dalších vlnách (shrnuto v Jukam et al., 2018). Každopádně k EGA dochází u savců právě během námi definovaného krizového období mezi dvoubuněčným embryem a blastocystou. Zde je navrženo několik mechanismů, jak by se SIRT1 mohl do EGA zapojovat:

Podle jedné z teorií je EGA závislá na poměru množství DNA a maternálních faktorů v cytoplazmě embrya, který stoupá během dělení bez buněčného růstu (Tsihklaki & FitzHarris, 2016). S rostoucím množstvím DNA je množství maternálních faktorů relativně menší a postupně přestávají inhibovat transkripci embryonálních genů. Jako jedny z možných maternálních produktů fungujících takto jako inhibitory transkripce byly uvedeny histony H3 a H4 (Amodeo et al., 2015), které na základě našich výsledků i dřívějších zdrojů považujeme za substráty SIRT1 (Obr. č. 5) a (Obr. č. 6). Toto schéma regulace EGA nebylo ovšem zatím spolehlivě potvrzeno u savců (Jukam et al., 2018). Jako pravděpodobnější se jeví zapojení SIRT1 zahájením EGA pomocí histonových modifikací. Uvádí se, že histonové značky umístěné enzymy maternálního původu mohou hrát roli při načasování genové exprese (Hontelez et al., 2015). SIRT1 by se pak mohl s dalšími enzymy ovlivňujícími epigenetický kód podílet pomocí modifikace histonů na označení aktivních lokusů ještě před začátkem transkripce. V souladu s tím je i naše pozorování přítomnosti maternálního SIRT1 v paternálním pronuleu, kde SIRT1 očividně sehrává svojí úlohu. Formování samčího prvojádra je skutečně provázeno množstvím dynamických epigenetických změn (Lei Li et al., 2013). Například některé metylace histonu H3 pravděpodobně označují oblasti počátku transkripce a odstranění této značky z ostatních oblastí se jeví jako zásadní pro normální EGA (Dahl et al., 2016). Stále se ale diskutují histonové modifikace spíše jako pouhý průvodní jev

a důsledek dynamiky chromatinu nežli příčina a regulace genové exprese během EGA (Henikoff & Shilatifard, 2011). Velmi důležitou roli hrají histonové modifikace také v ovlivnění dostupnosti embryonální DNA pro transkripční faktory a RNA polymerázu II zodpovědnou za transkripci během EGA (Jukam et al., 2018; Vastenhouw et al., 2019).

Jako nejslibnější směr dalšího výzkumu role SIRT1 v časně embryogenezi se jeví právě EGA. Jak konkrétně ale do této komplexní sítě SIRT1 zapadá a jakými přesnými mechanismy lze případně kompenzovat jeho ztrátu, je otázka pro budoucí zkoumání. K tomuto účelu může posloužit i model *Sirt1* cKO použitý pro tuto práci. Vhodné by bylo například popsat zde transkriptom pro bližší identifikaci genů, které jsou ztrátou *Sirt1* ovlivněny. Dále by pak případně bylo záhodno využít chromatin imunoprecipitaci pro přiblížení interakce SIRT1 s konkrétními lokusy. Další výzkum by měl odhalit bližší detaily fungování tohoto široce uplatňovaného enzymu, a tak přispět hlubšímu chápání gemetogeneze a časněho embryonálního vývoje.

8 Závěr

Cílem této diplomové práce bylo ověřit přítomnost SIRT1 v oocytech a časných embryích a následně odhalit jeho fyziologickou úlohu při zrání oocytů, oplození a raném embryonálním vývoji. Podařilo se nám tedy lokalizovat SIRT1 v různých fázích oogeneze a embryonálního vývoje. Dále jsme ověřili průkaznost našeho kondicionálního knock-out modelu a popsali jeho reprodukční fenotyp.

