

Univerzita Karlova v Praze

Přírodovědecká fakulta

Studijní program: Biologie

Studijní obor: Reprodukční a vývojová biologie



Bc. Eliška Zobalová

Role ubikvitin ligázy Fbxo38 v myší spermatogenezi

The role of Fbxo38 ubiquitin ligase in mouse spermatogenesis

Diplomová práce

Vedoucí závěrečné práce: Mgr. Lukáš Čermák, Ph.D.

Praha, 2021

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, 9.8. 2021

Eliška Zobalová

Poděkování

Především bych ráda poděkovala svému školiteli Mgr. Lukášovi Čermákovi, Ph.D. za možnost vypracovávat diplomovou práci v jeho laboratoři. Za jeho dlouholeté zkušenosti, o které se se mnou podělil, za cenné rady a odbornou pomoc. Rovněž bych chtěla poděkovat Mgr. Nikol Baloghové za celkové vedení mé práce v laboratoři, za její laskavost a nekonečnou trpělivost. V neposlední řadě patří velké díky mým rodičům za finanční podporu při mém studiu a mému příteli za podporu psychickou a že mi byl oporou během celého mého studia.

Abstrakt

Ubikvitin ligázy závislé na cullinových podjednotkách jsou zodpovědné za regulaci většiny buněčných procesů. Navzdory tomu, že jejich mutované formy jsou příčinou vzniku mnoha lidských onemocnění, nejsou jejich fyziologické role dostatečně popsány. V rámci předkládaných výsledků jsme se soustředili na fyziologickou roli ubikvitin ligázy SCF^{FBXO38} (SKP1-CULLIN1-FBXO38), jejíž mutované formy jsou zodpovědné za progresi distální neuropatie. Příprava myšího modelu absence FBXO38 odhalila vyšší mortalitu homozygotních mláďat a růstový defekt, a to jak na úrovni celého organismu, tak i jednotlivých orgánů, zejména jater a varlat. Samci s delecí v genu *Fbxo38* měli výrazně nižší reprodukční schopnost, což souviselo s nižší produkcí maturovaných spermií a patologickými změnami ve struktuře semenotvorných tubulů. Zjistili jsme, že protein FBXO38 je funkčně exprimován v Sertoliho buňkách zodpovědných za regulaci spermatogeneze a integrity semenotvorných kanálků. Bližší analýza spermatogenních populací odhalila defekt na úrovni spermatocytární diferenciace. Dynamika této diferenciace je závislá na funkční integritě hematotestikulární bariéry tvořené mezibuněčnými spoji Sertoliho buněk. Potvrdili jsme, že retenční schopnost této bariéry byla u mutovaných zvířat snížena, což korelovalo s poklesem exprese její hlavní podjednotky claudinu-11.

V souhrnu tato práce vedla k odhalení nové funkce ubikvitin-proteazomového systému v regulaci spermatogeneze. Tento výsledek může být podstatný v identifikaci příčin snížené fertility současné populace.

Klíčová slova: Ubikvitin-proteazomový systém, FBXO38, spermatogeneze, Sertoliho buňky, hematotestikulární bariéra

Abstract

Cullin-dependent ubiquitin ligases are responsible for the regulation of most cellular processes. Despite their mutated forms being the cause of many human diseases, their physiological roles are not sufficiently described. In the presented results, we focused on the physiological role of ubiquitin ligase SCFFBXO38 (SKP1-CULLIN1-FBXO38), whose mutated forms are responsible for the progression of distal neuropathy. Preparation of mouse model deficient in FBXO38 revealed that homozygous pups were born in a lower than expected ratio. Animals were growth-retarded, both at the level of the whole organism and individual organs, especially the liver and testes. Males with a deletion in the Fbxo38 gene had significantly lower reproductive capacity, which was associated with lower production of mature sperm and pathological changes in the structure of seminiferous tubules. We found that the FBXO38 protein is functionally expressed in Sertoli cells responsible for regulating spermatogenesis and seminiferous tubules integrity. Detailed analysis of spermatogenic populations revealed a defect at the level of spermatocyte differentiation. The dynamics of this differentiation depend on the hematotesticular barrier functional integrity formed by the intercellular junctions of Sertoli cells. We confirmed that the retention capacity of this barrier was reduced in mutated animals, which correlated with a decrease in the expression of its major subunit claudin 11.

In summary, this work led to the discovery of a new function of the ubiquitin-proteasome system in the regulation of spermatogenesis. This result may be relevant in identifying the causes of reduced fertility in the current human population.

Key words: Ubiquitin-proteasome system, FBXO38, spermatogenesis, Sertoli cells, hematotesticular barrier

Seznam zkratek

ABP	Androgen vazebný protein	<i>Androgen binding protein</i>
APC/C	Anafázní podporující komplex	<i>Anaphase promoting complex/cyclosome</i>
ATP	Adenosin trifosfát	<i>Adenosine triphosphate</i>
BetaTRCP	---	<i>Beta-transducin repeat containing</i>
bp	Pár bází	<i>Base pair</i>
BSA	Albumin z bovinního séra	<i>Bovine serum albumin</i>
BTB	Hematotestikulární bariéru	<i>Blood-testis barrier</i>
cAMP	Cyklický adenosin monofosfát	<i>Cyclic adenosine monophosphate</i>
CCNF	Cyklin F	<i>Cyclin F</i>
COPD	Chronické obstrukční plicní onemocnění	<i>Chronic obstructive pulmonary disease</i>
CRL	Cullin RING ubikvitin ligázy	<i>Cullin RING ubiquitin ligase</i>
CUL	Cullin	<i>Cullin</i>
DAPI	4',6-diamidín-2-fenylindol	<i>4',6-diamidino-2-phenylindole</i>
DHMN	Distální dědičné motorické neuropatie	<i>Distal hereditary motor neuropathies</i>
DMEM	---	<i>Dulbecco's Modified Eagle's medium</i>
DNA	Deoxyribonukleová kyselina	<i>Deoxyribonucleic acid</i>
Dpp	Dny po porodu	<i>Days post partum</i>
DRP1	---	<i>Dynamin-1-like protein</i>
DSMA	Distální spinální svalová atrofie	<i>Distal spinal muscular atrophy</i>
E	Embryonální dny	<i>Embryonic days</i>
E1	Ubikvitin aktivující enzym	<i>Ubiquitin activation enzyme</i>
E2	Ubikvitin konjugující enzym	<i>Ubiquitin conjugation enzyme</i>
E3	Ubikvitin ligáza	<i>Ubiquitin ligase</i>
EDTA	Kyselina ethilendiamintetraoctová	<i>Ethylenediaminetetraacetic acid</i>
ERAD	Degradace asociovaná s endoplasmatickým retikulem	<i>Endoplasmatic reticulum associated degradation</i>

FBXL	---	<i>LRR-repeat protein fbxl</i>
FBXO	---	<i>F-box only protein</i>
FBXW	---	<i>F-box/WD repeat-containing protein</i>
FBS	Fetální hovězí sérum	<i>Fetal bovine serum</i>
FIS1	---	<i>Mitochondrial fission 1 protein</i>
FSH	Folikul stimulující hormon	<i>Follicle stimulating hormone</i>
gRNA	---	<i>Guide RNA</i>
GSH	Redukovaný obsah gluathionu	<i>Reduced glutathione</i>
HECT	---	<i>Homologous to the E6-AP carboxyl terminus</i>
HRP	---	<i>Horseradish peroxidase</i>
HTF	---	<i>Human tubular fluid</i>
IFN-γ	Interferon gama	<i>Interferon gamma</i>
IF	Imunofluorescenční barvení	<i>Immunofluorescence staining</i>
IVF	Úmělé oplodnění	<i>In vitro fertilization</i>
K	Lysin	<i>Lysine</i>
Kid	---	<i>Kinesin-like DNA binding protein</i>
KIF20B	Kinesin 20B	<i>Kinesin 20B</i>
KLF7	Krüppel-like faktor 7	<i>Krüppel-like factor 7</i>
KO	---	<i>Knockout</i>
LASU1	---	<i>Large structure of UREB1</i>
LC-MS/MS	Kapalinová chromatografie s hmotnostní spektrometrií	<i>Liquid Chromatography with Tandem Mass-Spectrometry</i>
LH	Luteinizační hormon	<i>Luteinizing hormone</i>
M	Methionin	<i>Methionine</i>
MARCH	---	<i>Membrane associated RING-CH ubiquitin ligáza</i>
MBCD	---	<i>Methyl-β-cyclodextrin</i>
MEF	Myší embryonální fibroblasty	<i>Mouse embryonic fibroblasts</i>
MHC I.	---	<i>Major histocompatibility complex I.</i>
MoKa	---	<i>Modulator of KLF7 activity</i>
NAE1	---	<i>NEDD8 Activating Enzyme E1 Subunit 1</i>

NEDD8	---	<i>Neuronal precursor cell-expressed developmentally down-regulated protein 8</i>
NES	Jaderný exportní signál	<i>Nuclear export signal</i>
NLS	Jaderný lokalizační signál	<i>Nuclear localization signal</i>
PKA	Protein kináza A	<i>Protein kinase A</i>
PBS	Fosfátový solný roztok	<i>Phosphate-buffered saline</i>
PCR	Polymerázová řetězová reakce	<i>Polymerase chain reaction</i>
PD-1	---	<i>Programmed cell death 1</i>
PNA	Arašídový aglutinin	<i>Peanut agglutinin</i>
RA	Retinová kyselina	<i>Retinoic acid</i>
Rbx	RING-Box protein	<i>RING-Box protein</i>
RING	Velmi zajímavý nový gen	<i>Really interesting new gene</i>
RNF	---	<i>Ring-finger protein</i>
Rpn	---	<i>26S proteasome regulatory subunit</i>
SCF	SKP1-CUL1-F-box	<i>SKP1-CUL1-F-box</i>
SDS	Dodecylsírán sodný	<i>Sodium dodecyl sulfate</i>
SKP1	Protein 1 spojený s S-fázovou kinázou	<i>S phase kinase-associated protein 1</i>
SMA	Spinální svalová atrofie	<i>Spinal muscular atrophy</i>
SMN1	Survival motor neuron 1	<i>Survival motor neuron 1</i>
TBS-T	Tris-pufrovaný solný roztok s Tween 20	<i>Tris buffer saline-Tween 20</i>
TUNEL	---	<i>Terminal deoxynucleotidyl transferase dUTP nick end labeling</i>
UBC4	---	<i>Ubiquitin-conjugating enzyme E2 4</i>
USP7	Ubikvitin specifická proteáza 7	<i>Ubiquitin-specific-processing protease 7</i>
UIP	---	<i>Ubiquitous immunopoietic polypeptide</i>
UPS	Ubikvitin-proteazomový systém	<i>Ubiquitin proteasome systém</i>

