

Univerzita Karlova v Praze

Přírodovědecká fakulta

Katedra buněčné a vývojové biologie

Studijní program: Biologie

Studijní obor: Buněčná a vývojová biologie



Bc. Aleš Petelák

Vliv ubiquitinace spermií v rámci časného embryonálního vývoje u prasete

Effect of the sperm ubiquitination in the early embryonic development in pig

Diplomová práce

Vedoucí diplomové práce: RNDr. Ing. Vladimír Krylov Ph.D.

Praha, 2011

Prohlašuji, že jsem diplomovou práci zpracoval samostatně a že jsem uvedl všechny použité informační zdroje a literaturu.

V Praze, 26. 8. 2011

Aleš Petelák

Chtěl bych poděkovat mému školiteli Ing. RNDr. Vladimíru Krylovovi, PhD. za skvělou spolupráci nejen během této diplomové práce, ale během celého mého studia. Děkuji také mé kolegyni Ireně Barnetové za pomoc a spoustu cenných rad. Rád bych poděkoval celé mé rodině za jejich podporu a pochopení.

Abstrakt

Metoda intracelulární injekce spermie je velmi efektivním nástrojem pro výzkum oplození. Po vytvoření nové laboratoře na půdě PřF UK bylo nutné nejdříve tuto metodu zavést a charakterizovat časný embryonální vývoj oplozených oocytů. Oocyty byly po oplození kultivovány do stadia blastocysty s úspěšností srovnatelnou s jinými laboratořemi (17%).

Ubiquitin-proteazomální systém, který v buňce zajišťuje degradaci proteinů, se účastní regulace maturace a selekce spermií a je nezbytný pro penetraci vitelinní membrány. V těchto dějích je jeho funkce lokalizována extracelulárně. U spermií míra ubiquitinace koreluje s jejich kvalitou. Hypoteticky lze tedy předpokládat, že ubiquitinace nekvalitních spermií slouží jako negativní marker pro jejich rozpoznání a degradaci oocytárním 26S proteazomálním komplexem. Experimenty byly plánovány na základě předpokladu, že výkonnou částí selekčního mechanismu je 26S proteazom a z tohoto důvodu byl sledován vliv inhibice 20S proteazomu, pomocí peptidu MG132, na formování prvojader a následný časný embryonální vývoj po ICSI.

Z pohledu zahájení dekondezace spermie se neprojevil žádný účinek inhibice. Signifikantní rozdíl byl pozorován ve formování prvojader. U skupiny s MG132 docházelo k tvorbě prvojader jen v malém počtu případů (17%, 9%), oproti skupině bez inhibitoru (58% a 71%). U skupiny inkubované (do 18. hodiny po oplození) s MG132 vykazoval časný embryonální vývoj do stadia blastocysty zlepšení o 13% ($p=0,099$) oproti skupině, která byla inkubována bez něj. Tento výsledek naznačuje, že inhibice 26S proteazomálního komplexu v období tvorby prvojader by mohla být příčinou toho, že i méně kvalitní, povrchově ubiquitinované spermie nejsou tímto komplexem rozpoznány a jsou tudíž schopny se podílet na vzniku životaschopných embryí minimálně do stadia blastocysty.

Klíčová slova

Prase domácí, ubiquitin, proteazomální komplex, MG132, ICSI, úspěšnost oplození, časný embryonální vývoj

Abstract

The intracellular sperm injection (ICSI) technique is a very effective tool for the fertilization research. In the newly established laboratory at the Faculty of Science of the Charles University it was necessary to introduce this method and define the early developmental potential of fertilized oocytes. After fertilization oocytes were incubated to the blastocyst stage with a success comparable with other laboratories (17%).

The ubiquitin-proteasome system which plays a major role in a protein degradation within cells is involved in a regulatory mechanism of sperm maturation. It is also responsible for a penetration of a vitelline membrane. In these processes ubiquitin residues are localized extracellularly. High level of sperm ubiquitination correlates with their low quality. Hypotetically it can be expected that the ubiquitination of impaired sperm cells can be used as a negative marker for their recognition and degradation by 26S proteasome complex localized. Experiments in this diploma thesis were designed based on the hypothesis that the executive part of the selective mechanism is the 26S proteasome. Therefore the effect of MG132 peptide inhibition of the 20S proteasome on the pronuclei formation and subsequent early embryonic development after ICSI was studied.

Inhibition of 20S proteasome had no significant effect on initiation of sperm decondensation. On the other hand, significant difference was observed during formation of pronuclei. In the presence of pronuclei were formed only in 17% and 9% respectively if compared with fertilized oocytes cultivated in a medium without MG132 (58%, 71%). The early embryonic development to the blastocyst stage was improved about 13% ($p=0,099$) in fertilized oocytes incubated with MG132 for the first 18 hours after fertilization in comparison to the control group. This result suggests that the inhibition of 26S proteasome complex during the period of pronuclei formation could be the reason why even low quality, surface ubiquitinated sperms are not recognized by this complex and therefore able to participate on the formation of viable embryos at least to the blastocyst stage.

Keywords

Domestic pig, ubiquitin, proteasomal complex, MG132, ICSI, fertilization success, early embryonic development

Obsah

Abstrakt	4
Klíčová slova	4
Abstract	5
Keywords	5
Obsah	6
Seznam zkratek	9
1 Úvod	10
2 Literární přehled	11
2.1 Ubiquitin-proteazomální systém	11
2.1.1 Ubiquitin	11
2.1.1.1 Struktura a funkce	11
2.1.1.2 SUMO a Nedd8	12
2.1.2 Vazba ubiquitin-substrát	12
2.1.3 Proteazomální komplex	14
2.1.3.1 20S proteazom	14
2.1.3.2 19S proteazom	15
2.1.3.3 Alternativní regulační podjednotky proteazomálního komplexu	16
2.1.4 Receptory pro ubiquitin	17
2.2 Extracelulární ubiquitin	17
2.3 Ubiquitinace spermií během dozrávání v epididymis	18
2.3.1 Sperm-ubiquitin tag immunoassay	19
2.4 Akrozomální reakce	20
2.5 Zona pellucida	21
2.5.1 Extracelulární ubiquitinace oocyty	22
2.5.2 Penetrace zony pellucidy	22
2.5.3 Proteazomální komplex jako digestivní enzym ZPP	23
2.6 Průchod přes kumulární buňky a extracelulární matrix	24
2.6.1 Kumulární buňky (Cumulus oophorus)	24
2.6.2 Extracelulární matrix oocyty	24
2.7 Oplození	25
2.7.1 Maturace oocyty	25

2.7.2	Kapacitace spermií	26
2.7.3	Fúze pohlavních buněk	26
2.7.4	Aktivace oocyty	27
2.7.5	Dekondenzace spermie	27
2.7.6	Formování prvojader	28
2.8	ART (Assisted reproductive technology)	28
2.8.1	Metoda ICSI	29
2.8.1.1	Přínosy a komplikace	29
2.8.1.2	Penetrace plazmatické membrány spermie	30
2.8.1.3	Vliv injekčního média	30
2.8.1.4	Děje po oplození pomocí ICSI	31
2.8.1.5	Umělá aktivace	31
2.9	Inhibitory proteazomálního komplexu	32
3 Cíle práce		33
4 Materiál a metody		34
4.1	Chemikálie	34
4.2	Složení roztoků	35
4.3	Přístrojové vybavení	36
4.4	Metody	37
4.4.1	Izolace oocytů	37
4.4.1.1	Aspirační metoda	37
4.4.1.2	Disekční metoda	37
4.4.2	Maturace oocytů	38
4.4.3	Odstranění kumulárních buněk	38
4.4.4	Příprava spermií	38
4.4.5	Příprava kapilár a mikromanipulátoru pro ICSI	39
4.4.6	ICSI	39
4.4.7	Kultivace po oplození metodou ICSI	41
4.4.8	Inkubace s inhibítozem proteazomálního komplexu MG132	41
4.4.8.1	Vliv MG 132 na dekonzenzaci spermie a tvorbu prvojader	41
4.4.8.2	Časný embryonální vývoj po odstranění inhibítozu MG132	41
4.4.8.3	Odložené přidání inhibítozu	41
4.4.9	IVF	42
4.4.10	Samovolný partenogenetický vývoj	42
4.4.11	Fixace a barvení	42

4.4.11.1	Fixace roztokem formaldehydu	42
4.4.11.2	Montování do média s DAPI	42
4.4.11.3	Vizualizace extracelulárního Ub na spermiích	42
5	Výsledky	44
5.1	Ustanovení metody ICSI v nové laboratoři	44
5.1.1	Maturace oocytů	44
5.1.2	Vývoj po ICSI	45
5.1.2.1	Partenogenetický vývoj	45
5.1.2.2	Časové rozložení metody ICSI	46
5.2	Vliv inhibitoru MG132 na časný embryonální vývoj	46
5.2.1	Ověření funkčnosti inhibitoru	46
5.2.2	Rozpoznání spermií oocytem po ICSI	47
5.2.3	Tvorba prvojadra a vývoj embrya	48
5.2.4	Časný embryonální vývoj po zrušení inhibice UPS	49
5.2.5	Odložené přidání inhibitoru	50
6	Diskuze	51
6.1	Zavedení metody ICSI	51
6.2	Vliv inhibitoru MG132	52
7	Závěry	55
8	Seznam literatury	56

Seznam zkratek

AR	Akrozomální reakce
ATP	Adenosintrifosfát
DUB's	Deubiquitinační enzymy
E1	Ubiquitin-aktivující enzym
E2	Ubiquitin-konjugační enzym
E3	Ubiquitin ligáza
ECM	Extracelulární matrix
HA	Hyaluronová kyselina
IAM	Vnitřní akrozomální membrána (Inner acrozomal membrane)
ICSI	Intracelulární injekce spermie
IVF	Oplození <i>in vitro</i> (<i>In vitro</i> fertilization)
K	Lysin
MII	Metafáze II
OAM	Vnější akrozomální membrána (Outer acrozomal membrane)
PB	Pólové tělísko
PLC ζ	Fosfolipáza C ζ (zéta)
SOAF	Aktivační faktor spermie (Sperm oocyte activating factor)
Ub	Ubiquitin
VC	Vitelinní membrána (Viteline coat)
ZP	Zona pellucida
ZPP	Proteiny zony pellucidy

1 Úvod

Časný embryonální vývoj tvoří jednu z nejméně prostudovaných oblastí ve vývoji živočichů. Děje, které v tomto stádiu probíhají, jsou přitom možná ty nejdůležitější a nejkomplicovanější v celém vývoji daného jedince. Do současné doby nebyl popsán ani mechanismus, jakým dochází ke splynutí gamet a průchod spermie přes obaly oocyty byl popsán teprve nedávno. Za penetrací spermie přes vitelinní obal nebo zonu pellucidu je odpovědný systém, který je ve většině případů sledován pouze intracelulárně, tím je ubiquitin-proteazomální systém. Působení tohoto systému nebo alespoň jeho složek vně buněk je předmětem mnoha výzkumů a jsou objevovány jeho nové role. Jedním z nich by mohl být i selektivní systém v oocyty, který by mohl regulovat úspěšnost oplození.

Pro výzkum těchto aspektů je prase domácí (*Sus scrofa f. domestica*) velmi vhodným modelem. Důvodem je hlavně metabolická a velikostní blízkost k člověku, která umožňuje částečnou extrapolaci výsledků na lidský model.

Metoda intracelulární injekce spermie navíc umožňuje takový design pokusů, který není jinými metodami proveditelný. Právě sledování možné interakce mezi ubiquitin-proteazomálním komplexem oocyty a extracelulárním ubiquitinem na spermii je takovým případem, který je možné efektivně zkoumat jen díky vnesení spermie přímo do ooplazmy.

Často zmiňovaným problémem u intracelulární injekce spermie, zvláště pak v humánní medicíně, je obejití selekce a konkurence spermii, které probíhají během přirozeného oplození. Je pravda, že při této metodě danou spermii určenou pro oplození vybírá embryolog, ale není ještě zcela jasné, jak velkou úlohu tento výběr může hrát. Díky syncytiálnímu vývoji spermie a malému počtu v ní exprimovaných genů, je možnost vzniku rozdílů mezi jednotlivými spermii relativně malá a vzniká spíše na základě poškození dědičné informace. Právě tyto aspekty jsou rozhodující pro selekci spermie v nadvarleti a možná i na míře extracelulárního ubiquitinu. Není však jisté, jestli tento faktor hraje roli po vstupu spermie do oocyty nebo zde žádná interakce neprobíhá.

2 Literární přehled

2.1 Ubiquitin-proteazomální systém

2.1.1 Ubiquitin

Protein ubiquitin (Ub), jak již sám jeho název napovídá (z ang. ubiquitously: všudypřítomný), je součástí všech eukaryotických buněk. Tento malý protein v nich plní řadu funkcí a patrně ne všechny jsou v současné době známé. Navíc je ubiquitin v některých tkáních a na buňkách přítomen i extracelulárně, kde jeho úloha také není vždy zcela objasněna.

2.1.1.1 Struktura a funkce

Ubiquitin je 8,5Kda velký protein a je syntetizován ze 76 aminokyselin. Vývojově je jeho sekvence velmi konzervovaná. Sedmkrát se v sekvenci objevuje zbytek lysinu (K6, K11, K27, K29, K33, K48 a K63), pomocí kterého se mohou tvořit polyubiquitinové řetězce, přičemž přes stejný aminokyselinový zbytek se také váže na svůj substrát. Jedná se o reverzibilní kovalentní vazbu mezi C-koncem Ub a postranním řetězcem lysinového zbytku. Další molekuly Ub se sice mohou vázat přes kterékoli z uvedených míst v řetězci, ale většinou se váží přes K48 v případě, že molekula, kterou vznikající řetězec má označit, je určená pro degradaci pomocí 26S proteazomu. K navázání přes K63 dojde u substrátů směřovaných do lysozomu. Díky této variabilitě míst pro připojení dalších molekul Ub může docházet ke tvorbě specifických homotypických (při vazbě na stejnou pozici) nebo mixovaných (při vazbě na jiný lysinový zbytek v sekvenci) řetězců, které mohou zaujímat odlišné konformace a být různě rozpoznávány (shrnutí Woelk et al. 2007).

Značení proteinů určených k degradaci je hlavní a nejčastěji zmiňovanou funkcí Ub. Posttranslačně je pomocí polyubiquitinového řetězce modifikováno více než 80% proteinů určených k degradaci (shrnutí Lee a Goldberg 1998). Nejde však pouze o degradaci poškozených nebo špatně složených proteinů. Díky ovlivňování doby životnosti transkripčních a růstových faktorů či proteinů řídících buněčný cyklus hraje značení pomocí Ub esenciální roli v téměř všech buněčných procesech. Ub je však zapojen v řadě dalších dějů, kde jeho funkce nesouvisí s proteolýzou. Může určovat adresaci proteinů do jednotlivých buněčných kompartmentů včetně exozomů (Buschow et al. 2005), reguluje endocytózu a internalizaci receptorů, opravy DNA (shrnutí Pickart 2001, shrnutí Hershko a Ciechanover 1998), upravuje a svým navázáním přímo reguluje funkci řady proteinů

(Wang et al. 2001) nebo aktivuje signální dráhy. Zde navíc může polyubiquitinový řetězec působit i bez kovalentní vazby díky přítomnosti ubiquitin-vázající domény (UBD) na daném proteinu (shrnutí Hicke et al. 2005, Xia et al. 2009, French et al. 2005).

Rozptyl a počet možných důsledků regulace pomocí připojení Ub nebo jeho následného odštěpení pomocí deubiquitinačních enzymů (DUB's) se, podle některých studií, pomalu přibližuje úrovni, kterou v buněčné regulaci zaujímá úprava pomocí fosforylace a defosforylace proteinů kinázami a fosfatázami (shrnutí Thompson et al. 2008).

2.1.1.2 SUMO a Nedd8

Mimo značení Ub existuje ještě velmi podobný mechanismus posttranslačních modifikací pomocí Ubiquitin-like modulátorů (ULM's). Mezi dva nejběžnější zástupce patří SUMO (small ubiquitin-related modifier) a Nedd8 (neural precursor cell expressed developmentally downregulated-8). Tyto proteiny vykazují velmi podobnou prostorovou topologii s Ub, a to i přesto, že například Sumo-1 je sekvenčně homologní s Ub pouze z 18%. Také se váží na stejné místo substrátu (lysinový zbytek). Některé z proteinů SUMO mohou také tvořit na substrátu řetězce, což je případ proteinu Sumo2/3. Také jejich aktivační a konjugační enzymy vykazují značnou podobnost s E1 a E2 enzymy, které se účastní vazby Ub na substrát (shrnutí Thompson et al. 2008).

V poslední době se zkoumá vliv sumoylace na vývoj spermií a výsledky ukazují, že tato modifikace proteinů je zapojena i do regulace mnoha procesů v rámci spermatogeneze. Proteiny SUMO byly detekovány v jádře spermatogonií a předpokládá se jejich účast na regulaci meiózy, umlčování genů či asociace s DNA poškozením (shrnutí Vigodner 2011).

2.1.2 Vazba ubiquitin-substrát

Navázání Ub je zprostředkováno kaskádou tří reakcí. Prvním krokem je aktivace molekuly Ub navázáním přes její C-konec na ubiquitin-aktivující enzym (E1). K tomuto kroku je nezbytná energie z adenosintrifosfátu (ATP), která umožní vytvoření thioesterové vazby mezi enzymem a Ub. Poté se může Ub navázat na ubiquitin-konjugační enzym (E2). E2 je během toho již většinou vázán k ubiquitin ligáze (E3), která zajišťuje vlastní přenos na -amino skupinu lysinového zbytku substrátu nebo předchozí molekulu Ub v řetězci.

Největší podíl na řízení ubiquitin-proteazomálního komplexu (UPS) mají kroky regulující funkci E3 ligáz. UPS je často ovlivňován extracelulárními stimuly a je potřeba, aby celý systém reagoval s co nejmenším zpožděním a největší možnou specifitou. Tyto regulace většinou vedou ke stimulaci či inhibici E3 nebo k ovlivnění možnosti rozpoznání substrátu.

Činnost E3 mohou měnit interakce s dalšími proteiny, či jejich podjednotkami. Pomocné proteiny zde mohou pomáhat v rozpoznání substrátu jako adaptorové proteiny, například v případě adaptoru Smad7, který váže jak E3 ligázu Smurf2 tak TGF- β receptor (Izzi a Attisano 2004). Podobnou funkci mají některé proteiny v případě interakcí E2 a E3, když zajišťují jejich přiblížení, i zde lze jako příklad uvést dvojici Smurf2 E3 ligázu s adaptorem Smad7, který se angažuje i v její interakci s E2 UbcH7 (Ogunjimi et al. 2005). Efekt proteinů ovlivňujících UPS nemusí být vždy stimulační a některé proteiny mohou působit jako účinné inhibitory značení substrátu pomocí E3. To je mechanismus, který v buňkách například stabilizuje i velmi dobře prozkoumaný tumor supresorový protein p53, díky inhibici jeho E3 ligázy Mdm2 (Chen et al. 2005).

Samotný enzym E3 může být také modifikován pomocí specifických fosforylací a i zde je variabilita možností velmi široká. Činnost některých E3 ligáz je pomocí fosforylace aktivována a u jiných má inhibiční účinky, přičemž tento způsob regulace se vyskytuje i u mnoha dalších součástí UPS (shrnutí Gao a Karin 2005).

