

**Univerzita Karlova v Praze**

**Přírodovědecká fakulta**

Studijní program: Biologie

Studijní obor: Buněčná a vývojová biologie



**Bc. Kristýna Kroumanová**

**Vliv povrchové ubiquitinace spermií na časný embryonální vývoj u prasat**

Effect of sperm ubiquitination on the early embryonic development in pig

Diplomová práce

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

Praha 2016

**Prohlášení:**

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

V Praze, 14. 8. 2016

Kristýna Kroumanová

### **Poděkování:**

Poděkování patří mému školiteli doc. RNDr. Ing. Vladimíru Krylovovi, Ph.D. za vedení mé diplomové práce a cenné rady v průběhu celého mého studia. Ráda bych poděkovala také Mgr. Aleši Petelákovi za jeho trpělivost a odbornou pomoc. Dále děkuji všem členům kolektivu laboratoře za příjemné pracovní prostředí a jejich pomoc. Nesmím zapomenout vyjádřit velké díky mé rodině, která mě podporovala v průběhu celého studia, čehož si velmi vážím.

## Abstrakt

Ubiquitin-proteazomální systém, jehož hlavní funkcí je degradace proteinů v buňce, se účastní také selekce spermií v epididymis. Defektní spermie jsou zde extracelulárně ubiquitinovány a následně degradovány, přičemž míra povrchové ubiquitinace spermií negativně koreluje s jejich kvalitou. Vzhledem k tomu, že v ejakulátu savců jsou přítomné povrchově ubiquitinované spermie, které nejspíš unikly selekci, nabízí se hypotéza, zda oocyt nerozpoznává takto označené spermie po oplození (pravděpodobně přes 26S proteazomální komplex) a nezpůsobuje jejich poškození či degradaci, což by ve svém důsledku mělo vést k omezení, či úplnému zastavení vývoje potencionálně defektního embrya. Tato práce řeší vliv povrchové ubiquitinace spermií na časný embryonální vývoj u prasete domácího (*Sus scrofa f. domestica*) s využitím metody intracytoplazmatické injekce spermie (ICSI). Úspěšnost embryonálního vývoje do stádia blastocysty po ICSI byla srovnatelná s jinými laboratořemi. V rámci této práce nebyl zaznamenán signifikantní rozdíl v tvorbě prvojadér mezi oocytů oplozenými spermii s nízkou nebo vysokou mírou povrchové ubiquitinace. Naopak signifikantně lepší vývoj embryí do stádia blastocysty byl prokázán u oocytů oplozených spermii s nízkou mírou povrchové ubiquitinace (17 %) oproti oocytům oplozených vysoce povrchově ubiquitinovanými spermii (5 %). Dále byl prokázán signifikantně lepší vývoj do stádia blastocysty u oocytů oplozených spermii s maskovaným epitopem povrchového ubiquitinu pomocí protilátky (19 %) v porovnání s kontrolní skupinou, kde byly použity spermie bez navázané protilátky (10 %). Výsledky z obou experimentů ukazují na aktivní rozpoznání povrchového ubiquitinu spermií oocyttem, s největší pravděpodobností 26S proteazomálním komplexem, mající za následek zhoršený časný embryonální vývoj. Ubiquitin by tedy nemusel sloužit pouze jako marker kvality spermií, ale mohl by hrát roli i při rozpoznání nekvalitních spermií oocyttem po oplození.

## Klíčová slova

Ubiquitin, spermie, prase, embryonální vývoj, ICSI, FACS

## Abstract

The ubiquitin-proteasomal system which is the major pathway for intracellular protein degradation is also involved in sperm quality control in the mammalian epididymis. Defective sperm become surface-ubiquitinated during epididymal passage. The level of sperm surface ubiquitination negatively correlates with their quality. Hypothetically it is possible that after fertilization, highly ubiquitinated sperm, naturally present in mammalian ejaculates, would be actively recognized by oocyte (probably via 26S proteasomal complex). Subsequent partial or total sperm degradation should negatively affect the development of the potentially defective embryo. In this study, we examined the effect of sperm ubiquitination on the early embryonic development in pig (*Sus scrofa f. domestica*) using the method of intracytoplasmic sperm injection (ICSI). *In vitro* embryonic development to the blastocyst stage after ICSI was comparable with other laboratories. In this study, no significant difference was observed in the formation of pronuclei between oocytes fertilized by lower and highly ubiquitinated sperm cells. On the other hand, significantly better embryonic development to the blastocyst stage was observed in oocytes fertilized by sperm with lower surface ubiquitination (17 %) compared with oocytes fertilized by highly ubiquitinated sperm cells (5 %). In addition, we observed significantly better embryonic development to the blastocyst stage in the group of oocytes that were fertilized by sperm cells with masked ubiquitin epitope, using appropriate antibody (19 %) compared with the control group (10 %) without antibody treatment. These results suggest the active recognition of the sperm surface ubiquitin by the oocyte (probably via 26S proteasomal complex) leading to the impaired embryonic development in pig. It is possible that ubiquitin doesn't serve only as marker of sperm quality but also plays a role in the recognition of low-quality sperm cells by oocyte after fertilization.

## Keywords

Ubiquitin, sperm cell, pig, embryonic development, ICSI, FACS

# Obsah

1.	Seznam zkratk .....	10
2.	Úvod .....	13
3.	Literární přehled.....	14
3.1	Ubiquitin-proteazomální systém .....	14
3.1.1	Ubiquitin .....	14
3.1.2	Vazba Ub na substrát.....	16
3.1.3	Rozpoznání proteinů určených k degradaci.....	16
3.1.4	Regulace UPS .....	17
3.1.5	Deubiquitinační enzymy .....	18
3.1.6	26S proteazom.....	18
3.1.6.1	20S proteazom.....	18
3.1.6.2	19S proteazom.....	19
3.2	Extracelulární ubiquitinace .....	19
3.2.1	Extracelulární ubiquitinace spermií v nadvarleti .....	20
3.2.1.1	Maturace spermií.....	20
3.2.1.2	Kontrola kvality spermií .....	21
3.3	Oplození.....	23
3.3.1	Maturace oocytů.....	23
3.3.2	Kapacitace spermií .....	25
3.3.3	Kumulární buňky .....	25
3.3.4	Zona pellucida.....	26
3.3.5	Průnik spermie před zonu pellucidu.....	27
3.3.5.1	Akrozomální reakce .....	27
3.3.5.2	UPS a jeho role při oplození .....	28
3.3.6	Fúze pohlavních buněk .....	29

3.4	Děje po oplození .....	30
3.4.1	Aktivace oocyty .....	30
3.4.2	Fúze genetického materiálu .....	31
3.4.3	Časný embryonální vývoj .....	31
3.4.4	Degradace paternálních mitochondrií .....	32
3.4.4.1	UPS a jeho role při degradaci mitochondrií .....	33
3.5	Metody asistované reprodukce .....	33
3.5.1	ICSI .....	34
3.5.1.1	ICSI u prasete domácího.....	35
4.	Pracovní hypotéza .....	36
5.	Cíle .....	36
6.	Materiál a metody.....	37
6.1	Chemikálie .....	37
6.2	Složení roztoků .....	38
6.3	Přístroje.....	39
6.4	Metody.....	40
6.4.1	Izolace oocytů .....	40
6.4.1.1	Disekční metoda.....	40
6.4.2	Maturace oocytů.....	41
6.4.3	Odstranění kumulárních buněk .....	41
6.4.4	Příprava čerstvých spermií .....	41
6.4.5	Zamražení spermií.....	42
6.4.5.1	Rozmražení spermií před ICSI.....	43
6.5	Příprava spermií pro pokus s maskováním Ub epitopu na povrchu spermií .....	43
6.5.1.1	Centrifugace na gradientu Percollu .....	43
6.5.1.2	Inkubace s primární protilátkou .....	43
6.5.1.3	Kapacitace spermií .....	44

6.5.1.4	Inkubace se sekundární protilátkou.....	44
6.6	Příprava spermií pro pokus se sortovanými spermiiemi .....	44
6.6.1.1	Centrifugace na gradientu Percollu .....	44
6.6.1.2	Inkubace s primární a sekundární protilátkou.....	44
6.6.1.3	FACS .....	45
6.6.1.4	Zamražení spermií.....	45
6.6.2	ICSI .....	46
6.6.3	Kultivace po oplození.....	46
6.6.4	Fixace a barvení embryí .....	47
6.6.5	Nepřímá imunofluorescence spermií.....	47
6.6.6	Statistická analýza .....	47
7.	Výsledky .....	48
7.1	Maturace oocytů.....	48
7.2	Časný embryonální vývoj.....	48
7.3	Imunofluorescence spermií.....	49
7.4	FACS .....	50
7.5	Studium vztahu mezi mírou povrchové ubiquitinace spermií a kvalitou časného embryonálního vývoje po ICSI.....	51
7.5.1	Tvorba prvojader.....	51
7.5.2	Vývoj do stádia blastocysty.....	53
7.6	Vliv maskování Ub epitopu na povrchu spermií na kvalitu časného embryonálního vývoje po ICSI.....	54
8.	Diskuze .....	56
8.1	Maturace oocytů a časný embryonální vývoj po ICSI .....	56
8.2	Extracelulární ubiquitin spermií.....	57
8.3	FACS a mražení spermií.....	57
8.4	Studium vztahu mezi mírou povrchové ubiquitinace spermií a kvalitou časného embryonálního vývoje po ICSI.....	58



8.5	Vliv maskování Ub epitopu na povrchu spermií na kvalitu časného embryonálního vývoje po ICSI.....	60
9.	Závěr.....	62
10.	Seznam literatury .....	63

# 1. Seznam zkratek

1. PB	první pólové tělísko ( <i>1. polar body</i> )
AR	akrozomální reakce
ATP	adenosintrifosfát
BME	Eaglovo médium ( <i>Basal Medium Eagle</i> )
BSA	albumin z bovinního séra ( <i>bovine serum albumin</i> )
cAMP	cyklický adenosinmonofosfát
CASA	počítačová analýza spermatu ( <i>computer-assisted sperm analysis</i> )
Cbl	<i>Casitas B-lineage lymphoma proto-oncogene</i> , ubiquitin ligáza
CD9	<i>cluster of differentiation</i> , protein na oolemě důležitý pro fúzi gamet
c-Jun	transkripční faktor
cGMP	cyklický guanosinmonofosfát
DAPI	4',6-diamidino-2-phenylindole
DNA	deoxyribonukleová kyselina
E1	aktivační enzym
E2	konjugační enzym
E3	ubiquitin ligáza
E4	ubiquitinační faktor, který se může podílet na tvorbě polyubiquitinových řetězců
EGA	aktivace embryonálního genomu ( <i>embryonic genome activation</i> )
EGFR	receptor pro epidermální růstový faktor ( <i>epidermal growth factor receptor</i> )
ERAD	degradační dráha asociovaná s endoplazmatickým retikulem ( <i>endoplasmic reticulum associated degradation</i> )
FACS	třídění buněk na základě fluorescence ( <i>fluorescence-activated cell sorting</i> )
FITC	fluorescein isokyanát
FSH	folikuly stimulující hormon
GPBoS	růstové proteiny bovinního séra ( <i>growth proteins from bovine serum</i> )
GFP	zelený fluorescenční protein ( <i>green fluorescent protein</i> )
GJ	mezerové spoje ( <i>gap junctions</i> )
GV	germinální váček ( <i>germinal vesicle</i> )

HrVC70	receptor pro vazbu spermie na vitelinní membráně sumek
ICSI	intracytoplazmatická injekce spermie ( <i>intracytoplasmic sperm injection</i> )
IVF	<i>in vitro</i> oplození ( <i>in vitro fertilization</i> )
Itch	<i>itchy homolog</i> , ubiquitin ligáza
IZUMO 1	protein na membráně spermie důležitý pro fúzi gamet
K	lysin
LH	luteinizační hormon
MII	metafáze druhého meiotického dělení
M199	médium pro maturaci prasečích oocytů
Mdm2	<i>murine double minute 2</i> , ubiquitin ligáza
MEM	minimální esenciální médium ( <i>Minimum Essential Medium</i> )
MG115, MG132	inhibitory proteazomálního komplexu
MPF	maturaci podporující faktor ( <i>maturation promoting factor</i> )
mTBM	modifikované Tris médium ( <i>modified Tris-buffered medium</i> )
mtDNA	mitochondriální DNA
NGS	normální kozí sérum ( <i>normal goat serum</i> )
p53	nádorový supresor
p19 <sup>ARF</sup>	nádorový supresor
PAWP	<i>post-acrosomal sheat WW domain-binding protein</i> , aktivační faktor spermie
PBS	fosfátový pufr ( <i>phosphate buffered saline</i> )
PEST	peptidová sekvence bohatá na prolin, glutamovou kyselinu, serin a threonin
PKA	protein kináza A
PLC $\zeta$	fosfolipáza C- $\zeta$
PVA	polyvinylalkohol
PVP	polyvinylpyrrolidon
PZM3	<i>porcine zygote medium 3</i> , médium pro kultivaci prasečích oocytů
RING	<i>really interesting new gene</i> , skupina ubiquitin ligáz
RNA	ribonukleová kyselina
Rpn	<i>regulatory particle non-ATPase</i> , regulační podjednotky 19S proteazomu
SDS	dodecylsírán sodný ( <i>sodium dodecyl sulfate</i> )
Smad7	<i>mothers against decapentaplegic homolog 7</i> , antagonist

	TGF- $\beta$ signalizace
SOAFs	aktivační faktory spermie ( <i>sperm oocyte-activating factors</i> )
SPACA 6	<i>sperm acrosome membrane-associated protein 6</i> , protein spermie účastníci se fúze gamet
SUTI	metoda imunofluorescenčního značení extracelulárního ubiquitinu spermii ( <i>sperm-ubiquitin tag immunoassay</i> )
TGF- $\beta$	transformující růstový faktor $\beta$ ( <i>transforming growth factor <math>\beta</math></i> )
Ub	ubiquitin
UBA	asociované s ubiquitinem ( <i>ubiquitin-associated</i> )
UbL	podobné ubiquitinu ( <i>ubiquitin-like</i> )
UPS	ubiquitin-proteazomální systém
ZP	zona pellucida
ZP1-ZP4	názvy glykoproteinů zony pellucidy
ZPA, ZPB, ZPC	názvy glykoproteinů zony pellucidy u prasete

## 2. Úvod

Ubiquitin je malý všudypřítomný protein nacházející se ve všech eukaryotických buňkách, kde hraje roli v regulaci řady buněčných procesů. Jeho hlavní funkcí je značení proteinů určených k degradaci v 26S proteazomu. Výskyt ubiquitinu však není omezen pouze na intracelulární prostor, ale je přítomný i extracelulárně. Extracelulární ubiquitinace je předmětem mnoha výzkumů a velký význam je jí přikládán v souvislosti s oplozením. Při penetraci zony pellucidy je důležitý 26S proteazom spermie, který rozpoznává a degraduje ubiquitované proteiny zony pellucidy (Zimmerman *et al.*, 2011). Extracelulární vazba ubiquitinu na spermiích může sloužit jako negativní marker jejich kvality (Sutovsky *et al.*, 2001a). Právě povrchový ubiquitin spermií by mohl hrát roli i při rozpoznání nekvalitních spermií oocytom po oplození a regulovat tak úspěšnost oplození a časný embryonální vývoj.

Vhodným modelem pro výzkum oplození je prase domácí (*Sus scrofa f. domestica*). To vykazuje v mnoha ohledech morfologickou a fyziologickou podobnost s člověkem a umožňuje tak částečně extrapolovat získané poznatky pro použití v humánní medicíně.

Z důvodu častého výskytu polyspermiího oplození při *in vitro* oplození je u prasete vhodné použít metodu intracytoplazmatické injekce spermie (shrnutí Kren *et al.*, 2003). Ta spočívá v injekci jediné spermie do ooplazmy, je manuálně velmi náročná a vyžaduje dlouhodobou praxi. Výhodou této metody je možnost oplození oocyty spermiemi, které by při klasickém *in vitro* oplození neuspěly. V rámci studia vlivu povrchové ubiquitinace spermií byly v této práci použity metody (třídění spermií metodou FACS, imuno fluorescenční barvení), které vedou k poškození spermií a neumožňují tak použít klasické *in vitro* oplození. V tomto případě je oplození metodou intracytoplazmatické injekce vhodným řešením.

## 3. Literární přehled

### 3.1 Ubiquitin-proteazomální systém

Pro správné fungování všech eukaryotických buněk je nezbytný ubiquitin-proteazomální systém (UPS). Ubiquitin-proteazomální dráha je velmi konzervovaná a vede především k proteolytické degradaci intracelulárních proteinů v 26S proteazomu nebo lysozomu. Kromě degradace proteinů, hraje ubiquitinace důležitou roli i v regulaci mnoha buněčných procesů.

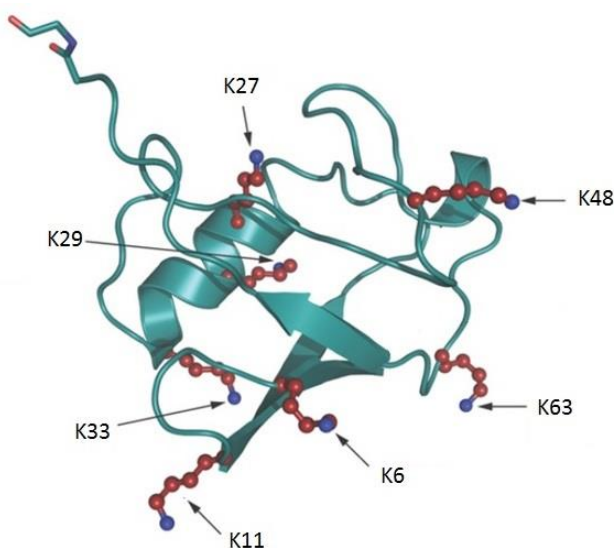
#### 3.1.1 Ubiquitin

Ubiquitin (Ub) je malý globulární protein s hydrofobním jádrem (Vijay-Kumar *et al.*, 1985), který se nachází v cytoplazmě všech eukaryotických buněk a v některých případech se může vyskytovat i extracelulárně.

Ubiquitin je velký 8.5KDa a je tvořený 76 aminokyselinovými zbytky. Jeho aminokyselinová sekvence je evolučně velmi konzervovaná. V sekvenci se nachází sedm lysinových zbytků (K6, K11, K27, K29, K33, K48 a K63; Obrázek 1), přes které se mohou vázat jednotlivé molekuly Ub a tvořit tak polyubiquitinové řetězce. Přes stejné aminokyselinové zbytky jsou molekuly Ub připojeny na substrát v procesu ubiquitinace. Jde o reverzibilní kovalentní vazbu mezi C-koncovým glycinem molekuly Ub a postranním řetězcem lysinového zbytku na dalším Ub nebo substrátu. Díky různým variantám propojení Ub mohou vzniknout strukturně odlišné polyubiquitinové řetězce. Ty mohou být homotypické (pokud se molekuly Ub v řetězci vážou přes stejný lysinový zbytek), heterotypické (v polyubiquitinovém řetězci jsou jednotlivé Ub vázány přes různé lysinové zbytky) nebo větvené. Substrát však může být označen i navázáním pouze jedné molekuly Ub. Právě specifická struktura Ub řetězců následně definuje osud substrátu, na který jsou navázány (shrnutí Komander, 2009).

Intracelulární proteiny určené k degradaci v 26S proteazomu jsou většinou označeny polyubiquitinovým řetězcem o minimální délce čtyř molekul (Thrower *et al.*, 2000), kde jsou jednotlivé Ub převážně vázány přes K48 (Chau *et al.*, 1989; Gregori *et al.*, 1990). V menší míře mohou být polyubiquitinové řetězce propojeny přes K11, jako je tomu u regulátorů buněčného cyklu během mitózy. Dále pak membránové proteiny směřované k degradaci v lysozomu jsou

buď monoubiquitinovány, nebo je na ně připojen polyubiquitinový řetězec s vazbou Ub přes K63 (shrnuto Komander & Rape, 2012).



**Obrázek 1:** Struktura ubiquitinu. Lysinové zbytky (K6, K11, K27, K29, K33, K48 a K63) jsou vyznačeny (převzato a upraveno Komander, 2009).

Proces ubiquitinace je důležitý v regulaci celé řady buněčných dějů. Příkladem je ubiquitinace a následná degradace specifických cyklinů v jednotlivých fázích buněčného cyklu (Glotzer *et al.*, 1991) nebo ovlivňování životnosti transkripčních faktorů (Kornitzer *et al.*, 1994).

Ub hraje významnou roli i v procesech, které nevedou k proteolytické degradaci proteinů. Reguluje lokalizaci proteinů v buňce, je důležitý při aktivaci některých signálních drah, podílí se na transkripci a také na opravě poškozené DNA. Ub se může vázat na ribozomální proteiny, což vede ke stabilizaci polyzomů a zvýšení efektivity translace (shrnuto Komander & Rape, 2012). Ubiquitinace je také jednou z posttranslačních modifikací histonů. Ub se může vázat ve formě monomeru na histony H2A a H2B a regulovat tak genovou expresi. Vazba Ub na histon H2A hraje roli také při opravách DNA (shrnuto Weake & Workman, 2008). Ve varlatech dokonce dochází k ubiquitinaci histonu H3 v „elongating“ spermatidách (Chen *et al.*, 1998).