Zjistili jsme, že SIRT1 se podílí na kvalitě oocytů prostřednictvím svých substrátů, a to především prostřednictvím modulace histonového kódu chromatinu a stabilizací dělicího vřeténka. Přítomnost SIRT1 je tedy zřejmě schopna předcházet chybné segregaci a aneuploidii oocytů. Ze studia zygot vyplývá, že SIRT1 působící v samčím i samičím prvojádru je výhradně maternálního původu. Dále jsme také určili, že přítomnost SIRT1 má značný vliv na úspěšnost časného embryonálního vývoje. Klíčovým způsobem se zde podílí na procesu aktivace embryonálního genomu. Dosažené výsledky tedy potvrzují naše hypotézy o přítomnosti SIRT1 v oocytech a embryích a jeho zapojení do fyziologických procesů zrání oocytů, oplození a rané embryogeneze.

Naše výsledky mohou přispět k pochopení mechanismů, kterými se řídí časný embryonální vývoj. Tyto informace mohou být využity jak pro další výzkum zabývající se fertilizací a časnou embryogenezí, tak v praxi pro zkvalitnění technik asistované reprodukce u lidí i hospodářských zvířat.

Přesné mechanismy, kterými se SIRT1 do těchto procesů zapojuje, a jak je v některých případech jeho ztráta kompenzována, zůstává otázkou pro budoucí zkoumání. Jako nejslibnější cíl těchto výzkumů se jeví studium role SIRT1 v procesu aktivace embryonálního genomu. Pro tento účel je možné využít i námi popsany myší kondicionální knock-out model.

9 Literatura

Abdalla, H., Yoshizawa, Y., & Hochi, S. (2009). Active Demethylation of Paternal Genome in Mammalian Zygotes. *Journal of Reproduction and Development*, 55(4), 356–360.

Abe, K. ichiro, Funaya, S., Tsukioka, D., Kawamura, M., Suzuki, Y., Suzuki, M. G., Schultz, R. M., & Aoki, F. (2018). Minor zygotic gene activation is essential for mouse preimplantation development. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 115(29), E6780–E6788.

Adamkova, K., Yi, Y. J., Petr, J., Zalmanova, T., Hoskova, K., Jelinkova, P., Moravec, J., Kralickova, M., Sutovsky, M., Sutovsky, P., & Nevoral, J. (2017). SIRT1-dependent modulation of methylation and acetylation of histone H3 on lysine 9 (H3K9) in the zygotic pronuclei improves porcine embryo development. *Journal of Animal Science and Biotechnology*, 8(1), 1–12.

Akiyama, T., Nagata, M., & Aoki, F. (2006). Inadequate histone deacetylation during oocyte meiosis causes aneuploidy and embryo death in mice. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 103(19), 7339–7344.

Alda-Catalinas, C., Bredikhin, D., Hernando-Herraez, I., Santos, F., Kubinyecz, O., Eckersley-Maslin, M. A., Stegle, O., & Reik, W. (2020). A Single-Cell Transcriptomics CRISPR-Activation Screen Identifies Epigenetic Regulators of the Zygotic Genome Activation Program. *Cell Systems*, 11(1), 25-41.e9.

Amodeo, A. A., Jukam, D., Straight, A. F., & Skotheim, J. M. (2015). Histone titration against the genome sets the DNA-to-cytoplasm threshold for the *Xenopus* midblastula transition. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 112(10), E1086-95.

Andreu-Vieyra, C. V, Chen, R., Agno, J. E., Glaser, S., Anastassiadis, K., Stewart, A. F., & Matzuk, M. M. (2010). MLL2 Is Required in Oocytes for Bulk Histone 3 Lysine 4 Trimethylation and Transcriptional Silencing. *PLOS Biology*, 8(8), 1–19.

Aoki, F., Worrad, D. M., & Schultz, R. M. (1997). Regulation of transcriptional activity during the first and second cell cycles in the preimplantation mouse embryo. *Developmental Biology*, 181(2), 296–307.

Baldock, R., Bard, J., Davidson, D., & Morriss-Kay, G. (2015). *Kaufman's Atlas of Mouse Development Supplement: With Coronal Sections*. Elsevier Science & Technology. 9780128009130

Behringer, R., Gertsenstein, M., Vintersten Nagy, K., & Nagy, A. (2014). *Manipulating the Mouse Embryo: A Laboratory Manual* (4th vyd.). Cold Spring Harbor Laboratory Press.