E3 ligázy jsou ovlivněny i ubiquitinací a autoubiquitinací. Základní mechanismus zde tvoří regulace množství dané E3 ligázy v buňce. Jak jsem již uvedl výše, rozpoznávání proteinů ubiquitin-proteazomálním systémem je nejběžnějším způsobem degradace v buňce a pochopitelně se vztahuje i na vlastní jeho složky. U E3 ligáz se objevuje i značení pomocí Ub tohoto enzymu samotného. Ubiquitinací může však být i činnost dané E3 ligázy podmíněna, jako je tomu u E3 ligázy Ring1B rozpoznávající značené histony. Tento enzym pro svou správnou funkci musí být monoubiquitinován, což se děje patrně autoubiquitinací (Ben-Saadon et al. 2006).

Všechny tyto typy regulací mohou probíhat specificky pouze v daných kompartmentech buňky a tato lokalizace sama o sobě tvoří další úroveň v řízení UPS.

Fungování této dráhy je evolučně konzervované, ale vzhledem k tomu, že musí postihnout obrovské množství různých substrátů, má zvláště v posledním kroku velmi široké spektrum enzymů a regulací. Obecně se dá říci, že u jednotlivých eukaryot roste variabilita potřebných enzymů v každém následném kroku. Proteomická analýza eukaryotických buněk odhalila počet různých enzymů E1 počítatelný v jednotkách, E2 v desítkách a E3 ve stovkách variant (Semple 2003). Možnosti vzájemných interakcí u takto velkého počtu enzymů dovolují velmi komplexní řízení ubiquitin-proteazomálního systému.

Pro označení proteinu k degradaci je většinou použit polyubiquitinový řetězec o minimální délce 4 molekul (Thrower et al. 2000). V některých drahách stačí k označení proteinu i jediná molekula Ub, tento případ nastává převážně u transmembránových proteinů, kde i toto minimální značení může být dostatečné pro spuštění endocytózy a

internalizaci proteinu (shrnutu Hicke a Dunn 2003, shrnutu Mukhopadhyay a Riezman 2007).

Označení proteinu může proběhnout až po aktivaci degradačního signálu na substrátu, což je další klíčová oblast pro regulaci UPS. K tomu může obecně docházet díky fosforylaci substrátu specifickou kinázou, odstraněním proteinu, který je vázán na místě degradačního signálu, nebo odštěpením části substrátu, čímž dojde k odhalení destabilizačního N-konce.

2.1.3 Proteazomální komplex

Vlastní degradace proteinů značených Ub probíhá ve 26S proteazomálním komplexu, který se vyskytuje v nejhojnější míře v cytoplazmě, kde může být volně nebo asociovaný s různými kompartmenty (mikrotubuly, endoplazmatické retikulum). Dále je již popsána jeho aktivita v nukleoplazmě (shrnutu Wojcik a DeMartino 2003, shrnutu von Mikecz 2006). 26S proteazomální komplex se skládá z proteolytického 20S jádra se soudkovitým tvarem a dvou 19S regulačních podjednotek, které jsou asociovány na jeho koncích.

Proteazomální komplex se díky svému majoritnímu podílu na obratu proteinů v buňce nepřímo účastní řízení všech buněčných dějů.

2.1.3.1 20S proteazom

Jádro 20S proteazomu je složeno z α podjednotek (α 1-7) a β podjednotek (β 1-7), které jsou uspořádány do čtyř na sobě ležících kruhů okolo středového póru, kde α tvoří dva vnější a β dva vnitřní kruhy. Vnitřní kruhy tvořené β podjednotkami mají proteolytickou aktivitu. Té je dosaženo díky hydroxylové skupině terminálního threoninu β podjednotek, která umožňuje nukleofilní atak řetězce substrátu. K proteolýze dochází pouze uvnitř póru a vstup je regulován jak vnějšími kruhy z α podjednotek, tak 19S proteazomy nebo jinými regulačními podjednotkami.

K základním proteolytickým aktivitám 20S proteazomu dochází na třech koncích různých β podjednotek, tato místa se nazývají podle enzymů, jejichž funkci připomínají, chymotrypsinové, trypsinové a post-glutamyl-peptid hydrolázové (shrnutu Myung et al. 2001). Substrát je zde pomocí těchto aktivit rozštěpen na peptidy o délce až 25 aminokyselinových zbytků, jež jsou následně uvolněny do cytoplazmy a rozštěpeny pomocí endopeptidáz.

Existují i varianty 20S proteazomu, tzv. imunoproteazomy, kde jsou tři z β podjednotek nahrazeny podjednotkami, jejichž exprese a inkorporace do proteazomálního

komplexu je indukována pomocí interferonů (shrnutí Kloetzel a Ossendorp 2004). Všechny tyto tři alternativní podjednotky imunoproteazomu byly rovněž nalezeny v kančích spermích (Sutovsky et al. 2004b).

Na obou koncích 20S proteazomu bývají většinou asociované regulační podjednotky, ale v některých případech se 20S proteazom může vyskytovat i samostatně bez připojených regulačních proteazomálních čepiček (Wiggins et al. 2011).

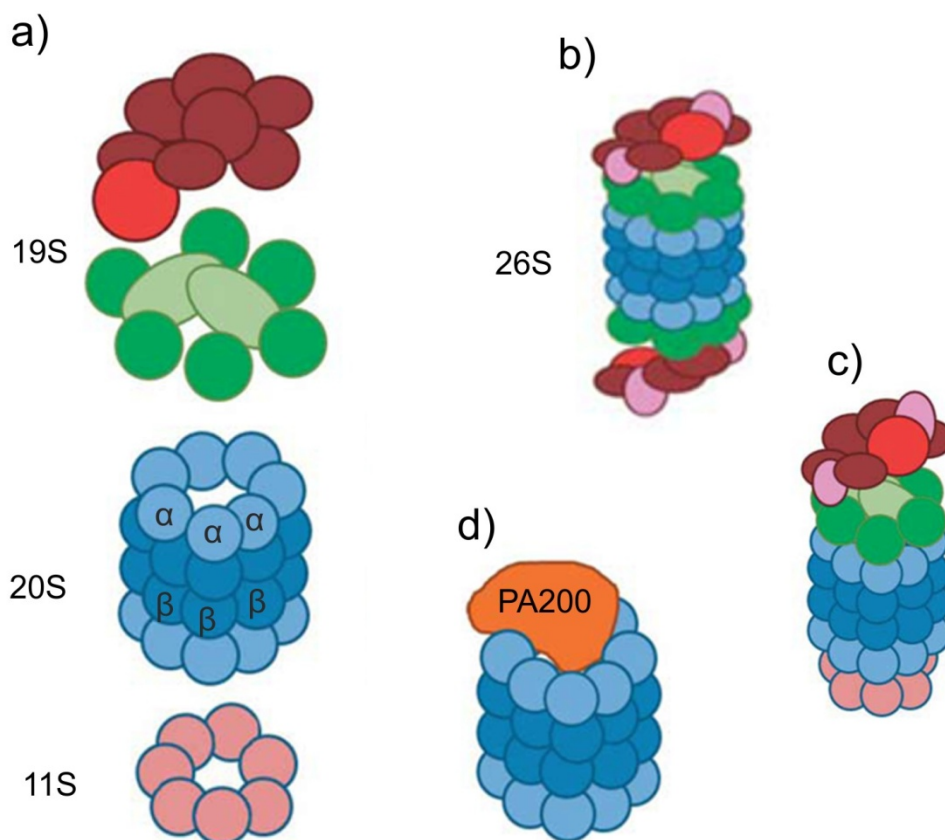
2.1.3.2 19S proteazom

Proteazomální komplex je regulován primárně dvěma 19S proteazomy, které se nacházejí na obou koncích póru v 20S proteazomu. Každý 19S proteazom je tvořen 19 podjednotkami, které zajišťují vazbu na 20S proteazom.

Šest z podjednotek vykazuje ATPázovou aktivitu, přičemž energie z hydrolyzy ATP umožňuje hlavně rozbalení proteinu určeného k degradaci. Navázání ATP je zde však nezbytné a ovlivňuje další procesy, hlavně složení a stabilizaci proteazomálního komplexu a jeho aktivaci. V tomto případě však není vyžadována hydrolyza ATP, ale pouze jeho přítomnost (Liu et al. 2006).

Hlavní funkcí 19S proteazomu je specifická vazba substrátu určeného k degradaci, jeho rozbalení a umožnění translokace tohoto proteinu do katalytického jádra 20S proteazomu, k čemuž dochází díky uvolnění sterické zábrany v ústí póru. Dochází zde také k odštěpení polyubiquitinového řetězce od substrátu. Tuto aktivitu vykazují některé podjednotky 19S proteazomu nebo ji zajišťují deubiquitinační enzymy, které s 19S proteazomem asociují. Po odštěpení je ubiquitin depolymerizován a může se zapojit do značení dalších proteinů.

Vzhledem k tomu, jak evolučně konzervovaný je ubiquitin-proteazomální systém a kolik komplexních regulačních drah obsahuje, není ani příliš překvapivé, že se jeho různé složky účastní i mnoha dějů a drah, které s proteolýzou vůbec nesouvisí. 19S proteazom je dokonce podle některých výzkumů schopný hrát úplně opačnou roli a přímo se vázat na chromatin a ovlivňovat transkripci. Tato regulace je umožněna pomocí aktivace chromatin-modelujících komplexů nebo adaptorovou funkcí 19S proteazomu pro jejich připojení v součinnosti s ubiquitinovým receptorem Rad23 (shrnutí Wade a Auble 2010). Histony v chromatinu jsou posttranslačně modifikovány pomocí Ub na jejich N-konci a tato úprava může regulovat metylaci a tím i transkripci a umlčování genů (Sun a Allis 2002).



Obrázek 1: Znázornění jednotlivých částí a možných kombinací stavby proteazomu. (a) jednotlivé proteazomální podjednotky, 19S proteazom (base a lid), 20S katalytické jádro a alternativní regulační podjednotka 11S, (b) složený 26S proteazom, (c) hybridní proteazom s různými regulačními podjednotkami, (d) 20S katalytické jádro s regulační podjednotkou PA200 (převzato Sutovsky 2011, upraveno).

2.1.3.3 Alternativní regulační podjednotky proteazomálního komplexu

Kromě nejběžnější regulační podjednotky proteazomálního komplexu 19S proteazomu se mohou vyskytovat i další varianty jako 11S proteazom (PA28) a regulační podjednotka PA200. Katalytické jádro 20S proteazomu může tvořit hybridní proteazomální komplexy jak se dvěma 11S proteazomy, tak s dvěma podjednotkami PA200. Tyto proteazomální komplexy jsou poté schopny degradovat i proteiny, které nejsou označeny Ub. Tento mechanismus a děje vedoucí k jeho aktivaci však nejsou zatím příliš prostudovány (shrnuto Sutovsky 2011).

2.1.4 Receptory pro ubiquitin

Ubiquitinované proteiny jsou proteazomálním komplexem rozpoznávány díky třem hlavním třídám receptorů (shrnutí Fu et al. 2010). První třídou jsou receptory v rámci struktury 26S proteazomálního komplexu, které jsou schopné přímo rozpoznávat ubiquitinované proteiny a většinou jsou součástí 19S proteazomu. Druhou třídou jsou kyvadlové přenašeče obsahující UBL (ubiquitin-like domain). Tyto receptory jsou schopné specificky vázat ubiquitinovaný substrát a 26S proteazom zároveň a zprostředkovávat tak jejich vzájemnou interakci. Třetí třída je možno charakterizovat jako komplexy založené na Cdc48, které se angažují hlavně při rozpoznávání substrátu na proteazomálních komplexech asociovaných s endoplazmatickým retikulem (systém ERAD), ale mohou interagovat i s cytoplazmatickými proteazomálními komplexy.

Poslední výzkumy ukazují, že i rozpoznání proteinů značených Ub může být regulováno pomocí dalších faktorů a jednotlivé receptory mohou mít různou specifitu k různým ubiquitinovaným proteinům. Tímto způsobem se otvírá prostor pro ještě přesnější řízení proteolýzy, která je řízena hlavně v rámci rozpoznání a ubiquitinace substrátu pomocí E3 ligáz (shrnutí Woelk et al. 2007).

2.2 Extracelulární ubiquitin

Funkce UPS v buňce je velmi detailně zkoumána již dlouhou dobu a informace o ní jsou obsahem stovek vědeckých publikací. Na druhé straně význam Ub vně buněk zůstává zatím do značné míry stranou výzkumných projektů, a jeho úloha na tomto poli není jistě zanedbatelná. Velký význam je mu přikládán právě v souvislosti s oplozením, kde působí jako marker defektních spermií a na oocytu plní roli receptoru pro proteazomální komplex spermie (Zimmerman et al. 2011, Sutovsky et al. 2001). Může také hrát úlohu imunomodulátoru, inhibuje růst některých typů hematopoetických buněk a je schopen aktivovat apoptotickou dráhu (Daino et al. 2000).

Extracelulární Ub je také vždy detekovatelný v tělních tekutinách, ale jeho koncentrace je velmi odlišná podle aktuálního stavu v organismu. Za normálních podmínek je v lidské krevní plazmě v koncentraci 10 nM, ale tato hodnota může vzrůst desetkrát při některých onemocněních (leukémie, cukrovka II. typu, infarkt myokardu). V mozkomíšním moku pak jeho koncentrace při různých typech poškození (Alzheimerova choroba, hypoxie) může nabývat až stonásobných hodnot oproti normálu (shrnutí Majetschak 2011). Tyto hodnoty se většinou dávají do souvislosti k množstvím poškozených buněk v daném systému, ale ne vždy musí jít o Ub, který se do tělních tekutin dostane vlivem poškození buněk. Na extracelulární Ub je zdaleka nejbohatší seminální tekutina a jeho koncentrace zde

může dosahovat až 0,92 μM (Lippert et al. 1993). Ve folikulární tekutině (výzkum prováděn na bovinních folikulech) může být hodnota koncentrace až 0,26 μM (Einspanier et al. 1993).

Exocytóza Ub pomocí vezikulů byla již zjištěna u epiteliálních buněk nadvarlete (epididymis), granulóznic buněk uvnitř folikulů, některých typů buněk imunitního systému a u chromafinních buněk, které primárně exocytují adrenalin (Wegrzyn et al. 2007) a v urinálních vezikulech uvolňovaných z epitelu ledvin (Pisitkun et al. 2004).

2.3 Ubiquitinace spermií během dozrávání v epididymis

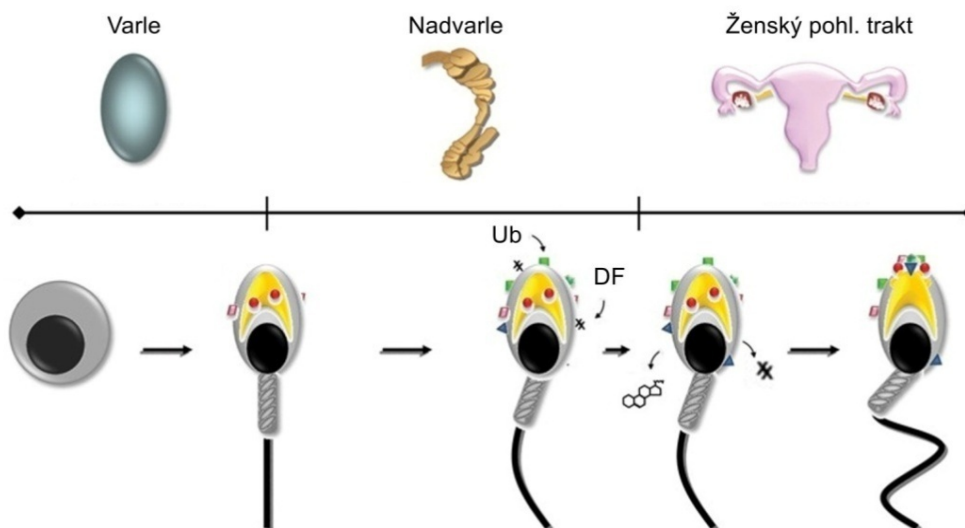
Pro úspěšné oplození musí spermie během svého vývoje absolvovat několik důležitých vývojových kroků. Mezi ně patří spermatogeneze ve varlatech, maturace v epididymis a kapacitace v samičím pohlavním traktu (Obrázek 2). Teprve poté je spermie zcela schopná průniku do oocytu a oplození.

Spermie, které po spermatogenezi opustí varlata, jsou již morfologicky téměř hotové, ale z funkčního hlediska jsou stále neschopné oplození. Potřebnou pohyblivost, která se ještě stupňuje po kapacitaci, a schopnost vázat se na zonu pellucidu (ZP) získají až během průchodu nadvarletem. Tento orgán, který je na vrcholu varlete, se skládá ze tří základních částí. Caput (hlava), kde dochází ke spojování přírodních kanálků z varlat, corpus (tělo) kde spojením těchto kanálků vznikne ductus epididymis. Tento postupně se zužující stočený kanálek o celkové délce až 5 m postupně přechází v caudu (ocas), ze které následně ústí chámovod. Změny, které zde spermie prodělá v rámci epididymální maturace jsou všechny řízené prostředím v epididymis, jelikož kompaktní genom spermie neumožňuje transkripci a i translačně jsou v tuto dobu zcela neaktivní. Komplexní prostředí v jednotlivých částech epididymis umožňuje sofistikované řízení změn ve složení plazmatické membrány a jejího povrchu, včetně připojení nebo modifikací mnoha proteinů s membránou asociovaných, připojení faktorů bránících předčasné kapacitaci a značení proteinů pomocí Ub (shrnutí Reid et al. 2011).

Během průchodu epididymis prokazatelně klesá procentuální obsah neživotaschopných spermií i spermií s různými defekty (abnormální morfologie hlavičky, spojovacího oddílu nebo akrozomu). Selekcí spermií zde zajišťují specializované epiteliální buňky nadvarlete a makrofágy pomocí fagocytózy nebo dochází k rozpadu a zkapalnění (liquefaction) spermií v lumen (shrnutí Sutovsky 2003, shrnutí Axner 2006).

Ub je do epididymální tekutiny sekretován hlavně dvěma způsoby. Jedním je exocytóza malých váčků epididymozomů do lumen z apikální strany epiteliálních buněk. Další cesta je odštěpování apikálních „váčků“ (blebs), které jsou schopné uvolňovat následně do lumen jak proteiny asociované s jejich membránou, tak původně

cytoplazmatické proteiny epiteliálních buněk. Do lumen epididymis se touto cestou nedostává pouze Ub, ale i další součásti UPS, které zajišťují navázání, aktivaci a ligaci Ub na substrát. V bovinní epididymální tekutině byl zjištěn i obsah deubiquitinačních enzymů regulujících UPS.



Obrázek 2: Úpravy spermie v průběhu její maturace. Během zrání v nadvarletí dochází k připojení Ub a dekapacitačních faktorů (DF) na membránu spermie. Dekapacitační faktory v samičím pohlavním traktu disociují, tento děj je závislý na uvolnění cholesterolu z membrány spermie (převzato shrnuto Reid et al. 2011, upraveno).

Způsob rozpoznávání a značení defektních spermií není doposud objasněn a vykazuje určité nesrovnalosti, jelikož lze najít i defektní spermie (po morfologické stránce) které pomocí Ub značeny nejsou (Varum et al. 2007). V zásadě je ale možné říct, že míra ubiquitinace spermií při průchodu epididymis vykazuje nepřímou úměrnost s jejich kvalitou a že tato závislost by mohla souviset s poškozením DNA nebo některými apoptotickými znaky (Sutovsky et al. 2002).