ÚMG	Ústavu molekulární genetiky	<i>Institute of Molecular Genetics of</i>
AV ČR	Akademie věd České Republiky	<i>the Czech Academy of Sciences</i>
WB	Imunoblotování	<i>Western blotting</i>
WD40	---	<i>Tryptophan-asparatic acid repeats</i>
WT	Divoký typ	<i>Wild type</i>
WT1	---	<i>Wilms tumor 1</i>
ZXDA/ B/C	---	<i>Zinc finger, X-linked, duplicated family member A/B/C</i>

1. Úvod	12
2. Teoretický úvod	12
2.1 Ubikvitin-proteazomový systém.....	12
2.1.1 Proteazom.....	13
2.1.2 Ubikvitinace	15
2.1.3 E3 ubikvitin ligázy.....	18
2.1.4 Multipodjednotkové E3 ubikvitin ligázy závislé na cullinu	19
2.1.5 Ubikvitin ligáza závislá na Cullin1 (SCF)	21
2.1.6 FBXO38 (MoKA).....	21
2.1.7 Role FBXO38 v distální spinální svalová atrofie.....	22
2.2 Spermatogeneze.....	23
2.2.1 Stádia spermatogeneze.....	24
2.2.2 První vlna spermatogeneze.....	27
2.2.3 Somatické buňky ve varlatech.....	27
2.3 Role E3 ubikvitin ligáz ve varlatech.....	30
3. Cíle práce	33
4. Materiál a metody.....	34
4.1 Péče o myši.....	34
4.1.1 Genotypování myši.....	34
4.1.2 Stanovení počtu spermií (sperm count)	35
4.1.3 Hodnocení motility spermií.....	36
4.1.4 Umělé oplození (in vitro fertilizace).....	36
4.1.5 Histochemie.....	37
4.1.5.1 Hematoxilin-eosinové barvení	37
4.1.5.2 Imunofluorescenční barvení.....	38
4.1.6 TUNEL esej.....	38
4.1.7 Biotinová esej.....	39
4.2 Použité buněčné kultury a jejich kultivace.....	39
4.2.1 Myši embryonální fibroblasty	40
4.2.2 Izolace proteinů a imunoblotování	40

4.2.3	Použitý software, mikroskop a statistická analýza	42
4.2.4	Protilátky použité při IF (immunofluorencence) a WB (western blotting)....	43
5.	Předběžná data a metody využité k jejich dosažení	44
6.	Výsledky	46
6.1	Příprava myšního kmene deficientního na <i>Fbxo38</i>	46
6.2	Absence FBXO38 vede k poruchám růstu.....	48
6.3	FBXO38 se podílí na produkci maturovaných spermií	50
6.4	Absence <i>Fbxo38</i> u myši způsobuje strukturální poruchy semenotvorného tubulu 52	
6.5	Protein FBXO38 je funkčně exprimován v Sertoliho buňkách.....	54
6.6	Absence FBXO38 způsobuje poruchy spermatogeneze	57
6.7	Dynamika první vlny spermatogeneze je u <i>Fbxo38</i> ^{-/-} samců zpožděna.....	58
6.8	SCF ^{FBXO38} je nezbytná pro integritu hematotestikulární bariéry	60
7.	Diskuze	62
8.	Závěr	70
9.	Seznam literatury:	71

1. Úvod

Incidence spinální svalové atrofie se pohybuje okolo jednoho případu na šest tisíc novorozenců (Haberlová a spol. 2016). U jedné z vzácnějších forem tohoto dědičného onemocnění byly identifikovány mutace v ubikvitin ligázovém substrátovém receptoru FBXO38 (F-box only protein 38). Z hlediska dědičnosti byla jedna z FBXO38 mutací autosomálně dominantní, zatímco u druhé se jednalo o recesivní typ. Detailní pochopení fyziologických a molekulárně biologických funkcí proteinů mutovaných ve spinálních atrofiích nám může pomoci porozumět etiologii těchto neurodegenerativních onemocnění. Toto byla hlavní motivace pro přípravu myšího modelu deficientního na protein FBXO38 a tato diplomová práce se soustředí na analýzu fenotypu tohoto kmene, zejména na detailní popis vlivu FBXO38 na spermatogenezi.

2. Teoretický úvod

2.1 Ubikvitin-proteazomový systém

Systémová proteinová degradace je u vyšších organismů zajištěna pomocí membránové organely zvané lyzozom a biochemické dráhy UPS (Ubiquitin proteasome system). Lyzozom obsahuje velké množství proteáz zvaných *cathepsiny*, které jsou aktivní při nízkém pH (Turk a spol. 2012). Proteiny, jejich komplexy nebo celé endocytované mikroorganismy jsou do lyzozomu dopravovány v membránových váčcích či obalené speciálními “cargo“ proteiny sloužícími jako receptory pro tento typ degradace. Fyziologická úloha lyzozomu je nezbytná v buněčné homeostáze a v odpovědi na metabolický stres, např. během autofágie. Jeho hlavní charakteristikou je nespecifičnost proteinové degradace (Ballabio a Bonifacino 2020). UPS je oproti tomu zodpovědný za specifické odstraňování poškozených nebo nepotřebných proteinů (Kwon a Ciechanover 2017). Jeho role je esenciální v mnoha buněčných procesech, které jsou závislé na dynamické kontrole hladiny jednotlivých proteinů. Jedná se například o aktivaci imunitní odpovědi, regulaci buněčného cyklu či reakci na environmentální stres. Kromě takových dynamických dějů je tento systém nezbytný i během vývoje mnohobuněčných organismů,

zejména v komunikaci a integraci signálních morfologických drah (Kumari a spol. 2017; Baloghova, Lidak, a Cermak 2019). Ke speciálnímu využití UPS dochází během kontroly kvality nově syntetizovaných, sekretovaných a transmembránových proteinů v endoplazmatickém retikulu. Tento kontrolní systém zvaný ERAD (endoplasmatic reticulum associated degradation) zprostředkovává degradaci defektně složených proteinů (Römisch 2005).

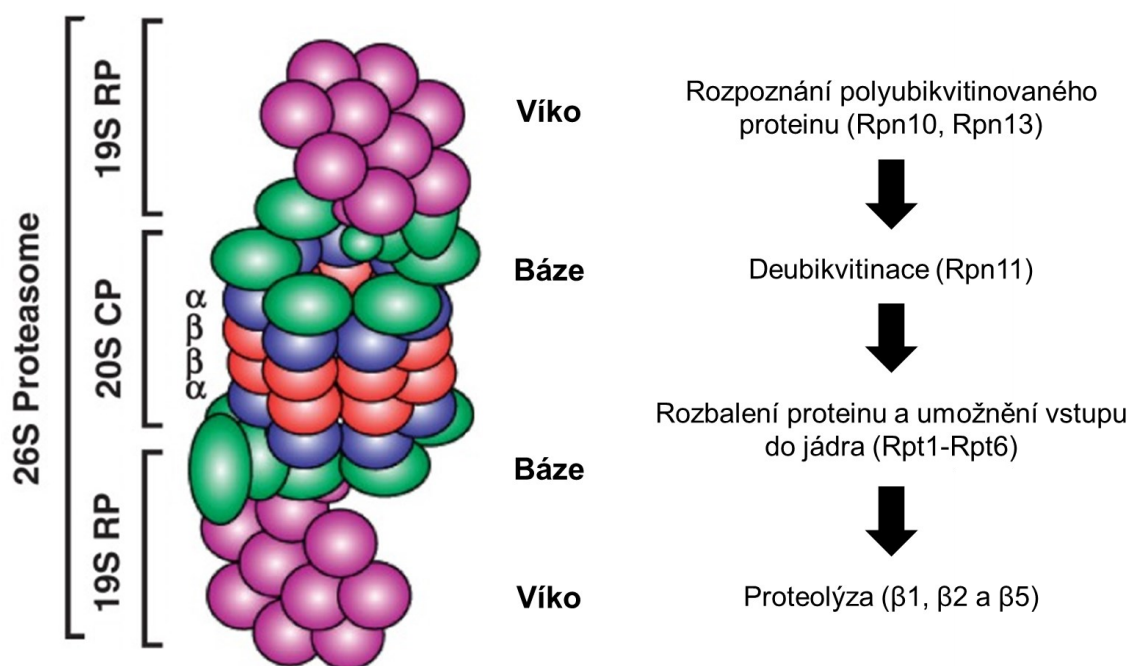
Z mechanického hlediska UPS představuje řetězec enzymatických aktivit. Celá kaskáda je iniciována specifickým označením substrátu (proteinu určeného k degradaci) řetězcem ubikvitinových peptidů. Takto označený substrát je následně zdegradován v lumen multiproteinového komplexu zvaného proteazom (Peters 1994). Ten rozpoznává ubikvitinem označené proteiny a za spotřeby ATP (adenosine triphosphate) je rozbaluje a posouvá do proteazomového jádra, kde se nacházejí aktivní proteázy zodpovědné za rozštěpení proteinů na nízké peptidy až aminokyseliny (Cooper 2000).