### 3.1.2 Vazba Ub na substrát

Ub je na substrát navázán v kaskádě tří reakcí. V prvním kroku je molekula Ub aktivována pomocí aktivačního enzymu (E1). V této reakci je nutná energie z adenosintrifosfátu (ATP), díky které se může aktivovaný Ub vázat svým C-koncem na cystein E1 pomocí thiolesterové vazby. V následujícím kroku je aktivovaný Ub přenesen na konjugací enzym (E2) za vzniku vysokoenergetického intermediátu. V posledním kroku ubiquitin ligáza (E3) katalyzuje přenos aktivovaného Ub z E2 na substrát nebo předchozí molekulu Ub v polyubiquitinovém řetězci. Ub je na substrát většinou vázán izopeptidovou vazbou, která vzniká mezi  $\alpha$ -karboxylovou skupinou glycinu na C-konci ubiquitinu a  $\epsilon$ -amino skupinou postranního řetězce lysinu na cílovém proteinu (shrnutí Hershko & Ciechanover, 1998). Není to ale pravidlem, neboť v některých případech je Ub připojen na volnou N-koncovou  $\alpha$ -amino skupinu proteinu (Breitschopf *et al.*, 1998; Aviel *et al.*, 2000).

Na tvorbě polyubiquitinových řetězců se může podílet i ubiquitinační faktor E4. Pokud má být substrát označen polyubiquitinovým řetězcem, většinou je nejdřív navázána jedna molekula Ub a postupně jsou přidávány další. Pokud se tvorby polyubiquitinového řetězce účastní E4, polyubiquitinový řetězec je na substrát přenesen v jednom kroku (Koegl *et al.*, 1999).

### 3.1.3 Rozpoznání proteinů určených k degradaci

Je několik způsobů, jak může být substrát určený k degradaci rozpoznán a následně ubiquitinován. Proteiny, které mají na svém N-konci destabilizující aminokyselinové zbytky, jsou ubiquitinovány a následně degradovány (shrnutí Varshavsky, 2011). Bylo také zjištěno, že proteiny obsahující jednu nebo více tzv. PEST sekvencí, jsou směřovány k rychlé degradaci a mají většinou krátký poločas života (Rogers *et al.*, 1986). Tato sekvence je bohatá na aminokyseliny prolin, kyselinu glutamovou, serin a threonin a je často obklopena pozitivně nabitými aminokyselinovými zbytky (Rogers *et al.*, 1986).

Jak již bylo zmíněno, špatně sbalené a poškozené proteiny jsou také degradovány prostřednictvím UPS. Pokud není protein dobře sbalený, může dojít k odhalení hydrofobních úseků, které se za normálních okolností nacházejí v jádře proteinu. Hydrofobní úseky poté mohou být rozpoznány E3 ligázou. Bylo zjištěno, že 12-15 % všech nascentních proteinů v buňce je ubiquitinováno kotranslačně, tedy ještě před dokončením syntézy celého polypeptidu. Ub se tak podílí na kontrole správnosti složení proteinů (Wang *et al.*, 2013).



Destrukční boxy u cyklinů patří také mezi motivy, které jsou rozpoznávané E3 ligázou. Jedná se o konzervovanou sekvenci devíti aminokyselin, která se nachází 40-50 aminokyselinových zbytků od N-konce (Glotzer *et al.*, 1991).

### 3.1.4 Regulace UPS

Jelikož E3 ligáza zajišťuje specifické rozpoznání substrátů v buňce, je patrné, že regulace UPS probíhá především na úrovni tohoto enzymu. Funkce E3 se dá ovlivnit několika způsoby. Mezi hlavní patří posttranslační modifikace E3 ligázy nebo substrátu a ovlivnění činnosti enzymu vazbou jiného proteinu. Tyto regulace většinou vedou k aktivaci nebo inhibici E3, ale mohou ovlivnit také rozpoznání cílového proteinu.

Jedním ze způsobů regulace UPS je fosforylace E3 ligázy. Tato posttranslační modifikace může vést k aktivaci nebo inhibici tohoto enzymu. Například E3 ligáza Itch může být fosforylací určitých aminokyselinových zbytků (serin, threonin) aktivována (Gallagher *et al.*, 2006) a naopak fosforylací jiných zbytků (tyrosin) může být její činnost inhibována (Yang *et al.*, 2006). Případem pozitivní regulace je fosforylace cyklozomu, která vede k jeho aktivaci a následné degradaci mitotických cyklinů a dalších proteinů (Lahav-Baratz *et al.*, 1995).

Fosforylován může být i samotný substrát, přičemž může jít o pozitivní, ale i negativní ovlivnění UPS. Fosforylace substrátu často vede k tvorbě vazebného místa pro E3. Příkladem může být fosforylace receptoru EGFR, která vede k vazbě E3 ligázy Cbl, její následné fosforylaci a ligaci Ub. Degradace EGFR je zde regulována fosforylací substrátu i E3 (Levkowitz *et al.*, 1999). Naopak fosforylace některých substrátů může bránit jejich rozpoznání a vazbě E3 ligázou a následné proteolytické degradaci, jako je tomu v případě transkripčního faktoru c-Jun (Gao *et al.*, 2006).

Jak již bylo zmíněno, činnost E3 ligázy může být ovlivněna i interakcí s jinými proteiny. Příkladem může být regulace TGF- $\beta$  signalizace ubiquitinací a následnou degradací TGF- $\beta$  receptoru. Adaptorový protein Smad7 váže nejen TGF- $\beta$  receptor, ale i E3 ligázu a E2. Díky přiblížení E2 k E3 ligáze může dojít k její aktivaci a přenesení Ub na receptor (shrnuto Izzi & Attisano, 2004; Ogunjimi *et al.*, 2005).

Pomocný protein může naopak bránit degradaci substrátu. Tumor supresorový protein p53 je ubiquitinován pomocí ligázy Mdm2 a následně degradován. Nicméně po vazbě proteinu p19<sup>ARF</sup> na ligázu dochází k inhibici její aktivity a p53 je stabilizován (Honda & Yasuda, 1999).

Další možností regulace UPS je ovlivňování množství samotných E3 ligáz v buňce. E3 ligázy mohou být označeny ubiquitinací i autoubiquitinací a následně směřovány k degradaci v proteazomu. Existují ale i výjimky, kdy E3 vyžaduje pro svoji funkci právě ubiquitinaci. Příkladem může být autoubiquitinace E3 ligázy RING1B, která je nutná pro její aktivitu a následné připojení Ub k substrátu, konkrétně k histonu H2A (Ben-Saadon *et al.*, 2006).

### 3.1.5 Deubiquitinační enzymy

Pro správné fungování UPS je důležitý také proces deubiquitinace, při kterém dochází k odstranění molekul Ub z proteinů. K tomu jsou zapotřebí deubiquitinační enzymy. Ub je ze substrátů odstraňován před vlastní degradací proteinů v 26S proteazomu. V tomto procesu hraje důležitou roli Rpn11 podjednotka s deubiquitinační aktivitou, která je součástí 19S partikule proteazomu (Verma *et al.*, 2002; Yao & Cohen, 2002). Molekuly Ub jsou tímto způsobem recyklovány a mohou být dále použity.

### 3.1.6 26S proteazom

Degradace proteinů označených Ub probíhá především v 26S proteazomu. Existují ale i proteiny, na které není navázán Ub, a přesto jsou v proteazomu degradovány (Murakami *et al.*, 1992). 26S proteazomální komplex je tvořen 20S jádrem s katalytickou funkcí a dvěma 19S regulačními podjednotkami, které se nachází na obou koncích 20S partikule.

#### 3.1.6.1 20S proteazom

K vlastní proteolýze substrátu dochází ve 20S proteazomu, multikatalytické proteáze soudkovitého tvaru. Jádro 20S proteazomu se skládá ze čtyř prstenců, které leží na sobě a tvoří tak pór. Každý prstenec obsahuje sedm podjednotek, přičemž dva vnější prstence jsou tvořeny  $\alpha$  podjednotkami ( $\alpha 1$ - $\alpha 7$ ) a slouží především k vazbě 19S regulačních partikulí a stabilizaci vnitřních prstenců tvořených  $\beta$  podjednotkami ( $\beta 1$ - $\beta 7$ ). Vnější prstence  $\alpha$  společně s 19S regulačními partikullemi také regulují vstup do póru proteazomu a to pomocí N- koncových zbytků na  $\alpha$  podjednotkách (Groll *et al.*, 1997; Groll *et al.*, 2000).

Vnitřní prstence  $\beta$  se účastní proteolytického štěpení proteinů na malé peptidy, které jsou následně uvolněny do cytoplazmy. V eukaryotickém proteazomu jsou proteolyticky aktivní podjednotky  $\beta 1$ ,  $\beta 2$  a  $\beta 5$  a to díky N-koncovému threoninu, který se při hydrolýze chová

jako nukleofil. Tato místa vykazují proteolytickou aktivitu podobnou trypsinu, chymotrypsinu a kaspázám (shrnutí Tanaka, 2009).

### 3.1.6.2 19S proteazom

Proteazomální komplex je regulován pomocí 19S regulačních podjednotek, které jsou většinou asociovány s  $\alpha$  podjednotkami obou vnějších prstenců 20S proteazomu. V některých případech se 20S proteazom může vyskytovat i samostatně, bez regulačních podjednotek (Wiggins *et al.*, 2011). 19S regulační partikule se podílí především na specifické vazbě substrátu, jeho rozbalení a odstranění polyubiquitinového řetězce před vstupem do katalytického jádra 20S proteazomu.

Součástí 19S proteazomu jsou místa, která jsou schopna vázat ubiquitinované proteiny určené k degradaci. Jedná se o podjednotky Rpn10/S5a a Rpn13 (Deveraux *et al.*, 1994; Husnjak *et al.*, 2008). Vazba je umožněna díky hydrofobním interakcím mezi molekulami Ub a těmito podjednotkami (Young *et al.*, 1998; Schreiner *et al.*, 2008). Někdy nedochází k přímé vazbě substrátu s proteazomem, ale interakce je zprostředkována přes kyvadlové přenašeče. Ty vážou polyubiquitinovaný substrát přes UBA (ubiquitin-associated) doménu a následnou vazbu na proteazom zajišťuje UbL (ubiquitin-like) doména (shrnutí Su & Lau, 2009).

19S proteazom obsahuje i šest podjednotek vykazujících ATPázovou aktivitu. Ty se podílejí hlavně na rozbalování proteinů (shrnutí Ciechanover & Stanhill, 2014).

## 3.2 Extracelulární ubiquitinace

Funkce ubiquitinu v buňce je již dobře prozkoumána, nicméně význam extracelulární ubiquitinace není doposud zcela popsán. Extracelulární Ub může hrát roli v modulaci imunitních odpovědí (shrnutí Majetschak, 2011), ale je důležitý také v procesech souvisejících s oplozením. U spermií slouží extracelulární Ub jako negativní marker jejich kvality (Sutovsky *et al.*, 2001a), při oplození 26S proteazom spermie rozpoznává a degraduje ubiquitinované proteiny zony pellucidy (ZP) (Zimmerman *et al.*, 2011). Extracelulární Ub se vyskytuje v hojné míře v seminální tekutině a jeho přítomnost byla zaznamenána i v dalších tělních tekutinách (mozkomíšní mok, bronchoalveolární a folikulární tekutina) (shrnutí Majetschak, 2011).

## 3.2.1 Extracelulární ubiquitinace spermií v nadvarletí

### 3.2.1.1 Maturace spermií

Tvorba samčích pohlavních buněk, které se mohou úspěšně účastnit oplození, zahrnuje několik důležitých dějů. Ve varlatech nejdříve vznikají haploidní spermatidy v procesu spermatogeneze, které následně podstupují řadu morfologických změn v průběhu spermiogeneze. Výsledkem jsou spermie, které jsou morfologicky téměř hotové, ale stále neschopné oplodnit oocyt. Dalším důležitým krokem je proto jejich maturace během průchodu nadvarletem (epididymis), kde spermie získají potřebnou motilitu a schopnost oplodnit oocyt (to je dále posíleno kapacitací v samičím pohlavním traktu). Epididymis také slouží ke skladování zralých spermií před ejakulací a jejich udržování v životaschopném stavu.

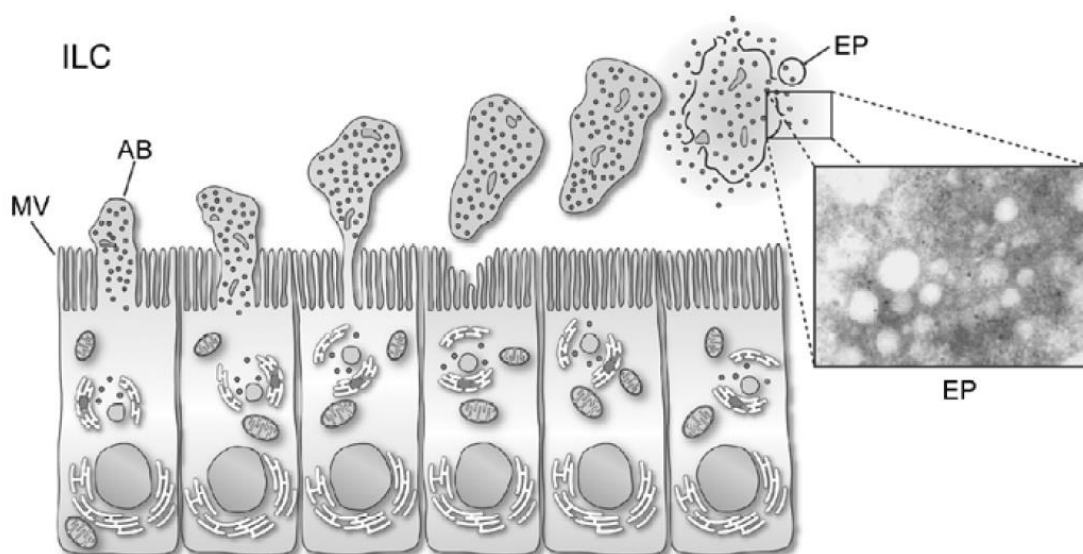
Epididymis je orgán spojující varlata s chámovodem a skládá se obecně ze tří částí-*caput* (hlava), *corpus* (tělo) a *cauda* (ocas). Proximálně se nachází *caput*, který se společně s částí *corpus* podílí na maturačních procesech spermií, zatímco *cauda* pokračující v chámovod, hraje důležitou roli při skladování zralých spermií před ejakulací. Změny související s maturací spermií jsou řízeny prostředím v epididymis, kdy v jeho jednotlivých částech dochází k sekreci různých proteinů díky odlišné genové expresi. Právě rozdílné složení epididymální tekutiny v individuálních kompartmentech epididymis ovlivňuje posloupnost změn v rámci maturace spermií (shrnutí Cornwall, 2009). Bylo zjištěno, že *caput* se svou genovou expresí liší od částí *corpus* a *cauda*, jejichž transkriptomy jsou naopak velmi podobné (Thimon *et al.*, 2007; Browne *et al.*, 2016).

Proces maturace spermií v epididymis zahrnuje změny v morfologii, biochemii i fyziologii spermií. Dochází ke změně morfologie akrozomu a také k organizaci komponent v akrozomální matrix. Jádro je stabilizováno pomocí disulfidických můstků stejně jako některé struktury v bičíku spermie a mění se také složení plazmatické membrány (shrnutí Bedford, 2015). Mnohé proteiny spermií jsou odstraňovány nebo vyměněny za nové, syntetizované v epididymis. U myši bylo zjištěno, že při průchodu spermií epididymis je odstraněno 1034 proteinů, zatímco pouze 732 proteinů je nově přidaných (Skerget *et al.*, 2015).

Proteiny jsou do lumen epididymis sekretovány klasicky merokrinní cestou přes endoplazmatické retikulum a Golgiho aparát nebo apokrinně. Apokrinní cesta je alternativní sekretorická dráha, která spočívá ve tvorbě a následném uvolnění apikálních váčků (apical blebs) z apikální strany sekretorických buněk epitelu epididymis (Obrázek 2). Součástí těchto

struktur jsou malé membránové váčky epididymosomy, které jsou následně uvolněny do extracelulárního prostředí, kde mohou fúzovat s membránou spermie. Epididymosomy se tak mohou podílet na přenosu proteinů na povrch spermie během jejich průchodu nadvarletem (shrnutí Sullivan, 2015). Bylo zjištěno, že u prasete začíná tvorba apikálních váček během puberty a následně se lineárně zvyšuje až do pohlavní dospělosti (Hughes & Berger, 2015).

Prostřednictvím epididymosomů je do lumen epididymis sekretován Ub a další komponenty UPS (Baska *et al.*, 2008).



**Obrázek 2:** Schematické znázornění apokrinní sekrece v epididymis. V detailu je mikrofotografie z elektronového mikroskopu, na které jsou patrné epididymosomy. AB-„Apical blebs“, EP-epididymosomy, ILC-intraluminální prostor epididymis, MV-mikrovilli (převzato Sullivan *et al.* 2007).

### 3.2.1.2 Kontrola kvality spermií

Pro úspěšné oplození je nezbytné, aby byly gamety od samice i samce plně funkční. U samců může docházet k tvorbě spermií, které jsou nějakým způsobem poškozené nebo vykazují abnormální morfologii. Bylo zjištěno, že během průchodu epididymis klesá procentuální obsah defektních spermií (Axner *et al.*, 1999; Sutovsky *et al.*, 2001a), což nasvědčuje jejich rozpoznání a eliminaci. Možný mechanismus zajišťující kontrolu kvality spermií v epididymis byl navržen Sutovským *et al.* (2001a), který předpokládá, že zde dochází k extracelulární ubiquitinaci defektních spermií. Ty jsou následně odstraněny pomocí fagocytózy epiteliálními buňkami nadvarlete a makrofágy nebo může alternativně dojít k jejich rozpadu a následnému zkapalnění (shrnutí Sutovsky 2003a; shrnutí Axner, 2006). Některé poškozené spermie mohou tomuto eliminačnímu mechanismu uniknout a mohou se dostat

do ejakulátu (Sutovsky *et al.*, 2001a). Přesný mechanismus rozpoznání a značení abnormálních nebo defektních spermií v epididymis není doposud zcela znám.

Bylo prokázáno, že míra extracelulární ubiquitinace spermií ve vzorku negativně koreluje s jejich kvalitou (koncentrace, motilita, normální morfologie) a naopak pozitivně koreluje s poškozením spermií, např. DNA zlomy (Sutovsky *et al.*, 2002; Sutovsky *et al.*, 2004a; Hodjat *et al.*, 2008). V těchto studiích bylo také zjištěno, že extracelulárně ubiquitinované spermie často vykazovaly abnormální morfologii jako zdvojený nebo stočený (coiled) bičík a abnormální nebo zdvojenou hlavičku. Rýhování po *in vitro* oplození (IVF; *in vitro* fertilization) také negativně koreluje se zvýšenou mírou povrchové ubiquitinace spermií ve vzorku (Sutovsky *et al.*, 2001b).

Ze získaných poznatků vyplývá, že extracelulární ubiquitin může sloužit jako marker kvality spermií. Metoda SUTI (sperm-ubiquitin tag immunoassay) může být hodnotným nástrojem při vyhodnocování kvality spermatu u lidí, ale i hospodářských zvířat (Sutovsky *et al.*, 2001b; Sutovsky *et al.*, 2002). Tento přístup spočívá ve vizualizaci extracelulárního Ub pomocí specifické protilátky a následném vyhodnocení pod fluorescenčním mikroskopem nebo za použití průtokového cytometru (Sutovsky *et al.*, 2001b).

Hodnocení kvality spermatu se provádí převážně analýzou pod mikroskopem nebo přístrojově pomocí CASA (computer-assisted sperm analysis). Pomocí těchto metod je možné zjistit základní parametry, jako jsou koncentrace, motilita nebo morfologie, nicméně tyto údaje nemusí vypovídat o skutečné schopnosti spermií oplodnit oocyt. Na druhé straně analýza spermatu pomocí SUTI (nebo použitím jiných negativních biomarkerů) může odhalit i defekty spermií na molekulární úrovni, nehledě na to, jestli se tato poškození projeví na fenotypu (morfologie, motilita) spermie. Hodnocení kvality spermatu pomocí markerů kvality spermií je pak značně zjednodušeno a automatizováno použitím průtokového cytometru (shrnutí Sutovsky *et al.*, 2015).

Pro praxi je také zajímavá možnost použití kovových nanočástic obsahujících na svém povrchu protilátky proti ubiquitinu, které se následně vážou na ubiquitinované spermie. Pomocí magnetu lze poté ze vzorku (např. inseminační dávka) odstranit kovové nanopartikelky s navázanými defektními spermii a zlepšit tak jeho výslednou kvalitu (Sutovsky & Kennedy, 2013).

Možnost použití Ub jako negativního markeru při hodnocení kvality spermií některé studie zamítají. Například Varum *et al.* (2007) ukázali, že lze najít morfologicky defektní

spermie, které nejsou extracelulárně značeny ubiquitinací. V jiné studii bylo zjištěno, že míra povrchové ubiquitinace pozitivně koreluje s kvalitou spermií, konkrétně s koncentrací, motilitou a normální morfologií (Muratori *et al.*, 2005). V této publikaci poukazují na to, že negativní korelace mezi mírou ubiquitinace a kvalitou spermatu může být způsobena jinými komponentami, než jsou spermie, konkrétně ubiquitinovanými tělísky. Eskandari-Shahraki *et al.* (2013) sice prokázali nepřímou úměrnost mezi značením spermií Ub a jejich koncentrací, nicméně zaznamenali pozitivní korelaci mezi intenzitou ubiquitinace a vývojem embryí po intracytoplazmatické injekci spermie (ICSI). Tento jev vysvětlili pomocí teorie hypoubiquitinace. Ta předpokládá, že pokud v epididymis probíhá řádná ubiquitinace, tak je většina defektních spermií fagocytována a do ejakulátu se dostane pouze malé množství ubiquitinovaných spermií. Naopak pokud v epididymis dochází k hypoubiquitinaci (nedostatečné ubiquitinaci), která není dostatečným spouštěčem pro eliminaci poškozených spermií, v ejakulátu se nachází více ubiquitinovaných spermií. I přesto, že tyto spermie nevykazují vysokou míru povrchové ubiquitinace, mohou mít nižší schopnost podstoupit kapacitaci a oplození oproti spermiím, které byly řádně ubiquitinovány a následně unikly degračnímu mechanismu v epididymis (Eskandari-Shahraki *et al.*, 2013).