2.3.1 Sperm-ubiquitin tag immunoassay (SUTI)

Poznatky o značení spermií pomocí Ub mohou velmi dobře posloužit k vyhodnocování kvality spermatu, rozhodování o jeho použití nebo o výběru možného dárce v humánní medicíně i hospodářských aplikacích. Charakterizace kvality spermatu se v současné době provádí hlavně analýzou spermií pod mikroskopem nebo přístrojově pomocí počítačem-asistované analýzy spermatu (computer-assisted semen analysis neboli

CASA). Vyhodnocení spermioqramu, vyjma koncentrace, je poměrně subjektivní záležitostí a vyžaduje zkušené odborníky. Vyhodnocení spermatu pomocí počítačové analýzy dosahuje velmi podobných výsledků jako klasické vyšetření pod mikroskopem, ale je technicky náročnější (Vested et al. 2011). Výsledky obou z těchto typů vyšetření také příliš neodpovídají skutečné schopnosti spermií oplodnit vajíčko a jsou velmi různorodé mezi jednotlivými laboratoři (Sutovsky et al. 2004a). Z těchto důvodů by byla velmi prospěšná možnost charakterizace kvality spermií pomocí míry ubiquitinace, což je podstata SUTI.

Extracelulární Ub na membráně spermií je vizualizován pomocí značení specifickou protilátkou. Míra ubiquitinace je potom analyzována pod fluorescenčním mikroskopem, přičemž pro toto vyhodnocení je důležitý Ub, který se vyskytuje na hlavičce spermie a ne na spojovacím oddílu či bičíku spermie. Během fixace a značení protilátkou nejsou použity žádné metody pro permeabilizaci membrány, tím by mělo být zajištěno, že vizualizovaný Ub je pouze extracelulární. Tato metoda ještě může být rozšířena analýzou na průtokovém cytometru (Ozanon et al. 2005).

V současnosti však metoda SUTI není příliš rozšířená a některé studie zabývající se tímto tématem dospěly k rozdílným výsledkům a možnost použití Ub jako markeru kvality spermatu odmítají (Varum et al. 2007, Muratori et al. 2005). Pro tyto účely se v poslední době používá detekce DNA zlomů, jakožto znaků apoptózy. To se provádí buď metodou TUNEL (terminal deoxynucleotidyl transferase-mediated dUDP nick end-labeling) detekující jednořetězcové zlomy nebo pomocí SCSA (sperm chromatin structure assay), která je založena na sledování denaturace DNA při změně pH (shrnutí Bungum et al. 2011).

2.4 Akrozomální reakce (AR)

Pro úspěšné oplození oocyty musí dojít po navázání spermie k AR. V případě, že akrozom spermie zůstane intaktní nebo dojde k akrozomální reakci před kontaktem s oocytem, je šance na oplození velmi malá, jelikož spermie během AR přijde o řadu enzymů a receptorů nezbytných pro navázání na ZP, průchod přes ZP a fúzi s oolemou.

Již během kapacitace dochází u spermií k mnoha změnám v plazmatické membráně, které umožňují pozdější exocytózu akrozomu a fúzi plazmatické membrány s vnitřní akrozomální membránou (IAM, inner acrosomal membrane). Následkem těchto změn je plazmatická membrána velmi náchylná k poškození a i malé změny v prostředí (pokles teploty, změna koncentrace iontů nebo pH) mohou iniciovat AR, což je problémem pro řadu studií. Přesto však v *in vivo* podmínkách dochází k AR u savců až po navázání spermie na ZP (shrnutí Flesch a Gadella 2000). Mechanismus a přesná lokalizace aktivace AR však zůstává neobjasněna (shrnutí Yanagimachi 2011)

Navázáním na glykoprotein ZPC, který je součástí obalu oocyty, dochází k aktivaci druhově specifických receptorů na plazmatické membráně spermie, které spouští signální kaskádu vedoucí k zvýšení cytozolické koncentrace Ca^{2+} a zvýšení pH. Následkem této signalizace dojde k depolymerizaci aktinu, který představuje překážku mezi vnější akrozomální membránou (OAM, outer acrosomal membrane) a plazmatickou membránou spermie. Dále dojde k uvolnění fúzogenních proteinů, které zajišťují tvorbu pórů mezi OAM a plazmatickou membránou a později i vznik hybridních vezikulů složených z těchto dvou membrán. Tyto procesy vedou k uvolnění obsahu akrozomu do extracelulárního prostoru, a to jak volně tak ve zmíněných vezikulech. Ztrátou plazmatické membrány přiléhající k akrozomu dojde i k odhalení IAM, v kterou po AR přechází plazmatická membrána v ekvatoriální oblasti. Díky IAM dochází ke stabilní vazbě spermie na ZP (shrnutí Abouhaila a Tulsiani 2009).

2.5 Zona pellucida

Plazmatickou membránu oocyty u většiny živočišných druhů těsně obklopuje glykoproteinová vrstva obecně nazývaná vitelinní membrána. U savčích oocytů se tato vrstva nazývá zona pellucida (z lat. pellucid: průhledný). Tento poměrně široký obal chrání oocyt před mechanickým poškozením a zajišťuje řadu dalších funkcí.

Zona pellucida je tvořena hlavně třemi glykoproteiny ZPA, ZPB, ZPC. Tento způsob označení zonálních glykoproteinů je doporučený v rámci prasečího modelu (*Sus scrofa f. domestica*), na kterém je tato diplomová práce vypracována. V současné době se však doporučuje označení ZP2 pro ZPA, ZP4 pro ZPB, ZP3 pro ZPC. Protein ZP1, který ve výčtu chybí, udává databáze NCBI jako alternativní název pro ZP2/ZPA v případě prasete (NCBI 2011, shrnutí Goudet et al. 2008). Heterodimery proteinů ZPB a ZPC jsou organizovány do dlouhých vláken, které jsou zesíťovány pomocí homodimerů ZPA.

Tvorba a sekrece proteinů ZP se může u různých druhů do velké míry lišit. V konkrétním případě prasete jsou tvořeny jak oocytem, tak kumulárními buňkami přilehlými k oocyty. Na druhou stranu u myši jsou syntetizovány výhradně oocytem (shrnutí Zimmerman et al. 2011).

Proteiny zony pellucidy tvoří poměrně rigidní strukturu, která kromě ochrany zajišťuje i specifické rozpoznání spermií daného druhu. Tato specifita však není absolutní. Vlastní navázání spermie probíhá v několika krocích. Prvotní vazba probíhá pomocí proteinů pouze asociovaných se ZP. V dalším kroku se spermie pevně váže na ZPC receptory na plazmatické membráně. Poté dojde k AR a uvolněné enzymy umožní proniknout spermii přes ZP k oolemě a fúzovat s ní.

Po oplození slouží ještě ZP jako ochrana proti předčasnému zahnízdění oocytu ve vejcovodech a tím vzniku mimoděložního vývoje. Embryo tento glykoproteinový obal opouští až ve stádiu blastocysty při tzv. hatchingu.

2.5.1 Extracelulární ubiquitinace oocytu

Význam extracelulárního Ub na oocytu by podle některých studií mohl spočívat ve funkci receptoru pro 26S proteazom uvolněný ze spermie. Nové studie 26S proteazom označují za odpovědný za průchod spermie přes ZP. To se děje pomocí štěpení proteinů ZP (ZPP), zvláště pak proteinu ZPC (Zimmerman et al. 2011). Způsob jakým spermie proniká k oolemě u savců je již dlouhá léta předmětem výzkumu a hypotéz mnoha laboratoří, jelikož sledování spermie během jejího průniku je v podstatě nemožné, zvláště pak po biochemické stránce (shrnutí Sutovsky 2011).

Ubiquitinace ZPP byla prokázána jak u ZP savčích oocytů (Sutovsky et al. 2004b), tak u VC vajíček ježovky či sumek (Sawada et al. 2002). K modifikaci ZPP pomocí Ub dochází u prasete již během oogeneze. Mechanismus tohoto značení není znám a rozdílné výsledky o četnosti těchto úprav poskytuje i proteomická analýza. I když byly tyto modifikace detekovány na všech třech hlavních komponentech ZP (ZPA, ZPB, ZPC), není stále jisté, jaké procento z nich tuto modifikaci obsahuje (Zimmerman et al. 2011). Značná míra extracelulární ubiquitinace oocytu je však detekovatelná již v primordiálních folikulech.

Otázkou zůstává i způsob těchto modifikací. Za normálních podmínek jsou proteiny značené Ub v buňce degradovány. Proteiny určené původně k exocytóze většinou pomocí degradace asociované s endoplazmatickým retikulem (ERAD). V současné době není jasné, jestli k ubiquitinaci ZPP opravdu dochází uvnitř buněk. V tomto případě by jejich exocytóza musela být zajištěna dříve, než dojde k degradaci pomocí UPS. Další variantou je modifikace ZPP až po jejich lokalizaci do ZP. Tuto hypotézu by mohla podporovat vysoká extracelulární koncentrace Ub ve folikulární tekutině (Einspanier et al. 1993). Tento problém není vyřešen nejen u proteinů vlastní ZP, ale i s dalšími proteinů tvořících extracelulární matrix (ECM) oocytu, které jsou také ubiquitinovány a následně štěpeny pomocí proteazomu spermie.

2.5.2 Penetrace zony pellucidy

Na průnik spermie přes ZP u savců existují dva odlišné pohledy. Některé práce prokazují, že k průniku k oolemě je dostatečná síla vytvářená bičíkem spermie (shrnutí Bedford 1998). V této práci však autor vychází hlavně z předpokladu, že enzymem umožňující penetraci spermie je akrozin a poukazuje na schopnost spermii oplodnit oocyt i v případě deficiencie či inhibice akrozinu. V jedné z dalších prací však týž autor uvádí akrozomální proteázy, jako odpovědné faktory za penetraci spermie přes ZP (shrnutí

Bedford 2006). Akrozin se opravdu zdál být dlouhou dobu vhodným kandidátem potvrzujícím hypotézu o enzymatickém štěpení ZPP umožňujícím průchod spermie, která byla nastíněna prací již v 50. letech (Austin a Bishop 1958). Akrozin je i v současnosti považován za velmi důležitý pro oplození, ale spíše se jeho úloha dává do souvislosti s vazbou spermie na oocyt (Howes a Jones 2002).

2.5.3 Proteazomální komplex jako digestivní enzym ZPP

Možný vliv UPS na oplození byl zkoumán nejprve na sumkách (Saitoh et al. 1993). Zde je již funkce proteazomu jakožto enzymu štěpícího proteiny VC velmi dobře popsána. Oproti savcům je zde ale zásadní rozdíl v tom, že se na tomto procesu podílí celý UPS spermie. Vajíčka sumek nejsou značeny Ub během vývoje, ale pomocí Ub konjugáčnických enzymů z akrozomu. Po navázání spermie na VC dojde k akrozomální reakci, uvolnění ubiquitinu a jeho připojení na protein Vesp70 (homolog ZP3) pomocí E3 ligáz spermie. Poté je Vesp70 rozpoznáván proteazomálním komplexem spermie a degradován (Sawada et al. 2002). Podjednotky proteazomálního komplexu byly rovněž detekovány pomocí různých metod v akrozomu savčích spermii (Sutovsky et al. 2004b).

Důkaz štěpení ZPP, značených ubiquitinem, pomocí proteazomálního komplexu u savců vycházel z možnosti inhibice oplození *in vitro*. Při použití proteazomálních inhibitorů jako MG132 a lactacystin byl jejich účinek pozorovatelný pouze u oocytů s neporušenou ZP. V případě *in vitro* oplození u oocytů s odstraněnou ZP neměla jejich přítomnost žádný efekt (Sutovsky et al. 2003, Sutovsky et al. 2004b). Potvrzení této teorie detekcí produktů štěpení ZP muselo být poté provedeno v upraveném systému, kdy kapacitované spermie byly umístěny do média s rozpuštěnými ZPP a následně byly analyzovány produkty v médiu.

Další pokus pak prokázal podobnou prostorovou strukturu a vzhled ZP u oocytů inkubovaných společně se spermii a u oocytů inkubovaných s izolovaným teplem inaktivovaným proteazomálním komplexem ze spermie (Zimmerman et al. 2011).

Proteazomální komplex spermie má kromě své degradační role na ZP i vliv na AR, jelikož degraduje některé akrozomální proteiny a proteiny asociované s akrozomální membránou, což vede ke změnám v její struktuře a rozpadu na akrozomální váčky (Zimmerman et al. 2011). Tento fakt podporují studie prokazující zabránění AR pomocí inhibitorů proteazomálního komplexu (Morales et al. 2003).

Degradace proteinů pomocí UPS sice není přímo závislá na hydrolýze ATP, jak je již zmiňováno výše, ale přítomnost ATP je důležitá pro asociaci 20S a 19S proteazomu a pro stabilitu proteazomálního komplexu. ATP je však striktně intracelulární molekulou, což značně komplikuje tento systém zvláště u oplození ve volném prostředí, jako je tomu

například u sumek a ježovek. Úplným odstraněním ATP z prostředí však bylo možné inhibovat oplození i u těchto živočichů (Sakai et al. 2003, Yokota a Sawada 2007). Výsledky podporující tyto studie byly získány i na prasečím modelu, kde pomocí ATP-difosfatázy štěpící ATP byla snížena úspěšnost oplození a četnost polyspermického oplození, k tomuto ovlivnění ale nedošlo při použití inaktivovaného enzymu (shrnutí Sutovsky 2011).

Vysoká koncentrace extracelulárního ATP je umožněna tvorbou lokálního mikroprostředí, které vznikne vylitím akrozomu. Akrozomální hybridní vezikuly, které se váží na ZP, a viskózní akrozomální cytoplazma udržují obsah akrozomu na daném místě pomocí tvorby tzv. akrozomálního pláště (shroud). Tyto enzymy společně s proteiny ukotvenými v plazmatické membráně a IAM spermie pak umožňují penetraci spermie a její fúzi s membránou oocyty (Zimmerman et al. 2011).

2.6 Průchod přes kumulární buňky a extracelulární matrix

Na cestě spermie k oocyty jsou ještě překážky, které jsem zatím příliš nezmiňoval. Zralý oocyt připravený k oplození je totiž obalen několika vrstvami kumulárních buněk a na vnější straně ZP i v perivitellinním prostoru pod ní je vrstva asociované ECM, tvořená hlavně kyselinou hyaluronovou.

2.6.1 Kumulární buňky (Cumulus oophorus)

Jde o souhrnný název pro granulózní buňky, které obklopují oocyt jak v antrálních folikulech, tak i po jeho uvolnění z vaječnicků. Tyto buňky regulují maturaci ooplazmy v závislosti na hormonálních signálech. Udržují, společně s faktory ve folikulární tekutině, oocyt v meiotickém bloku a poté se podílí i na opětovném zahájení meiózy. S oocytem jsou spojeny pomocí gap junction a vrstva nejtěsněji přilehlá k oocyty se označuje jako corona radiata. Spojení corony radiaty a oocyty umožňují mezibuněčný transport iontů a malých molekul a jsou pro správný vývoj oocyty nezbytné (shrnutí Tanghe et al. 2002).

Po ovulaci pak kumulární buňky zajišťují ochranu oocyty a zprostředkovávají i atrakci spermii pomocí tvorby progesteronu (shrnutí Eisenbach a Giojalas 2006).

2.6.2 Extracelulární matrix oocyty

Stabilitu vazeb mezi jednotlivými kumulárními samotnými buňkami a mezi coronou radiatou a oocytem zajišťuje hlavně kyselina hyaluronová. Tu kumulární buňky exocytují velmi intenzivně do svého okolí během dozrávání oocyty do metafáze II. Tento děj se nazývá expanze kumulárních buněk, jelikož zde dochází k zvětšení rozestupů mezi jednotlivými buňkami a cumulus dostává vzhled oblaku kolem oocyty. V tomto stadiu se přes něj také dostávají spermie při normálním *in vivo* oplození. To je umožněno hlavně díky proteinu PH-

20, který je vázán na plazmatické membráně spermie a vykazuje hyaluronidázovou aktivitu. Pomocí té je štěpena hyaluronová kyselina mezi kumulárními buňkami a také ECM na obou stranách ZP (Chan et al. 1999).

2.7 Oplození

Proces oplození se u různých druhů živočichů velmi liší. Početí však má několik obecných kroků. Nejprve je nutný kontakt obou pohlavních buněk a jejich vzájemné rozpoznání, které je do značné míry druhově specifické. Poté dochází k regulaci průniku spermie do oocyty, v tomto kroku je důležité, aby do oocyty pronikla pouze jediná spermie nebo byla zajištěna účast pouze jedné spermie na vzniku zygotického jádra. Po fúzi obou gamet musí dojít k vytvoření prvojader a následně k fúzi samotného genetického materiálu. Dále je nutná aktivace metabolismu vajíčka, který umožní zahájení vývoje nového jedince.

2.7.1 Maturace oocyty

Savčí oocyty dozrávají postupně ve vaječnicích během celého reprodukčního věku. Většina oocytů je vytvořena již během zárodečného vývoje. Vlivem hormonálních regulací dochází postupně k vývoji jednotlivých folikulů kolem každého oocyty, ale jsou pozorovatelné i folikuly s více oocyty. V *in vitro* podmínkách se hormonální stimulace nahrazuje přidáním FSH (folikuly stimulující hormon) a LH (luteinizační hormon). Během dozrávání ve vaječnicích dochází k akumulaci mnoha látek, které zajišťují vývoj embrya po oplození, zvláště pak do doby před reaktivací vlastního genomu embrya.

U většiny živočichů dochází k oplození ve stadiích před dokončením maturace oocyty, takže u nich nikdy není vytvořeno vajíčko ve smyslu pohlavní haploidní buňky. V případě savců dochází ke splynutí gamet ve stadiu druhé metafáze meiotického dělení (MII). Neplatí to však vždy, jelikož například u psů vstupuje spermie již do primárního oocyty. V primárním oocyty je přítomný zárodečný váček, což je název pro oocytární diploidní jádro. V rámci další maturace se tento zárodečný váček rozpadá, dochází k tvorbě dělicího vřeténka a zahájení meiózy. Ve stadiu MII, je již vyloučena nadbytečná část jaderného materiálu oocyty v podobě prvního pólového tělíska (1. PB). V tomto bodě je další postup meiózy inhibován. To způsobuje přetrvávající aktivita MPF (maturation promoting factor) udržovaná pomocí CSF (cytostatic factor). K dokončení maturace dochází po vstupu spermie do oocyty a jeho aktivaci. Tím je umožněno uvolnění z druhého meiotického bloku, tvorba dělicího vřeténka a vyloučení druhého pólového tělíska (2. PB) a chromozomy jsou seřazeny na mitotickém vřeténku. Klíčovými regulátory těchto posledních fází maturace jsou především MPF a MAPK (shrnutí Gosden a Lee 2010). Po dokončení meiózy se dělicí

vřeténko rozpadá a pro tvorbu zygotického dělicího vřeténka je základem samčí centrozom vnesený spermií.

2.7.2 Kapacitace spermií

Ejakulované spermie nejsou bezprostředně schopné oplození. Nejprve u nich dochází k dalším změnám vlivem vnějšího prostředí, v případě savců díky podmínkám v samičím pohlavním traktu. Soubor těchto změn se nazývá kapacitace a podmiňují vazbu spermie na ZP a spuštění akrozomální reakce. Je to proces, který je nezbytný pro úspěšné oplození *in vivo* i v *in vitro* systémech, snad jen s výjimkou intracelulární injekce spermie (ICSI), ale i tam se indukce kapacitace před vlastním oplozením provádí velmi často (Lee et al. 2003a).

Zahájení kapacitace u savců probíhá díky třem hlavním složkám v prostředí samičího pohlavního traktu, které zde jsou v poměrně vysoké koncentraci. Protein albumin pomáhá uvolnění cholesterolu z plazmatické membrány, což vede k její větší fluiditě a snazší fúzi a akrozomem. Z membrány spermie také, patrně vlivem uvolnění cholesterolu, disociují dekapacitační faktory, které se na ni vázaly v rámci úprav v epididymis a kapacitaci brání (shrnuje Reid et al. 2011). Další dvě složky jsou ionty Ca^{2+} a HCO_3^- , které pomocí kanálů prostupují přes membránu a přímo aktivují cytozolickou adenylátcyklázu. Díky tomu je syntetizován cAMP, který funguje jako druhý posel a spouští proces kapacitace pomocí aktivace tyrozinových kináz.