2.1.1 Proteazom

Proteazom byl poprvé izolován v roce 1977 z extraktu králičích retikulocytů jako nový typ proteolýzy závislé na spotřebě ATP. Do té doby byl znám pouze energeticky neutrální typ proteinové degradace zprostředkovaný lyzozomem (Hough, Pratt, a Rechsteiner 1987; Etlinger a Goldberg 1977). Katalytické jádro proteazomu je vysoce konzervované v celé eukaryotické říši a jeho varianty se nachází také u bakterií a archebakterií (Maupin-Furlow 2013; Striebel a spol. 2014). Strukturně se proteazom skládá ze dvou 19S regulačních částí a jednoho 20S proteolytického jádra, kde dochází ke štěpení peptidické vazby substrátů (Obr. 1). Struktura jádra je podobná barelu, který je složen z 28 podjednotek tvořících čtyři heptamerické kruhy naskládané na sobě (Peters 1994). Dva vnější kruhy z obou stran jsou složené z α podjednotek, které regulují vstup do proteolytického jádra (Finley 2009). Dva vnitřní kruhy jsou složeny z β podjednotek s odhalenými katalytickými triádami, které jsou zodpovědné za štěpení peptidických vazeb v substrátu (Arendt a Hochstrasser 1997, Chen a Hochstrasser 1996; Obr. 1). Pouze tři β podjednotky jsou aktivní proteázy – $\beta 1$, $\beta 2$ a $\beta 5$, z nichž každá může štěpit širokou škálu peptidických sekvencí. Podjednotka $\beta 1$ je kaspázová proteáza upřednostňující štěpení za kyselými zbytky, $\beta 2$ je trypsinová proteáza, která má tryptickou specifitu a štěpí především

C-konce argininu a lysinu, a $\beta 5$ je proteáza podobná chymotrypsinu se specifitou pro hydrofobní aminokyseliny (Finley 2009).

Regulační částice 19S má dvě podjednotky: víko a báze. Víko je zodpovědné za rozpoznání polyubikvitinového řetězce. Tuto vazbu zprostředkovává její podjednotky Rpn10 (26S proteasome regulatory subunit) a Rpn13 (Deveraux et al. 1994; Husnjak et al. 2008). Významnou funkcí 19S částice je odštěpení a recyklace polyubikvitinového řetězce. Toto je zprostředkováno proteázou Rpn11, která patří do rodiny tzv. deubikvitináz (Verma a spol. 2002). Báze lokalizována mezi víkem a α podjednotkami katalytického jádra je složena ze šesti AAA-ATPázových podjednotek a čtyř ne-ATPázových podjednotek. Tato motorická jednotka zajišťuje rozplétání substrátu za současné spotřeby ATP a posun rozpleteného substrátu skrze otevřený α kanál (α heptamer) do proteolytického jádra. Kontrola otevření α kanálu tak zamezuje nespecifické degradaci (Bard a spol. 2018; Tanaka 2009, Chen a Hochstrasser 1996; Obr. 1).



Obrázek 1: Proteazom

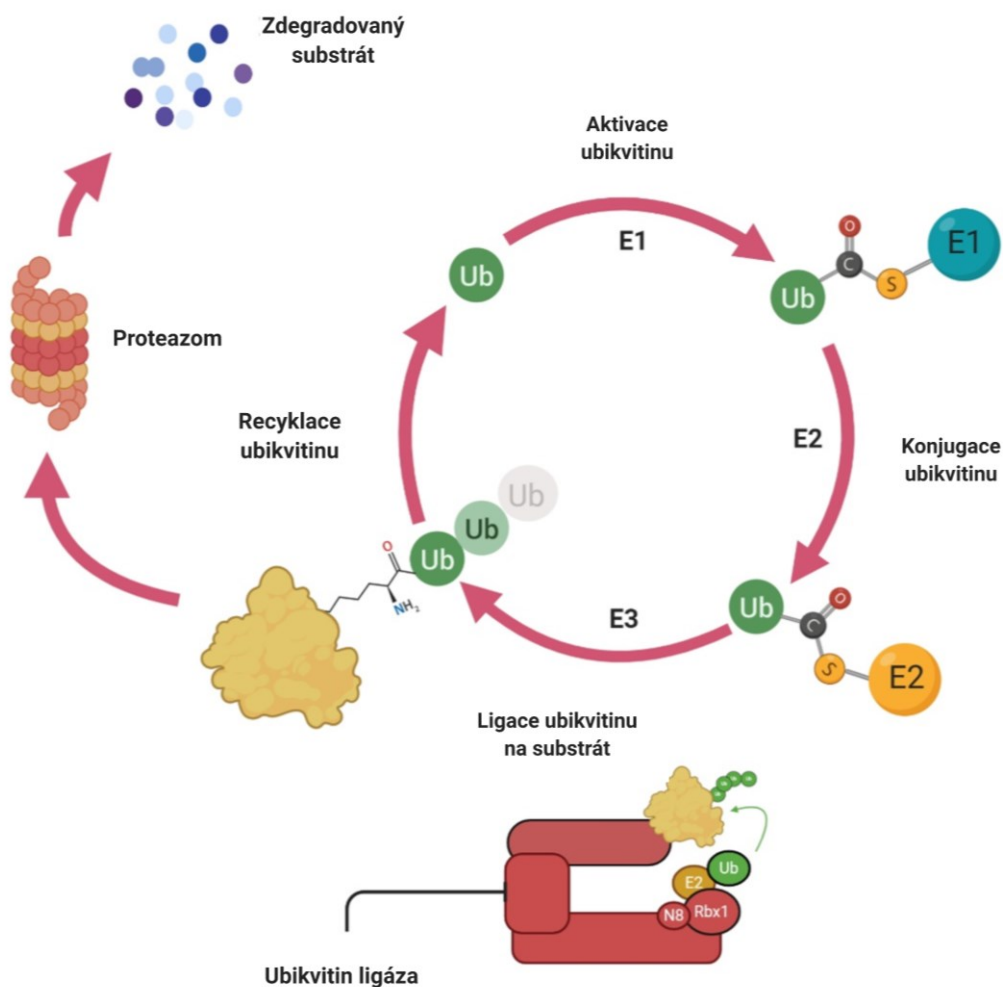
Víko regulační podjednotky 19S proteazomu je multiproteinový komplex zodpovědný za rozpoznání a odštěpení polyubikvitinového řetězce. Další část této podjednotky je báze, která za spotřeby ATP rozplétá substrát a posouvá ho do katalytické podjednotky proteolytického jádra, kde dochází k samotné degradaci proteinů prostřednictvím proteáz. *Převzato a upraveno:* (Tanaka 2009).

V některých buněčných typech se nacházejí speciální varianty proteazomu. Mezi ty se řadí imunoproteazom či thymoproteazom. Imunoproteazom generuje krátké peptidy, které jsou prezentovány na povrchu buněk pomocí MHC glykoproteinů I. třídy (major histocompatibility complex I.). Tento funkčně specifický typ proteazomu má odlišné katalytické podjednotky nazývané $\beta 1i$, $\beta 2i$, $\beta 5i$, které jsou exprimovány v odpovědi na prozánětlivý cytokin IFN- γ (interferon gamma) a přednostně inkorporovány do proteazomu za vzniku imunoproteazomu. Při oxidativním stresu a vyšším množství zánětlivých cytokinů hladina imunoproteazomu stoupá (Tanaka 2009; Ferrington a Gregerson 2012). Během pozitivní selekce CD8⁺ T lymfocytů v kůře brzlíku je exprimovaná katalytická podjednotka $\beta 5t$, která je spolu s $\beta 1i$, $\beta 2i$ nebo $\beta 1$, $\beta 2$ podjednotkami inkorporována do tzv. thymoproteazomu (Murata a spol. 2007; Tanaka 2009).

2.1.2 Ubikvitinace

Roku 1975 byl objeven krátký peptid přítomný ve všech tkáních. Jeho primární struktura byla vysoce evolučně konzervovaná u eukaryotických organismů a jeho homology se později našly i u bakterií a archebakterií. Originálně nazvaný UPIP (Ubiquitous immunopietic polypeptide) protein byl později přejmenovaný na ubikvitin (Goldstein a spol. 1975). Ubikvitin je 76 aminokyselin dlouhý peptid, který je schopný kovalentní vazby na jiný protein (substrát) a také vazby na další ubikvitiny a tvorbu tzv. polyubikvitinových řetězců, které označují proteiny určené k degradaci (Avram Hershko a Ciechanover 1998). Kovalentní vazba mezi substrátem a ubikvitinem stejně jako mezi dvěma ubikvitiny narůstajícího řetězce je tvořena izopeptidickou vazbou mezi lysiny substrátu a C-koncovými glyciny nově připojovaných ubikvitinů. Aktivace ubikvitinu a jeho kovalentní připojení na cílový substrát je řízeno procesem ubikvitinace. Tato sekvenční kaskáda enzymatických dějů je závislá na třech hlavních enzymech: E1 enzym aktivující ubikvitin, E2 konjugující enzym a E3 ubikvitin ligáza. Ubikvitin musí být nejprve aktivován prostřednictvím adenylace, kterou katalyticky zprostředkovává E1 enzym za spotřeby ATP (Ciechanover a spol. 1982). E2 enzym následně katalyzuje přenos aktivovaného ubikvitinu pomocí transesterifikační reakce z E1 na katalytický cystein E2. V posledním kroku pomocí komplexu E3 ubikvitin ligázy je ubikvitin konjugován na lysin cílového proteinu/substrátu, či narůstajícího polyubikvitinového řetězce. Tento proces se opakuje až do vzniku kritické