Bell, E. L., Nagamori, I., Williams, E. O., Del Rosario, A. M., Bryson, B. D., Watson, N., White, F. M., Sassone-Corsi, P., & Guarente, L. (2014). SirT1 is required in the male germ cell for differentiation and fecundity in mice. *Development (Cambridge, England)*, 141(18), 3495–3504.

Bianchi, E., & Wright, G. J. (2014). Izumo meets Juno: preventing polyspermy in fertilization. In *Cell cycle (Georgetown, Tex.)* (Roč. 13, Číslo 13, s. 2019–2020).

Bosch-Presegué, L., Raurell-Vila, H., Marazuela-Duque, A., Kane-Goldsmith, N., Valle, A., Oliver, J., Serrano, L., & Vaquero, A. (2011). Stabilization of Suv39H1 by SirT1 is part of oxidative stress response and ensures genome protection. *Molecular Cell*, 42(2), 210–223.

Bouniol-Baly, C., Hamraoui, L., Guibert, J., Beaujean, N., Szöllösi, M. S., & Debey, P. (1999). Differential transcriptional activity associated with chromatin configuration in fully grown mouse germinal vesicle oocytes. *Biology of Reproduction*, 60(3), 580–587.

Brenmoehl, J., & Hoeflich, A. (2013). Dual control of mitochondrial biogenesis by sirtuin 1 and sirtuin 3. *Mitochondrion*, 13(6), 755–761.

Chang, H.-C., & Guarente, L. (2014). SIRT1 and other sirtuins in metabolism. *Trends in Endocrinology and Metabolism: TEM*, 25(3), 138–145.

Chen, J., Melton, C., Suh, N., Oh, J. S., Horner, K., Xie, F., Sette, C., Blelloch, R., & Conti, M. (2011). Genome-wide analysis of translation reveals a critical role for deleted in azoospermia-like (Dazl) at the oocyte-to-zygote transition. *Genes and Development*, 25(7), 755–766.

Cheng, H. L., Mostoslavsky, R., Saito, S., Manis, J. P., Gu, Y., Patel, P., Bronson, R., Appella, E., Alt, F. W., & Chua, K. F. (2003). Developmental defects and p53 hyperacetylation in Sir2 homolog (SIRT1)-deficient mice. *Proceedings of the National*

Academy of Sciences of the United States of America, 100(19), 10794–10799.

Coussens, M., Maresh, J. G., Yanagimachi, R., Maeda, G., & Allsopp, R. (2008). Sirt1 deficiency attenuates spermatogenesis and germ cell function. *PLoS ONE*, 3(2), 1–8.

Dahl, J. A., Jung, I., Aanes, H., Greggains, G. D., Manaf, A., Lerdrup, M., Li, G., Kuan, S., Li, B., Lee, A. Y., Preissl, S., Jermstad, I., Haugen, M. H., Suganthan, R., Bjørås, M., Hansen, K., Dalen, K. T., Fedorcsak, P., Ren, B., & Klungland, A. (2016). Broad histone H3K4me3 domains in mouse oocytes modulate maternal-to-zygotic transition. *Nature*, 537(7621), 548–552.

Di Emidio, G., Falone, S., Vitti, M., D’Alessandro, A. M., Vento, M., Di Pietro, C., Amicarelli, F., & Tatone, C. (2014). SIRT1 signalling protects mouse oocytes against oxidative stress and is deregulated during aging. *Human Reproduction*, 29(9), 2006–2017.

Donlon, T. A., Morris, B. J., Chen, R., Masaki, K. H., Allsopp, R. C., Willcox, D. C., Tiirikainen, M., & Willcox, B. J. (2018). Analysis of polymorphisms in 59 potential candidate genes for association with human longevity. *Journals of Gerontology - Series A Biological Sciences and Medical Sciences*, 73(11), 1459–1464.