V rámci kapacitace dochází ke změnám metabolismu, což vede k vyšší spotřebě kyslíku a energie. To se projeví hyperaktivací, během níž se spermie začne pohybovat lineárně a větší rychlostí. Kapacitované spermie jsou k oocytu naváděny pomocí termotaxe a chemotaxe. Chemotaxi patrně vyvolávají některé látky uvolňované kumulárními buňkami oocytu. Jejich identifikace ještě není úplná, ale velmi důležitým se ukazuje být progesteron, který u spermie aktivuje specifické vápníkové kanály (Oren-Benaroya et al. 2008).

2.7.3 Fúze pohlavních buněk

Po průchodu spermie přes ZP (podrobně výše) dochází k vazbě spermie na oolemu. Ta tvoří na svém povrchu množství mikroklků (microvilli). Tyto výběžky se v blízkosti spermie velmi rychle prodlužují a seskupují do fertilizačního kónusu, který obalí spermii a umožní její fúzi. Po průniku celé spermie do oocytu jsou tyto mikroklky vstřebány. Způsob, jakým dochází k fúzi obou membrán, není zcela prostudován. Jsou ale určeny některé proteiny, které jsou pro fúzi nezbytné. Jedním je transmembránový protein spermie

s názvem Izumo, který se dostává na povrch membrány spermie v průběhu AR. Na oocytu je potom nezbytný protein CD9. Ten však patrně nezajišťuje samotnou fúzi, ale umožňuje vytvoření adhezivního místa pro spermii na oolemě (Jegou et al. 2011). Na fúzi se nutně bude podílet i mnoho dalších proteinů membrány oocytu, včetně extracelulárních proteinů připojených pomocí glykofosfatidylinositolové kotvy. Po ošetření oocytu enzymy, které tyto proteiny odstraňují, nebyly spermie schopné fúze s oocytem (Jegou et al. 2011). Tento zásadní krok není příliš prostudován a mechanismy, které za ním stojí, musí být teprve popsány.

2.7.4 Aktivace oocytu

Esenciální podmínka pro aktivaci oocytu je uvolnění SOAF (sperm oocyte activating factor) do ooplazmy. Tímto termínem se označuje soubor ve spermiu obsažených látek, které aktivaci oocytu po oplození umožňují. Předmětem výzkumů zůstává vysvětlení vlastního složení a působení SOAF a umožnění jeho kontaktu s ooplazmou v případě obejití přirozených mechanismů oplození u ICSI. Za hlavní enzym, odpovědný za aktivaci oocytu, je dnes považována spermiu nesená fosfolipáza C- ζ (PLC- ζ) (Fujimoto et al. 2004, Nomikos et al. 2011). PLC- ζ spouští masivní influx vápníku do ooplazmy pomocí inositol-1,4,5-trifosfátové (IP3) dráhy a její aktivita souvisí i s tvorbou Ca^{2+} oscilací následujících po oplození. Přes zásadní význam PLC- ζ v aktivaci oocytu není znám mechanismus zodpovědný za rozpoznání jejího substrátu. Možnou roli zde patrně mají bazické aminokyselinové řetězce PLC- ζ díky nimž vznikají elektrostatické interakce se záporně nabitým fosfatidylinositol-4,5-bisfosfátem (PIP2) v membráně (Nomikos et al. 2011).

Po první vlně vysoké koncentrace Ca^{2+} v ooplazmě dochází k periodickým oscilacím, které jsou zodpovědné za signalizaci vedoucí k exocytóze kortikálních granulí, rozpoznání a dekonenzaci jádra spermie, dokončení meiózy a tvorbě prvojader. Průběh Ca^{2+} oscilací je charakteristický pro jednotlivé druhy živočichů a liší se podle způsobu oplození oocytu (přirozené oplození, oplození *in vitro*, ICSI) (Morozumi et al. 2006, Yanagida et al. 2001).

2.7.5 Dekondenzace spermie

DNA spermie je ve velmi kondenzovaném stavu, což jí umožňuje nahrazení histonů v jádře protaminy během spermatogeneze. Protaminy jsou velmi bohaté na cystein a jeho thiolové skupiny jsou během maturace v epididymis pospojovány pomocí disulfidových vazeb. To zajišťuje velkou stabilitu DNA ve spermiu. Po proniknutí spermie do oocytu musí dojít k dekonenzaci chromatinu a výměně protaminů zpět za histony, což v první řadě umožňují oocytární enzymy redukující S-S vazby, hlavně glutathion (shrnutí Gosden a Lee 2010). Po zásahu těchto enzymů jsou rozvolněny stočené chromatinové smyčky a je

umožněn přístup k DNA pro další faktory a zpětnou výměnu histonů. Výměna histonů je velmi rychlý proces a začíná dříve než jednu hodinu po oplození (shrnutí Caglar et al. 2005).

Dekondenzace je v rámci oplození velmi důležitý děj a zvláště u metody ICSI často dochází k jejímu selhání a tím i neúspěšnému oplození. U prasete tento krok některé studie uvádějí jako nejvíce problematický (Lee et al. 2003a, shrnutí Kren et al. 2003).

2.7.6 Formování prvojader

Vznik prvojader, který u savců trvá v průměru 12 hodin, u prasete 18 hodin, je v porovnání s pouhou hodinou například u ježovky relativně pomalý proces. Je to dáno hlavně nutností dokončení meiózy oocyty a také odlišným způsobem tvorby zygotického jádra a replikace DNA obou gamet před prvním dělením. Nejprve dojde k rozvolnění chromozomů. U spermie je tento proces součástí dekonzenzace a u oocyty následuje po ukončení meiózy. Obě prvojádra spolu v této chvíli neinteragují a jejich membrána zůstává stabilní. Na rozdíl od uvedené ježovky dochází ke zdvojení DNA samostatně v samčím a samičím prvojádře. Během doby potřebné k replikaci obě prvojádra migrují v oocyty k sobě díky mikrotubulům. Mikrotubulární organizační centrum tvoří v embryu centrozom pocházející ze spermie. Po přiblížení prvojader dochází k rozpadu jaderných obalů. Savčí oocyty v této fázi netvoří pravé zygotické jádro, chromozomy se pouze seřadí na společném mitotickém vřetenku, odkud se poté rozchází do dvou vznikajících buněk. Pravé diploidní jádro se tak objevuje až ve dvoubuněčném embryu.

2.8 ART (Assisted reproductive technology)

Pod označením ART se ukrývá široké spektrum metod a technik, které se používají pro oplození. Zahrnují jak asistovanou reprodukci v *in vivo* podmínkách, kde se jedná hlavně o inseminaci, tak metody mimotělního oplození, po kterých následuje implantace časného embrya zpět do dělohy. Mimotělní oplození může být realizováno koinkubací oocytů se spermiemi. Tuto metodu obvykle označuje zkratka IVF (*in vitro* fertilization). V případě vážnějších komplikací, hlavně v souvislosti se špatnou kvalitou spermií, musí být spermie vpravena přímo do oocyty pomocí skleněné kapiláry.

U zvířat se těchto metod používá zvláště ke šlechtění a k oplození pomocí spermatu zvláště vhodných jedinců, přičemž cena takového oplození se může pohybovat až v řádech desítek tisíc korun (<http://www.obora.com>). V laboratorních podmínkách je ART velmi užitečným nástrojem k výzkumu oplození, časného embryonálního vývoje nebo i nových metod antikoncepce.

2.8.1 Metoda ICSI

Tato metoda je v současné době jedním z velmi častých postupů využívaných v asistované reprodukci u lidí. Do klinické praxe ji uvedl roku 1992 Dr. Gianpiero Palermo (Palermo et al. 1992) a zvláště z dnešního pohledu je téměř neuvěřitelné, že se tak stalo bez jediné předchozí studie na zvířatech, která by ověřovala její dopady na embryo. Nicméně první případ vnesení spermie do oocyty chirurgicky byl proveden již v roce 1976 (Uehara a Yanagimachi 1976).

V současné době se mnoho výzkumných skupin zabývá průběhem časného embryonálního vývoje, po oplození pomocí ICSI, u prasete (*Sus scrofa f. domestica*). Důvodem je metabolická a velikostní podobnost s člověkem, což umožňuje do jisté míry extrapolovat získané výsledky na lidský organismus.

Intracelulární injekce spermie je založena na přenosu jedné spermie přímo do ooplazmy. Provádí se pomocí mikromanipulátoru, případně osazeným piezoelektrickým aktuátorem či laserem, pod mikroskopem. Spermie je nasáta do skleněné mikrokapiláry, jež je zavedena do oocyty přes ZP a plazmatickou membránu, a poté je injikována do ooplazmy. Injekce se provádí po nastavení oocyty do polohy, kdy je viditelné 1. PB na pozici 1 nebo 5 (poloha číslic na ciferníku hodin). Tím je zajištěna nejmenší pravděpodobnost poškození jádra během injekce.

Metoda intracelulární injekce spermie byla v této diplomové práci prováděna v modifikovaném provedení za použití piezo-aktuátoru (piezo drive unit). Piezo jednotka je schopná vytvářet lineární vibrace v přesně definovaném rozpětí (až v řádu pikometrů). Tento pohyb se převádí na pohyb injekční kapiláry a pomocí něj penetruje kapilára ZP a poté pomocí jednoho slabého impulsu i oolemu. Tento způsob nedeformuje během průniku kapiláry oocyt, což by mohlo vést k poruchám cytoskeletu a častějšímu výronu ooplazmy po vytažení kapiláry (Yanagida et al. 1999). V klinické praxi není příliš používán, jelikož se pro zvýšení průraznosti a stabilizaci kapiláry v její špičce používá malé množství rtuti a existují obavy z jejího možného negativního efektu na oplození a následný embryonální vývoj. Koncentrace rtuti v médiu během piezo ICSI je však srovnatelná či nižší než v krvi (Yanagida et al. 1999, Kingman et al. 1998).

2.8.1.1 Přínosy a komplikace

Metoda ICSI se v klinické praxi využívá hlavně v případech, kdy spermie nejsou schopné spontánně oplodnit oocyt kvůli jejich nízkému počtu, malé pohyblivosti, úplné nepřítomnosti ve spermatu nebo při imunologicky podmíněné neplodnosti (shrnuto Tesarik 1996). V konkrétním případě prasete se ICSI využívá hlavně z důvodu častého výskytu

polyspermiího oplození při metodě IVF (shrnutí Kren et al. 2003, Han et al. 1999). Na druhou stranu se však ani metodou ICSI nedosahuje zcela optimálních výsledků a počet embryí, která se vyvinou do stadia blastocysty, je poměrně malý.

Vysoké nároky jsou kladeny i na vybavení laboratoře a nutnost osvojení si této náročné techniky. Oproti klasickému IVF jsou náklady na tvorbu vhodných laboratorních podmínek a zavedení této metody mnohonásobně vyšší.

2.8.1.2 Penetrace plazmatické membrány spermie

Záměrné porušení plazmatické membrány spermie jde většinou ruku v ruce s její imobilizací. Jedná se o nezbytný krok, který umožňuje SOAF proniknout do oocyty a spustit jeho aktivaci. Ve spermii pak tento krok indukuje některé změny ekvivalentní AR a tím může zlepšovat její schopnost dekonkondenzace. Imobilizace je dále nezbytná z technických důvodů, kdy manipulace s pohybující se spermii není téměř proveditelná.

Možností narušení plazmatické membrány spermie je několik. Mezi mechanické metody patří zlomení či rozdrčení bičíku spermie pomocí injekční kapiláry mikromanipulátoru. To je provedeno bezprostředně před injikací u vybrané spermie. Dále zde řadíme i sonikaci, která způsobí úplné oddělení bičíku od těla spermie. V tom případě se do oocyty dostává jen hlavička spermie, což méně odpovídá přirozenému průběhu oplození, ale na druhou stranu je zde menší množství média injikovaného do oocyty společně se spermii.

Pro penetraci plazmatické membrány spermie je možné využít i působení fyzikálních sil, k čemuž dochází při použití mraženého spermatu. Dále pak sil chemických při kultivaci v médiu s detergenty (například Triton-X100 či dithiothreitol). Na tento postup existuje více názorů, kde některé práce uvádí možné poškození paternální DNA a jiné poukazují na lepší výsledky vlivem těchto metod (Lee a Yang 2004a).

Pokud je pro injekci spermie používána některá z modifikací metody ICSI, ať již piezo aktuátorem nebo laserem, je možno toho využít pro znehybnění spermie a narušení membrány. U piezo-ICSI se to provádí pomocí několika silnějších pulzů, při umístění spermie v ústí injekční kapiláry.

2.8.1.3 Vliv injekčního média

Mezi faktory, které mohou hrát podstatnou roli při uvolnění SOAF do ooplazmy, aktivaci oocyty a další vývoj embrya, patří i výběr média, použitého pro kultivaci spermii těsně před oplozením, a jeho množství injikované do ooplazmy. Většina prací používá jako injekční médium polyvinylpyrrolidon (PVP), ve kterém je spermie také imobilizována výše

uvedenými způsoby. V tomto velmi viskózním médiu se spermie nemohou pohybovat příliš rychle a manipulace s nimi je jednodušší. Zároveň však díky PVP může docházet k zhoršené difúzi SOAF do ooplazmy. Tomuto se dá zabránit nasátím malého množství ooplazmy do injekční kapiláry po průniku do oocyty, čímž se zároveň potvrdí penetrace plazmatické membrány (Katayama et al. 2005). Tento krok však může mít vliv na vývoj embrya a poškozovat vnitřní strukturu cytoskeletu.

Injikování jistého množství PVP do oocyty také není zcela zanedbatelné. Tento velmi viskózní roztok používaný hlavně kvůli omezení rychlosti pohybujících se spermií je sice považován za inertní, ale jeho negativní účinky byly prokázány jak u spermií (Strehler et al. 1998), tak u embrya (Mizuno et al. 2002).

2.8.1.4 Děje po oplození pomocí ICSI

Bezprostředně po průniku spermie při přirozeném oplození dochází ke zvýšení intracelulární koncentrace Ca^{2+} . Tento proces vede okamžitě k aktivaci oocyty a exocytóze kortikálních granulí. Tím dojde k opuštění meiotického kontrolního bodu buněčného cyklu, formování prvojader a vyloučení 2. PB. Zformování samčího prvojádra musí ještě předcházet dekonduktace hlavičky spermie. Po provedení ICSI může také docházet ke zdánlivé aktivaci a vývoji oocyty, který však probíhá pouze za přispění samčího prvojádra, obdobně jako je tomu po partenogenetické aktivaci. Tyto oocyty se poté mohou vyvíjet případně až do stadia blastocysty a zkreslovat výsledky studií.

Průběh a tvar Ca^{2+} vln během oscilací charakteristických pro úspěšně oplozené oocyty byl zatím zkoumán podrobněji u člověka a myši a byly pozorovány jejich významné rozdíly u přirozeného oplození a oplození pomocí ICSI (Morozumi et al. 2006).

2.8.1.5 Umělá aktivace

Dodatečná aktivace oocyty po oplození metodou ICSI se provádí několika způsoby. Kultivací s Ca^{2+} ionoforem, kultivací s cykloheximidem nebo aplikací elektrického pulzu (Lee et al. 2003b). Všechny tyto metody jsou založeny na zvýšení koncentrace intracelulárního vápníku, které spouští další děje signální kaskády a oscilace Ca^{2+} , které v *in vivo* podmínkách aktivuje PLC ζ .

Problém aktivace oocyty je nedostatečně prostudován i v případě použití zmrazených spermií. U prasete není zcela jasné, zda jsou zmrazené spermie schopné spouštět dostatečné oscilace intracelulární koncentrace Ca^{2+} , které jsou pro aktivaci a další vývoj embrya nezbytné. Ve studii J. W. Lee a X. Yanga bylo zjištěno dvojnásobné zlepšení ve vývoji do

stádia blastocysty při použití elektroaktivace po oplození pomocí ICSI rozmraženými spermii, ve srovnání se skupinou bez aktivace (Lee a Yang 2004b).

2.9 Inhibitory proteazomálního komplexu

Výzkum mnoha procesů v buňkách je realizován metodou specifické inhibice daného proteinu či enzymu nebo eliminováním samotné tvorby dané látky. Ubiquitin-proteazomální systém je pro všechny eukaryotické buňky esenciální a tudíž není možné jej naprosto odstranit. Proto se pro jeho výzkum používají specifické inhibitory cílené na některé jeho součásti. Výkonnou částí UPS je 26S proteazom, jehož katalytickou funkci zajišťuje 20S jádro. Právě proti němu jsou zacílené dva z velmi často používaných inhibitorů, MG132 a lactacystin.

Lactacystin je přírodní produkt poprvé objevený ve streptomycetách. Váže se specificky do katalytického jádra 20S proteazomu a je zde schopen inhibovat všechny tři hlavní proteolytické aktivity, z toho dvě ireverzibilně. Zároveň však neinterferuje s žádnou další proteázou (shrnutí Fenteany a Schreiber 1998).

Naproti tomu je MG132 zcela syntetickým aldehydickým peptidem, který je schopný specificky inhibovat veškeré katalytické funkce 26S proteazomálního komplexu. Snadno prostupuje plazmatickou membránou buněk a jeho působení je reverzibilní.

3 Cíle práce

- Zvládnutí metody intracelulární injekce spermie, včetně přípravy mikrokapilár a izolace oocytů.
- Ustanovení metody ICSI v nové laboratoři a charakterizace časného vývoje embryí v těchto podmínkách.
- Studium vlivu zablokování oocytárního proteazomálního komplexu inhibitorem MG132 na rozpoznání spermie oocytem a tvorbu prvojader po ICSI.
- Studium vlivu inhibice oocytárního ubiquitin-proteazomálního komplexu na časný embryonální vývoj po ICSI.