### **3.3 Oplození**

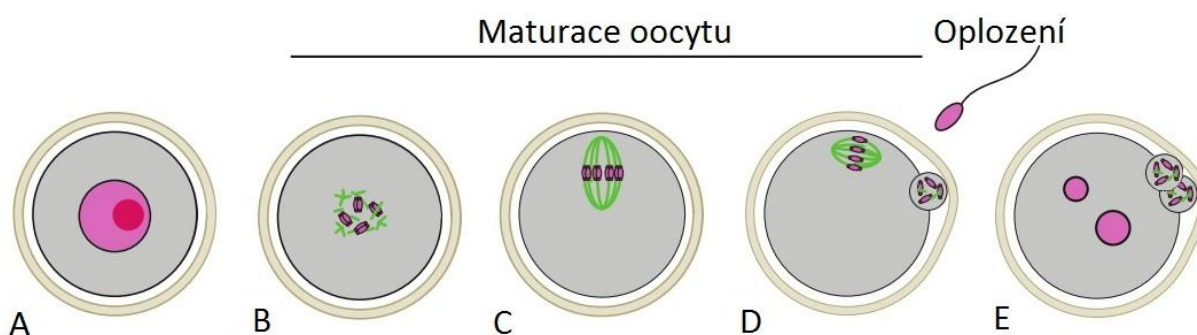
Při oplození dochází k fúzi samčí a samičí gamety. Výsledkem je vznik nového jedince, jehož genom je odvozený od obou rodičů. Průběh oplození se liší mezi jednotlivými druhy živočichů, nicméně zahrnuje několik dějů, které jsou společné. Prvním krokem je kontakt gamet a jejich vzájemné rozpoznání, většinou druhově specifické. Následuje průnik spermie do oocyty, což je vysoce regulovaný proces. Je nutné zajistit, aby do oocyty pronikla pouze jedna spermie, jejíž jádro splyne s tím samičím za vzniku zygoty. Spermie přináší do oocyty také centriolu, která při monospermním oplození tvoří bipolární dělicí vřeténko. To je důležité pro správné rozdělení chromozomů do dvou buněk. Existují proto mechanismy, které brání vstupu více spermií, tzv. polyspermnímu oplození, které je neslučitelné s dalším vývojem embrya.

#### **3.3.1 Maturace oocytů**

Oocyty se tvoří již během zárodečného vývoje. Pod vlivem hormonů pak dozrávají v průběhu celého reprodukčního období samice. Nicméně pouze malé množství oocytů je ovulováno. Naopak většina oocytů podstoupí proces buněčné smrti, který se označuje jako

atrezie. Zatímco u spermie je během spermiogeneze většina cytoplazmy odstraněna, oocyt musí poskytnout veškerý materiál pro budoucí vývoj embrya. V průběhu maturace oocyty tak dochází k akumulaci mnoha zásobních látek.

První meiotické dělení u samičích gamet začíná již během fetálního vývoje. Avšak v profázi prvního meiotického dělení dochází k zastavení dalšího dělení a oocyty se ocitají v tzv. prvním meiotickém bloku. Tento blok je způsoben udržováním nízké aktivity MPF (maturation promoting factor) a oocyty v tomto stavu mohou setrvávat i po dobu několika desítek let. Oocyty v profázi I se nazývají primární a obsahují velké jádro, tzv. germinální váček (GV), ve kterém chromozomy zůstávají v dekonzenzovaném stavu. Ve fyziologickém prostředí začíná znovuzahájení meiózy u jednotlivých oocytů díky zvýšené hladině luteinizačního hormonu (LH) před ovulací. V *in vitro* podmínkách je k tomu zapotřebí mechanické uvolnění oocytů z folikulů a jejich následná kultivace ve vhodném médiu. Znovuzahájení meiózy je charakteristické rozpadem GV a kondenzací chromozomů. U většiny savců meióza pokračuje až do metafáze druhého meiotického dělení (MII), kde dochází k druhému meiotickému bloku. Oocyty ve stádiu MII se nazývají sekundární a je u nich již patrné vyloučené 1. pólóvé tělísko (1. PB). Oocyty setrváávají ve fázi MII až do doby oplození (shrnutí Adhikari & Liu, 2014). Po oplození dojde k vyloučení 2. pólóvého tělíška. Maturaci oocytů u většiny savců popisuje Obrázek 3.



**Obrázek 3:** Schematické znázornění maturace oocytů u většiny savců. Oocyty jsou znázorněny šedě, růžovou barvou je označena DNA a zelenou barvou mikrotubuly (A) Primární oocyt se znázorněným germinálním váčkem (GV). (B) Znovuzahájení meiózy a rozpad GV. (C) Tvorba dělicího vřeténka. (D) Sekundární oocyt s vyloučeným prvním pólóvým tělíškem. V této fázi nastává druhý meiotický blok, který přetrvává až do oplození. (E) Samičí prvořádlo a znázorněná dvě vyloučená pólóvá tělíška (převzato a upraveno Verlhac & Terret, 2016).



### 3.3.2 Kapacitace spermií

Spermie nejsou schopné oplodnit oocyt ihned po ejakulaci a je potřeba, aby podstoupily řadu biochemických a biofyzikálních změn. U savců se tento proces nazývá kapacitace a odehrává se v samičím pohlavním traktu. Kapacitované spermie jsou schopné vázat se na ZP a podstoupit akrozomální reakci (AR). Proces kapacitace lze použitím vhodného média navodit i v *in vitro* podmínkách.

Jedním z hlavních procesů, ke kterému dochází při kapacitaci, je změna složení membrány. Protein albumin vyskytující se v samičím pohlavním traktu napomáhá odstranění cholesterolu z membrány spermií. To způsobuje větší fluiditu a umožňuje tak rychlejší laterální pohyb integrálních proteinů. Mezi další složky nacházející se ve zvýšené koncentraci v samičím pohlavním traktu patří bikarbonát ( $\text{HCO}_3^-$ ) a  $\text{Ca}^{2+}$ . Influx bikarbonátu zahajuje signalizační kaskádu, která vede k aktivaci skramblázy, enzymu zodpovědného za translokaci fosfolipidů mezi vnějším a vnitřním listem membrány. Porušení asymetrie vnějšího a vnitřního listu membrány spermie usnadňuje uvolnění cholesterolu z membrány. Z povrchu spermie jsou také odstraněny dekapacitační faktory, jež byly na spermii navázány během procesu maturace v epididymis a brání kapacitaci (shrnutí Reid *et al.*, 2011). Díky influxu bikarbonátu a  $\text{Ca}^{2+}$  dojde ke zvýšení intracelulární koncentrace těchto iontů, což vede k aktivaci adenylátcyklázy a produkci cyklického adenosinmonofosfátu (cAMP). Tento druhý posel aktivuje cAMP dependentní protein kinázu A (PKA), která fosforyluje tyrozinové kinázy. Fosforylace některých proteinů ve spermii pomocí těchto kináz je nezbytná pro proces kapacitace. Příkladem může být fosforylace proteinů bičíku podílející se na hyperaktivaci spermie (shrnutí Abou-haila & Tulsiani, 2009).

### 3.3.3 Kumulární buňky

Kapacitované spermie musí během putování k oocytu překonat bariéru ve formě kumulárních buněk. Jedná se o granulózní buňky obalující v několika vrstvách oocyt v antrálním folikulu i po ovulaci. Vrstva kumulárních buněk, které těsně přiléhají k oocytu, se nazývá *corona radiata*. Tyto buňky jsou s oocytem propojeny pomocí mezibuněčných spojů, tzv. gap junctions (GJ), umožňujících komunikaci mezi oocytem a kumulárními buňkami. Kumulární buňky se podílí na udržení oocytu v 1. meiotickém bloku a zároveň regulují znovuzahájení meiózy. To je umožněno pomocí přenosu cAMP a cyklického guanosinmonofosfátu (cGMP) z kumulárních buněk do oocytu přes GJ. Do oocytu se touto

cestou dostávají i další látky produkované kumulárními buňkami. Mezi ně patří ionty, nukleotidy, aminokyseliny nebo sacharidy (shrnutí Russell *et al.*, 2016).

Další funkcí kumulárních buněk je produkce progesteronu, který působí jako chemoatraktant pro spermie (Oren-Benaroya *et al.*, 2008). Progesteron aktivuje pH-dependentní vápníkové kanály CatSper na spermiu, což způsobí influx  $\text{Ca}^{2+}$  hrající roli v procesech chemotaxe i hyperaktivace (Lishko *et al.*, 2011; Strünker *et al.*, 2011).

Během maturace oocytů dochází k expanzi kumulárních buněk díky produkci extracelulární matrix, převážně kyseliny hyaluronové. V *in vitro* podmínkách je syntéza kyseliny hyaluronové stimulována pomocí folikuly stimulujícího hormonu (FSH) (Eppig, 1979).

### 3.3.4 Zona pellucida

Oocyty jsou obklopeny extracelulárním obalem složeným z glykoproteinů, který se nazývá vitelinní membrána a u savců zona pellucida. Kromě toho, že tento obal chrání oocyt před mechanickým poškozením, zajišťuje také řadu jiných funkcí. Mezi ně patří druhově specifické rozpoznání spermie a její vazba, indukce akrozomální exocytózy a ochrana proti polyspermiímu oplození. ZP brání předčasnému uhníždění embrya ve vejcovodech a zároveň ho chrání do doby, než doputuje do dělohy.

ZP je až na výjimky tvořena hlavně třemi glykoproteiny. Pojmenování jednotlivých glykoproteinů se liší u různých savců. U myši, modelového organismu v oblasti výzkumu zony pellucidy, se jedná o ZP1, ZP2 a ZP3. U lidských oocytů se glykoproteiny nazývají ZP1, ZP2, ZP3 a ZP4. Co se týče prasete, modelového organismu v rámci této práce, je označení poněkud komplikované. V mnoha publikacích můžeme nalézt názvy ZPA, ZPB a ZPC, ale je možné použít také pojmenování ZP2 pro ZPA, ZP4 pro ZPB a ZP3 pro ZPC. ZP1 může být zároveň alternativním názvem pro ZP2/ZPA (shrnutí Goudet *et al.*, 2008).

U myši vytváří heterodimery glykoproteinů ZP2 a ZP3 dlouhá filamenta, která jsou propojena pomocí dimerů ZP1 (shrnutí Green, 1997). V případě prasete jsou filamenta tvořena heterodimery ZPB a ZPC, zatímco glykoprotein ZPA slouží k jejich propojení (Yurewicz *et al.*, 1998). Primárním vazebným receptorem pro spermiu je u myši ZP3, u prasat se jedná o heterokomplex ZPB-ZPC (Bleil & Wassarman, 1980; Yurewicz *et al.*, 1998).

Syntéza a sekrece proteinů ZP se liší mezi jednotlivými živočišnými druhy. Zatímco u myši jsou tvořeny pouze oocytem, u prasete dochází k jejich syntéze jak oocytem, tak kumulárními buňkami obklopujícími oocyt (shrnutí Zimmerman *et al.*, 2011).

### 3.3.5 Průnik spermie před zónu pellucidu

Aby mohlo dojít k samotné fúzi gamet, je zapotřebí, aby spermie nejdříve pronikla přes ZP oocytu. K tomu je nutné, aby u spermie proběhla akrozomální reakce (AR), někdy označovaná jako akrozomální exocytóza. I přes to, že je penetrace ZP intenzivně zkoumána už několik desítek let, přesný mechanismus není znám.

Austin a Bishop v roce 1958 popsali teorii enzymatického štěpení proteinů ZP pomocí enzymu obsaženého v akrozomu spermie, který nazvali lyzin (Austin & Bishop, 1958). U savců se dlouhou dobu předpokládalo, že hlavním enzymem štěpícím ZP je akrozin (shrnutí Mcrorie & Williams, 1974). Nicméně bylo zjištěno, že samci myši, kteří jsou homozygotní pro mutaci v genu pro akrozin, jsou stále plodní (Baba *et al.*, 1994). Akrozin tedy není esenciální pro penetraci ZP a oplození, avšak při použití takto mutovaných myši bylo sledováno zpoždění v těchto procesech (Baba *et al.*, 1994). V posledních letech se množí názory, že by mohl funkci digestivního enzymu ZP plnit 26S proteazom spermie (Sutovsky *et al.*, 2004b; Zimmerman *et al.*, 2011).

#### 3.3.5.1 Akrozomální reakce

Při oplození jsou schopné penetrovat ZP pouze spermie, u kterých proběhla AR. Ta spočívá ve fúzi vnější akrozomální membrány s plazmatickou membránou. Tím je umožněno vylití lytických enzymů a dalších složek obsažených v akrozomu a nezbytných pro proniknutí spermie přes ZP. Aby spermie mohla podstoupit AR, musí nejdříve proběhnout kapacitace. Při tomto procesu dochází ke změnám v plazmatické membráně, které jsou důležité pro fúzi membrán a tím i akrozomální exocytózu (shrnutí Abou-haila & Tulsiani, 2009).

Podle převládajícího modelu vysvětlujícího proces AR musí nejdříve dojít k vazbě spermie na receptor ZP (ZP3 nebo ZPC). Díky této vazbě dochází k aktivaci membránových receptorů spermie a následnému spuštění signálních kaskád vedoucích ke zvýšení intracelulární koncentrace  $Ca^{2+}$  a ke zvýšení pH. Výsledkem je mimo jiné tvorba fúzogenních faktorů a také depolymerace aktinu, který u kapacitovaných spermií tvoří bariéru mezi vnější akrozomální membránou a plazmatickou membránou. Díky depolymeraci aktinu dojde k přiblížení obou

membrán, jejich splynutí pomocí fúzogenních faktorů a k následnému vytvoření hybridních vezikulů. To umožní uvolnění obsahu akrozomu do extracelulárního prostoru (shrnutí Abouhaila & Tulsiani, 2009).

Nicméně nové technologie umožňující citlivější detekci ukazují, že většina spermií podstoupí AR ještě předtím, než se vůbec navážou na ZP (Jin *et al.*, 2011). V této studii byly kapacitované spermie inkubovány s oocyty, u kterých nebyly odstraněny kumulární buňky. Pro tento experiment použili transgenní samce myši, u jejichž spermií docházelo k expresi GFP (green fluorescent protein) v akrozomu. Hlavička spermie vykazovala v oblasti akrozomu zelenou fluorescenci v případě, že byl akrozom intaktní. Po AR již fluorescence nebyla patrná. Jednotlivé spermie byly poté vyhodnoceny pomocí pořízeného videozáznamu. Překvapujícím výsledkem bylo zjištění, že většina spermií podstoupila AR již během průchodu kumulárními buňkami a tyto spermie byly navíc úspěšné při oplození. Naopak pouze malé množství spermií bylo schopné oplodnit oocyt, pokud u nich AR proběhla až po vazbě na ZP. Avšak mechanismus a přesné místo, kde dochází k aktivaci AR, není zcela objasněn.

### **3.3.5.2 UPS a jeho role při oplození**

26S proteazom spermie je v posledních letech považován za esenciální složku při penetraci ZP (Sutovsky *et al.*, 2004b; Zimmerman *et al.*, 2011). Mechanismus působení 26S proteazomu v roli digestivního enzymu spočívá ve štěpení proteinů ZP a následném umožnění průniku spermie do oocytu. Předpokladem této hypotézy je extracelulární ubiquitinace proteinů ZP a jejich následná degradace.

Bylo prokázáno, že u savčích oocytů dochází k ubiquitinaci proteinů ZP (Sutovsky *et al.*, 2004b), konkrétně u prasečích oocytů jsou ubiquitinovány všechny komponenty ZP, tedy ZPA, ZPB i ZPC (Zimmerman *et al.*, 2011). Vazba Ub byla zaznamenána i u proteinů vitelinní membrány vajíček sumky a ježovky (Sawada *et al.*, 2002; Yokota & Sawada, 2007).

K ubiquitinaci proteinů extracelulárního obalu (ZP nebo vitelinní membrána) může dojít u různých živočichů v odlišných fázích. Například u sumky jsou proteiny vitelinní membrány ubiquitinovány až při oplození, přičemž na ubiquitinaci se podílí komponenty UPS uvolněné ze spermie (Sawada *et al.*, 2002; Sakai, 2003). V tomto případě je Ub připojen na receptory pro vazbu spermií HrVC70 (homologem u savců je receptor pro vazbu spermie ZP3), které jsou poté rozpoznány proteazomálním komplexem spermie a degradovány (Sawada *et al.*, 2002). Naopak u ježovek a savců probíhá extracelulární ubiquitinace proteinů ZP

a vitelinní membrány už před oplozením, tedy během oogeneze (Sutovsky *et al.*, 2004b; Yokota & Sawada, 2007; Zimmerman *et al.*, 2011). Je však otázkou, jakým způsobem jsou během oogeneze proteiny ZP značeny molekulami Ub. První možností je, že jsou proteiny ZP ubiquitinovány už v sekreční dráze. Za normálních okolností funguje v endoplazmatickém retikulu degradační dráha (ERAD) která se podílí na ubiquitinaci a následné degradaci proteinů, které jsou např. špatně sbalené. Je ale možné, že ubiquitinovány proteiny ZP mohou degradaci uniknout, jsou sekretovány a následně lokalizovány do ZP. Další možností je ubiquitinace proteinů ZP až po jejich začlenění do ZP. Tuto teorii podporuje přítomnost volného Ub ve folikulární tekutině v poměrně vysoké koncentraci (shrnutí Zimmerman *et al.*, 2011).

Funkce 26S proteazomu při oplození byla zkoumána pomocí jeho inhibice při *in vitro* oplození. Inhibitory proteazomálního komplexu MG-132 a MG-115 efektivně blokují penetraci vitelinní membrány u ježovek (Yokota & Sawada, 2007). Stejný výsledek byl pozorován i v případě savců při použití inhibitorů proteazomálního komplexu MG-132 a lactacystinu (Sutovsky *et al.*, 2004b). Pokud byly použity oocyty, ze kterých byla předem odstraněna ZP, inhibitory neměly žádný vliv na oplození (Sutovsky *et al.*, 2004b).

Zimmerman *et al.* (2011) zkoumali vliv UPS na oplození odlišným přístupem. V této studii byly kapacitované kančí spermie inkubovány s rozpuštěnými proteiny ZP získanými z maturovaných oocytů. Výsledkem byla degradace receptorů pro spermii ZPC, stejně jako v případě inkubace rozpuštěných proteinů ZP s proteazomy izolovanými ze spermií. Při použití inhibitoru proteazomálního komplexu byla degradace ZPC blokována (Zimmerman *et al.*, 2011).

26S proteazom je důležitý nejen při penetraci ZP, ale také při AR. Proteazomální komplex degraduje některé proteiny asociované s akrozomální membránou, což může vést k akrozomální exocytóze (Zimmerman *et al.*, 2011). V případě použití inhibitoru proteazomálního komplexu (clasto-lactacystin  $\beta$  lactone) byla AR blokována (Morales *et al.*, 2003). U ježovek je 26S proteazom také odpovědný za AR (Yokota & Sawada, 2007).

### 3.3.6 Fúze pohlavních buněk

Pokud spermie úspěšně penetruje ZP, dochází k samotné fúzi gamet. U savců probíhá první kontakt mezi membránou ekvatoriální oblasti spermie a oolemou, kde se nachází velké množství mikroklků. Na molekulární úrovni není mechanismus fúze gamet zcela prostudován a doposud je známo pouze pár proteinů nezbytných pro interakci membrán. Jedním

z nich je protein IZUMO1 na membráně spermie (Inoue *et al.*, 2005). V této studii ukázali, že spermie samců myši, které byli IZUMO1-deficientní, jsou schopné penetrovat ZP, ale nejsou schopné fúze s oocytem. Na oolemě byl nedávno objeven protein Juno sloužící jako receptor pro protein IZUMO1 (Bianchi *et al.*, 2014). IZUMO1 a Juno jsou zatím jedinou známou interagující dvojicí proteinů účastníci se fúze, nicméně ani jeden z nich se nezdá být fúzogenním faktorem. IZUMO1 zřejmě interaguje s proteiny, které přímo zprostředkovávají splnutí membrán (shrnutí Klinovska *et al.*, 2014).

Na oolemě se nachází také protein CD9, jehož funkce spočívá spíše ve vazbě spermie na oocyt, než při samotné fúzi gamet. Je zřejmé, že se na fúzi budou podílet i jiné proteiny na membráně oocytu. Mezi ně patří např. extracelulární proteiny připojené pomocí glykofosfatidylinositolové kotvy (shrnutí Klinovska *et al.*, 2014).

Zdá se, že se procesu fúze membrán účastní i další faktor na membráně spermie, produkt genu SPACA6 (Lorenzetti *et al.*, 2014). Předpokládá se, že by mohl asociovat s dosud neznámým receptorem na oolemě, stejně jako je tomu v případě IZUMO1.

I přesto, že se tímto důležitým krokem při oplození zabývá řada výzkumů, není ještě dostatečně popsán a pro úplné pochopení tohoto složitého procesu bude zapotřebí další studium.