Edwards, R. G., & Hansis, C. (2005). Initial differentiation of blastomeres in 4-cell human embryos and its significance for early embryogenesis and implantation. *Reproductive Biomedicine Online*, 11(2), 206–218.

Eppig, J. J. (2001). Oocyte control of ovarian follicular development and function in mammals. *Reproduction*, 122(6), 829–838.

Fouladi-Nashta, A. A., Alberio, R., Kafi, M., Nicholas, B., Campbell, K. H. S., & Webb, R. (2005). Article Differential staining combined with TUNEL labelling to detect apoptosis in preimplantation bovine embryos. *Reproductive BioMedicine Online*, 10(4), 497–502.

Franciosi, F., Lodde, V., Goudet, G., Duchamp, G., Deleuze, S., Douet, C., Tessaro, I., & Luciano, A. M. (2012). Changes in histone H4 acetylation during in vivo versus in vitro maturation of equine oocytes. *Molecular Human Reproduction*, 18(5), 243–252.

Griffin, J., Emery, B. R., Huang, I., Peterson, C. M., & Carrell, D. T. (2006). Comparative analysis of follicle morphology and oocyte diameter in four mammalian species (mouse,

hamster, pig, and human). *Journal of Experimental and Clinical Assisted Reproduction*, 3, 1–9.

Guenatri, M., Bailly, D., Maison, C., & Almouzni, G. (2004). Mouse centric and pericentric satellite repeats form distinct functional heterochromatin. *Journal of Cell Biology*, 166(4), 493–505.

Henikoff, S., & Shilatifard, A. (2011). Histone modification: cause or cog? *Trends in Genetics : TIG*, 27(10), 389–396.

Hontelez, S., van Kruijsbergen, I., Georgiou, G., van Heeringen, S. J., Bogdanovic, O., Lister, R., & Veenstra, G. J. C. (2015). Embryonic transcription is controlled by maternally defined chromatin state. *Nature Communications*, 6, 10148.

Huang, J. C., Yan, L. Y., Lei, Z. L., Miao, Y. L., Shi, L. H., Yang, J. W., Wang, Q., Ouyang, Y. C., Sun, Q. Y., & Chen, D. Y. (2007). Changes in histone acetylation during postovulatory aging of mouse oocyte. *Biology of Reproduction*, 77(4), 666–670.

Huang, J., Ding, C. H., Li, Z. Y., Zhang, X. B., You, Z. S., Zhou, C. Q., & Xu, Y. W. (2017). Epigenetic changes of histone deacetylation in murine oocytes matured in vitro versus in vivo. *European review for medical and pharmacological sciences*, 21(9), 2039–2044.

Huang, Jia, Li, T., Ding, C. H., Brosens, J., Zhou, C. Q., Wang, H. H., & Xu, Y. W. (2012). Insufficient histone-3 lysine-9 deacetylation in human oocytes matured in vitro is associated with aberrant meiosis. *Fertility and Sterility*, 97(1), 178-184.e3.

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

Ivy, J. M., Klar, A. J., & Hicks, J. B. (1986). Cloning and characterization of four SIR genes of *Saccharomyces cerevisiae*. *Molecular and Cellular Biology*, 6(2), 688–702.

Janke, C., & Montagnac, G. (2017). Causes and Consequences of Microtubule Acetylation. *Current Biology*, 27(23), R1287–R1292.

Johnson, S., & Imai, S.-I. (2018). NAD⁺ biosynthesis, aging, and disease [version 1; referees: 2 approved]. *F1000Research*, 7, 1–10.