4 Materiál a metody

4.1 Chemikálie

Chemikálie	Výrobce	Katalogové číslo
Albumin, z bovinního séra	Sigma-Aldrich, St. Louis, USA	A6003-5G
Anti-Ubiquitin	Imgenex, San Diego, USA	IMG5020
BME	Sigma-Aldrich, St. Louis, USA	B6766
Calcium laktát, pentahydrát	Sigma-Aldrich, St. Louis, USA	C8356-250G
D-(+)-glukóza	Sigma-Aldrich, St. Louis, USA	G6152-100G
DAPI antifade ES	Imgenex, San Diego, USA	DES500L
Dihydrogenfosforečnan draselný	Sigma-Aldrich, St. Louis, USA	P5655-100G
Dulbecco´s PBS, fosfátem pufrovaný fyziologický roztok, bez CaCl ₂ a MgCl ₂	Gibco, Paisley, UK	21600-069
Etanol 96%, kvasný	Merci, Brno, ČR	64-17-5
Fenolová červeň	Sigma-Aldrich, St. Louis, USA	P5530-5G
Folikuly stimulující hormon	Sigma-Aldrich, St. Louis, USA	F2293-1VL
Gentamicin	Gibco, Paisley, UK	5750-037
Goat anti-rabbit IgG FITC	Imgenex, San Diego, USA	20302
GPBoS, růstové proteiny bovinního séra	Sevapharma, Praha, ČR	
Hyalurodidáza	Sigma-Aldrich, St. Louis, USA	H3506-100MG
Hydrogenuhlíčan sodný	Sigma-Aldrich, St. Louis, USA	S5761-500G
Hypotaurin	Sigma-Aldrich, St. Louis, USA	H1384-1G
Chlorid draselný	Sigma-Aldrich, St. Louis, USA	P5405-250G
Chlorid sodný	Sigma-Aldrich, St. Louis, USA	S5886-500G
Chlorid vápenatý, dihydrát	Sigma-Aldrich, St. Louis, USA	C7602-500G
L-Cystein	Sigma-Aldrich, St. Louis, USA	C7352-25G

L-Glutamin	Sigma-Aldrich, St. Louis, USA	G3126-100G
Luteinizační hormon	Sigma-Aldrich, St. Louis, USA	L5269-1VL
M2 medium	Sigma-Aldrich, St. Louis, USA	M7167
Medium M199	Sigma-Aldrich, St. Louis, USA	M4530
MEM	Sigma-Aldrich, St. Louis, USA	M7145
Minerální olej	Sigma-Aldrich, St. Louis, USA	M8410-100ML
Normal goat serum	Milipore, Billerica, USA	S26-100ML
Parafinový olej	Carl Roth, Karlsruhe, Německo	8904.1
Paraformaldehyd	Penta, Chrudim, ČR	140907F
Percoll	GE Healthcare Bio sciences AB, Uppsala, Švédsko	17-0891-02
Poly-L-Lysin	Sigma-Aldrich, St. Louis, USA	P4707
Polyvinylalkohol	Sigma-Aldrich, St. Louis, USA	P8136-250G
PVP	Cook Medical, Queensland, Austrálie	G26774
Rtuť	Sigma-Aldrich, St. Louis, USA	261017-250G
Síran hořečnatý, heptahydrát	Sigma-Aldrich, St. Louis, USA	M7774-500G
Sodium pyruvát	Sigma-Aldrich, St. Louis, USA	P4562-5G
Trizma base	Sigma-Aldrich, St. Louis, USA	T6066-100G
Z-Leu-Leu-Leu-al (MG132)	Sigma-Aldrich, St. Louis, USA	C2211-5MG

4.2 Složení roztoků

Pokud není uvedeno jinak, byla k přípravě roztoků použita deionizovaná voda.

PBS: 10x koncentrovaný roztok byl připraven rozpuštěním jednoho balení Dulbecco's PBS v 1l vody, roztok PBS byl připraven dalším naředěním v poměru 1:9 s vodou.

PBS/PVA: roztok byl připraven rozpuštěním 0,1g PVA v 1l PBS.

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

roztoky hormonů: roztoky LH i FSH byly připraveny rozpuštěním 1mg hormonu v 1ml originálního media M199.

M199: medium bylo připraveno rozpuštěním 36 mM sodium pyruvátu a 58 mM L-cysteinu v dodaném mediu M199 a přidáním 4 mg GPBoS/ml, 5 μ l roztoku LH/ml a 5 μ l roztoku FSH (Krylov *et al.* 2005).

manipulační medium: roztok byl připraven z M2 media a gentamicinu o konečné koncentraci 0,1%.

PZM3: roztok vznikl rozpuštěním 108 mM NaCl, 10 nM KCl, 350 μ M KH_2PO_4 , 400 μ M $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 70 μ M NaHCO_3 , 2 mM Calcium laktátu, 1mM L-glutaminu, 5 mM hypotaurinu a 200 μ M sodium pyruvátu ve vodě a přidáním 3 mg BSA/ml, 1 μ l gentamicinu/ml, 20 μ l BME/ml, 10 μ l MEM/ml a 1 μ l zásobního roztoku fenolové červeně (Yoshioka *et al.* 2002).

MG132: roztok inhibitoru byl připraven rozpuštěním 1 mg MG132 v 1 ml etanolu.

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

mTBM: roztok byl připraven rozpuštěním 113,1 mM NaCl, 3 mM KCl, 20 mM Trizma base, 5 mM glukózy, 5 mM sodium pyruvátu a 2 mM $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ ve vodě, dále byly přidány 2 mg BSA/ml.

4.3 Přístrojové vybavení

Binolupa Olympus SZX2-ILLK	Olympus, Tokyo, Japonsko
Centrifuga MPW-340	Mechanika Precyzyjna, Varšava, Polsko
Inkubátor Hera Cell 150	Kendro, Langenselbold, Německo
Mikromanipulátor Narishige	Narishige, Tokyo, Japonsko
Mikroskop Nikon Eclipse TE200	Nikon, Tokyo, Japonsko
Mikroskop Olympus IX 81 CellR	Olympus, Tokyo, Japonsko
Piezo micro manipulator controller PMAS-CT150	Prime Tech, Tsuchiura-shi, Japonsko
Pracovní box Biosan UVC/T-AR	Biosan, Riga, Litva
Otavovačka kapilár Microforge MF-900	Narishige, Tokyo, Japonsko
Topná podložka Thermo plate	Tokai Hit, Fujinomiya-shi, Japonsko
Mats-U505 R30	

Váhy SI-234	Denver Instrument, New York, USA
Vodní lázeň DKB-8A	Ibersan, Lourinhã, Portugalsko
Vytahovač kapilár Puller Sutter P97	Sutter Instrument, Novato, USA

4.4 Metody

4.4.1 Izolace oocytů

Oocyty použité v experimentech pocházely z vaječníků prepubertálních prasnic. Vaječníky byly získávány na jatkách během bourání a následně byly převezeny v médiu PBS/PVA o teplotě 25-35°C do laboratoře. Zde byly několikrát promyty stejným médiem o teplotě 35°C. Izolace oocytů byla prováděna dvěma způsoby.

4.4.1.1 Aspirační metoda

Pro experimenty prováděné jinou technikou než ICSI byla použita aspirace oocytů, jelikož umožňuje získání většího počtu oocytů v poměrně krátkém čase. Nevýhodou je absence selekce na úrovni folikulů. Ve většině publikací je tato metoda používána i pro oplození pomocí ICSI, ale je prokázáno, že vede k menší úspěšnosti zrání oocytů (Liu a Moor 1997).

Aspirace byla prováděna injekční jehlou 20G, kterou byla folikulární tekutina s oocyty podtlakem nasávána do injekční stříkačky. Odebraná folikulární tekutina byla poté naředěna v poměru 1:1 s manipulačním médiem. Z takto naředěné folikulární tekutiny přenesené do malé Petriho misky byly pod binolupou odebrány pouze oocyty s kompaktním vícevrstevným obalem kumulárních buněk. Tyto oocyty byly přeneseny do média M199.

4.4.1.2 Disekční metoda

Technikou disekce vaječníků je možné izolovat oocyty, které pocházejí pouze z morfologicky kvalitních folikulů. Na druhou stranu je manuálně i časově náročnější.

Pro disekci byly používány pouze vaječníky tzv. hroznovitého typu (grape-type), kde je větší počet folikulů o vhodné velikosti (Knox 2005). Každý vaječník byl rozřezán na skleněné Petriho misce pomocí dvojice skalpelů a byly vybrány folikuly o průměru 3-7 mm, které byly přeneseny do čistého PBS/PVA. Pod binolupou byly jednotlivé folikuly zbaveny přebytečné tkáně pomocí hodinářských pinzet. To umožnilo pohled do dutiny folikulu díky odhalené průsvitné folikulární stěně. Folikuly byly vybírány podle vnitřní struktury vrstev granulárních buněk, jejich případných malformací a na základě čirosti folikulární tekutiny. Dalším kritériem bylo pevné spojení mezi kumulárními buňkami, které těsně obalují oocyt a

granulózními buňkami stěny folikulu. Pokud se oocyt volně vznášel ve folikulární tekutině, byl tento folikul vyřazen.

Folikuly odpovídající požadavkům byly přeneseny do malé Petriho misky s manipulačním médiem. Hodinářskými pinzetami byl postupně každý folikul roztržen a oocyt byl opatrně oddělen od stěny folikulu. Takto získané oocyty, které vykazovaly kompaktní vícevrstvý obal kumulárních buněk, byly maturovány v médiu M199.

4.4.2 Maturace oocytů

Izolované a selektované oocyty byly maturovány v 500 ml média M199 ve čtyřjamkové destičce. Maturace probíhala v inkubátoru při teplotě 38,5°C a 5% atmosféře CO₂. Pro zpomalení výměny plynů během manipulace mimo inkubátor bylo médium v destičce převrstveno parafinovým olejem. Oocyty byly maturovány 44-48 hodin od vložení do inkubátoru (Krylov et al. 2005).

4.4.3 Odstranění kumulárních buněk

Pro další použití oocytů po maturaci je nutné odstranění přilehlých expandovaných kumulárních buněk.

Do média M199 s oocyty bylo přidáno 25 µl roztoku hyaluronidázy na dobu 5-7 minut. Poté byly oocyty kapilárou přeneseny do kapky manipulačního média překrytého parafinovým olejem a vytemperovaného na 38°C. Oocyty byly protahovány kapilárou, jejíž průměr ústí odpovídal průměru oocytu, čímž došlo k mechanickému odstranění kumulárních buněk. Odstranění bylo prováděno pod binolupou a v této fázi bylo možné pozorovat přítomnost 2. PB, což odpovídá stadiu MII.

Odstraněním kumulu bylo možné provést další selekci oocytů. Tento výběr probíhal na základě pozorování struktury cytoplazmy a morfologie oocytu. Pro oplození byly vybrány pouze oocyty, které měly rovnoměrně rozloženou cytoplazmu bez zvětšených tukových granul a viditelné 2. PB.

4.4.4 Příprava spermií

Před oplozením metodou IVF i ICSI byly spermie připravovány stejným způsobem. Spermie byly získány jako klasická inseminační dávka pro prasnice a to dodávkou z chovné stáje. Po doručení byly spermie udržovány v teplotě 17°C až do jejich přípravy, která probíhala těsně před oplozením.

Do zkumavky bylo odebráno 15 ml resuspendovaného inseminačního roztoku. Spermie byly sedimentovány centrifugací při přetížení 700 g po dobu 5 minut. Vzniklý

supernatant byl odsát na objem 0,75-1 ml a v tomto zbylém roztoku byly spermie resuspendovány. Takto koncentrované spermie byly opatrně navrstveny na gradient Percollu. Ten byl připraven v 10ml zkumavce podvrstvením 5 ml 40% Percollu 2 ml 80% Percollu. Zkumavka s Percollem a navrstvenými spermii byla centrifugována 15 minut při 700 g. Tento gradient sloužil k oddělení živých a mrtvých spermii na základě rozdílné hustoty. Po centrifugaci bylo odsáto vše kromě sedimentu na dně zkumavky. K sedimentu byl přidán 1 ml PBS/PVA a pomocí pipety byly spermie resuspendovány. Poté byly spermie promyty od zbytků Percollu a to doplněním na 10 ml roztokem PBS/PVA, 5 minutami centrifugace při 700 g, odsátím supernatantu a resuspendováním v 1 ml čistého PBS/PVA. Tento postup byl proveden dvakrát. Suspenze spermii byla poté přenesena zpět do 17°C. Koncentrace spermii byla zjištěna pomocí Bürkerovy komůrky aplikací 100 x vodou ředěné suspenze (voda způsobila imobilizaci spermii).

4.4.5 Příprava kapilár a mikromanipulátoru pro ICSI

Během experimentů prováděných v rámci této diplomové práce byly použity komerčně dostupné holdingové kapiláry od firmy Microtech IVF s.r.o. Injekční kapiláry byly připravovány ze skleněných kapilár značky Drummond na vytahovači kapilár, který jsem mohl používat ve Výzkumném ústavu živočišné výroby, v.v.i.

Na skleněné kapiláře byl nejprve pomocí vytahovačku vytvořen hrot, který byl na otavovačce kapilár ulomen v místě, kde průměr zužující se špičky kapiláry byl 8-10 μm . Tento okraj byl následně ohnut v úhlu 25-30° pomocí natavení kapiláry. Délka ohnuté části byla 120-150 μm .

Holdingová i injekční kapilára byly upevněny do držáků mikromanipulátoru a naplněny minerálním olejem. Do injekční kapiláry bylo vpraveno před olejem malé množství rtuti. Holdingová kapilára byla nastavena tak, aby její konec, taktéž ohnutý v úhlu 30°, byl ve vodorovné poloze. Konec injekční kapiláry byl nastaven v 5° úhlu směrem dolů, což je důležité pro imobilizaci spermie pomocí zlomení jejího bičíku hrotem kapiláry. Podle množství rtuti a průměru injekční kapiláry byla poté nastavena ovládací jednotka piezo-aktuátoru na nejmenší intenzitu a rychlost, při které byly vytvářené pulsy dostatečné pro penetraci ZP.

4.4.6 ICSI

Při vlastním oplození pomocí ICSI jde o co možná nejrychlejší provedení, jelikož se tím minimalizuje čas, který oocyt tráví v suboptimálních podmínkách mimo inkubátor. Pro zmírnění těchto podmínek je mikromanipulátor (Obrázek 3) osazen vyhřívanou destičkou a

oocyty jsou v průběhu oplození umístěny v jednotlivých kapkách manipulačního média překrytých parafinovým olejem, který brání jejich odpařování.

Spermie o známé koncentraci v roztoku PBS/PVA byly naředěny do mTBM(ICSI) média na koncentraci 2×10^6 /ml. V tomto médiu byly ponechány 30 minut v inkubátoru při teplotě $38,5^\circ\text{C}$ a 5% atmosféře CO_2 , aby u nich proběhla kapacitace. Ta je vyvolána díky vysoké koncentraci Ca^{2+} iontů v médiu a změně teploty.

Očištěné oocyty byly umístěny po dvou až třech do 10 μl kapek manipulačního média na připravené Petriho misce, respektive na jejím víčku. Dále byly na misku umístěny dvě 5 μl kapky PVP, do kterých byly po kapacitaci přidány spermie. Roztok spermií byl přidán v objemu 5 μl , takže výsledná koncentrace činila 1×10^6 /ml.



Obrázek 3: Mikroskop osazený mikromanipulátorem. V detailu dobře viditelný piezo aktuátor (bílý váleček) a držáky s kapilárami. Pohyb těchto kapilár je ovládán pomocí joysticků viditelných na celkovém pohledu.

Takto připravená miska byla umístěna pod mikromanipulátor. Spermii byl vždy přímo před oplozením zlomen bičík pomocí rychlého pohybu injekční kapiláry a to přibližně v první třetině jeho délky. Spermie byla nasáta do injekční kapiláry. Kapilára byla protažena kapkou manipulačního média bez oocytů, aby se zbavila případných vně nalepených spermií. Poté byla kapilára přesunuta k danému oocytu. Pomocí holdingové kapiláry byl oocyt zafixován a natočen do správné polohy. Poté byla silnými pulzy injekční kapiláry penetrována ZP. Po odstranění zátky, tvořené ZP, z ústí kapiláry mimo oocyt, bylo jedním slabým pulzem proniknuto přes oolemu. Průnik byl veden až do dvou třetin průměru oocytu, kde byla potvrzena penetrace nasátím minimálního množství ooplazmy. Následně byla

injikována spermie a kapilára byla vytažena. Při správném provedení se oolema okamžitě zacelila a nedocházelo k výronu cytoplazmy.

Po oplození všech oocytů na misce došlo k jejich přenesení do 500 μ l média PZM3 překrytého olejem ve čtyřjamkové destičce.

4.4.7 Kultivace po oplození metodou ICSI

Pro zavedení metody ICSI v nové laboratoři bylo nejdříve nutné ověřit její úspěšnost a zjistit schopnost vývoje embryí až do stádia blastocysty. K tomuto účelu byly oocyty po oplození metodou ICSI kultivovány po dobu max. jednoho týdne a pravidelně sledovány pod binolupou. Inkubace po oplození v rámci všech experimentů probíhala vždy v 38,5°C a 5% atmosféře CO₂.

4.4.8 Inkubace s inhibítorem proteazomálního komplexu MG132

4.4.8.1 Vliv MG 132 na dekondezaci spermie a tvorbu prvojader

Oocyty byly po oplození rozděleny na dvě skupiny a inkubovány v médiu PZM3 převrstveného parafinovým olejem ve čtyřjamkové destičce. K jedné skupině byl do média přidán inhibitor MG132 v konečné koncentraci 10 μ M. Obě tyto skupiny byly inkubovány po dobu 18 hodin nebo 24 hodin po oplození. Po této době byla embrya i neoplozené oocyty fixovány 4% formaldehydem a barveny pomocí DAPI.

4.4.8.2 Časný embryonální vývoj po odstranění inhibitoru MG132

Oocyty, ve dvou skupinách, byly po oplození inkubovány po dobu 18-19 hodin. U jedné byl do média přidán inhibitor MG132 (výsledná koncentrace 10 μ M). Po dané době byly oocyty/embrya obou skupin promyty třikrát po 5 minutách v kapkách čistého PZM3. Následně byly inkubovány dalších 48 hodin v 500 μ l PZM3 pod olejem. Úspěšnost oplození a případné vývojové stadium oocytů bylo analyzováno pod mikroskopem nebo pomocí fluorescenčního značení DAPI po fixaci 4% formaldehydem. Skupiny hodnocené pod klasickým mikroskopem byly ponechány v médiu a inkubovány celkově 7 dní po oplození. Poté byly fixovány a barveny stejným postupem výše.

4.4.8.3 Odložené přidání inhibitoru

Oocyty rozdělené do dvou skupin byly po oplození inkubovány 3 hodiny v oddělených jamkách v 500 μ l PZM3 pod olejem. Poté byl k jedné skupině přidán inhibitor MG132 v konečné koncentraci 10 μ M. Oplozené oocyty byly následně inkubovány dalších 21 hodin a poté fixovány 4% formaldehydem a barveny DAPI.

4.4.9 IVF

V rámci klasického *in vitro* oplození byly použity oocyty získané aspirační metodou. Spermie v PBS/PVA o známé koncentraci byly naředěny do média mTBM(IVF) na koncentraci 5×10^5 /ml. Do dvou jamek na čtyřjamkové destičce bylo přidáno po 500 μ l této suspenze spermií a destička byla vložena do inkubátoru na 20 minut (kapacitace spermií). Do jedné ze dvou jamek byl přidán inhibitor MG132 o výsledné koncentraci 10 μ M. Následovala inkubace dalších 10 minut. Maturované oocyty zbavené kumulárních buněk byly rozděleny do dvou skupin a přidány ke kapacitovaným spermiím. Oplození pomocí koinkubace pohlavních buněk bylo umožněno po dobu 4 hodin. Poté byly oocyty mechanicky zbaveny spermií navázaných na vnější straně ZP. Očištěné oocyty byly přeneseny do 500 μ l PZM3 převrstvených olejem ve zbylých dvou jamkách čtyřjamkové destičky. Oocyty byly přeneseny do inkubátoru na 12 hodin. Poté byly fixovány formaldehydem a barveny DAPI.

4.4.10 Samovolný partenogenetický vývoj

Po maturaci a očištění byly oocyty přeneseny rovnou do 500 μ l média PZM3 převrstveného olejem a inkubovány po dobu 4 dnů. Během této doby byl pravidelně pozorován jejich vzhled.

4.4.11 Fixace a barvení

4.4.11.1 Fixace roztokem formaldehydu

Oocyty i embrya byly fixovány pomocí 4% roztoku formaldehydu. Roztok o objemu 500 μ M byl napipetován do čtyřjamkové destičky a poté pomocí skleněné kapiláry byly do roztoku přeneseny oocyty/embrya. Fixace probíhala přes noc při pokojové teplotě.

4.4.11.2 Montování do média s DAPI

Fixované oocyty/embrya byly nejprve zbaveny veškerého formaldehydu pomocí propláchnutí 3x po 5 minutách v kapkách PBS. Po tomto kroku byly oocyty/embrya přeneseny v minimálním množství PBS do 4 μ l montovacího média s DAPI na podložním sklíčku a uzavřeny krycím sklíčkem.