### **3.4 Děje po oplození**

#### **3.4.1 Aktivace oocytu**

Aby bylo oplození úspěšné a mohl začít embryonální vývoj, musí po průniku spermie dojít k aktivaci oocytu. Za aktivaci oocytu jsou zodpovědné faktory obsažené ve spermii, tzv. SOAFs (sperm oocyte-activating factors). Mezi hlavní kandidáty na SOAFs patří fosfolipáza C- $\zeta$  (PLC $\zeta$ ), alternativně PAWP (Post-acrosomal sheath WW domain-binding protein) (shrnutí Anifandis *et al.*, 2016).

Předpokládaným mechanismem aktivace oocytu je uvolnění PLC $\zeta$  ze spermie po fúzi gamet, následné štěpení fosfatidylinositolu-4,5-bisfosfátu na 1,2-diacylglycerol a inositol-1,4,5-trifosfát indukující uvolnění  $\text{Ca}^{2+}$  z endoplazmatického retikula. Následné periodické oscilace hladiny  $\text{Ca}^{2+}$  v oocyty vedou k exocytóze kortikálních granulí, dokončení meiózy a tvorbě prvojadra (shrnutí Amdani *et al.*, 2015).

Deficience PLC $\zeta$  může být důvodem neplodnosti u mužů. Bylo zjištěno, že lidské spermie, které jsou opakovaně neúspěšné při metodě ICSI, jsou PLC $\zeta$ -deficientní a nejsou tak schopné indukovat Ca<sup>2+</sup> oscilace a tím i aktivovat oocyt (Yoon *et al.*, 2008).

### 3.4.2 Fúze genetického materiálu

U savců se na budoucím vývoji embrya podílí genomy spermie i oocytu. Při oplození je DNA spermie v kondenzovaném stavu díky přítomnosti bazických proteinů protaminů. Ty obsahují velké množství pozitivně nabitých aminokyselinových zbytků argininu, které neutralizují negativně nabitou DNA a způsobují tak její těsnější uspořádání. Protaminy jsou také bohaté na cystein. Tyto aminokyseliny jsou propojeny pomocí disulfidických vazeb, což zajišťuje stabilitu genomu. Jelikož je takto kondenzovaná DNA spermie transkripčně neaktivní, je potřeba aby po oplození došlo k dekonenzaci jádra spermie a k nahrazení protaminů histony. Při tomto kroku je důležitý glutathion v ooplazmě redukující disulfidické vazby mezi protaminy (shrnuto Gosden & Lee, 2010; shrnuto Ward, 2010).

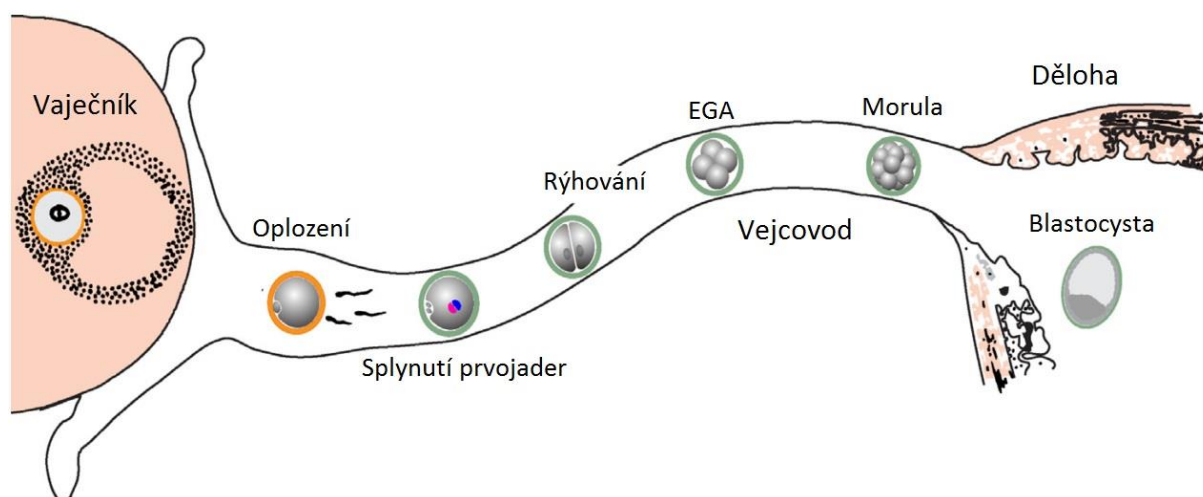
U většiny savců spermie proniká do oocytu nacházejícího se ve stádiu MII. Po oplození dochází k dokončení meiotického dělení a vzniká samičí prvojádru. Syntéza DNA probíhá zvlášť v samičím a samčím prvojádře. Obě prvojádra k sobě migrují pomocí mikrotubulů, které jsou organizovány díky centrozomu pocházejícího ze spermie. Při dostatečném přiblížení prvojader dojde k rozpadu jaderných obálek a splynutí. Tím ale nevzniká pravé zygotické jádro jako u ježovek, neboť kondenzované chromozomy se pouze seřadí na mitotickém vřetenku a následně se rozcházejí do dvou nově vzniklých buněk. U savců je tedy pravé diploidní jádro až ve dvoubuněčném stádiu. Proces vzniku prvojader, jejich migrace a následného splynutí je u savců poměrně pomalý proces, což je způsobeno zejména nutností dekonenzace jádra spermie a dokončením meiózy u oocytu. Při použití oocytů maturovaných *in vitro* je u prasete první fúze prvojader pozorována přibližně 18 hodin po oplození, maxima je dosaženo o několik hodin později (Laurincik *et al.*, 1994).

### 3.4.3 Časný embryonální vývoj

U savců embryo krátce po oplození využívá maternální zásoby RNA a proteinů nahromaděné v oocytu během jeho růstu a maturace. Klíčovým okamžikem pro další vývoj embrya je aktivace embryonálního genomu (EGA), při které dochází k zahájení transkripce a následně i translace na základě embryonálního genomu. Tento kritický moment rozhodující

o budoucím vývoji embrya nastává až po určitém počtu buněčných dělení. To je druhově specifické a konkrétně u prasete dochází k EGA ve čtyřbuněčném stádiu (Jarrell *et al.*, 1991).

Mitotické dělení pokračuje za vzniku nových buněk (blastomer), ale celková velikost embrya se nemění. V *in vivo* podmínkách putuje rýhující se embryo vejcovodem směrem k děloze. Embryo obsahující šestnáct buněk se nazývá morula. Postupně dochází k její kompaktaci, přičemž vnitřní blastomery jsou budoucím embryoblastem a vnější blastomery se stanou trofoblastem. Dochází k tvorbě dutiny vyplněné tekutinou a k oddělení dvou zmíněných populací buněk za vzniku blastocysty. Posledním dějem před implantací embrya je tzv. hatching blastocysty, kdy embryo opustí ZP. V *in vivo* podmínkách následuje uhníždění embrya v děložní sliznici. Embryoblast dá posléze vzniknout samotnému embryu a trofoblast vytvoří extraembryonální tkáň. Časný embryonální vývoj popisuje Obrázek 4.



**Obrázek 4:** Časný embryonální vývoj, konkrétně u prasete. Ovulovaný oocyt je oplozen ve vejcovodu a následně dochází k tvorbě a fúzi prvojader. Embryo během rýhování putuje vejcovodem směrem k děloze. Ve čtyřbuněčném stádiu je u prasete aktivován embryonální genom (EGA). Po dalších děleních vzniká morula a následně i blastocysta tvořená embryoblastem, trofoblastem a dutinou, která se nazývá blastocoel. Před implantací dojde k tzv. hatchingu blastocysty a uhníždění embrya ve sliznici dělohy (převzato a upraveno Li *et al.*, 2013).

### 3.4.4 Degradace paternálních mitochondrií

U většiny živočichů, včetně savců, se mitochondriální DNA (mtDNA) dědí maternálně a to i přesto, že při oplození do oocytu vstupují také mitochondrie spermie. Důvodem může být zvýšená míra výskytu mutací u mtDNA spermie způsobená oxidativním poškozením. Reaktivní sloučeniny kyslíku vznikající v procesu oxidativní fosforylace v mitochondriích, ději vedoucího k produkci ATP, mohou poškodit DNA, proteiny i lipidy. Jelikož spermie vyžaduje



velké množství energie pro zajištění pohybu, je také náchylná k tvorbě reaktivních sloučenin kyslíku a následným mutacím mtDNA (shrnutí Nakamura, 2013).

#### **3.4.4.1 UPS a jeho role při degradaci mitochondrií**

Možným mechanismem, který vede k eliminaci mitochondrií spermie, je jejich selektivní degradace. U savců je předpokladem ubiquitinace mitochondrií spermie a jejich následná degradace v oocyту (Sutovsky *et al.*, 1999; Sutovsky *et al.*, 2000). Molekuly Ub jsou na mitochondriální proteiny spermie připojeny po oplození v ooplazmě, nicméně prvotní ubiquitinace probíhá již v procesu spermiogeneze. Ubiquitované proteiny jsou během průchodu nadvarletem skryty díky zesíťování pomocí disulfidických vazeb a objeví se znovu až po oplození díky redukčnímu prostředí ooplazmy (Sutovsky *et al.*, 1999; Sutovsky *et al.*, 2000).

Mitochondrie spermie jsou degradovány v časných fázích embryonálního vývoje, avšak jejich degradaci je zabráněno přidáním lysozomálního inhibitoru (chlorid amonný) a mikroinjekcí protilátky proti Ub (Sutovsky *et al.*, 2000). V případě prasete dochází k degradaci mitochondrií spermie velmi brzo, tedy ještě před prvním dělením (Sutovsky *et al.*, 2003b). V této studii bylo také zjištěno, že degradace paternálních mitochondrií je blokována přidáním inhibitorů proteazomálního komplexu, lactacystinu a MG-132. MtDNA spermie tedy může být degradována proteazomální i lysozomální cestou.

Al Rawi *et al.* (2011) ve studii poukazuje na to, že by paternální mitochondrie u savců mohly být degradovány autofagií. Na myším modelu bylo zjištěno, že po oplození dochází k akumulaci autofagozomálních markerů na bičíku spermie (konkrétně v „midpiece“ oblasti, tedy v blízkosti ubiquitovaných mitochondrií), což by podporovalo zničení mitochondrií pomocí autofagie (Al Rawi *et al.*, 2011). Jiná studie tuto hypotézu nepotvrdila a naopak tvrdí, že autofágie se u myši nepodílí na degradaci paternálních mitochondrií (Luo & Sun, 2013). Přesný mechanismus degradace paternální mtDNA u savců je tedy zatím nejasný.

### **3.5 Metody asistované reprodukce**

Metody asistované reprodukce zahrnují široké spektrum technik používaných pro oplození. Nejjednodušší je intrauterinní inseminace. Existují však i metody (IVF, ICSI), kdy je provedeno mimotělní oplození a časně embryo je následně vneseno do dělohy.

Metod asistované reprodukce se využívá v humánní medicíně v případě, kdy se párům nepodaří počít dítě přirozenou cestou. Těchto technik se používá i při reprodukci živočichů. U hospodářských zvířat se provádí za účelem šlechtění nebo oplození samice spermatem od vhodného samce. V laboratorních podmínkách mohou být metody asistované reprodukce využity pro výzkum mechanismů oplození, časného embryonálního vývoje nebo nových antikoncepčních metod.

### 3.5.1 ICSI

Tato metoda spočívá ve vnesení jedné spermie přímo do ooplazmy pomocí tenké skleněné kapiláry (Obrázek 5). Toho se v klinické praxi využívá zejména v případech, kdy spermie nejsou schopny oplodnit oocyt z důvodu malé pohyblivosti, nízkého počtu nebo úplné nepřítomnosti ve spermatu (shrnutí Tesarik, 1996).



**Obrázek 5:** Metoda ICSI. Na mikrofotografii je oocyt s viditelným pólým tělískem fixovaný pomocí holdingové kapiláry. V tenké injekční kapiláře je viditelná spermie.

Metoda ICSI se provádí pomocí mikromanipulátoru. Tato technika je poměrně náročná a vyžaduje dlouhodobou praxi. V rámci této diplomové práce byl použit mikromanipulátor osazený piezo jednotkou. Tato jednotka vytváří lineární vibrace, které jsou převáděny na pohyb injekční kapiláry. Díky tomu je ZP penetrována bez deformace oocytu, která nastává při použití klasické verze ICSI bez piezo jednotky. Pro zvýšení účinnosti této metody je ve špičce injekční kapiláry malé množství rtuti. Při použití této modifikované verze ICSI bylo dosaženo vyšší úspěšnosti oplození oproti klasické metodě ICSI bez piezo jednotky (Yanagida *et al.*, 1999).

Vnesení spermie do oocyty obchází řadu procesů odehrávajících se při přirozeném oplození. Příkladem může být AR nebo fúze gamet, po které dochází k uvolnění SOAFs ze spermie do ooplazmy. Při použití ICSI se musí narušit membrána spermie, aby po injekci spermie došlo k uvolnění SOAFs do ooplazmy a k následné aktivaci oocyty. Poškození membrány je spojeno s její imobilizací, což umožňuje i snadnější provedení této metody oplození. Je několik způsobů penetrace membrány spermie. Mezi ty patří zlomení bičíku pomocí injekční kapiláry nebo imobilizace spermie v ústí kapiláry použitím několika silných piezo pulzů. V případě imobilizace spermie pomocí zlomení bičíku a následné aplikace několika piezo pulzů bylo dosaženo vyšší úspěšnosti oplození, než pokud byla spermie imobilizována pouze zlomením bičíku (Katayama *et al.*, 2005).

Je také možné provést dodatečnou aktivaci oocyty po ICSI. K tomu se může použít elektrických pulzů nebo různých chemických látek. V případě prasete bylo prokázáno zlepšení vývoje do stádia blastocysty při použití rozmražených spermií a dodatečné elektrické aktivaci, v porovnání se skupinou bez aktivace (Lee *et al.*, 2003).

Jak už bylo zmíněno, při oplození metodou ICSI nedochází k AR a spermie jsou do ooplazmy injikovány s intaktním akrozomálním váčkem. Vylití hydrolytických enzymů do ooplazmy však může mít vážné následky. Z tohoto důvodu je potřeba u spermií některých živočišných druhů před oplozením metodou ICSI indukovat AR. Jedná se např. o spermie hlodavců obsahující velký akrozomální váček (shrnuto Tesarik & Mendoza, 1999).

### **3.5.1.1 ICSI u prasete domácího**

Vhodným modelovým organismem pro výzkum oplození je prase domácí. Důvodem je značná podobnost s člověkem, což umožňuje částečně extrapolovat získané výsledky na lidský model. U prasete se metoda ICSI využívá především kvůli častému výskytu polyspermiího oplození při metodě IVF (shrnuto Kren *et al.*, 2003). Naopak nevýhodou ICSI u prasete je nízká úspěšnost vývoje embryí do stádia blastocysty. Bylo zjištěno, že stádia blastocysty dosáhnou s vyšší frekvencí embrya, která se v časných fázích vývoje dělí rychleji (Mateusen *et al.*, 2005). V porovnání s metodou IVF je vývoj embryí po ICSI opožděn a kvalita blastocyst je nižší (Nakai *et al.*, 2014).

Vzhledem k tomu, že proteolytické enzymy obsažené v akrozomálním váčku spermie nemají negativní vliv na embryonální vývoj, jako je tomu u hlodavců, není potřeba u prasete před metodou ICSI indukovat AR (Garcia-Rosello *et al.*, 2006).

## 4. Pracovní hypotéza

Pracovní hypotézou této diplomové práce je negativní korelace extracelulární ubiquitinace spermií s jejich kvalitou, která by se měla odrážet na zhoršeném potenciálu vysoce ubiquitinovaných spermií vytvořit kvalitní časná embrya do stádia blastocysty po ICSI.

## 5. Cíle

- Zvládnutí metody ICSI, včetně disekční metody izolace oocytů
- Studium vlivu povrchové ubiquitinace spermií na tvorbu prvojader u časných zárodků po ICSI.
- Studium vlivu povrchové ubiquitinace spermií na kvalitu časného embryonálního vývoje po ICSI.
- Studium vlivu maskování povrchového ubiquitinu spermií pomocí protilátky proti ubiquitinu na časný embryonální vývoj do stádia blastocysty po ICSI.

## 6. Materiál a metody

### 6.1 Chemikálie

Název chemikálie	Výrobce	Katalogové číslo
Anti-Ubiquitin	Imgenex, San Diego, USA	IMG5020
$\alpha$ -Laktóza monohydrát	Sigma-Aldrich, St. Louis, USA	L2643-500G
BME (Basal Medium Eagle)	Sigma-Aldrich, St. Louis, USA	B6766
BSA (albumin z bovinního séra)	Sigma-Aldrich, St. Louis, USA	A6003-5G
D-(+)-glukóza	Sigma-Aldrich, St. Louis, USA	G6152-100G
DAPI (4',6-diamidino-2-phenylindole)	Imgenex, San Diego, USA	DES500L
Dihydrogenfosforečnan draselný	Sigma-Aldrich, St. Louis, USA	P5655-100G
Dodecylsíran sodný	Sigma-Aldrich, St. Louis, USA	L4390
Dulbecco's PBS fosfátem	Gibco, Paisley, UK	21600-069
Etanol 96%, kvasný	Merci, Brno, ČR	64-17-5
Fenolová červeň	Sigma-Aldrich, St. Louis, USA	P5530-5G
FSH (folikuly stimulující hormon)	Sigma-Aldrich, St. Louis, USA	F2293-1VL
Gentamicin	Gibco, Paisley, UK	5750-037
Glycerol	Sigma-Aldrich, St. Louis, USA	G2025-100ML
Goat anti-rabbit IgG FITC	Imgenex, San Diego, USA	20302
GPBoS, růstové proteiny bovinního séra	Sevapharma, Praha, ČR	
Hoechst 33342	Sigma-Aldrich, St. Louis, USA	B2261
Hyalurodináza	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
Kalcium laktát, pentahydrát	Sigma-Aldrich, St. Louis, USA	C8356-250G
L-Cystein	Sigma-Aldrich, St. Louis, USA	C7352-25G
L-Glutamin	Sigma-Aldrich, St. Louis, USA	G3126-100G
LH (luteinizační hormon)	Sigma-Aldrich, St. Louis, USA	L5269-1VL

M2 médium	Sigma-Aldrich, St. Louis, USA	M7167
M199 médium	Sigma-Aldrich, St. Louis, USA	M4530
MEM (Minimum Essential Medium)	Sigma-Aldrich, St. Louis, USA	M7145
NGS (normal goat serum)	Milipore, Billerica, USA	S26-100ML
Olej minerální	Sigma-Aldrich, St. Louis, USA	M8410-100ML
Olej parafinový	Carl Roth, Karlsruhe, Německo	8904.1
Formaldehyd (36-38 %)	Penta, Chrudim, ČR	140907F
Percoll	GE Healthcare Bio sciences AB, Uppsala, Švédsko	17-0891-02
Poly-L-Lysin	Sigma-Aldrich, St. Louis, USA	P4707
PVA (polyvinylalkohol)	Sigma-Aldrich, St. Louis, USA	P8136-250G
PVP (polyvinylpyrrolidon)	Cook Medical, Queensland, Austrálie	G26774
Pyruvát sodný	Sigma-Aldrich, St. Louis, USA	P4562-5G
Rtuť	Sigma-Aldrich, St. Louis, USA	261017-250G
SDS (sodium dodecyl sulfate)		
Solusem	Varkens K.I. Nederland, Deventer, Netherlands	
Síran hořečnatý, heptahydrát	Sigma-Aldrich, St. Louis, USA	M7774-500G
Trizma base	Sigma-Aldrich, St. Louis, USA	T6066-100G

## 6.2 Složení roztoků

Pro přípravu roztoků byla použita deionizovaná voda, pokud není uvedeno jinak.

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

**PBS/PVA:** roztok byl připraven přidáním 0,1 g PVA do 1 l 1x koncentrovaného PBS.

**Fenolová červeň:** roztok byl připraven rozpuštěním 5 mg fenolové červně v 1 ml vody.

**4% roztok formaldehydu:** 100 ml tohoto roztoku bylo připraveno smícháním 10 ml 10x koncentrovaného PBS, 4 ml 38% paraformaldehydu a 86 ml vody používané pro tkáňové kultury.

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

**mTBM:** 113,1 mM NaCl, 3 mM KCl, 20 mM Trizma base, 5 mM glukóza, 5 mM pyruvát sodný, 1 mM kofein, 2,5 mM CaCl<sub>2</sub> · 2H<sub>2</sub>O, 14,1 nM fenolová červeň, 2 mg BSA/ml.

**PZM3:** 108 mM NaCl, 9,9 mM KCl, 0,35 mM KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 0,4 mM MgSO<sub>4</sub> · 7H<sub>2</sub>O, 25 mM NaHCO<sub>3</sub>, 2 mM kalcium laktát, 1 mM L-glutamin, 5 mM hypotaurin a 0,2 mM pyruvát sodný, 3 mg BSA/ml, 1 µl gentamicinu/ml, 20 µl BME/ml, 10 µl MEM/ml a 1 µl zásobního roztoku fenolové červeně/ml (Yoshioka *et al.*, 2002).