- Jukam, D., Shariati, S. A. M., & Skotheim, J. M. (2018). *Zygotic genome activation in vertebrates*. *42*(4), 316–332.
- Jung, Y. H., Sauria, M. E. G., Lyu, X., Cheema, M. S., Ausio, J., Taylor, J., & Corces, V. G. (2017). Chromatin States in Mouse Sperm Correlate with Embryonic and Adult Regulatory Landscapes. *Cell Reports*, *18*(6), 1366–1382.
- Kageyama, S., Liu, H., Kaneko, N., Ooga, M., Nagata, M., & Aoki, F. (2007). Alterations in epigenetic modifications during oocyte growth in mice. *Reproduction*, *133*(1), 85–94.
- Kawamura, Y., Uchijima, Y., Horike, N., Tonami, K., Nishiyama, K., Amano, T., Asano, T., Kurihara, Y., & Kurihara, H. (2010). Sirt3 protects in vitro - Fertilized mouse preimplantation embryos against oxidative stress - Induced p53-mediated developmental arrest. *Journal of Clinical Investigation*, *120*(8), 2817–2828.
- Kim, J.-M., Liu, H., Tazaki, M., Nagata, M., & Aoki, F. (2003). Changes in histone acetylation during mouse oocyte meiosis. *The Journal of Cell Biology*, *162*(1), 37–46.
- Kratz, E. M., Kokot, I., Dymicka-Piekarska, V., & Piwowar, A. (2021). Sirtuins—the new important players in women’s gynecological health. *Antioxidants*, *10*(1), 1–29.
- Kruhlak, M. J., Hendzel, M. J., Fischle, W., Bertos, N. R., Hameed, S., Yang, X. J., Verdin, E., & Bazett-Jones, D. P. (2001). Regulation of global acetylation in mitosis through loss of histone acetyltransferases and deacetylases from chromatin. *The Journal of Biological Chemistry*, *276*(41), 38307–38319.
- Kwak, S.-S., Cheong, S.-A., Yoon, J. D., Jeon, Y., & Hyun, S.-H. (2012). 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*(7), 1597–1610.
- Li, Lei, Lu, X., & Dean, J. (2013). Molecular Aspects of Medicine The maternal to zygotic transition in mammals. *Molecular Aspects of Medicine*, *34*(5), 919–938.
- Li, Lin, Yang, X., Hdac, M. Á., & Mechanosensing, Á. S. Á. (2015). Tubulin acetylation : responsible enzymes , biological functions and human diseases. *Cellular and Molecular Life Sciences*, *72*(22), 4237–4255.

- Li, X., Liu, X., Gao, M., Han, L., Qiu, D., Wang, H., Xiong, B., Sun, S.-C., Liu, H., & Gu, L. (2017). HDAC3 promotes meiotic apparatus assembly in mouse oocytes by modulating tubulin acetylation. *Development (Cambridge, England)*, *144*(20), 3789–3797.
- Liang, Q.-X., Lin, Y.-H., Zhang, C.-H., Sun, H.-M., Zhou, L., Schatten, H., Sun, Q.-Y., & Qian, W.-P. (2018). Resveratrol increases resistance of mouse oocytes to postovulatory aging in vivo. *Aging*, *10*(7), 1586–1596.
- Ma, P., & Schultz, R. M. (2013). Histone Deacetylase 2 (HDAC2) Regulates Chromosome Segregation and Kinetochores Function via H4K16 Deacetylation during Oocyte Maturation in Mouse. *PLoS Genetics*, *9*(3).
- Makabe, S., Naguro, T., & Stallone, T. (2006). Oocyte-follicle cell interactions during ovarian follicle development, as seen by high resolution scanning and transmission electron microscopy in humans. *Microscopy Research and Technique*, *69*(6), 436–449.
- McBurney, M. W., Yang, X., Jardine, K., Hixon, M., Boekelheide, K., Webb, J. R., Lansdorp, P. M., & Lemieux, M. (2003). The Mammalian SIR2 α Protein Has a Role in Embryogenesis and Gametogenesis. *Molecular and Cellular Biology*, *23*(1), 38–54.
- Mouchiroud, L., Houtkooper, R. H., Moullan, N., Katsyuba, E., Ryu, D., Cantó, C., Mottis, A., Jo, Y.-S., Viswanathan, M., Schoonjans, K., Guarente, L., & Auwerx, J. (2013). The NAD(+)/Sirtuin Pathway Modulates Longevity through Activation of Mitochondrial UPR and FOXO Signaling. *Cell*, *154*(2), 430–441.
- Mvunta, D. H., Miyamoto, T., Asaka, R., Yamada, Y., Ando, H., Higuchi, S., Ida, K., Kashima, H., & Shiozawa, T. (2017). Overexpression of SIRT1 is Associated With Poor Outcomes in Patients With Ovarian Carcinoma. *Applied Immunohistochemistry & Molecular Morphology: AIMM*, *25*(6), 415–421.
- Nevoral, J., Havrankova, J., Kolinko, Y., Prokesova, S., Fenclova, T., Monsef, L., Zalmanová, T., Petr, J., & Kralickova, M. (2021). Exposure to alternative bisphenols BPS and BPF through breast milk: Noxious heritage effect during nursing associated with idiopathic infertility. *Toxicology and Applied Pharmacology*, *413*(September 2020).
- Nevoral, J., Landsmann, L., Stiavnicka, M., Hosek, P., Moravec, J., Prokesova, S., Rimnacova, H., Koutna, E., Klein, P., Hoskova, K., Zalmanova, T., Fenclova, T., Petr, J., &