4.4.11.3 Vizualizace extracelulárního Ub na spermiích

Krycí sklíčko bylo v jamce čtyřadvacetijamkové destičky překryto 150 μ l roztoku poly-L-lysinu a inkubováno po dobu 30 minut na plotýnce ohřáté na 38°C. Poté bylo 2x opláchnuto TK H₂O. Přebytková voda byla odsáta. Na takto potažená sklíčka bylo napipetováno 250 μ l

suspenze spermií o koncentraci 1×10^7 /ml v PBS. Po 15 minutách inkubace bylo sklíčko opláchnuto 2x PBS a přeneseno do fixáže tvořené 400 μ l 4%formaldehydu na dobu 30 minut. Po fixaci bylo sklíčko 3x opláchnuto PBS. Následovalo 25 minut blokování v 300 μ l 5% NGS. Inkubace blokových spermií s primární protilátkou proti Ub ředěnou 1:100 v 1% NGS probíhala 1 hodinu. Následoval 3x 5 minut oplach 1% NGS, inkubace se sekundární protilátkou ředěnou 1:250 po dobu 1 hodiny a opět 3x 5 minut oplach v 1% NGS. Krycí sklíčko bylo poté umístěno na podložní sklíčko, stranou s přichycenými spermii dolů, s 5 μ l montovacího média s DAPI.

5 Výsledky

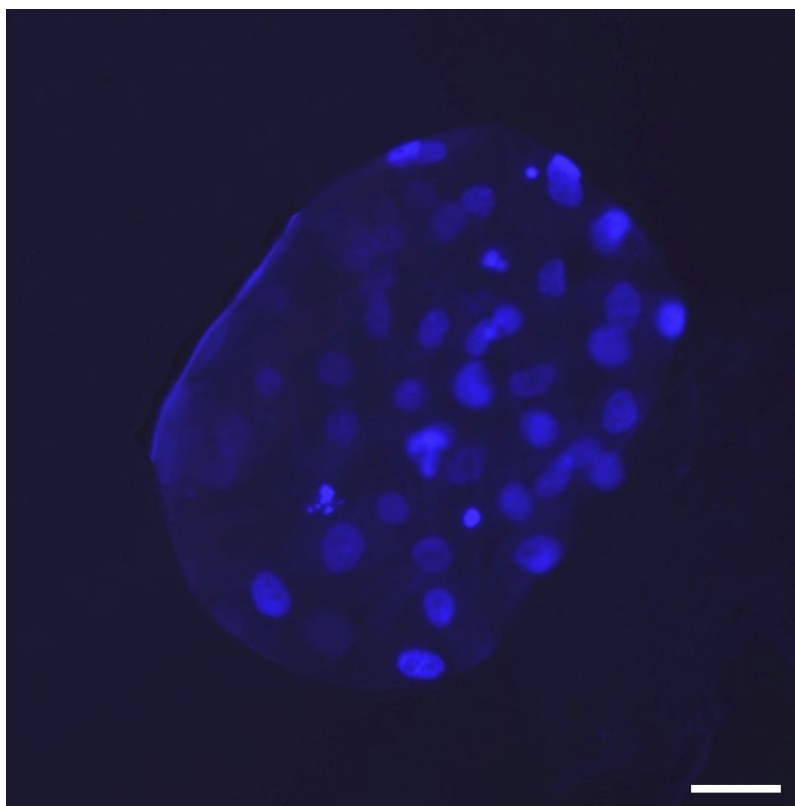
5.1 Ustanovení metody ICSI v nové laboratoři

Po dlouhodobém zapůjčení mikroskopu s mikromanipulátorem z České zemědělské univerzity bylo nutné nejdříve ustanovit tuto techniku v podmínkách laboratoře na katedře Buněčné a vývojové biologie PřF UK.

5.1.1 Maturace oocytů

Tento krok nepředstavoval v našem případě velký problém a bylo dosaženo velmi dobré úrovně maturace.

Vyhodnocení úspěšnosti maturace bylo prováděno pod binolupou pomocí sledování vyloučení 1. pólového tělíska (1.PB). Doba maturace před vyhodnocením se pohybovala mezi 44 až 46 hodinami, což odpovídá času, ve kterém se začíná provádět ICSI. Z celkového počtu 941 izolovaných a selektovaných oocytů 89,9% dosáhlo stádia metafáze II.



Obrázek 4: Embryo ve stadiu blastocysty. Měřítko 20 μm .

5.1.2 Vývoj po ICSI

Před vlastním provedením ICSI byly oocyty selektovány. Selektce probíhala na základě subjektivního vyhodnocení morfologie oocyty v rámci skupiny oocytů ve stadiu MII. Byla pozorována struktura a rozložení cytoplazmy v oocyty. Při zjištění odchylek od standardní morfologie byl oocyt z pokusu vyřazen. Pro všechny pokusy byly použity pouze oocyty ze skupin, kde úspěšnost maturace byla lepší než 80%. Do takto vybraných oocytů byla injikována spermie a následně byly kultivovány. Vyhodnocení probíhalo průběžně během celého vývoje pod světelným mikroskopem a po ukončení kultivace pomocí fluorescenčního mikroskopu (Obrázek 4).

V tabulce (Tabulka 1) jsou uvedena stadia, ve kterých se embrya nacházela do 48 hodinách a po 7 dnech od oplození. Pro vyhodnocení bylo sledováno 100 oocytů/embryí ve stadiu po 48 hodinách a 63 ve stadiu po 7 dnech (počet opakování 10 a 6).

Tabulka 1: Počet embryí v jednotlivých stádiích časného vývoje po uvedené době inkubace. Údaje v závorkách vyjadřují celkovou procentuální četnost daného stádia. Poslední sloupec tvoří fragmentovaná embrya.

	bez vývoje	2-b.	4-b.	8-b.	morula	blastocysta	fragment.
48 hodin	28 (27%)	20 (20%)	41 (41%)	11 (11%)	0	0	0
7 dní	4 (6%)	12 (19%)	6 (10%)	11 (17%)	10 (16%)	10 (16%)	10 (16%)

5.1.2.1 Partenogenetický vývoj

U oocytů maturovaných do stadia MII může docházet i k samovolné partenogenetické aktivaci. V tomto případě se oocyt začne dělit a jeho vývoj může dospět až do stadia, které se podobá embryu ve stadiu blastocysty (Krylov et al. 2005). Ve většině případů potřebuje oocyt pro zahájení partenogeneze aktivací signál, v *in vitro* podmínkách se nejčastěji používá elektrický pulz, ale dochází i samovolné aktivaci. Samovolně aktivované oocyty poté mohou zkreslovat výsledky oplození. Metoda ICSI může aktivaci oocytů napomáhat penetrací oolemy a injekcí média s obsahem Ca^{2+} .

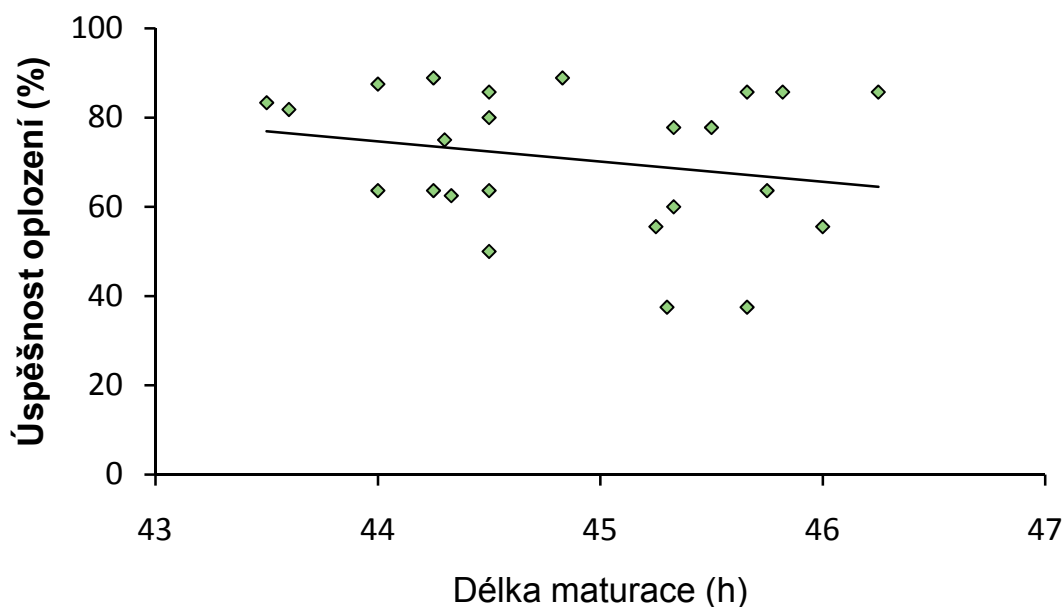
U maturovaných oocytů ve stadiu MII byla definována četnost této samovolné aktivace pomocí kultivace za stejných podmínek, jaké měly oplozené oocyty po ICSI. Ve 12% případů bylo po 24 hodinách této kultivace pozorováno rozdělení oocyty do stadia

zaměnitelného s oplozeným oocytem. Tento výsledek nebyl statisticky ověřován z důvodu malého souboru dat a doplňkového charakteru experimentu.

5.1.2.2 Časové rozložení metody ICSI

Oplození metodou ICSI se nejčastěji provádí mezi 44-46 hodinou od zahájení maturace. Sledováním délky maturace v průběhu všech pokusů bylo možné analyzovat, zda její doba má vliv na úspěšnost oplození. Úspěšnost oplození byla v tomto případě určována detekcí prvojadér nebo rozdělením embrya v rámci jednotlivých experimentů. Do tohoto vyhodnocení nebyly zahrnuty oocyty inkubované po ICSI v médiu s inhibítorem MG132.

Úspěšnosti oplození v závislosti na délce maturace byla vynesena do grafu (Graf 1). Proložená přímka lineární regrese byla analyzována pomocí lineárního modelu programem R (použita verze 2.6.0, <http://www.r-project.org>). Míra signifikance pro tuto přímku je $p=0,3017$.



Graf 1: Úspěšnost oplození oocyty v závislosti na délce maturace před oplozením. Hodnoty jsou průměry úspěšnosti v jednotlivých opakováních.

5.2 Vliv inhibitoru MG132 na časný embryonální vývoj

5.2.1 Ověření funkčnosti inhibitoru

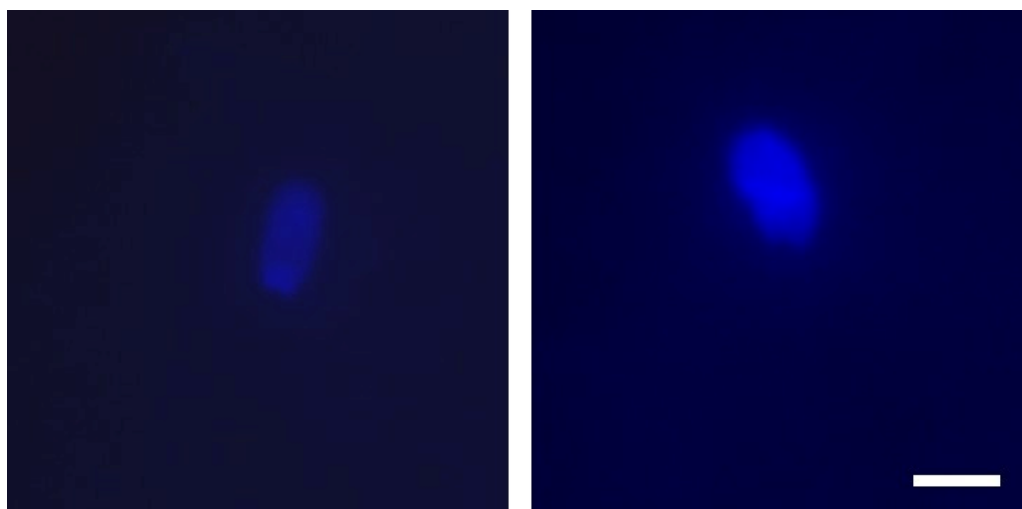
Potvrzení inhibice UPS pomocí inhibitoru MG132 bylo provedeno pomocí oplození metodou IVF. U této metody je velmi dobře zdokumentován účinek této inhibice

(Zimmerman et al. 2011). Spermie v přítomnosti inhibitoru nejsou schopné penetrovat ZP a úspěšnost oplození je nulová.

Výsledky provedených experimentů metodou IVF byly v naprosté shodě s výsledky jiných laboratoří. K oplození touto metodou nedošlo u žádného z námi zkoumaných oocytů. Paralelně byla metoda IVF prováděna s oocyty v médiu bez inhibitoru, kde úspěšnost oplození byla 40%.

5.2.2 Rozpoznání spermie oocytem po ICSI

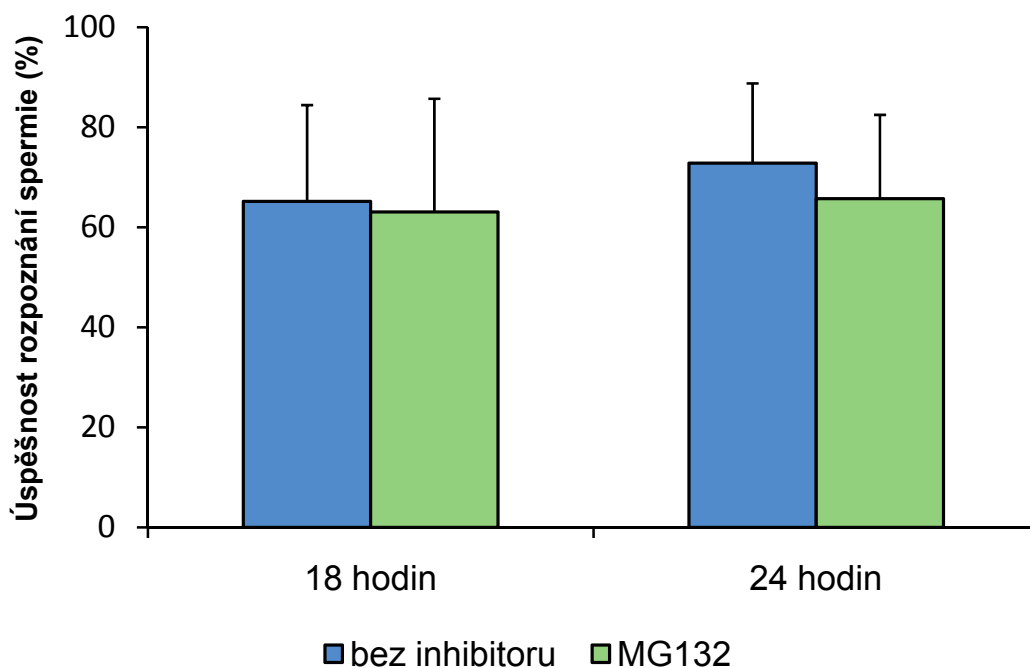
Rozpoznání spermie oocytem a jeho aktivace po oplození bylo sledováno ve dvou paralelních skupinách oplozených oocytů, s inhibitorem MG132 a bez inhibitoru. Samčí i samičí prvojádru je v *in vivo* podmínkách vytvořeno 16-18hodin po oplození. Oocyty byly po oplození inkubovány po 18 hodin nebo 24 hodin, poté byly fixovány a barveny. V obou skupinách byl vyhodnocen počet embryí, kde již došlo k prokazatelnému rozpoznání a dekonduzaci spermie. U skupiny s inhibitorem se spermie mohly nacházet i ve stádiu částečné nebo časně dekonduzace, kdy byla pozorovatelná změna morfologie hlavičky spermie (Obrázek 5).



Obrázek 5: Porovnání intaktní spermie a spermie v časně dekonduzaci, kde je patrné zvětšení hlavičky spermie. Měřítko 10 μm .

Průměrné hodnoty z obou skupin jsou vyneseny do grafu (Graf 2). Pro tento experiment bylo vyhodnoceno 155 oocytů/embryí ve skupině fixované po 18 hodinách (v rámci 9 opakování) a 161 oocytů/embryí fixovaných po 24 hodinách (také v rámci 9 opakování). Úspěšnosti rozpoznání byly velmi podobné. Skupiny vyhodnocované po 18 hodinách vykazovaly rozpoznanou spermii v 65% případů při inkubaci bez inhibitoru a v 63% případů u kultivace s MG132. Při fixaci po 24 hodinách byla rozpoznána spermie

pozorována v 72% případů ve skupinách bez přidaného inhibitoru a v 65% případů u skupin s MG132. Výsledky byly statisticky vyhodnoceny pomocí Studentova t-testu.

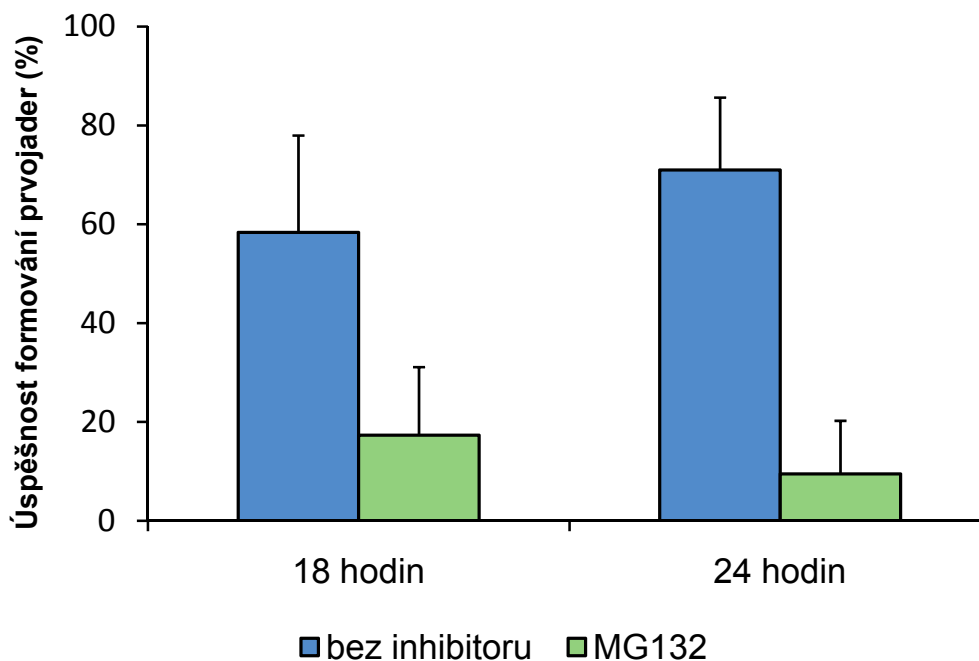


Graf 2: Průměrná úspěšnost rozpoznání spermie a zahájení dekondezace vyhodnocená u skupin fixovaných po 18 a 24 hodinách (n=9). Po dané doby byly paralelně inkubovány skupiny bez inhibitoru a s MG132. Hodnoty jsou uvedeny \pm SD.

5.2.3 Tvorba prvojader a vývoj embrya

Dalším kritickým bodem v zahájení vývoje embrya je tvorba prvojader. Vyhodnocení počtu prvojader a případných pozdějších stádií vývoje bylo provedeno ze stejných skupin oplozených oocytů jako rozpoznání spermie.