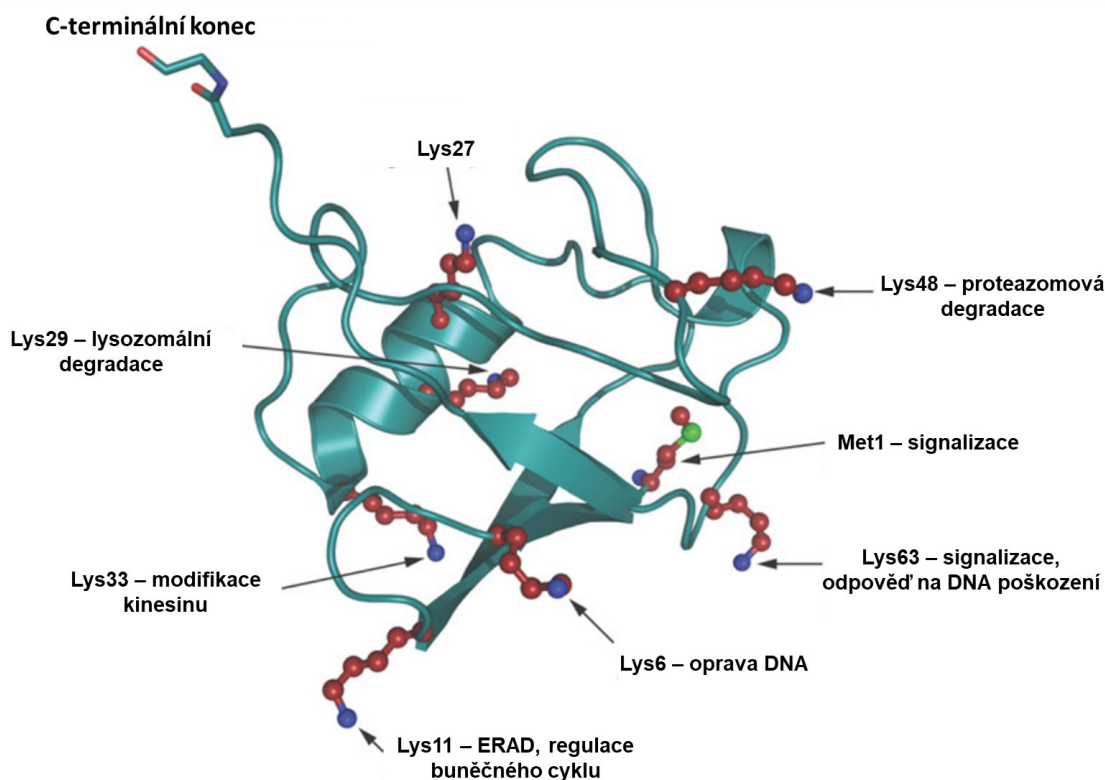
délky polyubikvitinového řetězce. Takto označený protein je následně rozeznán transportními proteiny nebo přímo proteazomem, kde je zdegradován (A. Hershko a spol. 1983; Obr. 2).



Obrázek 2: Ubikvitinace

UPS je evolučně konzervovaný proces, který představuje kaskádu třech hlavních enzymatických fází. Nejprve je ubikvitin aktivován pomocí E1 aktivujícího enzymu. Aktivovaný ubikvitin je dále předán na E2 konjugující enzym a v posledním kroku pomocí E3 ubikvitin ligázy kovalentně navázán na substrát. Ubikvitin tvoří polyubikvitinové řetězce prostřednictvím řetězení navázaných ubikvitinů. *Vytvořeno v BioRender.com.*

Ubikvitin sám obsahuje sedm lysinových zbytků. E2 enzymy ve spolupráci s E3 ligázami jsou zodpovědné za charakter narůstajícího řetězce, který určuje následné děje (Li a Ye 2008). Polyubikvitinový řetězec vytvořený řetězením na lysinu v pozici 6 (K6) hraje roli v opravě dvouřetězcových zlomů DNA. Řetězec K11 je tvořen komplexem APC/C (anaphase-promoting complex/cyclosome) ubikvitin ligázy a je zodpovědný za degradaci promitotických proteinů během metafáze a tudíž za koordinaci a kontrolu dělení replikované DNA během poslední fáze buněčného cyklu. Nejstandardnější formou degradačního signálu je polyubikvitinový řetězec K48, který je zodpovědný za degradaci proteazomálním komplexem (Chau a spol. 1989). Posledním z typických řetězců je K63. Tyto řetězce vytvářejí lineární formy polyubikvitinů se schopností amplifikovat některé buněčné signální dráhy, které se účastní například oprav DNA, imunitní odpovědi nebo endocytózy (Arnason a Ellison 1994). Podobným příkladem je M1 (methionin v první pozici) řetězec, který se od všech odlišuje tím, že se jedná o kovalentní vazbu mezi N-koncem methioninu a C-koncem glycinu. Nejedná se tedy o vazbu izopeptidickou, ale peptidickou (Kulathu a Komander 2012; Komander 2009; Obr. 3).

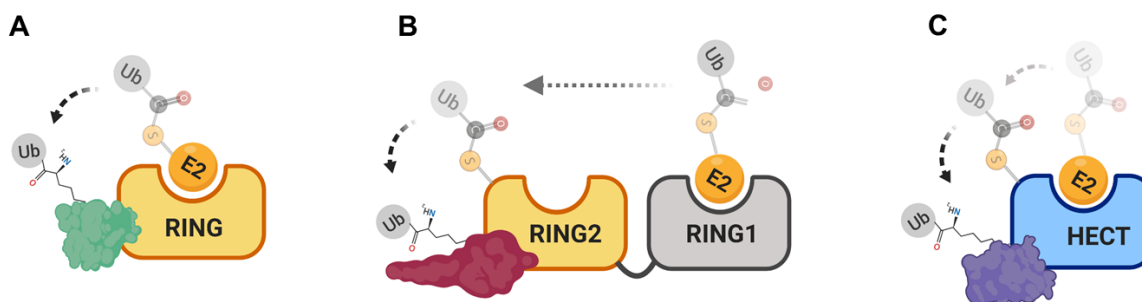


Obrázek 3: Ubikvitin

Ubikvitin tvoří různé typy polyubikvitinových řetězců, podle kterých zprostředkovává odlišné funkce. K tomu slouží sedm lysinových zbytků spolu s prvním methioninem, které se na ubikvitinu nacházejí. *Převzato a upraveno: (Komander 2009).*

2.1.3 E3 ubikvitin ligázy

E3 ubikvitin ligázy jsou zodpovědné za výběr substrátu a s tím související specifičnost systému. V lidském genomu se nachází přibližně 600-1000 genů kódujících E3 ubikvitin ligázy či jejich podjednotky. Tato nesourodá skupina se dělí do třech skupin podle mechanismu přenosu ubikvitinu na substrát (Zheng a Shabek 2017; Baloghova, Lidak, a Cermak 2019). HECT (homologous to the E6-AP carboxyl terminus) a RBR (RING-between-RING; RING – Really Interesting New Gene) ubikvitin ligázy jsou charakterizovány sekvenčním přenosem ubikvitinu, který v aktivovaném stavu přechází procesem transesterifikace nejprve na katalytický cystein nacházející se přímo v ubikvitin ligáze a následně na lysin cílového substrátu (Buetow a Huang 2016, Rotin a Kumar 2009) (Obr. 4B, C). Největší skupinou ubikvitin ligáz jsou RING E3 ubikvitin ligázy obsahující RING motiv (Obr. 4A). Tyto ubikvitin ligázy zprostředkovávají přímý přenos ubikvitinu mezi E2 enzymem a substrátem. RING E3 ubikvitin ligázy jsou rozděleny do podskupin podle počtu podjednotek: monomerní, homodimerní, heterodimerní a multipodjednotkové RING E3 ubikvitin ligázy. Do této skupiny patří navíc i U-box ubikvitin ligázy obsahující U-box motiv, který je strukturně podobný RING motivu, ale postrádá aminokyseliny koordinující zinečnaté ionty (Metzger a spol. 2014).

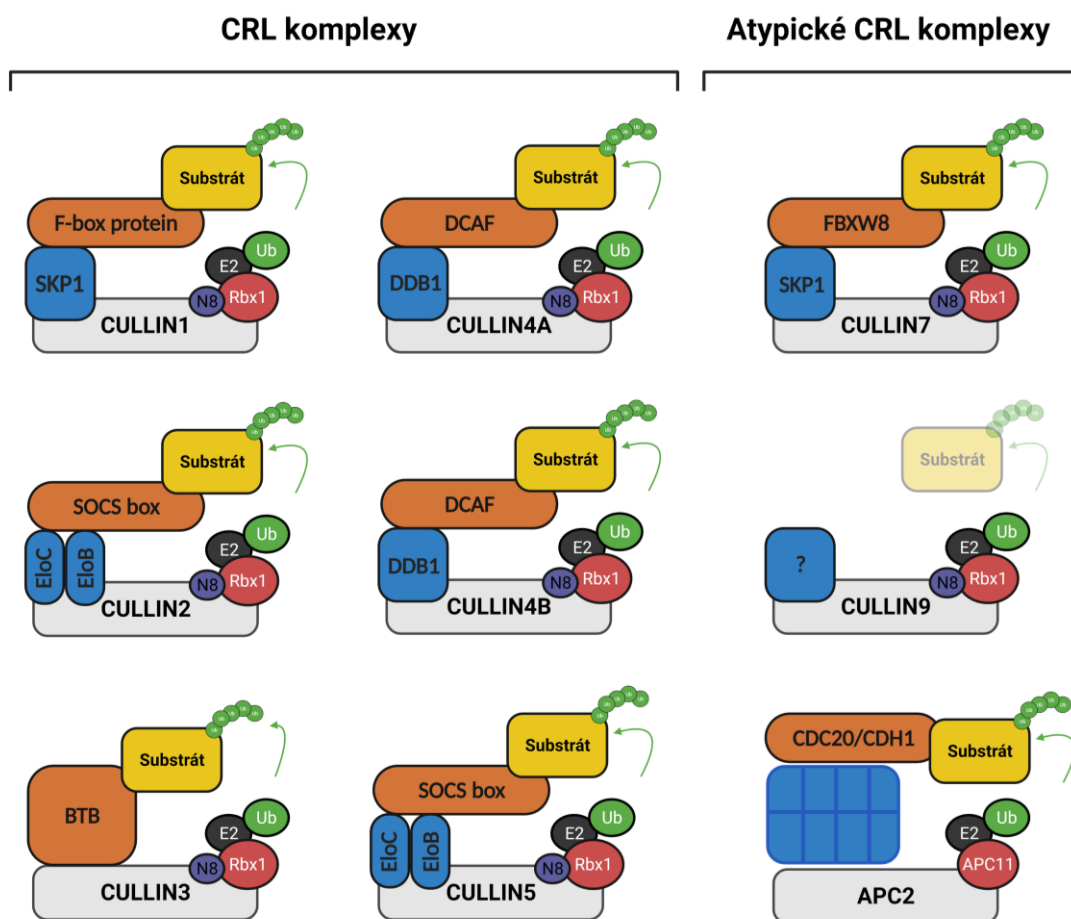


Obrázek 4: Ubikvitin ligázy

Rozdělení E3 ubikvitin ligáz do tří hlavních skupin: RING, RBR a HECT. (A) RING E3 ubikvitin ligázy zprostředkovávají přímý přenos ubikvitinu mezi E2 enzymem a cílovým substrátem. (B, C) HECT a RBR E3 ubikvitin ligázy jsou charakterizovány transienční vazbou ubikvitinu na katalytický cystein lokalizovaným v jejich strukturách a následným přenosem ubikvitinu na lysin substrátu (Rotin a Kumar 2009). *Vytvořeno v BioRender.com podle : (Rieser, Cordier, a Walczak 2013).*