- Kralickova, M. (2019). Epigenetic and non-epigenetic mode of SIRT1 action during oocyte meiosis progression. *Journal of Animal Science and Biotechnology*, *10*(1), 1–12.
- Niakan, K. K., Han, J., Pedersen, R. A., Simon, C., & Pera, R. A. R. (2012). Human pre-implantation embryo development. *Development (Cambridge, England)*, *139*(5), 829–841.
- North, B. J., Marshall, B. L., Borra, M. T., Denu, J. M., & Verdin, E. (2003). The human Sir2 ortholog, SIRT2, is an NAD⁺-dependent tubulin deacetylase. *Molecular Cell*, *11*(2), 437–444.
- Oliva, R. (2006). Protamines and male infertility. *Human Reproduction Update*, *12*(4), 417–435.
- Piotrowska-Nitsche, K., Perea-Gomez, A., Haraguchi, S., & Zernicka-Goetz, M. (2005). Four-cell stage mouse blastomeres have different developmental properties. *Development*, *132*(3), 479–490.
- Piprek, R. P., Kloc, M., & Kubiak, J. Z. (2016). Early development of the gonads: Origin and differentiation of the somatic cells of the genital ridges. *Results and Problems in Cell Differentiation*, *58*.
- Reynaud, K., de Lesegno, C. V., Chebrou, M., Thoumire, S., & Chastant-Maillard, S. (2009). Follicle population, cumulus mucification, and oocyte chromatin configuration during the periovulatory period in the female dog. *Theriogenology*, *72*(8), 1120–1131.
- Robbins, A. R., Jablonski, S. A., Yen, T. J., Yoda, K., Robey, R., Bates, S. E., & Sackett, D. L. (2005). Inhibitors of histone deacetylases alter kinetochore assembly by disrupting pericentromeric heterochromatin. *Cell Cycle*, *4*(5), 717–726.
- Saiz, N., & Plusa, B. (2013). Early cell fate decisions in the mouse embryo. *Reproduction*, *145*(3).
- Satoh, A., Brace, C. S., Rensing, N., Cliften, P., Wozniak, D. F., Herzog, E. D., Yamada, K. A., & Imai, S. I. (2013). Sirt1 extends life span and delays aging in mice through the regulation of Nk2 Homeobox 1 in the DMH and LH. *Cell Metabolism*, *18*(3), 416–430.
- Sauve, A. A., & Schramm, V. L. (2003). Sir2 regulation by nicotinamide results from switching between base exchange and deacetylation chemistry. *Biochemistry*, *42*(31), 9249–9256.

Seifert, E. L., Caron, A. Z., Morin, K., Coulombe, J., He, X. H., Jardine, K., Dewar-Darch, D., Boekelheide, K., Harper, M.-E., & McBurney, M. W. (2012). SirT1 catalytic activity is required for male fertility and metabolic homeostasis in mice. *FASEB Journal : Official Publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology*, 26(2), 555–566.