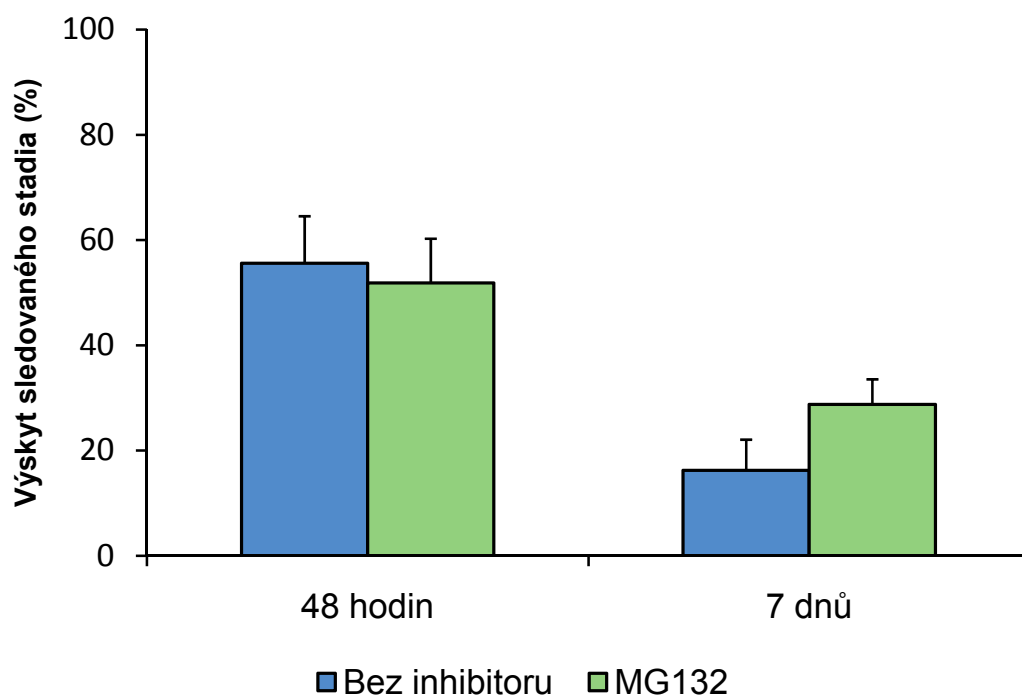
V grafu (Graf 3) jsou znázorněny rozdíly průměrů úspěšnosti tvorby prvojader a pokročilejších vývojových stádií u obou skupin. Tvorba prvojádra nebo rýhování embrya bylo u skupin bez inhibitoru pozorováno průměrně v 58% případů po 18 hodinách a v 71% případů po 24 hodinách. U skupin s MG 132 došlo k tvorbě prvojader průměrně v 17% případů po 18 hodinách a v 9% případů po 24 hodinách. Signifikance rozdílu byla ověřena Studentovým t-testem.



Graf 3: Průměrná úspěšnost formování prvojader po dané době kultivace u skupin inkubovaných s MG132 a bez něj. Hodnoty jsou uvedeny \pm SD. Signifikance rozdílů u paralelních skupin $p < 0,001$.

5.2.4 Časný embryonální vývoj po zrušení inhibice UPS

Vliv inkubace oocytů s MG132 na jejich další vývoj byl sledován díky reverzibilitě vazby tohoto inhibitoru. Po jeho odmytí byla vyhodnocována četnost rýhování embryí po 48 hodinách a byla zaznamenána vývojová stadia embryí 7 dnů po oplození. Výsledky jsou opět vyneseny do grafu (Graf 4). V tomto experimentu bylo vyhodnoceno 105 oocytů/embryí (rámci 5 opakování) pro stadium po 48 hodinách po oplození a 69 (v rámci 3 opakování) pro stadium 7 dní po oplození. Po 48 hodinách bylo úspěšné oplození pozorováno průměrně v 56% případů, ve skupinách bez inkubace s inhibitorem a průměrně v 51% případů ve skupině kultivované s MG132 počátečních 18 hodin. V době 7 dní po oplození byly vyhodnocovány embrya, která se nacházela ve stádiu moruly a blastocysty. Tato stadia byla pozorována průměrně v 16% případů, u skupin inkubovaných po celou dobu bez inhibitoru. Skupiny inkubované počátečních 18 hodin s MG132 vykazovaly tato stadia ve 26% případů. Pro rozdíly skupin byla odvozena hodnota p na základě Studentova t-testu. V případě skupin vyhodnocovaných po 7 dnech bylo $p = 0,099$



Graf 4: Průměrná úspěšnost oplození po 48 hodinách a četnost pozorování stadia moruly a blastocysty po 7 dnech od oplození. V obou časech byly hodnoceny skupiny inkubované prvních 18 hodin bez inhibitoru a skupiny inkubované tuto dobu s MG132. Hodnoty jsou uvedeny \pm SD, signifikance pro rozdíl skupin v době po 7 dnech $p=0,099$.

5.2.5 Odložené přidání inhibitoru

Do současné doby byl zkoumán vliv inhibitorů UPS na časný embryonální vývoj pouze po oplození metodou IVF (například Sutovsky et al. 2004b, Shin et al. 2010). Z důvodu neschopnosti spermie penetrovat ZP při inhibici UPS, byl daný inhibitor přidáván do média až později.

Tyto podmínky byly napodobeny přidáním MG132 do média s kultivovanými oocyty až 3 hodiny po oplození. Při tomto pokusu nebyly zjištěny žádné rozdíly v rozpoznání spermie a tvorbě prvojadér v porovnání s kontrolní skupinou. Statistické vyhodnocení nebylo provedeno z důvodu malého souboru dat.

6 Diskuze

Oplození metodou ICSI je poměrně náročné a vyžaduje jak nákladné přístrojové vybavení laboratoře, tak velmi dobrou znalost této techniky. U prasete je navíc úspěšnost této metody velmi nízká. Modifikace ICSI pomocí piezo aktuátoru přinesla jistá zlepšení, stále však je podíl kvalitních embryí poměrně malý (shrnuto Garcia-Rosello et al. 2009). Celá řada studií prováděných na praseti má za cíl možnou extrapolaci výsledků na člověka. Na druhou stranu úspěšnost oplození pomocí ICSI nedosahuje zdaleka takových hodnot, jako je tomu v klinické praxi. Nízká úspěšnost a heterogenita výsledků dělá výzkum značně komplikovaný. Oproti například myšímú modelu je problémem i získávání materiálu, jelikož převoz vaječnicků, na delší vzdálenosti z jatek do laboratoře, vnáší do experimentů další proměnné, které mohou výsledky ovlivňovat. Navíc kvalita vaječnicků, ze kterých jsou získávány oocyty pro experimenty, je závislá na celé řadě faktorů před a během porážky zvířat. Tyto aspekty vedou k rozdílným názorům na strukturu jednotlivých pracovních postupů. Téměř v každé laboratoři jsou pak tyto postupy prováděny jinak nebo s pozorností soustředěnou na různé kroky.

6.1 Zavedení metody ICSI

V rámci hledání vhodných podmínek pro metodu ICSI jsme v nové laboratoři vycházeli hlavně z osvědčeného modelu, který dlouhou dobu funguje ve Výzkumném ústavu živočišné výroby (VÚŽV, v.v.i). Maturace oocytů, která je prvním předpokladem pro úspěšné oplození, přinesla velmi dobré výsledky s tím, že po 43-46 hodinách maturace se 89,9% oocytů nacházelo ve stádiu MII.

Úspěšnost oplození a časného embryonálního vývoje dosahovala hodnot srovnatelných s jinými laboratořemi (shrnuto Garcia-Rosello et al. 2009). Výsledky této diplomové práce vykazují úspěšné oplození u 67,9% embryí. Z pohledu časného embryonálního vývoje do stádia blastocysty se literární údaje pohybují mezi 10-38% (Kim et al. 1998, shrnuto Garcia-Rosello et al. 2009). V rámci této práce bylo dosaženo úspěšnosti 17%, což je hodnota jen o 3% nižší oproti zavedené laboratoři VÚŽV. Tento rozdíl může být způsobeno delším převozem oocytů, které nejdříve putují do VÚŽV, v.v.i a poté do nové laboratoře. Nezanedbatelný vliv má samozřejmě i lidský faktor v rámci vlastního ICSI.

Časové rozložení provedení ICSI v nových podmínkách je částečně variabilní v délce maturace oocytu před oplozením. Odchyly od ideálního času jsou způsobeny hlavně přípravou mikromanipulátoru a oocytů. Úspěšnosti oplození však nevykazují signifikantní

zhoršení při delší době maturace a jejich kompetence pro oplození, během intervalu 44-46 hodin, zůstává konstantní.

6.2 Vliv inhibitoru MG132

Vzhledem k tomu, že funkční proteasomální komplex je nezbytný pro průnik spermie přes ZP (Sawada et al. 2002, Sutovsky et al. 2004b), je metoda ICSI jedinou možnou cestou jak zkoumat důsledky jeho inhibice v těsné návaznosti na oplození. Tento problém je možné obejít použitím oocytů s odstraněnou ZP, ale tento způsob výrazně méně odpovídá fyziologickým podmínkám a embrya potřebují velmi specifické podmínky pro další vývoj (Lagutina et al. 2006).

Možná souvislost mezi mírou ubiquitinace spermie a jejího rozpoznání oocytárním UPS nebyla doposud zkoumána. Dosavadní výzkum byl koncipován hlavně z pohledu sledování interakce mezi UPS spermie a ubiquitinem značených ZPP (shrnutí Sutovsky 2011). Výzkumy, které se zabývaly množstvím extracelulárního Ub na spermii jakožto markerem její kvality (Sutovsky et al. 2004a), byly vždy porovnávány s jinými metodami charakterizace spermií. Na základě těchto studií byla objevena negativní korelace mezi mírou značení spermií extracelulárním Ub a jejich kvalitou, hodnocenou úspěšností oplození. Není však jisté, jestli je toto značení rozpoznáváno oocytem. Pomocí ubiquitinového značení dochází k rozpoznávání a degradaci spermií i při jejich maturaci v epididymis (shrnutí Jones 2004). Role extracelulárního Ub neseného na povrchu spermie není v oocytu zatím objasněna.

Experimenty v této diplomové práci vycházely z hypotézy, že dochází k interakci UPS oocytu s Ub značenými proteiny v membráně spermie, z pohledu rozpoznání méně kvalitních spermií a jejich následné degradace. Tento selektivní oocytární mechanismus by se například také mohl podílet na sezónních rozdílech v úspěšnosti oplození u některých zvířat (Ciereszko et al. 2000).

Vliv inhibitoru MG132 byl nejprve zkoumán u embryí 18 hodin po oplození, kdy by měla být vytvořena prvojádra. U experimentů jiné laboratoře, kde bylo oplození provedeno metodou IVF, nebyl zjištěn žádný vliv inhibitoru MG132 na dekonduzaci spermie a na formování prvojader u prasečích embryí (Sun et al. 2004). Experimenty provedené metodou ICSI v rámci této diplomové práce však vykazovaly po 18 hodinách zformované prvojádru jen v 17% případech. V kontrolní skupině byl tento počet více než trojnásobný (58%).

Vliv inhibitorů UPS na oocyty a časný embryonální vývoj způsobuje také zpomalení maturace oocytu i dějů následujících po jeho oplození (Sutovsky et al. 2003, Ono et al. 2011). Z tohoto důvodu byla inkubace embryí před fixací prodloužena na 24 hodin.

Výsledek byl velmi podobný a formování prvojader bylo pozorováno pouze v 9% případů, oproti 71% u kontrolní skupiny.

Spermie ve skupinách s inhibitorem MG132 však vykazovaly morfologické změny hlavičky. Pro tento stav byl zaveden termín časná dekondezace. Definování časné dekondezace spermie bylo odvozeno z publikací (například Nakai et al. 2006) i z pozorování jednotlivých stádií dekondezace při polyspermním oplození (nezveřejněná data), kde byly jednotlivé rozdíly díky mnoha spermiiím v různých fázích dekondezace snadno porovnatelné.

Na základě těchto morfologických změn bylo vyhodnoceno úspěšné rozpoznání spermie a zahájení dekondezace. Výsledky úspěšnosti dosažení tohoto stádia jasně ukazují, že UPS má na tento krok poměrně malý efekt. V obou vyhodnocovaných časech sice vykazuje mírně zhoršené hodnoty, ale tento rozdíl může být zcela náhodný, což naznačuje i p -hodnota vypočtená na základě Studentova t -testu ($p=0,83$). Spermie je tedy oocyttem rozpoznána a dojde k zahájení její dekondezace nezávisle na přítomnosti či nepřítomnosti inhibitoru MG132.

Provedení metody IVF se oproti ICSI liší především nutností přidat inhibitor UPS až po oplození, kvůli penetraci ZP. Oplození probíhá po dobu několika hodin a mnoho oocytů může být oplozeno již zpočátku koinkubace se spermiiemi. Tyto podmínky byly simulovány experimentem s odloženým přidáním inhibitoru. Výsledky formování prvojader nebo dělení embryí byly v tomto případě velmi podobné při kultivaci v médiu s inhibitorem MG132 i bez něj, což odpovídá dříve publikovaným výsledkům (Sun et al. 2004).

To ukazuje na esenciální roli UPS během prvních několika hodin po oplození. Jednou z hlavních funkcí by mohla být degradace cyklinu B, který jako součást MPF (maturation promoting factor) reguluje uvolnění z 2. meiotického bloku. Případy, kdy i při inkubaci s MG132 došlo k tvorbě prvojader, je možné vysvětlit dobou strávenou v manipulačním médiu. Oplození všech oocytů metodou ICSI může trvat až 120 minut. Je tedy možné, že část embryí, oplozených v úvodu, se stačila dostat přes bod, pro který je UPS nezbytný, před jejich přenosem do kultivačního média s MG132.

Dalším experimentem bylo ověřeno zlepšení časného embryonálního vývoje díky inhibici UPS, které by odpovídalo hypotéze o existenci selekčního mechanismu oocytu závislém na míře ubiquitinace. Rozdíl v časném vývoji po 48 hodinách inkubace byl u skupiny s přidáním inhibitorem velmi malý. Signifikance rozdílu odpovídá p -hodnotě 0,32 a tento výsledek tudíž nelze brát za směrodatný. Oproti tomu při vyhodnocení vývojových stádií embryí 7 dní po oplození bylo již znatelné zlepšení četnosti pokročilých vývojových stádií o 13%, s mírou signifikance $p=0,099$. Hodnota signifikance je sice vyšší než běžně

užívaná kritická hodnota 0,05, ale vzhledem k heterogenitě výsledků, které ICSI u prasete poskytuje, není rozhodně zanedbatelná. Toto zlepšení by mohlo podporovat hypotézu, že k interakci Ub spermie a UPS oocyty opravdu dochází a to specificky v době během dekondezace spermie. Cílem dalších experimentů bude další zpřesnění těchto výsledků na větším souboru embryí.

Otázkou zůstává vliv tohoto postupu na případný další vývoj embrya a životaschopnost plodu. Zlepšením časného vývoje po oplození, obejitím případného selekčního mechanismu oocyty, může být umožněn vývoj i embryím vzniklých z méně kvalitních spermií. Negativní aspekty tohoto postupu se tak mohou objevit až v pozdějších stádiích vývoje. Na druhou stranu tento postup může přinést zlepšení do experimentů, které s implantací embryí do dělohy neoperují. Studium role UPS během prvních hodin po oplození navíc doposud není příliš prostudováno a výzkum zaměřený tímto směrem může přinést řadu zajímavých výsledků.

7 Závěry

- Byla ustanovena metoda ICSI v prostorách nové laboratoře PřF UK. Výsledky této techniky jsou z pohledu úspěšnosti ve všech krocích srovnatelné se zavedenými laboratořemi.
- Byl prokázán minimální vliv přítomnosti inhibitoru MG132 v médiu na rozpoznání spermie oocytem a zahájení dekondezace. Negativní vliv inhibitoru byl však jasně patrný při sledování úspěšnosti tvorby prvojader. Pro tento efekt je klíčové přidání inhibitoru bezprostředně po vnesení spermie do oocyty.
- Bylo pozorováno zlepšení časného embryonálního vývoje do stadia blastocysty. Toto zlepšení vykazovaly oocyty inkubované 18 hodin po ICSI s inhibitorem MG132, který byl následně odmyt.
- Tyto výsledky nepřímo indikují možnou existenci selekčního mechanismu oocyty, který je založen na funkci 26S proteazomu a je schopen rozpoznávat a možná i degradovat spermii v závislosti na míře její extracelulární ubiquitinace.

8 Seznam literatury

- Abou-haila A, Tulsiani DR.** 2009. Signal Transduction Pathways That Regulate Sperm Capacitation and the Acrosome Reaction. *Arch Biochem Biophys* 485: 72-81.
- Austin CR, Bishop MW.** 1958. Role of the Rodent Acrosome and Perforatorium in Fertilization. *Proc R Soc Lond B Biol Sci* 149: 241-248.
- Axner E.** 2006. Sperm Maturation in the Domestic Cat. *Theriogenology* 66: 14-24.
- Bedford JM.** 1998. Mammalian Fertilization Misread? Sperm Penetration of the Eutherian Zona Pellucida Is Unlikely to Be a Lytic Event. *Biol Reprod* 59: 1275-1287.
- Bedford JM.** 2006. Why Do Penetrating Sperm Create an Oblique Path in the Zona Pellucida? *Reproduction* 131: 23-25.
- Ben-Saadon R, Zaaroor D, Ziv T, Ciechanover A.** 2006. The Polycomb Protein Ring1b Generates Self Atypical Mixed Ubiquitin Chains Required for Its in Vitro Histone H2a Ligase Activity. *Mol Cell* 24: 701-711.
- Bungum M, Bungum L, Giwercman A.** 2011. Sperm Chromatin Structure Assay (Scsa): A Tool in Diagnosis and Treatment of Infertility. *Asian J Androl* 13: 69-75.
- Buschow SI, Liefhebber JM, Wubbolts R, Stoorvogel W.** 2005. Exosomes Contain Ubiquitinated Proteins. *Blood Cells Mol Dis* 35: 398-403.
- Caglar GS, Hammadeh M, Asimakopoulos B, Nikolettos N, Diedrich K, Al-Hassani S.** 2005. In Vivo and in Vitro Decondensation of Human Sperm and Assisted Reproduction Technologies. *In Vivo* 19: 623-630.
- Ciereszko A, Ottobre JS, Glogowski J.** 2000. Effects of Season and Breed on Sperm Acrosin Activity and Semen Quality of Boars. *Anim Reprod Sci* 64: 89-96.
- Daino H, et al.** 2000. Induction of Apoptosis by Extracellular Ubiquitin in Human Hematopoietic Cells: Possible Involvement of Stat3 Degradation by Proteasome Pathway in Interleukin 6-Dependent Hematopoietic Cells. *Blood* 95: 2577-2585.
- Einspanier R, Schuster H, Schams D.** 1993. A Comparison of Hormone Levels in Follicle-Lutein-Cysts and in Normal Bovine Ovarian Follicles. *Theriogenology* 40: 181-188.