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

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

### 6.3 Přístroje

Binolupa Olympus SZX2-ILLK	Olympus, Japonsko
Box Biosan UVC/T-AR	Biosan, Litva
Centrifuga MPW-340	Mechanika Precyzyjna, Polsko
Inkubátor Hera Cell	Kendro, Německo
Mikromanipulátor Narishige	Narishige, Japonsko
Mikroskop Nikon Eclipse TE200	Nikon, Japonsko
Mikroskop Olympus IX81 CellR	Olympus, Japonsko
Piezo micro manipulator controller	Prime Tech, Japonsko
PMAS-CT150	
Plynový hořák GS-510	Pro's Kit, USA
Průtokový cytometr se sorterem	BD Biosciences, USA
BD-Influx	
Topná deska Thermo plate Mats-U505 R30	Tokai Hit, Japonsko
Váhy SI-234	Denver Instrument, USA
Vodní lázeň DKB-8A	Ibersan, Portugalsko

## **6.4 Metody**

### **6.4.1 Izolace oocytů**

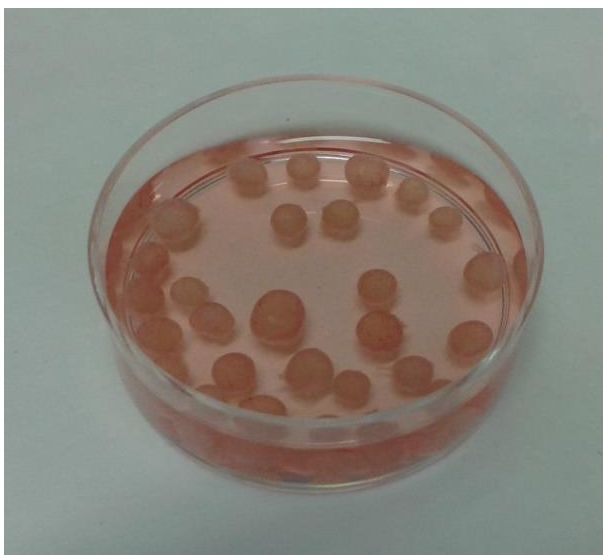
Oocyty pro naše experimenty byly získávány z vaječníků prepubertálních prasnic poražených na jatkách. Vaječníky byly z jatek převáženy v termosce o teplotě 30-35 °C do laboratoře, kde byly promyty nahřátým médiem (cca 35 °C) PBS/PVA. Během izolace byla teplota udržována pomocí vyhřívané plotny.

#### **6.4.1.1 Disekční metoda**

Pro izolaci oocytů byla použita disekční metoda. Ta umožňuje izolovat oocyty pouze z morfologicky kvalitních folikulů, ale v porovnání s aspirační metodou je časově i manuálně náročnější (při aspirační metodě je z vaječníků pomocí injekční jehly podtlakem nasávána folikulární tekutina s oocyty). Bylo prokázáno, že oocyty izolované disekční metodou mají vyšší úspěšnost zrání než při použití aspirační metody (Liu & Moor, 1997).

Při disekci byly použity pouze vaječníky, které obsahovaly větší počet folikulů o velikosti 3-7 mm. Folikuly byly preparovány pomocí dvojice skalpelů, kterými byl na skleněné Petriho misce rozřezán každý vaječník. Folikuly o vhodné velikosti byly přeneseny do média PBS/PVA, jehož teplota byla udržována pomocí vyhřívané plotny. Pod binolupou byly folikuly následně zbaveny přebytečné tkáně pomocí hodinářských pinzet a umístěny do manipulačního média M2 (Obrázek 6). To umožnilo vyhodnotit morfologii každého folikulu díky průsvitné folikulární stěně. Folikuly, jejichž folikulární tekutina obsahovala uvolněné granulózní buňky nebo uvolněný oocyt, byly vyřazeny. Pro další pokusy byly použity pouze folikuly s čistou folikulární tekutinou a oocytem, jehož kumulární buňky byly pevně spojeny s granulózními buňkami stěny folikulu. Takto selektované folikuly byly přeneseny do malé Petriho misky s manipulačním médiem, kde byl každý folikul roztržen pomocí hodinářských pinzet a oocyt byl opatrně oddělen od folikulární stěny. Následovala selekce na úrovni samotných oocytů, kdy byly do maturačního média umístěny pouze oocyty s kompaktním vícevrstevným obalem kumulárních buněk.





**Obrázek 6:** Folikuly zbavené přebytečné tkáně a umístěné v manipulačním médiu M2 v malé Petriho misce.

#### **6.4.2 Maturace oocytů**

Oocyty izolované disekční metodou byly maturovány ve čtyřjamkové destičce v 0,5 ml média M199 převrstveného parafinovým olejem. Maturace probíhala po dobu 44-48 hodin v inkubátoru při teplotě 38,5 °C a 5% atmosféře CO<sub>2</sub> (Krylov *et al.*, 2005).

#### **6.4.3 Odstranění kumulárních buněk**

U maturovaných oocytů, které mají být použity pro další pokusy, je nutné odstranění přilehlých kumulárních buněk.

Do jamky s M199 a oocyty bylo přidáno 25 µl roztoku hyaluronidázy. Po 5-7 minutách byly oocyty přeneseny do kapek manipulačního média překrytých vytemperovaným (cca 38 °C) parafinovým olejem. Pod binolupou byly oocyty protahovány skleněnou kapilárou, přičemž průměr konce kapiláry byl stejný jako průměr oocytu. Díky tomu došlo k mechanickému odstranění kumulárních buněk oocytu. Pro další použití byly vybrány pouze oocyty s pravidelně uspořádanou ooplazmou a vyloučeným 1.PB.

#### **6.4.4 Příprava čerstvých spermií**

Spermie pro všechny pokusy byly získávány ze standardní inseminační dávky od chovných kanců (Chovservis a.s., Hradec Králové). Po dopravení do laboratoře byly spermie uchovávány při teplotě 17 °C až do jejich zpracování.

Do zkumavky bylo odebráno 10 ml resuspendované inseminační suspenze, která byla centrifugována (5 minut, 700 x g). Supernatant byl odsát na objem 1 ml a spermie v něm byly resuspendovány. Pro oddělení živých spermií od mrtvých byly spermie navrstveny na gradient Percollu (do zkumavky bylo nejdříve napipetováno 5 ml 40% Percollu a následně podvrstveno 2 ml 80% Percollu) a centrifugovány (15 minut, 700 x g). Po centrifugaci bylo odsáto vše kromě sedimentu na dně zkumavky. Sediment byl resuspendován v 1 ml PBS/PVA a spermie byly promyty od Percollu doplněním na objem 10 ml PBS/PVA a následnou centrifugací (5 minut, 700 x g). Supernatant byl odsát a sediment resuspendován v 1 ml PBS/PVA. Proces promytí byl proveden celkem dvakrát.

Koncentrace spermií byla následně spočítána pomocí Bürkerovy komůrky. Pro počítání množství spermií byla suspenze naředěna 100x vodou, která způsobuje imobilizaci spermií a usnadňuje tak jejich počítání. Spermie o známé koncentraci v roztoku PBS/PVA byly naředěny do média mTBM na výslednou koncentraci  $2 \times 10^6$  spermií/ml a kapacitovány v inkubátoru po dobu 30 minut, při teplotě 38,5 °C a 5% atmosféře CO<sub>2</sub>.

#### **6.4.5 Zamražení spermií**

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

#### **6.4.5.1 Rozmražení spermií před ICSI**

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

### **6.5 Příprava spermií pro pokus s maskováním Ub epitopu na povrchu spermií**

#### **6.5.1.1 Centrifugace na gradientu Percollu**

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

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

#### **6.5.1.2 Inkubace s primární protilátkou**

Pro následující práci se dále používalo 0,5 ml suspenze, která byla centrifugována (5 minut, 700 x g). Supernatant byl odsát a sediment resuspendován v 5% NGS o objemu 0,5 ml. Blokování probíhalo po dobu 30 minut při 17 °C a poté byla suspenze centrifugována (5 minut, 700 x g). Vzniklý supernatant byl odstraněn a sediment resuspendován v 0,5 ml 1% NGS. Do dvou mikrozkušavek (typu Eppendorf) bylo odebráno 50 µl této suspenze a do jedné z nich byla navíc přidána primární protilátka proti Ub (Anti- Ubiquitin, Imgenex; ředění 1:100). Druhá zkumavka sloužila jako kontrolní vzorek pro následující pokusy. Obě mikrozkušavky byly inkubovány po dobu 45 minut při teplotě 17 °C. Po inkubaci byly spermie centrifugovány (5 minut, 700 x g), supernatant byl odebrán a peleta resuspendována v 50 µl 1% NGS.

### **6.5.1.3 Kapacitace spermií**

Z každé mikrozkuhavky bylo odebráno 10  $\mu\text{l}$  suspenze (se zbylými 40  $\mu\text{l}$  suspenze bylo provedeno kontrolní barvení) a přidáno do 200  $\mu\text{l}$  média mTBM. Výsledná koncentrace spermií v mTBM činila  $2 \times 10^6$  spermií/ml. Spermie byly kapacitovány v inkubátoru (teplota 38,5 °C, 5% atmosféra  $\text{CO}_2$ ) po dobu 20-30 minut. Kapacitované spermie byly následně použity pro ICSI.

### **6.5.1.4 Inkubace se sekundární protilátkou**

Ke zbylým 40  $\mu\text{l}$  suspenze v každé mikrozkuhavce bylo napipetováno dalších 40  $\mu\text{l}$  1% NGS a do obou mikrozkuhovek byla přidána sekundární protilátka (Goat anti-rabbit IgG FITC, Imgenex; ředění 1:200). Při teplotě 17 °C probíhala inkubace po dobu 1 hodiny. Obě zkuhavky byly centrifugovány (5 minut, 700 x g). Supernatant byl odstraněn a sediment resuspendován v 80  $\mu\text{l}$  1% NGS. Pro odstranění přebytečné sekundární protilátky byly spermie dvakrát promyty v 1% NGS. Na podložní skličko bylo napipetováno 5  $\mu\text{l}$  z každé mikrozkuhavky a překryto krycím sklíčkem. Sklička byla vyhodnocena na mikroskopu.

## **6.6 Příprava spermií pro pokus se sortovanými spermii**

### **6.6.1.1 Centrifugace na gradientu Percollu**

20 ml inseminační dávky bylo připraveno dle kapitoly 6.4.4 s tím rozdílem, že promytí od Percollu bylo provedeno pouze jednou a nebyl proveden krok kapacitace. Výsledná koncentrace suspenze zde činila  $1 \times 10^8$  spermií/ml.

### **6.6.1.2 Inkubace s primární a sekundární protilátkou**

Bylo odebráno 5 ml suspenze a centrifugováno (5 minut, 700 x g). Supernatant byl odsát a sediment resuspendován v 5 ml 5% NGS. Blokování probíhalo po dobu 30 minut při 17 °C. Následně byly spermie centrifugovány (5 minut, 350 x g). Supernatant byl odstraněn a sediment byl resuspendován v 0,5 ml 1% NGS do kterého byla přidána primární protilátka proti Ub (Anti-Ubiquitin, Imgenex; ředění 1:100). Inkubace probíhala po dobu 40 minut při teplotě 17 °C. Suspenze byla centrifugována (5 minut, 350 x g) a vzniklý supernatant byl odsát. Spermie byly dvakrát promyty v 1% NGS a inkubovány v 1 ml 1% NGS se sekundární protilátkou (Goat anti-rabbit IgG FITC, Imgenex; ředění 1:200) po dobu 60 minut při teplotě

17 °C. Suspenze byla centrifugována (5 minut, 350 x g), supernatant byl odsát a sediment rozpuštěn ve 2 ml média Solusem (Varkens K.I. Nederland).

### **6.6.1.3 FACS**

FACS (fluorescence-activated cell sorting) umožňuje získávání subpopulace buněk vykazující určitý znak z heterogenní populace na základě fluorescenčních vlastností každé buňky. Pro naše pokusy byly spermie tříděny na průtokovém cytometru se sorterem BD-Influx v Servisním pracovišti pro světelnou mikroskopii a průtokovou cytometrii Ústavu molekulární genetiky, Akademie věd České republiky.

Z důvodu odlišení spermií od debris a jiných částic bylo provedeno barvení pomocí Hoechst 33342 (Sigma-Aldrich). Výsledná koncentrace Hoechst 33342 v roztoku PBS/PVA se spermiemi činila 1 µg/ml. Barvení probíhalo po dobu 15 minut. Vzorek byl filtrován přes 40 µm sítko kvůli odstranění shluklých spermií.

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

### **6.6.1.4 Zamražení spermií**

Obsah zkumavek s tříděnými spermiemi byl centrifugován (5 minut, 700 x g). Supernatant byl odstraněn a sediment byl jemně resuspendován v 200 µl frakce A zamrazovacího média. Suspenze byla postupně chlazena v lednici po dobu 2 hodin na teplotu 5 °C. K suspenzi bylo přidáno 200 µl frakce B zamrazovacího média a další postup byl proveden dle kapitoly 6.4.5.

## 6.6.2 ICSI

Při manipulaci s oocyty/embryi je vždy důležité, aby se omezil čas strávený mimo inkubátor. Z tohoto důvodu je potřeba provést ICSI co nejrychleji. Pro minimalizaci teplotního rozdílu je mikromanipulátor vybaven vyhřívanou destičkou.

Na speciální IVF/ICSI misku bylo napipetováno několik 10 $\mu$ l kapek manipulačního média M2, dvě 5 $\mu$ l kapky PVP a dvě očišťovací kapky M2 (20  $\mu$ l). Kapky byly následně překryty parafinovým olejem, aby se zamezilo jejich odpařování. Do 10 $\mu$ l kapek byly pomocí skleněné kapiláry přeneseny oocyty, přičemž v jedné kapce se nacházelo vždy více oocytů. Do 5 $\mu$ l kapek PVP bylo napipetováno 5  $\mu$ l kapacitovaných spermií v médiu mTBM a připravená miska byla umístěna pod mikromanipulátor.

Spermie byla imobilizována, buď zlomením bičíku pomocí rychlého pohybu injekční kapiláry, nebo nasátím spermie do kapiláry a následnou aplikací několika silných pulzů piezo jednotkou. Kapilára s nasátou spermií byla protažena očišťovací kapkou s manipulačním médiem, aby došlo k odstranění spermií přichycených vně kapiláry a byla přemístěna do kapky s oocyty. Daný oocyt byl vždy zafixován pomocí holdingové kapiláry tak, že se 1.PB nacházelo v poloze 1 nebo 5 (poloha číslic na ciferníku). Důvodem byla co nejnižší pravděpodobnost poškození jádra v průběhu injekce spermie. Pomocí silných pulzů byla penetrována ZP oocytu a z kapiláry byla odstraněna zátka tvořená ZP. K průniku přes oolemu byly použity slabé pulzy, přičemž injekční kapilára byla vedena až do 2/3 průměru oocytu. Penetrace byla potvrzena nasátím malého množství ooplazmy, která byla následně injikována i se spermií zpět do oocytu. Kapilára byla vytažena tak, aby došlo k rychlému zacelení oolemy a z oocytu nevytékala ooplazma.

Tímto postupem bylo provedeno oplození všech oocytů na misce. Po provedení ICSI byly oocyty přeneseny do jamek s 0,5 ml média PZM3 překrytého parafinovým olejem.

## 6.6.3 Kultivace po oplození

Embrya byla po oplození kultivována v inkubátoru při teplotě 38,5 °C a 5% atmosféře CO<sub>2</sub>. Doba kultivace závisela na charakteru pokusu. Pokud se u embryí sledovala tvorba prvojader, byla doba kultivace 19-20 hodin. Kultivace embryí do stádia blastocysty probíhala po dobu jednoho týdne.

#### **6.6.4 Fixace a barvení embryí**

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

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

#### **6.6.5 Nepřímá imunofluorescence spermií**

Na dno jamek ve čtyřjamkové destičce byla umístěna kulatá krycí sklíčka a překryta 200  $\mu$ l poly-L-lysinu. Inkubace probíhala po dobu 30 minut na vyhřívané plotně (38 °C). Sklíčka byla dvakrát opláchnuta pomocí vody pro tkáňové kultury a přebytečná voda byla odsáta. Na poly-L-lysinem potažená sklíčka bylo napipetováno 300  $\mu$ l suspenze spermií v PBS o koncentraci  $2 \times 10^6$  spermií/ml (příprava spermií je popsána v kapitole 6.4.4, posledním krokem je počítání koncentrace spermií). Po 25 minutách inkubace byla přebytečná suspenze odsáta a sklíčka byla opláchnuta PBS. Následovala blokáce v 300  $\mu$ l 5% NGS po dobu 30 minut. Přebytečná tekutina byla odsáta a sklíčka byla inkubována s 200  $\mu$ l 1% NGS s primární protilátkou proti Ub (Anti-Ubiquitin, Imgenex; ředění 1:100) po dobu 1 hodiny. Sklíčka byla poté třikrát opláchnuta 1% NGS (5 minut na jeden oplach) a inkubována se sekundární protilátkou (Goat anti-rabbit IgG FITC, Imgenex) v 200  $\mu$ l 1% NGS (ředění 1:250) po dobu 1 hodiny. Následoval oplach 1% NGS (3x 5 minut). Na podložní sklíčko bylo napipetováno 5  $\mu$ l montovacího média s DAPI a na tuto kapku bylo položeno krycí sklíčko se spermiemi (stranou s přichycenými spermiemi dolů).

#### **6.6.6 Statistická analýza**

Tvorba grafů a statistická analýza byla provedena v programu Microsoft Excel 2013 (Microsoft Corporation). Získané výsledky byly vyhodnoceny pomocí Studentova t-testu. Hodnota p menší než 0,05 byla považována za statisticky signifikantní, \* $p < 0,05$ , \*\* $p < 0,01$ . \*\*\* $p < 0,001$ .

## 7. Výsledky

### 7.1 Maturace oocytů

Vyhodnocení maturace oocytů bylo prováděno pod binolupou (44-46 hodin od začátku maturace) pomocí sledování přítomnosti 1. PB (Obrázek 7). V našem případě byla maturace oocytů na vysoké úrovni a nepředstavovala problém. Z celkového počtu 2064 oocytů vykazovalo 89,4 % vyloučené 1. PB.

Pro všechny pokusy byly používány pouze oocyty ze skupin, kde úspěšnost maturace dosahovala minimálně 80 %.

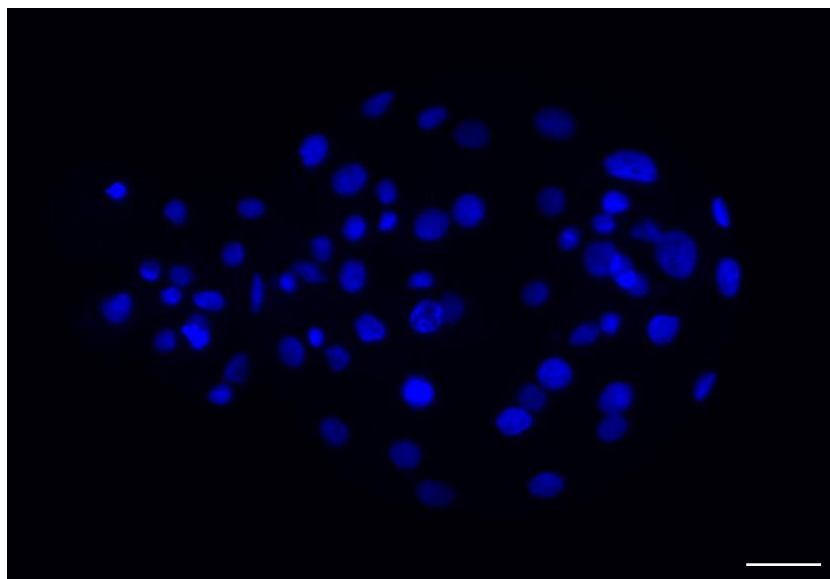


**Obrázek 7:** Maturované prasečí oocyty. Vyloučená pólová tělíčka jsou označena šipkou. Měřítko 50  $\mu\text{m}$ .

### 7.2 Časný embryonální vývoj

V tomto experimentu byla sledována úspěšnost vývoje embryí do stádia blastocysty při použití metody ICSI. Embrya byla po oplození kultivována po dobu jednoho týdne, poté fixována, barvena DAPI a vyhodnocena pomocí fluorescenčního mikroskopu (Obrázek 8).





**Obrázek 8:** Embryo ve stádiu blastocysty. Modře nabarvená jádra pomocí DAPI. Měřitko 20  $\mu\text{m}$ .

Časný embryonální vývoj byl hodnocen po oplození čerstvými nebo rozmraženými spermii (Tabulka 1). V tomto experimentu bylo vyhodnoceno 92 embryí (6 opakování) v případě oplození čerstvými spermii a 45 embryí (3 opakování) při použití rozmražených spermii. Stádia blastocysty dosáhlo 21 % embryí v případě čerstvých spermii a 11 % při oplození rozmraženými spermii.