Shi, J., Chen, Q., Li, X., Zheng, X., Zhang, Y., Qiao, J., Tang, F., Tao, Y., Zhou, Q., & Duan, E. (2015). Dynamic transcriptional symmetry-breaking in pre-implantation mammalian embryo development revealed by single-cell RNA-seq. *Development (Cambridge, England)*, 142(20), 3468–3477.

Shirane, A., Wada-Hiraike, O., Tanikawa, M., Seiki, T., Hiraike, H., Miyamoto, Y., Sone, K., Hirano, M., Oishi, H., Oda, K., Kawana, K., Nakagawa, S., Osuga, Y., Fujii, T., Yano, T., Kozuma, S., & Taketani, Y. (2012). Regulation of SIRT1 determines initial step of endometrial receptivity by controlling E-cadherin expression. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 424(3), 604–610.

Taguchi, A., Wada-Hiraike, O., Kawana, K., Koga, K., Yamashita, A., Shirane, A., Urata, Y., Kozuma, S., Osuga, Y., & Fujii, T. (2014). Resveratrol suppresses inflammatory responses in endometrial stromal cells derived from endometriosis: a possible role of the sirtuin 1 pathway. *The Journal of Obstetrics and Gynaecology Research*, 40(3), 770–778.

Tatone, C., di Emidio, G., Barbonetti, A., Carta, G., Luciano, A. M., Falone, S., & Amicarelli, F. (2018). Sirtuins in gamete biology and reproductive physiology: Emerging roles and therapeutic potential in female and male infertility. *Human Reproduction Update*, 24(3), 267–289.

Tatone, C., Di Emidio, G., Vitti, M., Di Carlo, M., Santini, S., D'Alessandro, A. M., Falone, S., & Amicarelli, F. (2015). Sirtuin Functions in Female Fertility: Possible Role in Oxidative Stress and Aging. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*, 2015.

Tian, X., Firsanov, D., Zhang, Z., Cheng, Y., Luo, L., Tomblin, G., Tan, R., Simon, M., Henderson, S., Steffan, J., Goldfarb, A., Tam, J., Zheng, K., Cornwell, A., Johnson, A., Yang, J. N., Mao, Z., Manta, B., Dang, W., ... Gorbunova, V. (2019). SIRT6 Is Responsible for More Efficient DNA Double-Strand Break Repair in Long-Lived Species. *Cell*, 177(3), 622–638.e22.

- Tsichlaki, E., & FitzHarris, G. (2016). Nucleus downscaling in mouse embryos is regulated by cooperative developmental and geometric programs. *Scientific Reports*, 6, 28040.
- Valerio, D., Luddi, A., De Leo, V., Labella, D., Longobardi, S., & Piomboni, P. (2018). SA1/SA2 cohesion proteins and SIRT1-NAD⁺ deacetylase modulate telomere homeostasis in cumulus cells and are eligible biomarkers of ovarian aging. *Human Reproduction (Oxford, England)*, 33(5), 887–894.
- Vaquero, A., Sternglanz, R., & Reinberg, D. (2007). NAD⁺-dependent deacetylation of H4 lysine 16 by class III HDACs. *Oncogene*, 26(37), 5505–5520.
- Vaquero, Alejandro. (2009). The conserved role of sirtuins in chromatin regulation. *International Journal of Developmental Biology*, 53(2–3), 303–322.
- Vaquero, Alejandro, Scher, M., Erdjument-Bromage, H., Tempst, P., Serrano, L., & Reinberg, D. (2007). SIRT1 regulates the histone methyl-transferase SUV39H1 during heterochromatin formation. *Nature*, 450(7168), 440–444.
- Vaquero Alejandro, Scher, M., Lee, D., Erdjument-Bromage, H., Tempst, P., & Reinberg, D. (2004). Human SirT1 interacts with histone H1 and promotes formation of facultative heterochromatin. *Molecular Cell*, 16(1), 93–105.
- Vassena, R., Boué, S., González-Roca, E., Aran, B., Auer, H., Veiga, A., & Izpisua Belmonte, J. C. (2011). Waves of early transcriptional activation and pluripotency program initiation during human preimplantation development. *Development (Cambridge, England)*, 138(17), 3699–3709.
- Vastenhouw, N. L., Cao, W. X., & Lipshitz, H. D. (2019). The maternal-to-zygotic transition revisited. *Development*, 146(11).
- Vazquez, B. N., Vaquero, A., & Schindler, K. (2020). Sirtuins in female meiosis and in reproductive longevity. *Molecular Reproduction and Development*, 87(12), 1175–1187.
- Wang, H. Y., Jo, Y. J., Oh, J. S., & Kim, N. H. (2017). Quercetin delays postovulatory aging of mouse oocytes by regulating SIRT expression and MPF activity. *Oncotarget*, 8(24), 38631–38641.
- Wassarman, P. M., & Kinloch, R. A. (1992). Gene expression during oogenesis in mice.