2.1.4 Multipodjednotkové E3 ubikvitin ligázy závislé na cullinu

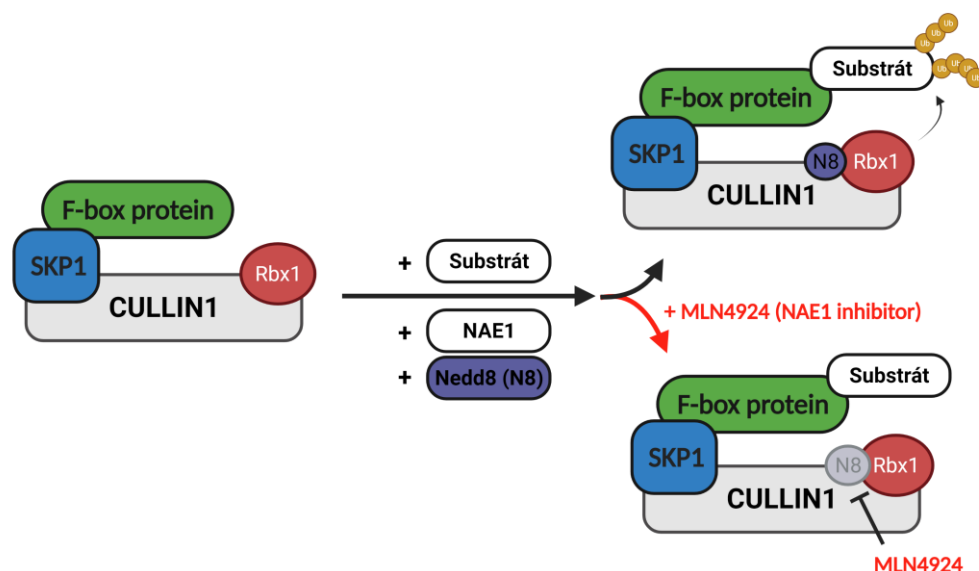
Specifickou podtřídou RING ubikvitin ligáz jsou multipodjednotkové Cullin-RING ubikvitin ligázy (CRL; Cullin-RING ubiquitin ligase). Cullin (CUL) v CRL tvoří strukturní podjednotku zajišťující propojení Rbx1 (RING-Box protein 1) a modul rozpoznávající substrát (Nakayama a Nakayama 2006). Rbx1 leží na C-konci CUL podjednotky a váže E2 konjugující enzym přinášející aktivovaný ubikvitin. Modul rozpoznávající substrát se váže na N-konec cullinu a je většinou tvořen adaptorovým proteinem a receptorem vázající substrát. Výběr těchto podjednotek je závislý na typu cullinu. V současnosti je jich známo devět (CUL1-9) a jeden příbuzný cullin APC2 (Anaphase-promoting complex 2) nacházející se v ubikvitin ligáze APC/C. (Skaar, Pagan, a Pagano 2013; Obr. 5).



Obrázek 5: Multipodjednotkové E3 ubikvitin ligázy závislé na CUL

U člověka se nachází pět typických cullinových podjednotek (CUL1-CUL5), které vážou různé adaptorové substrátové proteiny. CUL7 a CUL9 jsou atypické cullinové podjednotky. Součástí ligázy regulující vstup do mitotické anafáze je APC2 protein, který je také vzdáleně příbuzný cullinu. *Vytvořeno v BioRender.com podle: (Skaar, Pagan, a Pagano 2013).*

Kromě strukturní role je cullin také zodpovědný za aktivitu celého komplexu. Aktivní forma cullinu je na C-konci modifikována malým ubikvitinu podobným peptidem NEDD8 (Neural precursor cell expressed developmentally down-regulated protein 8) (Lammer a spol. 1998). U takto neddylovaného cullinu dochází ke konformační změně C-koncové domény. Rbx1 je uvolněn z autoinhibiční konformace a umožňuje přiblížení C-konce a N-konce cullinové podjednotky, které je důležité pro předání ubikvitinu z E2 konjugujícího enzymu na cílový substrát (Pan a spol. 2004, Rabut a Peter 2008, Enchev, Schulman, a Peter 2015). V experimentálních podmínkách může být proces neddylace blokován pomocí malé molekuly MLN4924, která inhibuje E1 aktivující enzym specifický pro NEDD8 (NAE1 – NEDD8 Activating Enzyme E1 Subunit 1) (Soucy a spol. 2009; Obr. 6). Inhibice neddylace vede k akumulaci substrátů, které jsou jinak degradovány CRL, což při delší expozici vede ke spuštění buněčného stresu a apoptóze (Lan a spol. 2016).



Obrázek 6: Regulace aktivity SCF ubikvitin ligázy

Aktivita multipodjednotkových E3 ubikvitin ligáz obsahující cullinový strukturní protein je regulována pomocí procesu zvaného neddylace. Tento protein podobný ubikvitinu NEDD8, je konjugován na C-konec cullinové podjednotky a zprostředkovává aktivní přenos ubikvitinu na cílový substrát. Farmakologická inhibice NEDD8 E1 aktivujícího enzymu pomocí MLN4924, vede k zablokování akce celého enzymu a k akumulaci jejich substrátů. *Vytvořeno v BioRender.com.*

2.1.5 Ubikvitin ligáza závislá na Cullinu1 (SCF)

CUL1, SKP1 (S phase kinase-associated protein 1) a F-box proteiny spolu s RBX1 proteinem tvoří ubikvitin ligázový komplex zvaný SCF (SKP1-CUL1-F-box). Objev F-box domény je spojen s objevem cyklinu F (C Bai, Richman, a Elledge 1994), který kromě cyklinové domény obsahuje přibližně 40 aminokyselin dlouhý F-box motiv. Ten je zodpovědný za vazbu F-box proteinu na adaptérový protein SKP1 (Chang Bai a spol. 1996). Většina proteinů s F-box motivem má na svém C-konci různé typy repetitivních motivů či komplexních domén, které zprostředkovávají specifickou vazbu cílového substrátu. Podle těchto oblastí můžeme F-box proteiny rozdělit do tří podskupin. První skupinou jsou F-box domény s leucinovými repeticemi (FBXL), druhá skupina obsahuje WD40 repetice (FBXW) a poslední skupina obsahuje jiné, či neznámé motivy zprostředkovávající interakci substrátu a F-box proteinu (FBXO) (Skaar, Pagan, a Pagano 2013). Některé ubikvitin ligázy jako třeba β -TrCP (β -transducin repeat containing; BTRCP nebo FBXW1) či CCNF (cyclin F; FBXO1) mají kromě nových nomenklaturních názvů i svá historická a většinou preferovaná jména. V současnosti je známo 69 proteinů s F-box doménou, které jsou kódované v lidském genomu (Wang a spol. 2014). Nomenklatura ubikvitin ligáz obsahující F-box proteiny je odvozena od příslušného substrátového receptoru, který se píše horním indexem, např.: SCF^{FBXO38} (Skowyra a spol. 1997). Každá taková ligáza rozeznává jiné spektrum substrátů. Některé jako třeba SCF ^{β -TrCP} či SCF^{FBXW7} váží substráty v kontextu jejich fosforylovaných forem, jiné jako třeba SCF^{CCNF} váží přímo nemodifikované substráty (Skowyra a spol. 1997). Již v roce 1996 byla vyřčena hypotéza, že proteiny obsahující F-box doménu mohou být zapojeny do destrukčních systémů konkrétního proteinu, což se také následně potvrdilo (Chang Bai a spol. 1996).

2.1.6 FBXO38 (MoKA)

FBXO38 je 140kDa velký protein, jinak známý také jako MoKA (modulator of KLF7 activity), který patří do skupiny proteinů s F-box doménou. Společně s adaptorovým proteinem SKP1 a strukturálním cullinem CUL1 tvoří ubikvitin ligázu SCF^{FBXO38}. Gen *Fbxo38* je u myši lokalizován na chromozomu 18, u lidí na chromozomu 5, a jeho exprese není tkáňově specifická. Ve své primární struktuře obsahuje tři NES (jaderné exportní

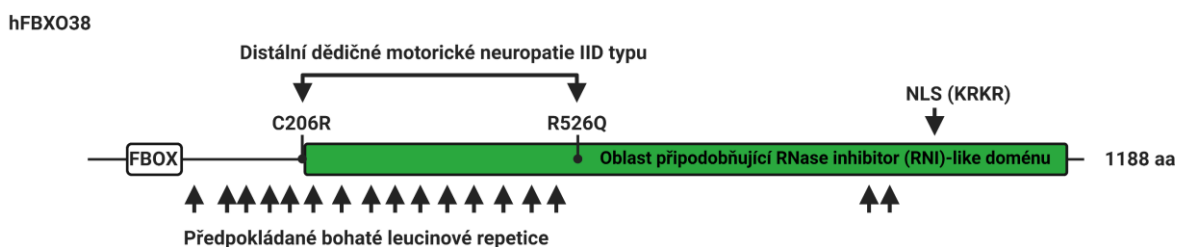
signály) a tři potenciální NLS (jaderné lokalizační signály), z nichž pouze NLS2 je zodpovědný za obligatorní nukleární lokalizaci (Smaldone a spol. 2004, Smaldone a Ramirez 2006).