	Intaktní spermie	<2b	2-4b	5b- Morula	Blastocysta
Čerstvé spermie	9 (10 %)	16 (17 %)	28 (30 %)	20 (22 %)	19 (21 %)
Rozmražené spermie	9 (20 %)	5 (11 %)	19 (42 %)	7 (16 %)	5 (11 %)

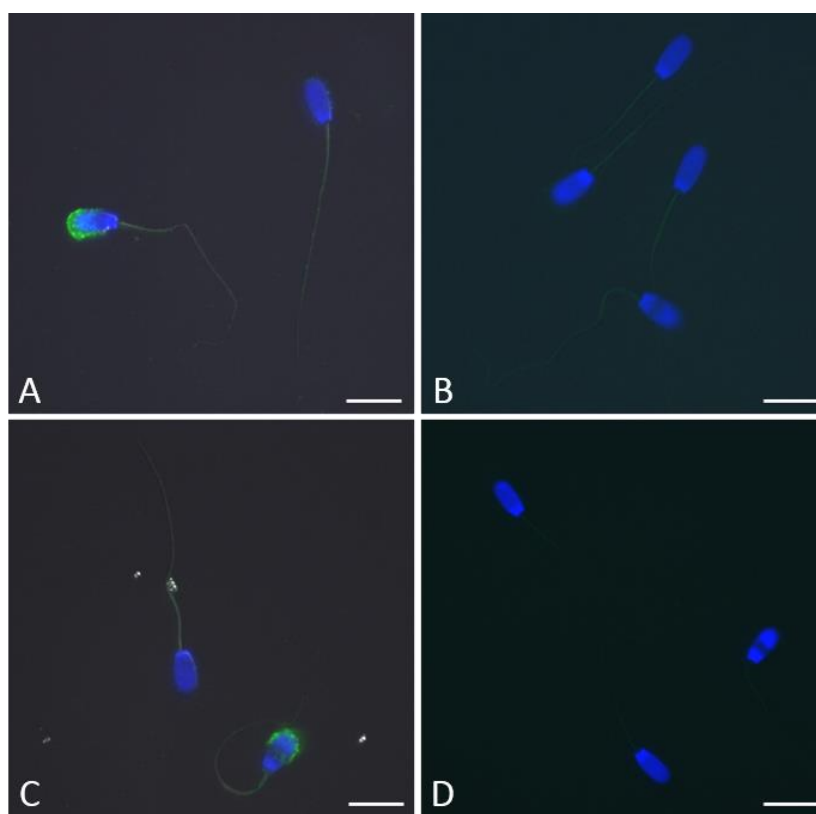
**Tabulka 1:** Počet embryí v jednotlivých stádiích časného vývoje po týdnu kultivace při oplození čerstvými nebo rozmraženými spermii. V závorkách je uvedena celková procentuální četnost daného stádia.

### 7.3 Imunofluorescence spermii

Na základě značení povrchového Ub pomocí nepřímé imunofluorescence byly detekovány spermie vykazující povrchovou ubiquitinaci. Extracelulárně ubiquitované spermie byly pozorovány u čerstvých i rozmražených kančích spermii (Obrázek 9). Podíl povrchově ubiquitovaných spermii se mezi jednotlivými vzorky lišil a pohyboval se v rozmezí jednotek až desítek procent. U ubiquitovaných spermii byl silný signál ve většině

případů pozorován na hlavičce spermie a pouze malá intenzita signálu byla zaznamenána na bičíku. Pokud byl u některých spermii silně ubiquitinován i bičík, jednalo se ve většině případů o bičík viditelně defektní.

Kontrolní skupiny v případě čerstvých i rozmražených spermii byly inkubovány pouze se sekundární protilátkou. Fluorescenční signál odpovídající povrchové ubiquitinaci nebyl zaznamenán ani u jedné kontrolní skupiny.

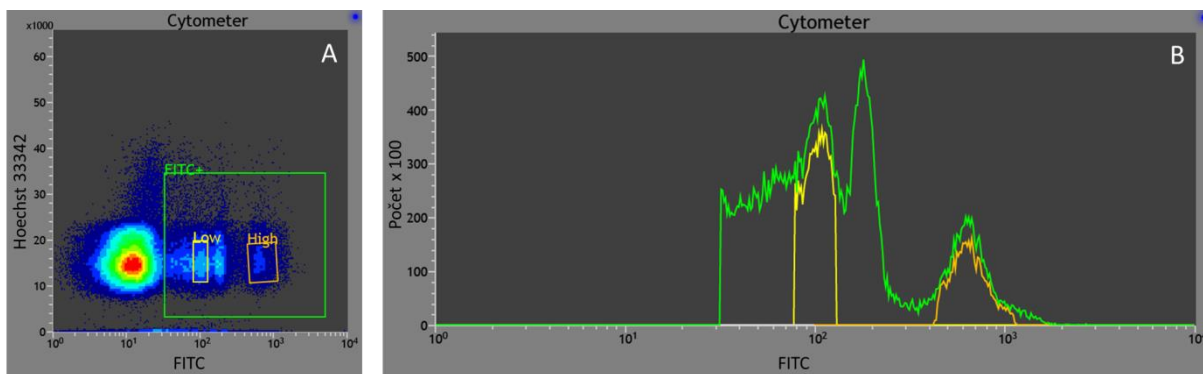


**Obrázek 9:** Povrchová ubiquitinace kančích spermii. Ubiquitin (zeleně) značen pomocí Anti-Ubiquitin/ FITC, jádro (modře) značeno pomocí DAPI. (A) Čerstvé spermie. Příklad spermie vykazující vysokou míru povrchové ubiquitinace (vlevo) a spermie s nízkou mírou povrchové ubiquitinace (vpravo). (B) Čerstvé spermie, kontrola. (C) Rozmražené spermie. Příklad spermie s vysokou mírou povrchové ubiquitinace (dole) a spermie s nízkou mírou povrchové ubiquitinace (nahore). (D) Rozmražené spermie, kontrola. Měřítka 10  $\mu\text{m}$ .

## 7.4 FACS

Na spermiih byl pomocí nepřímé imunofluorescence označen povrchový ubiquitin. Spermie byly následně tříděny metodou FACS na základě fluorescenčního signálu FITC odpovídajícího různé míře povrchové ubiquitinace. Podle intenzity fluorescence byly spermie rozděleny do dvou skupin (Obrázek 10). V první skupině se nacházely spermie vykazující nízkou intenzitu fluorescenčního signálu a tedy i povrchové ubiquitinace. Druhá skupina

zahrnovala spermie s vysokou intenzitou fluorescenčního signálu, což odpovídalo vysoké povrchové ubiquitinaci. Z hlediska co největší uniformity v rámci každé skupiny byla vybrána pouze populace spermií vykazující obdobnou intenzitu signálu FITC.



**Obrázek 10:** Třídění spermií s různou mírou povrchové ubiquitinace metodou FACS. (A) Dot plot- osa x znázorňuje intenzitu fluorescence FITC (ubiquitin), osa y fluorescenci Hoechst 33342 (všechny spermie). Zelený obdélník označuje všechny singletové spermie, žlutým obdélníkem jsou označeny spermie s nízkou mírou povrchové ubiquitinace, oranžovým obdélníkem označeny spermie s vysokou mírou povrchové ubiquitinace (B) Histogram- osa x vyjadřuje intenzitu fluorescence FITC, osa y počet buněk (spermií). Žlutě označena subpopulace spermií s nízkou mírou povrchové ubiquitinace, oranžově jsou označeny spermie s vysokou mírou povrchové ubiquitinace.

## 7.5 Studium vztahu mezi mírou povrchové ubiquitinace spermií a kvalitou časného embryonálního vývoje po ICSI

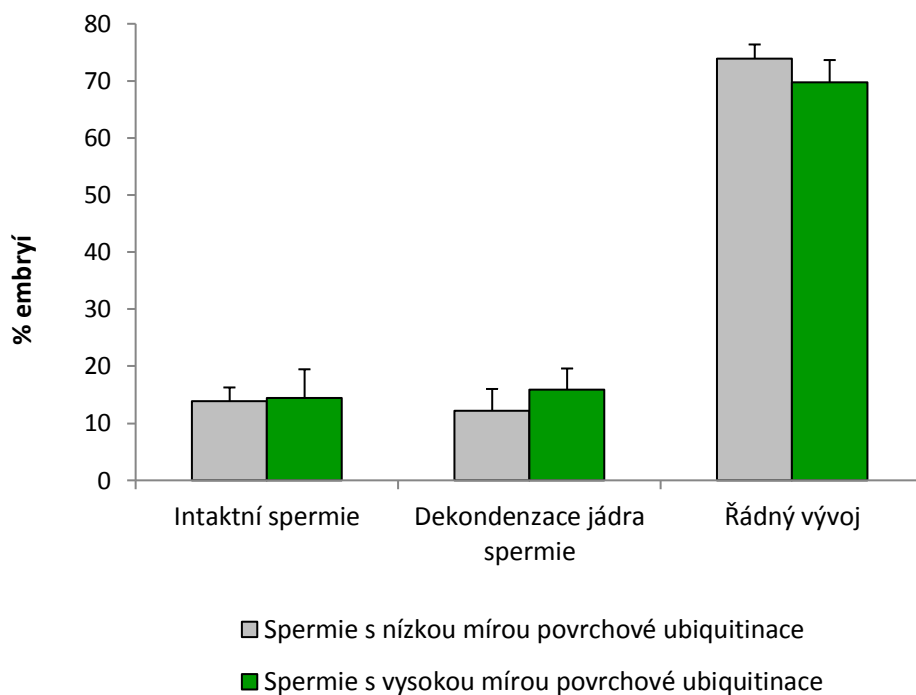
V rámci tohoto studia byly spermie roztrženy metodou FACS do dvou skupin (s nízkým a vysokým zastoupením povrchového Ub) a poté zamrazeny. Následně byly do oocytů injikovány spermie z obou experimentálních skupin. Časný embryonální vývoj byl porovnáván 1) po 19-20 hodinách (tvorba prvojader) a 2) po týdnu kultivace (stádium blastocysty). Embrya byla zafixována, nabarvena DAPI a vyhodnocena pod fluorescenčním mikroskopem.

Díky úspěšnému zavedení kryoprezervačního protokolu bylo možné v rámci provedených experimentů použít spermie získané z jediné inseminační dávky. Tím byly odstraněny rozdíly v kvalitě spermií mezi jednotlivými kanci a také mezi jednotlivými inseminačními dávkami získanými od jednoho kance.

### 7.5.1 Tvorba prvojader

Úspěšnost tvorby prvojader byla sledována 19-20 hodin po oplození a porovnávána mezi dvěma skupinami oocytů, oplozených pomocí spermií s různou mírou povrchové ubiquitinace. Embrya byla považována za řádně se vyvíjející v případě, že u nich byla

pozorována tvorba prvojader (samičího i samčího), případně se již nacházela ve dvoubuněčném stádiu. U zbývajících oocytů, bylo hodnoceno, zda spermie zůstala po oplození intaktní nebo došlo k dekondenzaci jejího jádra. Průměrná úspěšnost tvorby prvojader a četnost pozorování intaktní spermie nebo dekondenzace jádra spermie je znázorněna v grafu (Graf 1).



**Graf 1:** Průměrná úspěšnost tvorby prvojader po 19-20 hodinách kultivace u oocytů oplozených spermii s vysokou nebo nízkou mírou povrchové ubiquitinace. Řádný vývoj zahrnuje embrya, u kterých došlo k formování prvojader nebo se nacházela ve dvoubuněčném stádiu. V tomto grafu je znázorněna také četnost výskytu intaktní spermie nebo dekondenzace jádra spermie u embryí. Zobrazena standardní chyba průměru (SEM).

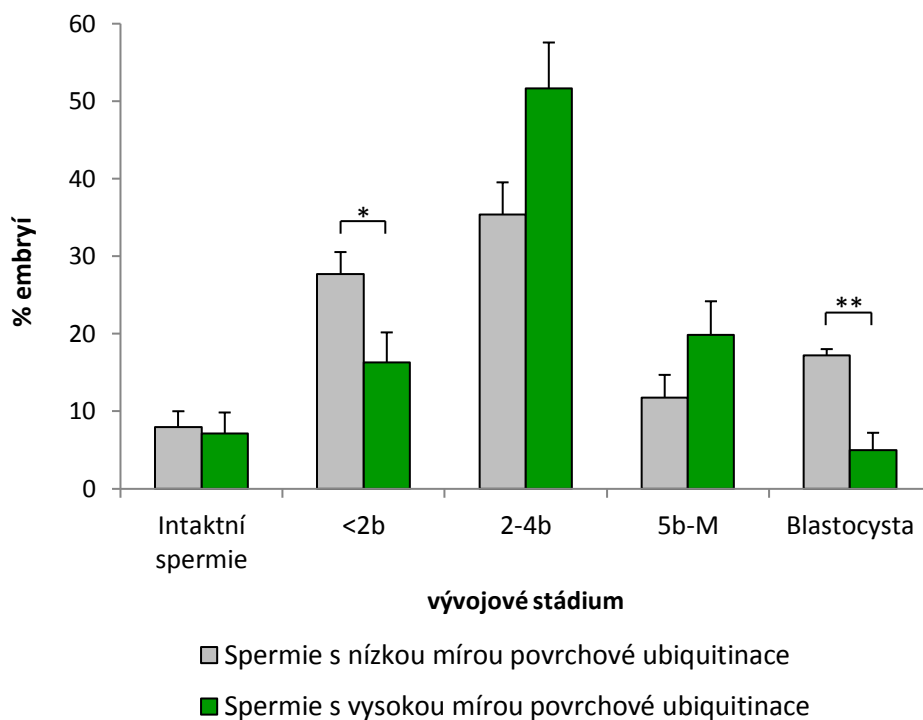
Pro tento experiment bylo vyhodnoceno 136 oocytů/embryí ve skupině oocytů oplozených spermii s nízkou mírou povrchové ubiquitinace a 132 oocytů/embryí v případě oplození spermii s vysokou mírou povrchové ubiquitinace. Uvedený počet oocytů/embryí byl získán v rámci 9 opakování u obou skupin. Tvorba prvojader nebo dvoubuněčné stádium byly pozorovány průměrně v 74 % případů při použití spermii s nízkou mírou povrchové ubiquitinace a v 70 % případů při použití spermii s vysokou mírou povrchové ubiquitinace. Procentuální výskyt oocytů obsahujících intaktní spermii byl shodný u obou skupin (14 %). Procento embryí, u kterých byla pozorována dekondenzace jádra spermie, bylo u obou skupin podobné (12 % u spermii s nízkou mírou povrchové ubiquitinace a 16 % u spermii s vysokou mírou povrchové ubiquitinace). Bylo zjištěno, že v žádném sledovaném znaku není statisticky signifikantní rozdíl ( $p < 0,05$ ) mezi oběma skupinami.

## 7.5.2 Vývoj do stádia blastocysty

V tomto experimentu byl sledován vztah mezi mírou povrchové ubiquitinace spermií a časným embryonálním vývojem do stádia blastocysty po ICSI. V rámci vyhodnocení byla embrya rozdělena do několika vývojových skupin podle počtu buněk. Pro tento pokus bylo klíčové zjistit, jaké procento embryí se vyvine do stádia blastocysty v rámci každé skupiny. U obou skupin jsou průměrné procentuální hodnoty embryí nacházejících se v jednotlivých stádiích vyneseny v grafu (Graf 2).

Pro tento pokus bylo vyhodnoceno 82 embryí ve skupině oocytů oplozených spermii s nízkou mírou povrchové ubiquitinace a 85 embryí při použití spermií vykazujících vysokou míru povrchové ubiquitinace. Oplození bylo prováděno paralelně u obou skupin. Počet opakování byl tedy stejný pro obě skupiny (6 opakování). Ve skupině oocytů oplozených spermii s nízkou mírou povrchové ubiquitinace vykazovala embrya signifikantně lepší vývoj do stádia blastocysty oproti skupině, kde byly použity vysoce ubiquitinované spermie ( $p < 0,01$ ). Po týdnu kultivace se ve stádiu blastocysty nacházelo průměrně 17 % embryí při použití spermií s nízkou mírou povrchové ubiquitinace a pouze 5 % embryí při oplození vysoce ubiquitinovanými spermii. Signifikantní rozdíl ( $p < 0,05$ ) mezi oběma skupinami byl zaznamenán také v četnosti dvoubuněčného stádia (28 % embryí v případě nízké ubiquitinovaných spermií a 16 % v případě vysoce ubiquitinovaných spermií). U ostatních vývojových stádií nebyl zaznamenán signifikantní rozdíl mezi jednotlivými skupinami.

V obou skupinách byl zjištěn průměrný počet buněk v blastocystách. Pokud byly oocyty oplozeny spermii s nízkou mírou povrchové ubiquitinace, blastocysty byly tvořeny průměrně 50 buňkami. Při použití vysoce povrchově ubiquitinovaných spermií byl u blastocyst zjištěn průměrný počet buněk 60. Signifikantní rozdíl v průměrném počtu buněk však nebyl prokázán.



**Graf 2:** Vliv míry povrchové ubiquitinace na časný embryonální vývoj po 7 dnech kultivace. U obou skupin (spermie s nízkou nebo vysokou mírou povrchové ubiquitinace) jsou znázorněny průměrné procentuální hodnoty množství embryí vyskytujících se v daném stádiu. Intaktní spermie, <2b (dekondenzovaná spermie nebo prvojádra), 2-4b (dvoubuněčné až čtyřbuněčné stádium), 5b-M (pětibuněčné stádium až morula), blastocysta. Zobrazena standardní chyba průměru (SEM); \* $p < 0,05$ , \*\* $p < 0,01$ .

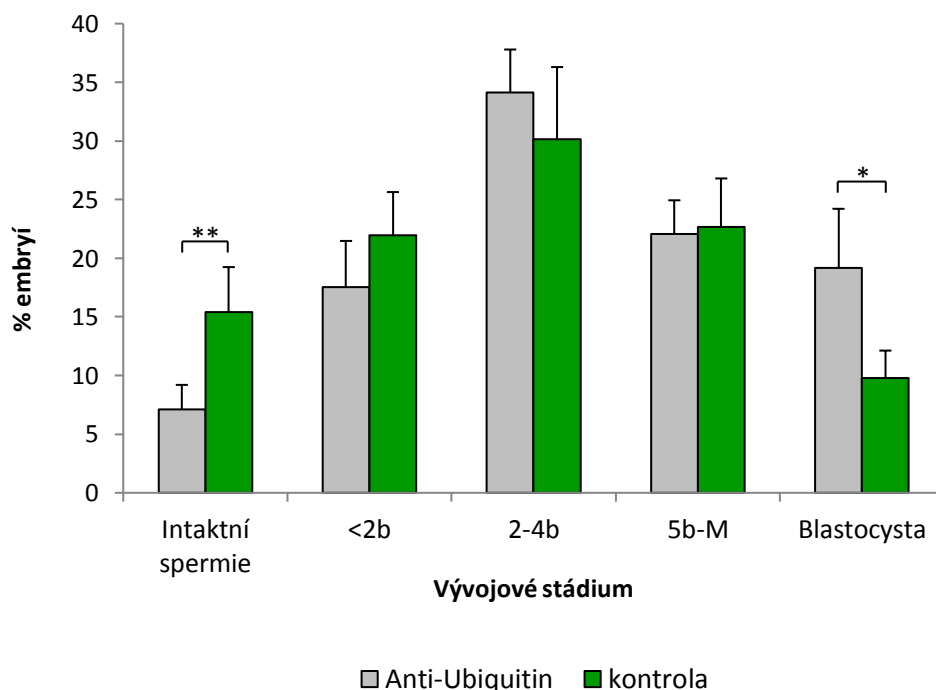
## 7.6 Vliv maskování Ub epitopu na povrchu spermií na kvalitu časného embryonálního vývoje po ICSI

Tento experiment vycházel z hypotézy, že po oplození dochází k rozpoznání vysoce ubiquitovaných spermií 26S proteazomálním komplexem oocyty, což vede k částečné či úplné degradaci spermie a ve svém důsledku k omezení či zastavení dalšího vývoje embrya. V našem experimentu byl tento předpoklad zkoumán pomocí oplození oocytů čerstvými spermii s maskovaným povrchovým Ub díky vazbě protilátky proti Ub. Kontrolní skupina oocytů byla oplozena čerstvými spermii bez navázané protilátky. Vazba primární protilátky byla v každém opakování tohoto experimentu ověřena kontrolním barvením, kdy byly spermie v obou skupinách inkubovány se sekundární protilátkou konjugovanou s FITC. V experimentální skupině byl u některých spermií pozorován fluorescenční signál odpovídající povrchové ubiquitinaci. Naopak v kontrolní skupině nebyl zaznamenán žádný fluorescenční signál.

K oplození obou skupin oocytů byla využita metoda ICSI. Embrya byla kultivována po dobu jednoho týdne, poté fixována, nabarvena pomocí DAPI a vyhodnocena za použití

fluorescenčního mikroskopu. Stejně jako v předchozím experimentu byla při vyhodnocení embrya rozdělena do několika vývojových kategorií podle počtu buněk. Výsledky experimentu jsou znázorněny v grafu (Graf 3).

V rámci tohoto pokusu bylo vyhodnoceno 79 embryí v případě použití spermií s maskovaným povrchovým Ub pomocí protilátky a 73 embryí v kontrolní skupině. Obě skupiny byly oplozeny paralelně a počet opakování byl tedy shodný u obou skupin (8 opakování). Signifikantně lepší vývoj embryí do stádia blastocysty byl pozorován při použití spermií s navázanou protilátkou proti Ub v porovnání s kontrolní skupinou ( $p < 0,05$ ). Po týdnu kultivace se vyvinulo do stádia blastocysty průměrně 19 % embryí v případě oplození spermiemi s maskovaným Ub a 10 % v případě kontrolní skupiny. Signifikantní rozdíl mezi experimentální a kontrolní skupinou byl pozorován také v četnosti výskytu intaktních spermií (7 % v případě použití spermií s maskovaným povrchovým Ub a 15 % v kontrolní skupině;  $p < 0,01$ ). Signifikantní rozdíl mezi oběma skupinami nebyl zaznamenán v případě ostatních vývojových stádií. Dále byl zjištěn průměrný počet buněk v blastocystách v rámci daných skupin. Výsledek byl velmi podobný. V experimentální skupině byly blastocysty tvořeny průměrně 31 buňkami a v kontrolní skupině 29 buňkami.