- Eisenbach M, Giojalas LC.** 2006. Sperm Guidance in Mammals - an Unpaved Road to the Egg. *Nat Rev Mol Cell Biol* 7: 276-285.
- Fenteany G, Schreiber SL.** 1998. Lactacystin, Proteasome Function, and Cell Fate. *J Biol Chem* 273: 8545-8548.
- Flesch FM, Gadella BM.** 2000. Dynamics of the Mammalian Sperm Plasma Membrane in the Process of Fertilization. *Biochim Biophys Acta* 1469: 197-235.
- French M, Swanson K, Shih SC, Radhakrishnan I, Hicke L.** 2005. Identification and Characterization of Modular Domains That Bind Ubiquitin. *Methods Enzymol* 399: 135-157.
- Fu H, Lin YL, Fatimababy AS.** 2010. Proteasomal Recognition of Ubiquitylated Substrates. *Trends Plant Sci* 15: 375-386.
- Fujimoto S, Yoshida N, Fukui T, Amanai M, Isobe T, Itagaki C, Izumi T, Perry AC.** 2004. Mammalian Phospholipase C ζ Induces Oocyte Activation from the Sperm Perinuclear Matrix. *Dev Biol* 274: 370-383.
- Gao M, Karin M.** 2005. Regulating the Regulators: Control of Protein Ubiquitination and Ubiquitin-Like Modifications by Extracellular Stimuli. *Mol Cell* 19: 581-593.
- Garcia-Rosello E, Garcia-Mengual E, Coy P, Alfonso J, Silvestre MA.** 2009. Intracytoplasmic Sperm Injection in Livestock Species: An Update. *Reprod Domest Anim* 44: 143-151.
- Gosden R, Lee B.** 2010. Portrait of an Oocyte: Our Obscure Origin. *J Clin Invest* 120: 973-983.
- Goudet G, Mugnier S, Callebaut I, Monget P.** 2008. Phylogenetic Analysis and Identification of Pseudogenes Reveal a Progressive Loss of Zona Pellucida Genes During Evolution of Vertebrates. *Biol Reprod* 78: 796-806.
- Han YM, Abeydeera LR, Kim JH, Moon HB, Cabot RA, Day BN, Prather RS.** 1999. Growth Retardation of Inner Cell Mass Cells in Polyspermic Porcine Embryos Produced in Vitro. *Biol Reprod* 60: 1110-1113.
- Hershko A, Ciechanover A.** 1998. The Ubiquitin System. *Annu Rev Biochem* 67: 425-479.
- Hicke L, Dunn R.** 2003. Regulation of Membrane Protein Transport by Ubiquitin and Ubiquitin-Binding Proteins. *Annu Rev Cell Dev Biol* 19: 141-172.

- Hicke L, Schubert HL, Hill CP.** 2005. Ubiquitin-Binding Domains. *Nat Rev Mol Cell Biol* 6: 610-621.
- Howes L, Jones R.** 2002. Interactions between Zona Pellucida Glycoproteins and Sperm Proacrosin/Acrosin During Fertilization. *J Reprod Immunol* 53: 181-192.
- Chan CP, Gupta S, Mark GE.** 1999. Identification of Linear Surface Epitopes on the Guinea Pig Sperm Membrane Protein Ph-20. *Life Sci* 64: 1989-2000.
- Chen D, Kon N, Li M, Zhang W, Qin J, Gu W.** 2005. Arf-Bp1/Mule Is a Critical Mediator of the Arf Tumor Suppressor. *Cell* 121: 1071-1083.
- Izzi L, Attisano L.** 2004. Regulation of the Tgfbeta Signalling Pathway by Ubiquitin-Mediated Degradation. *Oncogene* 23: 2071-2078.
- Jegou A, Ziyat A, Barraud-Lange V, Perez E, Wolf JP, Pincet F, Gourier C.** 2011. Cd9 Tetraspanin Generates Fusion Competent Sites on the Egg Membrane for Mammalian Fertilization. *Proc Natl Acad Sci U S A* 108: 10946-10951.
- Jones R.** 2004. Sperm Survival Versus Degradation in the Mammalian Epididymis: A Hypothesis. *Biol Reprod* 71: 1405-1411.
- Katayama M, Sutovsky P, Yang BS, Cantley T, Rieke A, Farwell R, Oko R, Day BN.** 2005. Increased Disruption of Sperm Plasma Membrane at Sperm Immobilization Promotes Dissociation of Perinuclear Theca from Sperm Chromatin after Intracytoplasmic Sperm Injection in Pigs. *Reproduction* 130: 907-916.
- Kim NH, Lee JW, Jun SH, Lee HT, Chung KS.** 1998. Fertilization of Porcine Oocytes Following Intracytoplasmic Spermatozoon or Isolated Sperm Head Injection. *Mol Reprod Dev* 51: 436-444.
- Kingman A, Albertini T, Brown LJ.** 1998. Mercury Concentrations in Urine and Whole Blood Associated with Amalgam Exposure in a Us Military Population. *J Dent Res* 77: 461-471.
- Kloetzel PM, Ossendorp F.** 2004. Proteasome and Peptidase Function in Mhc-Class-I-Mediated Antigen Presentation. *Curr Opin Immunol* 16: 76-81.
- Knox RV.** 2005. Recruitment and Selection of Ovarian Follicles for Determination of Ovulation Rate in the Pig. *Domest Anim Endocrinol* 29: 385-397.
- Kren R, Kikuchi K, Nakai M, Miyano T, Ogushi S, Nagai T, Suzuki S, Fulka J, Fulka J, Jr.** 2003. Intracytoplasmic Sperm Injection in the Pig: Where Is the Problem? *J Reprod Dev* 49: 271-273.

- Krylov V, Kren R, Okada K, Vackova I, Tlapakova T, Fulka J.** 2005. Effect of Protein Supplement Source on Porcine Oocyte Maturation and Subsequent Embryonic Development after Parthenogenetic Activation. *Folia Biol (Praha)* 51: 29-33.
- Lagutina I, Lazzari G, Galli C.** 2006. Birth of Cloned Pigs from Zona-Free Nuclear Transfer Blastocysts Developed in Vitro before Transfer. *Cloning Stem Cells* 8: 283-293.
- Lee, Goldberg AL.** 1998. Proteasome Inhibitors: Valuable New Tools for Cell Biologists. *Trends Cell Biol* 8: 397-403.
- Lee, Tian XC, Yang X.** 2003a. Failure of Male Pronucleus Formation Is the Major Cause of Lack of Fertilization and Embryo Development in Pig Oocytes Subjected to Intracytoplasmic Sperm Injection. *Biol Reprod* 68: 1341-1347.
- Lee, Yang X.** 2004a. Factors Affecting Fertilization of Porcine Oocytes Following Intracytoplasmic Injection of Sperm. *Mol Reprod Dev* 68: 96-102.
- Lee JW, Tian XC, Yang X.** 2003b. Failure of Male Pronucleus Formation Is the Major Cause of Lack of Fertilization and Embryo Development in Pig Oocytes Subjected to Intracytoplasmic Sperm Injection. *Biol Reprod* 68: 1341-1347.
- Lee JW, Yang X.** 2004b. Factors Affecting Fertilization of Porcine Oocytes Following Intracytoplasmic Injection of Sperm. *Mol Reprod Dev* 68: 96-102.
- Lippert TH, Seeger H, Schieferstein G, Voelter W.** 1993. Immunoreactive Ubiquitin in Human Seminal Plasma. *J Androl* 14: 130-131.
- Liu, Li X, Thompson D, Wooding K, Chang TL, Tang Z, Yu H, Thomas PJ, DeMartino GN.** 2006. Atp Binding and Atp Hydrolysis Play Distinct Roles in the Function of 26s Proteasome. *Mol Cell* 24: 39-50.
- Liu, Moor RM.** 1997. Factors Affecting Electrical Activation of Porcine Oocyte Matured in Vitro. *Anim Reprod Sci* 48: 67-80.
- Majetschak M.** 2011. Extracellular Ubiquitin: Immune Modulator and Endogenous Opponent of Damage-Associated Molecular Pattern Molecules. *J Leukoc Biol* 89: 205-219.
- Mizuno K, Hoshi K, Huang T.** 2002. Fertilization and Embryo Development in a Mouse Icsi Model Using Human and Mouse Sperm after Immobilization in Polyvinylpyrrolidone. *Hum Reprod* 17: 2350-2355.
- Morales P, Kong M, Pizarro E, Pasten C.** 2003. Participation of the Sperm Proteasome in Human Fertilization. *Hum Reprod* 18: 1010-1017.

- Morozumi K, Shikano T, Miyazaki S, Yanagimachi R.** 2006. Simultaneous Removal of Sperm Plasma Membrane and Acrosome before Intracytoplasmic Sperm Injection Improves Oocyte Activation/Embryonic Development. *Proc Natl Acad Sci U S A* 103: 17661-17666.
- Mukhopadhyay D, Riezman H.** 2007. Proteasome-Independent Functions of Ubiquitin in Endocytosis and Signaling. *Science* 315: 201-205.
- Muratori M, Marchiani S, Forti G, Baldi E.** 2005. Sperm Ubiquitination Positively Correlates to Normal Morphology in Human Semen. *Hum Reprod* 20: 1035-1043.
- Myung J, Kim KB, Crews CM.** 2001. The Ubiquitin-Proteasome Pathway and Proteasome Inhibitors. *Med Res Rev* 21: 245-273.
- Nakai M, Kashiwazaki N, Takizawa A, Maedomari N, Ozawa M, Noguchi J, Kaneko H, Shino M, Kikuchi K.** 2006. Morphologic Changes in Boar Sperm Nuclei with Reduced Disulfide Bonds in Electrostimulated Porcine Oocytes. *Reproduction* 131: 603-611.
- Nomikos M, Elgmati K, Theodoridou M, Calver BL, Nounesis G, Swann K, Lai FA.** 2011. Phospholipase C{Zeta} Binding to Ptdins(4,5)P2 Requires the Xy-Linker Region. *J Cell Sci* 124: 2582-2590.
- Ogunjimi AA, Briant DJ, Pece-Barbara N, Le Roy C, Di Guglielmo GM, Kavsak P, Rasmussen RK, Seet BT, Sicheri F, Wrana JL.** 2005. Regulation of Smurf2 Ubiquitin Ligase Activity by Anchoring the E2 to the Hect Domain. *Mol Cell* 19: 297-308.
- Ono T, Mizutani E, Li C, Yamagata K, Wakayama T.** 2011. Offspring from Intracytoplasmic Sperm Injection of Aged Mouse Oocytes Treated with Caffeine or Mg132. *Genesis* 49: 460-471.
- Oren-Benaroya R, Orvieto R, Gakamsky A, Pinchasov M, Eisenbach M.** 2008. The Sperm Chemoattractant Secreted from Human Cumulus Cells Is Progesterone. *Hum Reprod* 23: 2339-2345.
- Ozanon C, Chouteau J, Sutovsky P.** 2005. Clinical Adaptation of the Sperm Ubiquitin Tag Immunoassay (Suti): Relationship of Sperm Ubiquitylation with Sperm Quality in Gradient-Purified Semen Samples from 93 Men from a General Infertility Clinic Population. *Hum Reprod* 20: 2271-2278.

- Palermo G, Joris H, Devroey P, Van Steirteghem AC.** 1992. Pregnancies after Intracytoplasmic Injection of Single Spermatozoon into an Oocyte. *Lancet* 340: 17-18.
- Pickart CM.** 2001. Mechanisms Underlying Ubiquitination. *Annu Rev Biochem* 70: 503-533.
- Pisitkun T, Shen RF, Knepper MA.** 2004. Identification and Proteomic Profiling of Exosomes in Human Urine. *Proc Natl Acad Sci U S A* 101: 13368-13373.
- Reid AT, Redgrove K, Aitken RJ, Nixon B.** 2011. Cellular Mechanisms Regulating Sperm-Zona Pellucida Interaction. *Asian J Androl* 13: 88-96.
- Saitoh Y, Sawada H, Yokosawa H.** 1993. High-Molecular-Weight Protease Complexes (Proteasomes) of Sperm of the Ascidian, *Halocynthia Roretzi*: Isolation, Characterization, and Physiological Roles in Fertilization. *Dev Biol* 158: 238-244.
- Sakai N, Sawada H, Yokosawa H.** 2003. Extracellular Ubiquitin System Implicated in Fertilization of the Ascidian, *Halocynthia Roretzi*: Isolation and Characterization. *Dev Biol* 264: 299-307.
- Sawada H, Sakai N, Abe Y, Tanaka E, Takahashi Y, Fujino J, Kodama E, Takizawa S, Yokosawa H.** 2002. Extracellular Ubiquitination and Proteasome-Mediated Degradation of the Ascidian Sperm Receptor. *Proc Natl Acad Sci U S A* 99: 1223-1228.
- Semple CA.** 2003. The Comparative Proteomics of Ubiquitination in Mouse. *Genome Res* 13: 1389-1394.
- Shin SW, et al.** 2010. Inhibition of the Ubiquitin-Proteasome System Leads to Delay of the Onset of Zga Gene Expression. *J Reprod Dev* 56: 655-663.
- Strehler E, Baccetti B, Sterzik K, Capitani S, Collodel G, De Santo M, Gambera L, Piomboni P.** 1998. Detrimental Effects of Polyvinylpyrrolidone on the Ultrastructure of Spermatozoa (*Notulae Seminologicae* 13). *Hum Reprod* 13: 120-123.
- Sun, Allis CD.** 2002. Ubiquitination of Histone H2b Regulates H3 Methylation and Gene Silencing in Yeast. *Nature* 418: 104-108.
- Sun, Fuchimoto D, Nagai T.** 2004. Regulatory Roles of Ubiquitin-Proteasome Pathway in Pig Oocyte Meiotic Maturation and Fertilization. *Theriogenology* 62: 245-255.

- Sutovsky P.** 2003. Ubiquitin-Dependent Proteolysis in Mammalian Spermatogenesis, Fertilization, and Sperm Quality Control: Killing Three Birds with One Stone. *Microsc Res Tech* 61: 88-102.
- Sutovsky P.** 2011. Sperm Proteasome and Fertilization. *Reproduction* 142: 1-14.
- Sutovsky P, Hauser R, Sutovsky M.** 2004a. Increased Levels of Sperm Ubiquitin Correlate with Semen Quality in Men from an Andrology Laboratory Clinic Population. *Hum Reprod* 19: 628-638.
- Sutovsky P, Manandhar G, McCauley TC, Caamano JN, Sutovsky M, Thompson WE, Day BN.** 2004b. Proteasomal Interference Prevents Zona Pellucida Penetration and Fertilization in Mammals. *Biol Reprod* 71: 1625-1637.
- Sutovsky P, McCauley TC, Sutovsky M, Day BN.** 2003. Early Degradation of Paternal Mitochondria in Domestic Pig (*Sus Scrofa*) Is Prevented by Selective Proteasomal Inhibitors Lactacystin and Mg132. *Biol Reprod* 68: 1793-1800.
- Sutovsky P, Neuber E, Schatten G.** 2002. Ubiquitin-Dependent Sperm Quality Control Mechanism Recognizes Spermatozoa with DNA Defects as Revealed by Dual Ubiquitin-Tunel Assay. *Mol Reprod Dev* 61: 406-413.
- Sutovsky P, Terada Y, Schatten G.** 2001. Ubiquitin-Based Sperm Assay for the Diagnosis of Male Factor Infertility. *Hum Reprod* 16: 250-258.
- Tanghe S, Van Soom A, Nauwynck H, Coryn M, de Kruif A.** 2002. Minireview: Functions of the Cumulus Oophorus During Oocyte Maturation, Ovulation, and Fertilization. *Mol Reprod Dev* 61: 414-424.
- Tesarik J.** 1996. Fertilization of Oocytes by Injecting Spermatozoa, Spermatids and Spermatozoa. *Rev Reprod* 1: 149-152.
- Thompson, Loftus LT, Ashley MD, Meller R.** 2008. Ubiquitin-Proteasome System as a Modulator of Cell Fate. *Curr Opin Pharmacol* 8: 90-95.
- Thrower JS, Hoffman L, Rechsteiner M, Pickart CM.** 2000. Recognition of the Polyubiquitin Proteolytic Signal. *EMBO J* 19: 94-102.
- Uehara T, Yanagimachi R.** 1976. Microsurgical Injection of Spermatozoa into Hamster Eggs with Subsequent Transformation of Sperm Nuclei into Male Pronuclei. *Biol Reprod* 15: 467-470.
- Varum S, Bento C, Sousa AP, Gomes-Santos CS, Henriques P, Almeida-Santos T, Teodosio C, Paiva A, Ramalho-Santos J.** 2007. Characterization of Human

- Sperm Populations Using Conventional Parameters, Surface Ubiquitination, and Apoptotic Markers. *Fertil Steril* 87: 572-583.
- Vested A, Ramlau-Hansen CH, Bonde JP, Thulstrup AM, Kristensen SL, Toft G.** 2011. A Comparison of Conventional and Computer-Assisted Semen Analysis (Crismas Software) Using Samples from 166 Young Danish Men. *Asian J Androl* 13: 453-458.
- Vigodner M.** 2011. Roles of Small Ubiquitin-Related Modifiers in Male Reproductive Function. *Int Rev Cell Mol Biol* 288: 227-259.
- von Mikecz A.** 2006. The Nuclear Ubiquitin-Proteasome System. *J Cell Sci* 119: 1977-1984.
- Wade SL, Auble DT.** 2010. The Rad23 Ubiquitin Receptor, the Proteasome and Functional Specificity in Transcriptional Control. *Transcr* 1: 22-26.
- Wang C, Deng L, Hong M, Akkaraju GR, Inoue J, Chen ZJ.** 2001. Tak1 Is a Ubiquitin-Dependent Kinase of Mkk and Ikk. *Nature* 412: 346-351.
- Wegrzyn J, Lee J, Neveu JM, Lane WS, Hook V.** 2007. Proteomics of Neuroendocrine Secretory Vesicles Reveal Distinct Functional Systems for Biosynthesis and Exocytosis of Peptide Hormones and Neurotransmitters. *J Proteome Res* 6: 1652-1665.
- Wiggins CM, Tsvetkov P, Johnson M, Joyce CL, Lamb CA, Bryant NJ, Komander D, Shaul Y, Cook SJ.** 2011. Bim(El), an Intrinsically Disordered Protein, Is Degraded by 20s Proteasomes in the Absence of Poly-Ubiquitylation. *J Cell Sci* 124: 969-977.
- Woelk T, Sigismund S, Penengo L, Polo S.** 2007. The Ubiquitination Code: A Signalling Problem. *Cell Div* 2: 11.
- Wojcik C, DeMartino GN.** 2003. Intracellular Localization of Proteasomes. *Int J Biochem Cell Biol* 35: 579-589.
- Xia ZP, Sun L, Chen X, Pineda G, Jiang X, Adhikari A, Zeng W, Chen ZJ.** 2009. Direct Activation of Protein Kinases by Unanchored Polyubiquitin Chains. *Nature* 461: 114-119.
- Yanagida K, Katayose H, Hirata S, Yazawa H, Hayashi S, Sato A.** 2001. Influence of Sperm Immobilization on Onset of Ca(2+) Oscillations after Icsi. *Hum Reprod* 16: 148-152.

- Yanagida K, Katayose H, Yazawa H, Kimura Y, Konnai K, Sato A.** 1999. The Usefulness of a Piezo-Micromanipulator in Intracytoplasmic Sperm Injection in Humans. *Hum Reprod* 14: 448-453.
- Yanagimachi R.** 2011. Mammalian Sperm Acrosome Reaction: Where Does It Begin before Fertilization? *Biol Reprod* 85: 4-5.
- Yokota N, Sawada H.** 2007. Sperm Proteasomes Are Responsible for the Acrosome Reaction and Sperm Penetration of the Vitelline Envelope During Fertilization of the Sea Urchin *Pseudocentrotus Depressus*. *Dev Biol* 308: 222-231.
- Yoshioka K, Suzuki C, Tanaka A, Anas IM, Iwamura S.** 2002. Birth of Piglets Derived from Porcine Zygotes Cultured in a Chemically Defined Medium. *Biol Reprod* 66: 112-119.
- Zimmerman SW, Manandhar G, Yi YJ, Gupta SK, Sutovsky M, Odhiambo JF, Powell MD, Miller DJ, Sutovsky P.** 2011. Sperm Proteasomes Degrade Sperm Receptor on the Egg Zona Pellucida During Mammalian Fertilization. *PLoS One* 6: e17256.
- <http://www.obora.com>.** 2011. Hřebci Na Připouštění. (10.8. 2011; <http://www.obora.com/breeding-stallions.html>)
- NCBI.** National Center for Biotechnology Information. 2011. Zp2 Zona Pellucida Glycoprotein 2 (Sperm Receptor) [*Sus Scrofa*]. (3.8. 2011; <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene?term=396846>)