Protein FBXO38 byl původně identifikován jako potenciální koaktivátor transkripčního faktoru KLF7 (Krüppel-like factor 7) účastnícího se vývoje nervového systému (Matsumoto a spol. 1998). Tato interakce byla nezávislá na SCF komplexu a nevedla k ubikvitinaci ani degradaci KLF7 (Smaldone a spol. 2004). Kromě KLF7 byl protein FBXO38 identifikován jako interakční partner USP7 (ubiquitin-specific-processing protease 7). USP7 se podílela na stabilizaci komplexu FBXO38 a KIF20B (kinesin family member 20B). Inhibice USP7 vedla k poklesu jejich proteinových hladin a k následnému defektu v cytokinezi (Georges a spol. 2019). Jediným dosud identifikovaným a charakterizovaným substrátem SCF^{FBXO38} je transmembránový protein PD-1 (programmed cell death 1). Ten je exprimován na T-buňkách a slouží jako kontrolní bod aktivace imunitního systému. FBXO38 polyubikvitinoval PD-1 a byl nezbytný pro jeho proteazomální degradaci (Meng a spol. 2018). Genetické populační studie odhalily polymorfismus genu *FBXO38* u některých vrozených a získaných syndromů. Kromě vlivu na míru rozvoje COPD (Chronic obstructive pulmonary disease) u kuřáků (Saferali a spol. 2019) bylo objeveno několik mutací asociovaných s rozvojem časného neurodegenerativního onemocnění.

2.1.7 Role FBXO38 v distální spinální svalová atrofie

SMA (Spinál muscular atrophy) je degenerativní onemocnění postihující zejména motorické míšní nervy předního rohu. Nejběžnější forma SMA je spojena s mutací nebo delecí genu SMN1 (survival motor neuron 1) (Mazanec a spol. 2016). S nástupem celogenomických sekvenačních studií došlo k objevu většího spektra proteinových variant způsobujících různé formy tohoto onemocnění. Tyto formy se liší zejména dobou nástupu, vzorcem dědičnosti i klinickým fenotypem (Farrar a Kiernan 2015). Příkladem může být právě DSMA (Distal spinal muscular atrophy), která spadá do širší skupiny DHMN (Distal hereditary motor neuropathies) (Wee, Kong, a Sumner 2010; Kaindl a spol. 2007). Mutace v DHMN lze rozdělit do tří kategorií: autosomálně dominantní, autosomálně recesivní a mutace vázané na X chromozom (Rossor a spol. 2012). Mutace v genu pro substrátový

receptor FBXO38 byly identifikovány jako příčiny vzniku jak autosomálně dominantní, tak autosomálně recesivní formy tohoto onemocnění (Obr. 7). Do skupiny autosomálně dominantních mutací patří heterozygotní mutace c.616T> C v genu *FBXO38*, která vede k záměně cysteinu na pozici 206 za arginin (Cys206Arg) a je zodpovědná za vznik distální motorické neuropatie typu IID s nástupem v dospělosti (Sumner a spol. 2013). Následkem homozygotní mutace *FBXO38* v c.1577G>A vedoucí k záměně Arg526Gln je časný vznik pomalu progresivní distální motorické neuropatie, která nastupuje spolu se ztrátou sluchu a dalšími anomáliemi (Akçimen a spol. 2019).



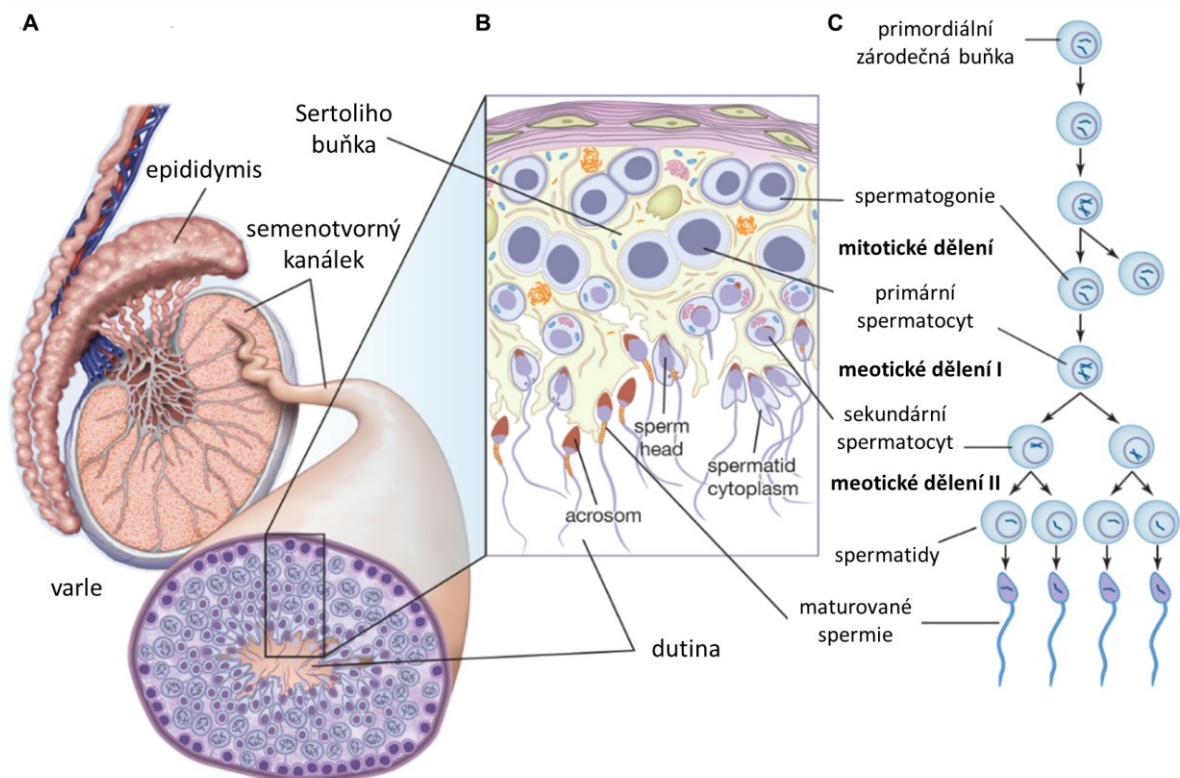
Obrázek 7: Struktura proteinu FBXO38

Mutace v genu *FBXO38* vedoucí k záměnám Cys206Arg a Arg526Gln byly identifikovány jako příčiny vzniku dědičné distální motorické neuropatie. Vytvořeno v *BioRender.com* podle: (Sumner a spol. 2013).

2.2 Spermatogeneze

Spermatogeneze je proces, při kterém vznikají spermie s haploidní sadou chromozomů. Spermie jsou diferenciovány ze zárodečných diploidních progenitorových buněk, takzvaných spermatogonií. Redukce chromozomů je zprostředkována meiotickým dělením, které má dvě fáze. První je dělení heterotypické, takzvané redukční a druhé se nazývá homotypické, které je shodné s mitotickým dělením. Proces spermatogeneze je lokalizován do semenotvorných kanálků uspořádaných ve varlatech. Každý kanálek je ohraničen bazální laminou tvořenou extracelulární matrix, na ní nasedajícími peritubulárními myoidními fibroblasty a epitelem tvořeným střídavě uspořádanými Sertoliho buňkami a spermatogoniemi. Od této buněčné populace probíhá spermatogeneze polárně směrem do lumen kanálku. Výsledkem spermatogeneze je vznik kulatých stádií spermatid, která jsou procesem spermiogeneze přeměněna na bičíkaté spermie (Obr. 8). Ty se skrze lumen kanálků přesouvají do nadvarlete. Nadvarle je strukturně a funkčně rozděleno

na tři části: hlava, tělo a ocas nadvarlete (*caput, corpus a cauda*). Díky průchodu nadvarletem se spermie stávají motilními a jejich povrch a akrozom prochází maturačními změnami tak, aby byly spermie schopné oplodnit vajíčko. Spolu se spermii je v nadvarletí přítomna dekapacitační tekutina, která brání spermii v předčasné kapacitaci a následné akrozomální reakci. Pro správnou funkci spermatogeneze je vyžadována nižší než tělesná teplota a proto je nezbytné sestoupení varlat mimo břišní dutinu do části pohlavního orgánu zvané šourek (Borg a spol. 2010; de Kretser a spol. 1998).



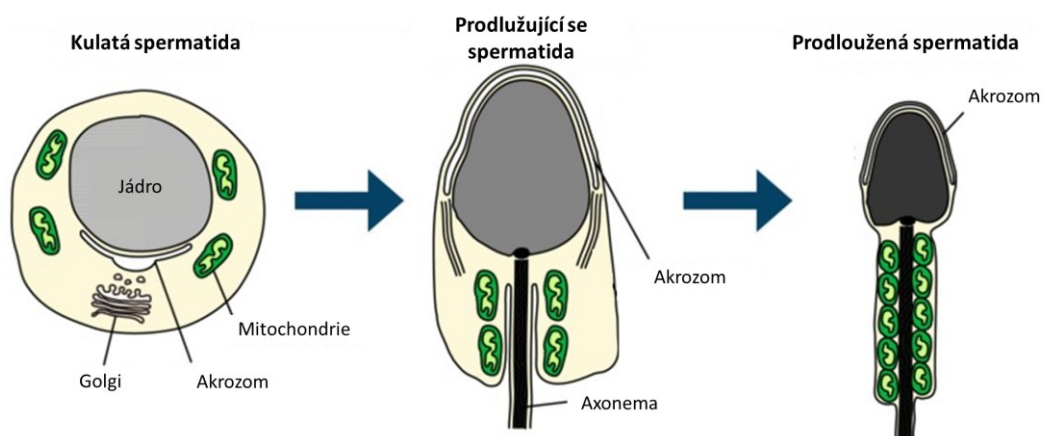
Obrázek 8: Proces spermatogeneze

(A) Průřez varletem. (B) Průřez semenotvorným kanálkem, ve kterém dochází k procesu spermatogeneze. (C) Spermatogeneze zahrnuje mitotické a meiotické dělení, které vede ke vzniku spermii z primordiálních zárodečných buněk. *Převzato a upraveno: (Encyclopaedia Britannica, 2013).*