**Graf 3:** Vliv maskování povrchového Ub spermií na časný embryonální vývoj po oplození. U experimentální (maskování Ub epitopu na povrchu spermií) i kontrolní skupiny jsou do grafu vyneseny průměrné procentuální hodnoty množství embryí nacházejících se po týdnu kultivace v určitém vývojovém stádiu. Intaktní spermie, <2b (dekondenzovaná spermie nebo prvojádra), 2-4b (dvoubuněčné až čtyřbuněčné stádium), 5b-M (pětibuněčné stádium až morula), blastocysta. Zobrazena standardní chyba průměru (SEM); \* $p < 0,05$ , \*\* $p < 0,01$ .

## 8. Diskuze

V rámci této diplomové práce bylo jako modelový organismus pro výzkum oplození použito prase domácí (*Sus scrofa f. domestica*). Tento živočich vykazuje v mnoha ohledech morfologickou a fyziologickou podobnost s člověkem a umožňuje tak částečně extrapolovat získané poznatky pro použití v humánní medicíně. Nicméně úspěšnost vývoje embryí do stádia blastocysty při použití metody ICSI je v případě prasete poměrně nízká (shrnuto Garcia-Rosello *et al.*, 2009). Oplození *in vitro* je u prasat možné provádět po celý rok díky získávání vaječnicků z jatek. Na druhou stranu kvalita oocytů i úspěšnost embryonálního vývoje je značně ovlivněna ročním obdobím. U oocytů oplozených v zimních měsících je úspěšnost vývoje do stádia blastocysty výrazně vyšší než u oocytů oplozených v létě (Suzuki, 2010). Výsledky pokusů mohou být ovlivněny i převozem vaječnicků z jatek do laboratoře a nezanedbatelné jsou také zkušenosti embryologa při izolaci oocytů i při samotném ICSI.

### 8.1 Maturace oocytů a časný embryonální vývoj po ICSI

Pro naše experimenty bylo zásadní získat poměrně velké množství kvalitních oocytů. To se v rámci této práce podařilo a celkem bylo izolováno 2064 oocytů. Oocyty byly izolovány disekční metodou, která je manuálně náročná a bylo potřeba si ji osvojit. Na druhou stranu oocyty izolované touto metodou vykazují vyšší úspěšnost maturace než oocyty získané aspirační metodou (Liu & Moor, 1997). Po 44-46 hodinách maturace bylo pozorováno vyloučené 1.PB u 89,4 % oocytů.

Metoda ICSI je poměrně náročná a vyžaduje dlouhodobou praxi. V našem případě byla úspěšnost vývoje do stádia blastocysty při použití čerstvých spermií průměrně 21 %. Tento výsledek odpovídá hodnotám uváděným v jiných studiích, kde se úspěšnost vývoje embrya do stádia blastocysty pohybuje mezi 9,1-38 % (Kim *et al.*, 1998; Wu *et al.*, 2001; Yoo *et al.*, 2012). Ve zmíněných studiích, stejně jako v našem případě, byly k oplození oocytů použity čerstvé spermie a nebyla provedena dodatečná aktivace oocytu.

Úspěšnost vývoje do stádia blastocysty po ICSI v případě použití rozmražených spermií byla průměrně 11 %. Tento výsledek je také srovnatelný s hodnotami uvedenými v jiných publikacích, kde se do stádia blastocysty vyvinulo 8 % a 10,5 % embryí (Lee *et al.*, 2003; Yong *et al.*, 2003). Ze získaných výsledků je patrné, že úspěšnost vývoje do stádia blastocysty je nižší při použití rozmražených spermií v porovnání s čerstvými spermii. Důvodem může být poškození cytoplazmatické membrány spermií v důsledku mražení, což je u prasete poměrně



častý problém (shrnuto White, 1993). Po procesech mražení a rozmražení značně klesá motilita a viabilita kančích spermií (Cerolini *et al.*, 2001).

## 8.2 Extracelulární ubiquitin spermií

V epididymis dochází k extracelulární ubiquitinaci defektních spermií a extracelulární Ub tak může sloužit jako negativní marker jejich kvality (Sutovsky *et al.*, 2001a). Řada publikací skutečně prokázala negativní závislost míry povrchové ubiquitinace spermií ve vzorku s parametry určujícími jejich kvalitu (motilita, normální morfologie) a naopak pozitivní korelaci s poškozením spermií, např. DNA zlomy (Sutovsky *et al.*, 2002; Sutovsky *et al.*, 2004a; Hodjat *et al.*, 2008). Vysoká míra povrchové ubiquitinace byla objevena u defektních spermií řady savců včetně člověka (shrnuto Sutovsky 2001b) a dá se tedy předpokládat, že by u savců Ub mohl sloužit jako univerzální marker jejich kvality. Na druhou stranu existují i studie, které použití Ub jako negativního kvalitativního markeru odmítají (Muratori *et al.*, 2005; Varum *et al.*, 2007). Jejich počet a rozsah výsledků je však v rámci tohoto tématu minoritní.

U čerstvých i rozmražených kančích spermií byla metodou nepřímé imunofluorescence detekována extracelulární ubiquitinace. Při procesech imunofluorescenčního barvení nebyla provedena permeabilizace a fixace spermií, takže bylo zaručeno značení pouze extracelulárního Ub. Podíl povrchově ubiquitinovaných spermií se mezi jednotlivými vzorky lišil a pohyboval se v rozmezí jednotek až desítek procent. V případě, že byly spermie ubiquitinované, byl silný signál většinou pozorován na hlavičce spermie a pouze malá intenzita signálu byla zaznamenána na bičíku. Pokud byl u některých spermií silně ubiquitinován i bičík, jednalo se ve většině případů o bičík viditelně defektní, jak bylo ukázáno i ve studii Sutovského *et al.* (2001a). Ubiquitin byl také často asociovaný s cytoplazmatickými kapkami.

## 8.3 FACS a mražení spermií

V rámci dalších pokusů byl v naší laboratoři ustanoven protokol na třídění spermií podle míry povrchové ubiquitinace metodou FACS a jejich následného mražení (Petelak & Krylov, 2016). Na základě odlišné intenzity fluorescenčního signálu FITC odpovídajícího různé míře povrchové ubiquitinace byly spermie rozděleny do dvou skupin pomocí metody FACS. První skupina obsahovala spermie s nízkou a druhá s vysokou mírou povrchové ubiquitinace. Z důvodu co největší uniformity v rámci každé skupiny byla vybrána pouze populace spermií vykazující obdobnou intenzitu fluorescenčního signálu. Během třídění metodou FACS byl

zaznamenán pokles motility a viability spermií. Kančí spermie jsou v porovnání se spermii jiných živočišných druhů (býk, beran) více citlivé k fluorescenčnímu barvení DNA, působení laseru a vystavení vysoké rychlosti během sortování (shrnuto Vazquez *et al.*, 2009).

Kančí spermie vykazují velkou variabilitu v parametrech značících jejich kvalitu, odolnosti vůči mražení a v jejich úspěšnosti oplodnit oocyty a to jak mezi různými kanci, tak i mezi jednotlivými odběry ejakulátu konkrétního kance (Roca *et al.*, 2006, shrnuto Gil *et al.*, 2008). Díky mražení spermií bylo umožněno používat spermie získané z jednoho ejakulátu po dobu celého experimentu a bylo tak omezeno vnášení variability do pokusu.

Dle publikovaných výsledků z naší laboratoře jsou průměrné hodnoty viability spermií po procesech sortování, mražení a rozmražení 12 % u spermií s nízkou mírou povrchové ubiquitinace a 7 % v případě spermií s vysokou mírou povrchové ubiquitinace (Petelak & Krylov, 2016). Nicméně další optimalizací celého procesu, jako je zkrácení doby mezi sortováním a mražením nebo minimalizace teplotních změn, bylo po sortování a kryoprezervaci spermií dosaženo viability 30 % v rámci obou skupin (nepublikovaná data).

#### **8.4 Studium vztahu mezi mírou povrchové ubiquitinace spermií a kvalitou časného embryonálního vývoje po ICSI**

V rámci tohoto studia bylo cílem potvrdit či vyvrátit negativní efekt povrchové ubiquitinace spermií na časný embryonální vývoj u prasat. K oplození oocytů testovanými spermii z obou experimentálních skupin (nízká a vysoká míra povrchové ubiquitinace) byla použita metoda ICSI. Tento návrh experimentu se liší od postupů v jiných laboratořích zabývajících se podobným tématem (Sutovsky *et al.*, 2001b; Ozanon *et al.*, 2005; Eskandari-Shahraki *et al.*, 2013). V žádné ze zmíněných publikací nebyly k oplození použity spermie rozdělené do skupin podle míry povrchové ubiquitinace, ale vždy směsná populace spermií. Jejich výsledky tak jen porovnávají procentuální zastoupení ubiquitinovaných spermií v daném vzorku ejakulátu s úspěšností oplození a časného embryonálního vývoje.

V prvním experimentu byl zkoumán vliv povrchové ubiquitinace spermií na časný embryonální vývoj 19-20 hodin po ICSI. Embryonální vývoj byl považován za řádný, pokud byla po dané době pozorována tvorba samčího i samičího prvojádra, nebo se embrya nacházela ve dvoubuněčném stádiu. Při použití metody ICSI není možné oplodnit všechny oocyty v jeden čas a doba mezi oplozením a fixací se tak může mezi jednotlivými oocyty mírně lišit. To je

důvod, proč byla u některých oocytů pozorována přítomnost prvojader, zatímco u jiných již začalo rýhování.

Tvorba prvojader je považována za kritický krok v rámci časného embryonálního vývoje u prasat (Lee *et al.*, 2003). V našem případě byla pozorována tvorba prvojader nebo rýhování embrya průměrně v 74 % případů při použití spermií s nízkou mírou povrchové ubiquitinace a v 70 % případů při použití vysoce povrchově ubiquitinovaných spermií. Nebyl však zaznamenán signifikantní rozdíl v tvorbě prvojader mezi skupinou oocytů, která byla oplozena spermiemi s nízkou mírou povrchové ubiquitinace a spermiemi vykazujícími vysokou míru povrchové ubiquitinace.

Druhý experiment se zabýval studiem vlivu povrchové ubiquitinace spermií na časný embryonální vývoj do stádia blastocysty (týden po oplození). Byl zaznamenán signifikantní rozdíl ( $p < 0,05$ ) v průměrném procentu embryí se zastaveným vývojem ve dvoubuněčném stádiu mezi skupinou oocytů oplozených spermiemi s nízkou (28 %) a vysokou (16 %) mírou povrchové ubiquitinace. Pokud ale srovnáme celkové počty embryí zastavených ve vývoji do stádia EGA (<2b + 2-4b) jsou rozdíly mezi experimentálními skupinami statisticky nesignifikantní (63% resp. 68%). Dále byl prokázán signifikantně lepší vývoj do stádia blastocysty při oplození oocytů spermiemi s nízkou mírou povrchové ubiquitinace v porovnání s oplozením spermiemi s vysokou mírou povrchové ubiquitinace ( $p < 0,01$ ). Po týdnu kultivace se oocyty oplozené spermiemi s nízkou mírou povrchové ubiquitinace vyvinuly do stádia blastocysty průměrně v 17 % případů. Naopak průměrný výskyt embryí ve stádiu blastocysty při použití spermií s vysokou mírou povrchové ubiquitinace byl pouze 5 %.

Získaná data jsou v souladu s jinými publikacemi (Sutovsky *et al.*, 2001b; Ozanon *et al.*, 2005), kde procento ubiquitinovaných spermií negativně koreluje s úspěšností embryonálního vývoje (míra rýhování) po IVF nebo ICSI. Zároveň potvrzuje možnost použití extracelulárního Ub jako markeru kvality spermií (Sutovsky *et al.*, 2001a). Naopak rozdílný výsledek byl zjištěn ve studii Eskandari-Shahraki *et al.* (2013), ve které zaznamenali pozitivní korelaci mezi intenzitou ubiquitinace a vývojem embryí po ICSI. Tato závislost byla ve zmíněné publikaci vysvětlena pomocí teorie hypoubiquitinace spermií v epididymis (zhoršení funkce selekčního systému u některých kanců, podrobněji popsáno v kapitole 3.2.1.2).

Úspěšnost vývoje embryí do stádia blastocysty u obou skupin (17 % při použití nízcce ubiquitinovaných spermií a 5 % v případě použití vysoce ubiquitinovaných spermií) byla nižší

v porovnání s úspěšností vývoje embryí do stádia blastocysty při použití čerstvých spermií (21 %). To mohlo být způsobeno stresem, který spermie podstoupí během procesu třídění a mražení (shrnutí Vazquez *et al.*, 2009). Zajímavé je potom porovnání výsledků tohoto pokusu s výsledky experimentu, kde byly použity rozmražené spermie (směsná populace spermií). Úspěšnost vývoje embrya do stádia blastocysty při použití rozmražených, ale netříděných spermií, byla 11 %. V porovnání s tímto výsledkem byl vývoj do stádia blastocysty lepší při použití spermií s nízkou mírou povrchové ubiquitinace (17 %) a naopak horší při použití vysoce ubiquitovaných spermií (5 %). Tento výsledek opět ukazuje na možné použití extracelulárního Ub jako markeru kvality spermií (Sutovsky *et al.*, 2001a).

## **8.5 Vliv maskování Ub epitopu na povrchu spermií na kvalitu časného embryonálního vývoje po ICSI**

Předchozím pokusem byl prokázán horší vývoj embryí do stádia blastocysty v případě oplození oocytů spermii s vysokou mírou povrchové ubiquitinace, tedy potencionálně defektních spermií. Otázkou ale je, jaký mechanismus k tomu vede. Horší vývoj embrya může být způsoben vlastním poškozením spermií (např. zlomy DNA) a extracelulární Ub tedy může sloužit pouze jako marker kvality spermií. Další možnost a zároveň naše hypotéza je, že po oplození dojde k rozpoznání vysoce povrchově ubiquitovaných spermií 26S proteazomálním komplexem oocytu a k následnému zabránění dalšího vývoje embrya (Sutovsky *et al.*, 2001b). Toto téma však nebylo v jiných publikacích blíže zkoumáno.

Možné rozpoznání povrchového Ub spermií 26S proteazomálním komplexem oocytu po oplození a případné zastavení embryonálního vývoje bylo v naší laboratoři testováno pomocí metody ICSI. Ta umožňuje díky injekci spermie do ooplazmy zkoumat přímý vliv Ub na časný embryonální vývoj, v našem případě vývoj embrya do stádia blastocysty. K oplození byla použita směsná populace čerstvých spermií získaná z různých inseminačních dávek od různých kanců. V experimentální skupině byl povrchový Ub spermií maskován pomocí protilátky proti Ub, zatímco spermie v kontrolní skupině na sobě neměly protilátku navázanou, což bylo ověřeno kontrolním barvením pomocí sekundární protilátky.

V případě, že by naše hypotéza platila, lepší embryonální vývoj do stádia blastocysty byl očekáván po oplození oocytů spermii s maskovaným povrchovým Ub oproti kontrolní skupině. To se opravdu potvrdilo. Vývoj embryí do stádia blastocysty byl signifikantně lepší při oplození oocytů spermii s maskovaným povrchovým Ub v porovnání s kontrolní skupinou (19 % vs. 10 %;  $p < 0,05$ ). Signifikantní rozdíl ( $p < 0,01$ ) byl také zaznamenán

v četnosti intaktních spermií mezi skupinami (7 % v případě použití spermií s maskovaným povrchovým Ub a 15 % v kontrolní skupině). Vzhledem k tomu, že v rámci předchozích experimentů se sortovanými spermiemi nebyl prokázán vliv (pozitivní či negativní) povrchové ubiquitinace na tvorbu prvojader, je tento výsledek velmi překvapující a ukazuje na možný efekt maskovací anti-Ub protilátky na lepší průběh dekondezace hlavičky spermie. Tento fenomén je v odborné literatuře zatím neznámý a v laboratoři školitele bude tomuto tématu věnována pozornost v rámci dalších studií.

Dalším zajímavým, nikoliv překvapujícím, poznatkem byla vyšší míra variability výsledků tohoto pokusu v porovnání s předchozím experimentem, kde byly použity rozmražené spermie získané z jedné inseminační dávky. Jak jsem již zmínila, kvalita spermií se velmi liší jak mezi jednotlivými kanci, tak i mezi jednotlivými odběry ejakulátu konkrétního kance (Roca *et al.*, 2006, shrnuto Gil *et al.*, 2008).

Výsledky tohoto experimentu ukazují na možný vliv povrchového Ub spermií na časný embryonální vývoj. Zdá se, že Ub nemusí být pouze markerem kvality spermií, ale může hrát roli i při rozpoznání nekvalitních spermií oocytem po oplození, což může vést k zhoršení či úplnému zastavení embryonálního vývoje. Způsob rozpoznání povrchové ubiquitinace spermií s největší pravděpodobností zahrnuje 26S proteazomální komplex oocyty, nicméně přesný mechanismus je třeba dále studovat. Cílem dalších experimentů by mohlo být studium vlivu maskování povrchového ubiquitinu u sortovaných spermií (nízce vs. vysoce povrchově ubiquitinované spermie) nebo inhibice proteazomálního komplexu oocyty.

## 9. Závěr

- Byla zvládnuta metoda ICSI, včetně izolace oocytů. Úspěšnost vývoje embryí do stádia blastocysty byla srovnatelná s jinými laboratořemi.
- Nebyl prokázán signifikantní rozdíl v tvorbě prvojader u oocytů oplozených spermii s nízkou nebo vysokou mírou povrchové ubiquitinace.
- Byl prokázán negativní efekt povrchové ubiquitinace spermii na kvalitu časného embryonálního vývoje do stádia blastocysty. Tento výsledek potvrzuje možnost využít povrchový Ub spermii jako negativní marker jejich kvality.
- Byl zaznamenán signifikantně lepší embryonální vývoj do stádia blastocysty u oocytů oplozených spermii s maskovaným povrchovým Ub pomocí protilátky proti Ub v porovnání s kontrolní skupinou. Tento výsledek ukazuje na možný vliv povrchového Ub spermii při rozpoznávání defektních spermii oocytem po oplození. Mechanismus rozpoznání povrchové ubiquitinace spermii s největší pravděpodobností zahrnuje 26S proteazomální komplex oocyty, nicméně jsou nutné další studie.

## 10. Seznam literatury

- Abou-haila, A., Tulsiani, D.R. 2009. Signal transduction pathways that regulate sperm capacitation and the acrosome reaction. *Arch. Biochem. Biophys.* **485**: 72–81.
- Adhikari, D., Liu, K. 2014. The regulation of maturation promoting factor during prophase I arrest and meiotic entry in mammalian oocytes. *Mol. Cell. Endocrinol.* **382**: 480–487.
- Al Rawi, S., Louvet-Vallée, S., Djeddi, A., Sachse, M., Culetto, E., Hajjar, C., *et al.* 2011. Postfertilization autophagy of sperm organelles prevents paternal mitochondrial DNA transmission. *Science* **334**: 1144–1147.
- Amdani, S.N., Yeste, M., Jones, C., Coward, K. 2015. Sperm factors and oocyte activation: current controversies and considerations. *Biol. Reprod.* **93**: 50.
- Anifandis, G., Messini, C.I., Dafopoulos, K., Daponte, A., Messinis, I.E. 2016. Sperm contributions to oocyte activation: more that meets the eye. *J. Assist. Reprod. Genet.* **33**: 313–316.
- Austin, C.R., Bishop, M.W. 1958. Role of the rodent acrosome and perforatorium in fertilization. *Proc. R. Soc. Lond. B Biol. Sci.* **149**: 241–248.
- Aviel, S., Winberg, G., Massucci, M., Ciechanover, A. 2000. Degradation of epstein-barr virus latent membrane protein 1 (LMP1) by the ubiquitin-proteasome pathway. Targeting via ubiquitination of the N-terminal residue. *J. Biol. Chem.* **275**: 23491–23499.
- Axner, E., Linde-Forsberg, C., Einarsson, S. 1999. Morphology and motility of spermatozoa from different regions of the epididymal duct in the domestic cat. *Theriogenology* **52**: 767–778.
- Axner, E. 2006. Sperm maturation in the domestic cat. *Theriogenology* **66**: 14–24.
- Baba, T., Azuma, S., Kashiwabara, S., Toyoda, Y. 1994. Sperm from mice carrying a targeted mutation of the acrosin gene can penetrate the oocyte zona pellucida and effect fertilization. *J. Biol. Chem.* **269**: 32845–31849.
- Baska, K.M., Manandhar, G., Feng, D., Agca, Y., Tengowski, M.W., Sutovsky, M., *et al.* 2008. Mechanism of extracellular ubiquitination in the mammalian epididymis. *J. Cell. Physiol.* **215**: 684–696.
- Bedford, J.M. 2015. The epididymis re-visited: a personal view. *Asian J. Androl.* **17**: 693–698.
- 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.
- Bianchi, E., Doe, B., Goulding, D., Wright, G.J. 2014. Juno is the egg Izumo receptor and is essential for mammalian fertilization. *Nature* **508**: 483–487.