Mutation Research, 296(1–2), 3–15.

White, M. D., Angiolini, J. F., Alvarez, Y. D., Kaur, G., Zhao, Z. W., Mocskos, E., Bruno, L., Bissiere, S., Levi, V., & Plachta, N. (2016). Long-Lived Binding of Sox2 to DNA Predicts Cell Fate in the Four-Cell Mouse Embryo. *Cell*, 165(1), 75–87.

Xing, X., Zhang, J., Wu, T., Zhang, J., Wang, Y., Su, J., & Zhang, Y. (2021). SIRT1 reduces epigenetic and non-epigenetic changes to maintain the quality of postovulatory aged oocytes in mice. *Experimental Cell Research*, 399(2), 112421.

Xiong, L., Ye, X., Chen, Z., Fu, H., Li, S., Xu, P., Yu, J., Wen, L., Gao, R., Fu, Y., Qi, H., Kilby, M. D., Saffery, R., Baker, P. N., & Tong, C. (2021). Advanced Maternal Age-associated SIRT1 Deficiency Compromises Trophoblast Epithelial-Mesenchymal Transition through an Increase in Vimentin Acetylation. *Aging Cell*, 20(10), e13491.

Yang, Q., Dai, S., Luo, X., Zhu, J., Li, F., Liu, J., Yao, G., & Sun, Y. (2018). Melatonin attenuates postovulatory oocyte dysfunction by regulating SIRT1 expression. *Reproduction*, 156(1), 81–92.

Yeste, M., Jones, C., Amdani, S. N., & Coward, K. (2017). Oocyte activation and fertilisation: Crucial contributors from the sperm and oocyte. *Results and Problems in Cell Differentiation*, 59, 213–239.

Zentner, G. E., & Henikoff, S. (2013). Regulation of nucleosome dynamics by histone modifications. *Nature Structural & Molecular Biology*, 20(3), 259–266.

Zhang, K., Lu, Y., Jiang, C., Liu, W., Shu, J., Chen, X., Shi, Y., Wang, E., Wang, L., Hu, Q., Dai, Y., & Xiong, B. (2017). HDAC8 functions in spindle assembly during mouse oocyte meiosis. *Oncotarget*, 8(12), 20092–20102.

Zhang, T., Zhou, Y., Li, L., Wang, H.-H., Ma, X.-S., Qian, W.-P., Shen, W., Schatten, H., & Sun, Q.-Y. (2016). SIRT1, 2, 3 protect mouse oocytes from postovulatory aging. *Aging*, 8(4), 685–696.

Zhang, X., Liu, X., Chen, L., Wu, D. Y., Nie, Z. W., Gao, Y. Y., & Miao, Y. L. (2017). Caffeine delays oocyte aging and maintains the quality of aged oocytes safely in mouse. *Oncotarget*, 8(13), 20602–20611.

Zhao, H. C., Ding, T., Ren, Y., Li, T. J., Li, R., Fan, Y., Yan, J., Zhao, Y., Li, M., Yu, Y., & Qiao, J. (2016). Role of Sirt3 in mitochondrial biogenesis and developmental competence of human in vitro matured oocytes. *Human Reproduction*, 31(3), 607–622.