2.2.1 Stádia spermatogeneze

Spermatogenezi lze rozdělit do tří fází: obnova spermatogonií a jejich proliferace, meióza a spermiogeneze. Proliferace spermatogonií probíhá prostřednictvím mitózy na basální straně epitelu semenotvorného tubulu. Tento proces dává vzniku spermatogoniím

typu A a spermatogoniím typu B. Spermatogonie typu A, nazývané jinak také tmavé spermatogonie, udržují konstantní počet kmenových buněk. Před vstupem do diferenciální fáze se spermatogonie A nejprve několikrát mitoticky rozdělí a dají vznik subpopulaci spermatogonií typu A1-A4. Poslední stádia spermatogonií A4 jsou buď odstraněny procesem apoptózy nebo se přemění na tzv. přechodné spermatogonie. Tyto progenitory se mitotickým dělením dále přemění na spermatogonie typu B (jinak také světlé spermatogonie) a následně vstupují do druhé fáze spermatogeneze, která zahrnuje meiózu (Eugene F. Oakberg 1956a; Dym 1994; Eugene F. Oakberg 1971). Meióza I. je zahájena profází, která zahrnuje fáze leptotene, zygotene, pachytene, diplotene a diakineze. Redukční dělení meiózy zredukuje chromozomy na haploidní počet a po dokončení meiózy I. vznikají sekundární spermatocyty, které nevstupují do interfáze a hned podléhají meióze II., při níž vznikají spermatidy. Poslední fází spermatogeneze je spermiogeneze, která se odehrává v lumen semenotvorného kanálku a je charakterizována morfologickými změnami maturovaných spermatid (Bellve a spol. 1977). Změny zahrnují 16 stádií, během kterých dochází ke vzniku a morfologickým přeměnám akrozomu, jádra a bičíku. Morfologické změny se týkají tvaru jádra, kdy dochází ke sbalení a kondenzaci chromatinu. Za tímto účelem jsou histony dočasně nahrazeny proteiny protaminy, na které je DNA namotána do struktur zvaných toroidy. Na budoucí hlavičce spermie dochází ke vzniku a polarizaci akrozomu, který se generuje z Golgiho aparátu. V hlavičce spermie také dochází k minimalizaci cytoplazmy, která je prostřednictvím Sertoliho buněk fagocyticky pohlcena (Obr. 9). Dochází také ke vzniku axonemy bičíku (O'Donnell 2015).

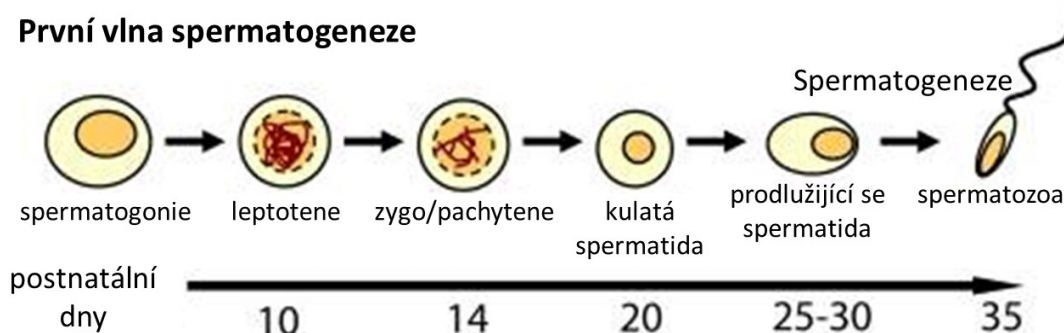


Obrázek 9: Proces spermiogeneze

Poslední fází spermatogeneze je spermiogeneze, kdy se z kulaté spermatidy (vlevo) stává prodloužená spermatida (vpravo). Tento proces je doprovázen mnoha změnami jako je reorganizace hlavičky spermatidy, redukce cytoplazmy a tvorba akrozomu a bičíku. *Převzato a upraveno: (Nakamura 2013).*

2.2.2 První vlna spermatogeneze

Na začátku postnatálního období jsou semenotvorné tubuly složeny pouze ze Sertoliho buněk (84 %) a ze spermatogonií typu A (16 %). U myši dochází před desátým dpp (days post partum) k tzv. první vlně spermatogeneze (Obr. 11), kdy se začínají dělit a diferencovat spermatogonie typu B. Okolo 10 dpp začíná proces meiózy. Mezi 20 dpp a 25 dpp se začínají objevovat spermatidy a okolo 35 dpp vznikají spermie (Bellve a spol. 1977; Zimmermann a spol. 2015). U člověka dochází k aktivaci procesu spermatogeneze až s nástupem puberty.



Obrázek 11: První vlna spermatogeneze

První vlna myší spermatogeneze začínající okolo 10 dpp. Následně dochází k meiotickému dělení a okolo třicátého pátého dne postnatálního věku je první vlna spermatogeneze ukončena procesem spermiogeneze a vznikem maturovaných spermií. *Převzato a upraveno: (Chi a spol. 2009).*

2.2.3 Somatické buňky ve varlatech

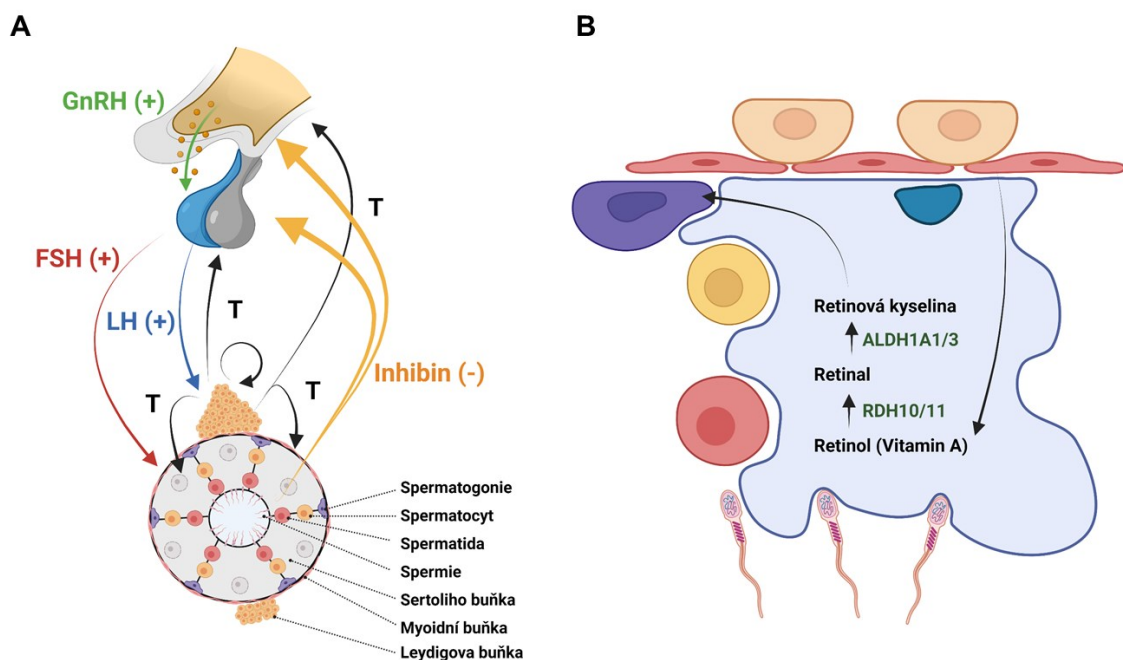
Varlata jsou imunoprivilegovaná tkáň, která obsahuje tři typy somatických buněk: Sertoliho buňky, Leydigovy buňky a peritubulární myoidní buňky, které jsou nezbytné pro regulaci a správný chod spermatogeneze. Zatímco Sertoliho buňky spolu s peritubulárními myoidními buňkami tvoří bazální laminu semenotvorného kanálku, Leydigovy buňky jsou součástí perinukleárního prostoru a účastní se zejména hormonální regulace spermatogeneze (Zhou a spol. 2019).

Sertoliho buňky byly identifikovány na konci 19. století Von Ebnerem, který je pojmenoval podle jejich objevitele Enrico Sertoliho. Ten tyto buňky poprvé pozoroval roku

1865 a popsal je jako zvláštní rozvětvené buňky v semenotvorných tubulech lidských varlat (Sertoli 2018). Sertoliho buňky jsou v přímém funkčním kontaktu se zárodečnými buňkami a kontrolují celý proces spermatogeneze. Jsou mimo jiné zodpovědné za cyklické dělení spermatogonií a pohyb vyvíjejících se spermatocytů a spermatid ve směru od basální laminy do lumenu semenotvorného kanálku (Wen a spol. 2018). Jedna Sertoliho buňka může vyživovat a podporovat 30-50 zárodečných buněk (Cheng a spol. 2010; Neto a spol. 2016). Více než polovina diferencujících spermatogonií podléhá apoptóze, přičemž Sertoliho buňky podobně jako fagocyty odstraňují zbytky apoptotických spermatogonií. Stejnou roli hrají i v procesu spermiogeneze při odstraňování přebytečné cytoplazmy kulatých spermatid (Nakanishi a Shiratsuchi 2004). Sertoliho buňky tvoří vysoce specializované mikroprostředí semenotvorných kanálků díky těsným spojům, adhezním spojům a spojům mezerovým, které zodpovídají za vznik BTB (blood-testis barrier) a imunologické bariéry. Takto vzniklá bariéra je důležitá pro ochranu haploidních zárodečných buněk před autoimunitní odpovědí, zabraňuje difúzi molekul a látek a tvoří fyzickou bariéru mezi krevním řečištěm a semenotvorným kanálkem (Pelletier 1995; Gerber, Heinrich, a Brehm 2016). Sertoliho buňky jsou spolu s buňkami Leydigovými součástí hormonální regulace spermatogeneze, a to skrze regulaci hladiny RA (retinoic acid), morfogenů či hormonů (Griswold 2016; Obr. 12B).