- Bleil, J.D., Wassarman, P.M. 1980. Mammalian sperm-egg interaction: identification of a glycoprotein in mouse egg zonae pellucidae possessing receptor activity for sperm. *Cell* **20**: 873–882.
- Breitschopf, K., Bengal, E., Ziv, T., Admon, A., Ciechanover, A. 1998. A novel site for ubiquitination: the N-terminal residue, and not internal lysines of MyoD, is essential for conjugation and degradation of the protein. *EMBO J.* **17**: 5964–5973.
- Browne, J.A., Yang, R., Leir, S.H., Eggener, S.E., Harris, A. 2016. Expression profiles of human epididymis epithelial cells reveal the functional diversity of caput, corpus and cauda regions. *Mol. Hum. Reprod.* **22**: 69–82.
- Cerolini, S., Maldjian, A., Pizzi, F., Gliozzi, T.M. 2001. Changes in sperm quality and lipid composition during cryopreservation of boar semen. *Reproduction* **121**: 395-401.
- Ciechanover, A., Stanhill, A. 2014. The complexity of recognition of ubiquitinated substrates by the 26S proteasome. *Biochim. Biophys. Acta* **1843**: 86–96.
- Cornwall, G. A. 2009. New insights into epididymal biology and function. *Hum. Reprod. Update* **15**: 213–227.
- Deveraux, Q., Ustrell, V., Pickart, C., Rechsteiner, M. 1994. A 26 S protease subunit that binds ubiquitin conjugates. *J. Biol. Chem.* **269**: 7059–7061.
- Eppig, J.J. 1979. FSH stimulates hyaluronic acid synthesis by oocyte-cumulus cell complexes from mouse preovulatory follicles. *Nature* **281**: 483–484.
- Eskandari-Shahraki, M., Tavalae, M., Deemeh, M.R., Jelodar, G.A., Nasr-Esfahani, M.H. 2013. Proper ubiquitination effect on the fertilisation outcome post-ICSI. *Andrologia* **45**: 204–210.
- Gallagher, E., Gao, M., Liu, Y.C., Karin, M. 2006. Activation of the E3 ubiquitin ligase Itch through a phosphorylation-induced conformational change. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **103**: 1717–1722.
- Gao, B., Lee, S.M., Fang, D. 2006. The tyrosine kinase c-Abl protects c-Jun from ubiquitination-mediated degradation in T cells. *J. Biol. Chem.* **281**: 29711–29718.
- Garcia-Rosello, E., Matas, C., Canovas, S., Moreira, P.N., Gadea, J., Coy, P. 2006. Influence of sperm pretreatment on the efficiency of intracytoplasmic sperm injection in pigs. *J. Androl.* **27**: 268-275.
- Garcia-Rosello, E., Garcia-Mengual, E., Coy, P., Alfonso, J., Silvestre, M.A. 2009. Intracytoplasmic sperm injection in livestock species: an update. *Reprod. Domest. Anim.* **44**: 143-151.
- Gil, M.A., Alminana, C., Roca, J., Vazquez, J.M., Martinez, E.A. 2008. Boar semen variability and its effects on IVF efficiency. *Theriogenology* **70**: 1260-1268.



- Glotzer, M., Murray, A.W., Kirschner, M.W. 1991. Cyclin is degraded by the ubiquitin pathway. *Nature* **349**: 132–138.
- 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.
- Green, D.P. 1997. Three-dimensional structure of the zona pellucida. *Rev. Reprod.* **2**: 147–156.
- Gregori, L., Poosch, M.S., Cousins, G., Chau, V. 1990. A uniform isopeptide-linked multiubiquitin chain is sufficient to target substrate for degradation in ubiquitin-mediated proteolysis. *J. Biol. Chem.* **265**: 8354–8357.
- Groll, M., Ditzel, L., Lowe, J., Stock, D., Bochtler, M., Bartunik, H.D., *et al.* 1997. Structure of 20S proteasome from yeast at 2.4 Å resolution. *Nature* **386**: 463–471.
- Groll, M., Bajorek, M., Köhler, A., Moroder, L., Rubin, D., Huber, R., *et al.* 2000. A gated channel into the proteasome core particle. *Nat. Struct. Biol.* **7**: 1062–1067.
- Hershko, A., Ciechanover, A. 1998. The ubiquitin system. *Annu. Rev. Biochem.* **67**: 425–479.
- Hodjat M., Akhondi M. A., Al-Hasani S., Mobaraki M., Sadeghi M.R. 2008. Increased sperm ubiquitination correlates with abnormal chromatin integrity. *Reprod. Biomed. Online* **17**: 324–330.
- Honda, R., Yasuda, H. 1999. Association of p19 ARF with Mdm2 inhibits ubiquitin ligase activity of Mdm2 for tumor suppressor p53. *EMBO J.* **18**: 22–27.
- Hughes, J., Berger, T. 2015. Development of apical blebbing in the boar epididymis. *PLoS One* **10**: e0126848.
- Husnjak, K., Elsasser, S., Zhang, N., Chen, X., Shi, Y., Hofmann, K., *et al.* 2008. Proteasome subunit Rpn13 is a novel ubiquitin receptor. *Nature* **453**: 481–488.
- Chau, V., Tobias, J.W., Bachmair, A., Marriotr, D., Ecker, D.J., Gonda, D.K., *et al.* 1989. A multiubiquitin chain is confined to specific lysine in a targeted short-lived protein. *Science* **243**: 1576–1583.
- Chen, H.Y., Sun, J., Zhang, Y., Davie, J.R., Meistrich, M.L. 1998. Ubiquitination of histone H3 in elongating spermatids of rat testes. *J. Biol. Chem.* **273**: 13165–13169.
- Inoue, N., Ikawa, M., Isotani, A., Okabe, M. 2005. The immunoglobulin superfamily protein Izumo is required for sperm to fuse with eggs. *Nature* **434**: 234–238.
- Izzi, L., Attisano, L. 2004. Regulation of the TGFbeta signalling pathway by ubiquitin-mediated degradation. *Oncogene* **23**: 2071–2078.

- Jarrell, V.L., Day, B.N., Prather, R.S. 1991. Transition from and maternal to zygotic control of development occurs during the 4-cell stage qualitative in the domestic pig, *Sus scrofa*: quantitative and qualitative aspects of protein synthesis. *Biol. Reprod.* **44**: 62–68.
- Jin, M., Fujiwara, E., Kakiuchi, Y., Okabe, M., Satouh, Y., Baba, S.A., *et al.* 2011. Most fertilizing mouse spermatozoa begin their acrosome reaction before contact with the zona pellucida during in vitro fertilization. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **108**: 4892–4896.
- Katayama, M., Sutovsky, P., Yang, B.S., Cantley, T., Rieke, A., Farwell, R., *et al.* 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, N.H., Lee, J.W., Jun, S.H., Lee, H.T., Chung, K.S. 1998. Fertilization of porcine oocytes following intracytoplasmic spermatozoon or isolated sperm head injection. *Mol. Reprod. Dev.* **51**: 436-444.
- Klinovska, K., Sebkova, N., Dvorakova-Hortova, K. 2014. Sperm-egg fusion: a molecular enigma of mammalian reproduction. *Int. J. Mol. Sci.* **15**: 10652–10668.
- Koegl, M., Hoppe, T., Schlenker, S., Ulrich, H.D., Mayer, T.U., Jentsch, S. 1999. A novel ubiquitination factor, E4, is involved in multiubiquitin chain assembly. *Cell* **96**: 635–644.
- Komander, D. 2009. The emerging complexity of protein ubiquitination. *Biochem. Soc. Trans.* **37**: 937-953.
- Komander, D., Rape, M. 2012. The Ubiquitin Code. *Annu. Rev. Biochem.* **81**: 203–229.
- Kornitzer, D., Raboy, B., Kulka, R.G., Finkl, G.R. 1994. Regulated degradation of the transcription factor Gcn4. *EMBO J.* **13**: 6021–6030.
- Kren, R., Kikuchi, K., Nakai, M., Miyano, T., Ogushi, S., Nagai, T., *et al.* 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.
- Lahav-Baratz, S., Sudakin, V., Ruderman, J. V., Hershko, A. 1995. Reversible phosphorylation controls the activity of cyclosome-associated cyclin- ubiquitin ligase. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **92**: 9303–9307.
- Laurincik, J., Rath, D., Niemann, H. 1994. Differences in pronucleus formation and first cleavage following in vitro fertilization between pig oocytes matured in vivo and in vitro. *J. Reprod. Fertil.* **102**: 277–284.
- Lee, J.W., Tian, X.C., Yang, X. 2003. 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.

- Levkowitz, G., Waterman, H., Ettenberg, S. a, Katz, M., Tsygankov, a Y., Alroy, I., *et al.* 1999. Ubiquitin ligase activity and tyrosine phosphorylation underlie suppression of growth factor signaling by c-Cbl/Sli-1. *Mol. Cell* **4**: 1029–1040.
- Li, L., Lu, X., Dean, J. 2013. The maternal to zygotic transition in mammals. *Mol. Aspects Med.* **34**: 919–938.
- Lishko, P.V., Botchkina, I.L., Kirichok, Y. 2011. Progesterone activates the principal Ca<sup>2+</sup> channel of human sperm. *Nature* **471**: 387–391.
- Liu, L., Moor, R.M. 1997. Factors affecting electrical activation of porcine oocyte matured in vitro. *Anim. Reprod. Sci.* **48**: 67–80.
- Lorenzetti, D., Poirier, C., Zhao, M., Overbeek, P. A, Harrison, W., Bishop, C.E. 2014. A transgenic insertion on mouse chromosome 17 inactivates a novel immunoglobulin superfamily gene potentially involved in sperm-egg fusion. *Mamm. Genome* **25**: 141–148.
- Luo, S.M., Sun, Q.Y. 2013. Autophagy is not involved in the degradation of sperm mitochondria after fertilization in mice. *Autophagy* **9**: 2156–2157.
- Majetschak, M. 2011. Extracellular ubiquitin: immune modulator and endogenous opponent of damage-associated molecular pattern molecules. *J. Leukoc. Biol.* **89**: 205–219.
- Mateusen, B., Van Soom, A., Maes, D.G., Donnay, I., Duchateau, L., Lequarre, A.S. 2005. Porcine embryo development and fragmentation and their relation to apoptotic markers: a cinematographic and confocal laser scanning microscopic study. *Reproduction* **129**: 443–452.
- Mcrorie, R.A., Williams, W.L. 1974. Biochemistry of mammalian fertilization. *Annu. Rev. Biochem.* **43**: 777–803.
- Morales, P., Kong, M., Pizarro, E., Pasten, C. 2003. Participation of the sperm proteasome in human fertilization. *Hum. Reprod.* **18**: 1010–1017.
- Murakami, Y., Matsufuji, S., Kameji, T., Hayashi, S., Igarashi, K., Tamura, T., *et al.* 1992. Ornithine decarboxylase is degraded by the 26S proteasome without ubiquitination. *Nature* **360**: 597–599.
- Muratori, M., Marchiani, S., Forti, G., Baldi, E. 2005. Sperm ubiquitination positively correlates to normal morphology in human semen. *Hum. Reprod.* **20**: 1035–1043.
- Nakai, M., Ozawa, M., Maedomari, N., Noguchi, J., Kaneko, H., Ito, J., *et al.* 2014. Delay in cleavage of porcine embryos after intracytoplasmic sperm injection (ICSI) shows poorer embryonic development. *J. Reprod. Dev.* **60**: 256–259.
- Nakamura, N. 2013. Ubiquitination regulates the morphogenesis and function of sperm organelles. *Cells* **2**: 732–750.

- Ogunjimi, A. A, Briant, D.J., Pece-Barbara, N., Le Roy, C., Di Guglielmo, G.M., Kavsak, P., *et al.* 2005. Regulation of Smurf2 ubiquitin ligase activity by anchoring the E2 to the HECT domain. *Mol. Cell* **19**: 297–308.
- 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.
- Petelak, A., Krylov, V. 2016. Cryopreservation of fluorescence activated cell sorted boar spermatozoa based on extracellular ubiquitination. *Czech J. Anim. Sci.* **61**: 310-316.
- Reid, A.T., Redgrove, K., Aitken, R.J., Nixon, B. 2011. Cellular mechanisms regulating sperm-zona pellucida interaction. *Asian J. Androl.* **13**: 88–96.
- Roca, J., Hernandez, M., Carvajal, G., Vazquez, J.M., Martinez, E.A. 2006. Factors influencing boar sperm cryosurvival. *J. Anim. Sci.* **84**: 2692-2699.
- Rogers, S., Wells, R., Rechsteiner, M. 1986. Amino acid sequences common to rapidly degraded proteins: the PEST hypothesis. *Science* **234**: 364–368.
- Russell, D.L., Gilchrist, R.B., Brown, H.M., Thompson, J.G. 2016. Bidirectional communication between cumulus cells and the oocyte: old hands and new players? *Theriogenology* **86**: 62–68.
- Sakai, N. 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., *et al.* 2002. Extracellular ubiquitination and proteasome-mediated degradation of the ascidian sperm receptor. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **99**: 1223–1228.
- Schreiner, P., Chen, X., Husnjak, K., Randles, L., Zhang, N., Elsassner, S., *et al.* 2008. Ubiquitin docking at the proteasome through a novel pleckstrin-homology domain interaction. *Nature* **453**: 548–552.
- Skerget, S., Rosenow, M.A., Petritis, K., Karr, T.L. 2015. Sperm proteome maturation in the mouse epididymis. *PLoS One* **10**: e0140650.
- Strünker, T., Goodwin, N., Brenker, C., Kashikar, N.D., Weyand, I., Seifert, R., *et al.* 2011. The CatSper channel mediates progesterone-induced Ca<sup>2+</sup> influx in human sperm. *Nature* **471**: 382–386.
- Su, V., Lau, A.F. 2009. Ubiquitin-like and ubiquitin-associated domain proteins: significance in proteasomal degradation. *Cell. Mol. Life Sci.* **66**: 2819–2833.

- Sullivan, R., Frenette, G., Girouard, J. 2007. Epididymosomes are involved in the acquisition of new sperm proteins during epididymal transit. *Asian J. Androl.* **9**: 483–491.
- Sullivan, R. 2015. Epididymosomes: a heterogeneous population of microvesicles with multiple functions in sperm maturation and storage. *Asian J. Androl.* **17**: 726–729.
- Sutovsky, P., Moreno, R.D., Ramalho-santos, J., Dominko, T., Simerly, C., Schatten, G., *et al.* 1999. Ubiquitin tag for sperm mitochondria. *Nature* **402**: 371–372.
- Sutovsky, P., Moreno, R.D., Ramalho-Santos, J., Dominko, T., Simerly, C., Schatten, G. 2000. Ubiquitinated sperm mitochondria, selective proteolysis, and the regulation of mitochondrial inheritance in mammalian embryos. *Biol. Reprod.* **63**: 582–590.
- Sutovsky, P., Moreno, R., Ramalho-Santos, J., Dominko, T., Thompson, W.E., Schatten, G. 2001a. A putative, ubiquitin-dependent mechanism for the recognition and elimination of defective spermatozoa in the mammalian epididymis. *J. Cell Sci.* **114**: 1665–1675.
- Sutovsky, P., Terada, Y., Schatten, G. 2001b. Ubiquitin-based sperm assay for the diagnosis of male factor infertility. *Hum. Reprod.* **16**: 250–258.
- 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. 2003a. 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., McCauley, T.C., Sutovsky, M., Day, B.N. 2003b. 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., 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, T.C., Caamaño, J.N., Sutovsky, M., Thompson, W.E., *et al.* 2004b. Proteasomal interference prevents zona pellucida penetration and fertilization in mammals. *Biol. Reprod.* **71**: 1625–1637.
- Sutovsky, P., Kennedy, C.E. 2013. Biomarker-based nanotechnology for the improvement of reproductive performance in beef and dairy cattle. *Ind. Biotechnol.* **9**: 24–30.
- Sutovsky, P., Aarabi, M., Miranda-Vizueté, A., Oko, R. 2015. Negative biomarker based male fertility evaluation: Sperm phenotypes associated with molecular-level anomalies. *Asian J. Androl.* **17**: 554–560.

- Suzuki, Y., Watanabe, H., Fukui, Y. 2010. Effects of seasonal changes on in vitro developmental competence of porcine oocytes. *J. Reprod. Dev.* **56**: 396-399.
- Tanaka, K. 2009. The proteasome: overview of structure and functions. *Proc. Jpn. Acad., Ser. B* **85**: 12-36.
- Tesarik, J. 1996. Fertilization of oocytes by injecting spermatozoa, spermatids and spermatocytes. *Rev. Reprod.* **1**: 149–152.
- Tesarik, J., Mendoza, C. 1999. In vitro fertilization by intracytoplasmic sperm injection. *BioEssays* **21**: 791-801.
- Thimon, V., Koukoui, O., Calvo, E., Sullivan, R. 2007. Region-specific gene expression profiling along the human epididymis. *Mol. Hum. Reprod.* **13**: 691–704.
- Thrower, J.S., Hoffman, L., Rechsteiner, M., Pickart, C.M. 2000. Recognition of the polyubiquitin proteolytic signal. *EMBO J.* **19**: 94–102.
- Varshavsky, A. 2011. The N-end rule pathway and regulation by proteolysis. *Protein Sci.* **20**: 1298–1345.
- Varum, S., Bento, C., Sousa, A.P., Gomes-Santos, C.S., Henriques, P., Almeida-Santos, T., *et al.* 2007. Characterization of human sperm populations using conventional parameters, surface ubiquitination, and apoptotic markers. *Fertil. Steril.* **87**: 572–583.
- Vazquez, J.M., Parrilla, I., Roca, J., Gil, M.A., Cuello, C., Vazquez, J.L., Martinez, E.A. 2009. Sex-sorting sperm by flow cytometry in pigs: issues and perspectives. *Theriogenology* **71**: 80-88.
- Verlhac, M.H., Terret, M.E. 2016. Oocyte Maturation and Development [version 1; referees: 2 approved]. *F1000Res.* **5**(F1000 Faculty Rev): 309.
- Verma, R., Aravind, L., Oania, R., McDonald, W.H., Yates, J.R., Koonin, E. V, *et al.* 2002. Role of Rpn11 metalloprotease in deubiquitination and degradation by the 26S proteasome. *Science* **298**: 611–615.
- Vijay-Kumar, S., Bugg, C., Wilkinson, K., Cook, W. 1985. Three-dimensional structure of ubiquitin at 2.8 Å resolution. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **82**: 3582–3585.
- Wang, F., Durfee, L.A., Huibregtse, J.M. 2013. A cotranslational ubiquitination pathway for quality control of misfolded proteins. *Mol. Cell* **50**: 368–378.
- Ward, W.S. 2010. Function of sperm chromatin structural elements in fertilization and development. *Mol. Hum. Reprod.* **16**: 30–36.
- Weake, V.M., Workman, J.L. 2008. Histone ubiquitination: triggering gene activity. *Mol. Cell* **29**: 653–663.
- White, I.G. 1993. Lipids and calcium uptake of sperm in relation to cold shock and preservation: a review. *Reprod. Fertil. Dev.* **5**: 639-658.

- Wiggins, C.M., Tsvetkov, P., Johnson, M., Joyce, C.L., Lamb, C. a, Bryant, N.J., *et al.* 2011. BIM(EL), an intrinsically disordered protein, is degraded by 20S proteasomes in the absence of poly-ubiquitylation. *J. Cell Sci.* **124**: 969–977.
- Wu, J., Carrell, D.T., Wilcox, A.L. 2001. Development of in vitro-matured oocytes from porcine preantral follicles following intracytoplasmic sperm injection. *Biol. Reprod.* **65**: 1579-1585.
- 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.
- Yang, C., Zhou, W., Jeon, M.-S., Demydenko, D., Harada, Y., Zhou, H., *et al.* 2006. Negative regulation of the E3 ubiquitin ligase itch via Fyn-mediated tyrosine phosphorylation. *Mol. Cell* **21**: 135–141.
- Yao, T., Cohen, R.E. 2002. A cryptic protease couples deubiquitination and degradation by the proteasome. *Nature* **419**: 403–407.
- Yi, Y.J., Im, G.S., Park, C.S. 2002. Lactose-egg yolk diluent supplemented with N-acetyl-D-glucosamine affect acrosome morphology and motility of frozen-thawed boar sperm. *Anim. Reprod. Sci.* **74**: 187–194.
- 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.
- Yong, H.Y., Pyo, B.S., Hong J.Y., Kang, S.K., Lee, B.C., Lee, E.S., Hwang, W.S. 2003. A modified method for ICSI in the pig: injection of head membrane-damaged sperm using a 3-4  $\mu$ m diameter injection pipette. *Hum. Reprod.* **18**: 2390-2396.
- Yoo, J.G., Hur, C.G., Park, M.R., Park, J.Y., Hwang, K.C., Kim, J.H., *et al.* 2012. Electrical activation enhances pre-implantation embryo development following sperm injection in in vitro matured pig oocytes. *J Vet Med Sci.* **74**: 429-434.
- Yoon, S., Jellerette, T., Salicioni, A.M., Lee, H.C., Yoo, M., Coward, K., *et al.* 2008. Human sperm devoid of PLC, zeta 1 fail to induce Ca(2+) release and are unable to initiate the first step of embryo development. *J. Clin. Invest.* **118**: 3671–3681.
- Yoshioka, K., Suzuki, C., Tanaka, A., Anas, I.M., Iwamura, S. 2002. Birth of piglets derived from porcine zygotes cultured in a chemically defined medium. *Biol. Reprod.* **66**: 112–119.
- Young, P., Deveraux, Q., Beal, R.E., Pickart, C.M., Rechsteiner, M. 1998. Characterization of two polyubiquitin binding sites in the 26 S protease subunit 5a. *J. Biol. Chem.* **273**: 5461–5467.
- Yurewicz, E.C., Sacco, A.G., Gupta, S.K., Xu, N., Gage, D.A. 1998. Hetero-oligomerization-dependent binding of pig oocyte zona pellucida glycoproteins ZPB and ZPC to boar sperm membrane vesicles. *J. Biol. Chem.* **273**: 7488–7494.

Zimmerman, S.W., Manandhar, G., Yi, Y.J., Gupta, S.K., Sutovsky, M., Odhiambo, J.F., *et al.* 2011. Sperm proteasomes degrade sperm receptor on the egg zona pellucida during mammalian fertilization. *PLoS One* **6**: e17256.