Leydigovy buňky je buněčná populace vmezeřená mezi semenotvornými tubuly. Dospělé Leydigovy buňky prochází čtyřmi vývojovými stádii. Z mezenchymálních kmenových Leydigových buněk vznikají progenitory, které dávají vzniknout nezralým buňkám a ty jsou dále diferencovány na dospělé Leydigovy buňky (Benton, Shan, a Hardy 1995). Tento proces je aktivní během embryonálního vývoje. Po narození dochází k jeho útlumu a až během puberty pod vlivem LH (luteinizing hormone) dochází k jeho opětovné aktivaci. Leydigovy buňky se vyskytují v intersticiálním prostoru spolu s buňkami imunitního systému, krevním řečištěm a pojivovou tkání. Jejich hlavní funkcí je produkce testosteronu, který je nezbytný pro správný vývoj a funkci mužského reprodukčního systému. Produkce testosteronu je závislá na signalizaci z hypotalamu a hypofýzy, ty produkují LH, který se váže na receptory na Leydigových buňkách. LH aktivuje tvorbu cAMP (cyclic adenosine monophosphate) a stimuluje aktivaci PKA (protein kinase A). To vede k uvolnění cholesterolu, který se přeměňuje nejprve na pregnenolon ve vnitřní mitochondriální membráně Leydigových buněk a následně na testosteron v mitochondriích a hladkém endoplazmatickém retikulu (Dufau a Catt 1979, Zirkin a Papadopoulos 2018).

Vzájemná komunikace mezi Sertoliho a Leydigovými buňkami je součástí komplexní endokrinní regulace spermatogeneze z vyšších neurálních center. Regulace zahrnuje mnoho činitelů a důležitou zpětnovazebnou smyčku kontrolující hladinu testosteronu. Hypotalamus produkuje gonadotropní hormony, které ovlivňují produkci LH a FSH (follicle stimulating hormone) z hypofýzy. LH a FSH se krevním řečištěm dostávají do varlat. LH vstupuje do intersticiálního prostoru, kde jsou umístěny Leydigovy buňky a ty, jak je výše zmíněno, pod vlivem LH produkují testosteron. Vysoká hladina testosteronu vede k negativní zpětné vazbě a ke snížení produkce LH v hypofýze. Souhra testosteronu a FSH ovlivňuje funkci Sertoliho buněk a jejich vliv na zárodečné buňky a samotný průběh spermatogeneze. Sertoliho buňky odpovídají na testosteron a FSH stimulací ABP (androgen vazebného proteinu). ABP stimuluje proces spermatogeneze a spermiogeneze a podporuje tvorbu spermií. Negativní zpětná vazba zahrnuje sekreci ligandu zvaného inhibin ze Sertoliho buněk, která vede k inhibici FSH (Hogarth a Griswold 2010; Neto a spol. 2016; Obr. 12A).



Obrázek 12: Hormonální regulace spermatogeneze

(A) Spermatogeneze je řízena zpětnovazebným hormonálním systémem. V hypotalamu je produkován gonadotropní hormon (GnRH), který stimuluje produkci luteinizačního (LH) a folikul stimulujícího hormonu (FSH) v hypofýze. Tyto hormony jsou krevním řečištěm dopraveny do varlat. LH stimuluje produkci testosteronu (T) v Leydigových buňkách. Testosteron (T) následně ovlivňuje pozitivně Sertoliho a myoidní buňky. Produkce testosteronu je negativně regulována Sertoliho buňkami, a to prostřednictvím inhibinu, který blokuje hormonální produkci v hypotalamu a hypofýze. (B) Tvorba retinové kyseliny ve varlatech je důležitou součástí spermatogeneze. Sertoliho buňky přeměňují retinol (vitamin A) na retinal a následně na kyselinu retinovou, která stimuluje dělení spermatogónií. *Vytvořeno v BioRender.com.*

RA je derivátem vitamínu A a je nedílnou součástí regulace spermatogeneze (Obr. 12B). Je zodpovědná za iniciaci diferenciaci spermatogonií a následný vstup do meiózy. RA v zárodečných buňkách indukuje expresi STRA8, která stimuluje syntézu některých proteinů důležitých pro regulaci meiózy jako je například synaptonemální komplex (Koubova a spol. 2006). Při nedostatku RA nedochází k diferenciaci, dělení spermatogonií a v semenotvorných tubulech se nachází pouze Sertoliho buňky a nediferenciované zárodečné buňky (Mitranond a spol. 1979; Hogarth a Griswold 2010).

2.3 Role E3 ubikvitin ligáz ve varlatech

Proces ubikvitinace probíhá ve varlatech v porovnání s jinými orgány až s trojnásobně vyšší mírou. Souvisí to s velkým množstvím aktivně se dělících a diferencujících pohlavních buněk a také s velkým počtem proteinů, které musí být během spermatogeneze odstraněny (Rajapurohitam, Bedard, a Wing 2002). Takto vysoká míra ubikvitinace a s ní související proteinová degradace se vyskytuje zejména u pohlavně dospělých jedinců. U pohlavně nezralých jedinců, kde nebyla spermatogeneze ještě plně aktivována, je proces ubikvitinace nižší (Rajapurohitam a spol. 1999). Ubikvitinace je nenahraditelnou součástí procesu spermatogeneze ve varlatech. Podílí se na tvorbě bičíku a akrozomu spermie, účastní se restrukturalizace hlavičky a remodelace chromatinu v jádře každé spermie. Také se podílí na dynamice vzájemné interakce mezi Sertoliho a zárodečnými buňkami. (Richburg, Myers, a Bratton 2014; Nakamura 2013; Hou a Yang 2013). Kromě dynamických jevů regulují ubikvitin ligázy i homeostázu jednotlivých buněčných populací lokalizovaných v epitelu tubulů. Např. pro správnou funkci Sertoliho buněk je nezbytná souhra několika ubikvitin ligáz. Restrukturalizace Sertoliho buněk je závislá na adhezních spojích, které mohou být ubikvitinovány prostřednictvím E3 ubikvitin ligázy SCF^{β-TrCP}. Savci mají dva paralogy β-TrCP s podobnými biochemickými vlastnostmi, β-TrCP1 a β-TrCP2, s odlišnou expresí (Suzuki a spol. 1999). β-TrCP1 je exprimována především v meiotických buňkách a pak v nižší míře i ve spermatogoniích. β-TrCP2 je exprimována v nízkých hladinách v meiotických buňkách a ve střední míře ve spermatogoniích. E3 ubikvitin ligáza SCF^{β-TrCP} hraje důležitou roli v ubikvitinaci proteinu SNAIL1, což je represor E-kadherinu, který se podílí na tvorbě adhezních spojů. V Sertoliho buňkách deficientních na SCF^{β-TrCP} dochází ke stabilizaci SNAIL1, což vede ke snížení E-kadherinu v adhezních spojích a k defektům spermatogeneze. Tato represe E-kadherinu je

reverzibilní a pokud dojde k opětovnému zvýšení hladiny SCF^{β-TrCP}, dojde také ke zvýšení E-kadherinu (Kanarek a sol. 2010).

Proces redukce DNA a vznik haploidních spermatid je regulován množstvím ubikvitin ligáz. Mnohé z nich se účastní obecných procesů jako je buněčný cyklus a opravy DNA, ale některé z nich jsou specifické pro meiotické dělení a jeho regulaci. Siah1 je RING E3 ubikvitin ligáza, která pozitivně působí na pozdní meiotické dělení. Pokud je ubikvitin ligáza Siah1 mutovaná, hromadí se spermatocyty v metafázi I. a následně podléhají apoptóze. Spermatocyty, které uniknou apoptóze a pokračují ve vývoji, mají různé abnormality a nedokáží se dál dělit. Z toho vyplývá, že Siah1 hraje nezbytnou roli v přechodu z metafáze I. do anafáze I., a to patrně kvůli proteolytickému odstranění inhibitorů anafáze jako například protein Kid (kinesin vázající DNA protein), který se účastní segregace chromozomů během meiózy. Nadměrná exprese Siah1 vede k vyšší degradaci proteinu Kid, což má za následek neschopnost dokončit rozchod chromozomů (Germania spol. 2000, Dickins a spol. 2002).

Ubikvitin ligázy RAD6, UBR2, CUL4A, HEI10 hrají roli v meiotické rekombinaci při tvorbě dvouřetězcových DNA zlomů (Yamashita, Shinohara, a Shinohara 2004; Kwon a spol. 2003, 2; Kopanja a spol. 2011; Qiao a spol. 2014). Prostřednictvím těchto ubikvitin ligáz dochází k tvorbě polyubikvitinačních řetězců a vazbě faktorů opravující DNA (Baudat, Imai, a de Massy 2013; Ranjha, Howard, a Cejka 2018).

Proces spermiogeneze je poslední fází spermatogeneze, která se týká morfologických změn spermatocytů. Tento proces je také kontrolován velkým množstvím E3 ubikvitin ligáz. Jak již bylo zmíněno důležitým procesem spermiogeneze je záměna histonů za protaminy. Během této výměny je důležitá degradace histonů prostřednictvím HECT ubikvitin ligázy LASU1 (Large structure of UREB1) a na ní navázaného E2 konjugujícího enzymu UBC4 (Ubiquitin-conjugating enzyme E2 4) (Liu, Oughtred, a Wing 2005). Další ubikvitin ligázou nezbytnou pro tento proces je RNF8 (Ring-finger protein). Tato ligáza podporuje acetylaci H4K16, modifikaci, která je důležitá pro nahrazení histonů za protaminy (Lu a spol. 2010).

Další částí spermiogeneze je redukce cytoplazmy, na které se podílí E3 ubikvitin ligázy z rodiny MARCH (membrane associated RING-CH ubikvitin ligáza). MARCH10 je asociován s mikrotubuly a účastní se tvorby bičíku spermie (Iyengar a spol. 2011, 10), MARCH11 reguluje transport z Golgiho aparátu do endosomu během tvorby akrozomu a MARCH7 je vysoce exprimovaný jak v bičíku, tak v nejpřednější části akrozomu, kde

zprostředkovává ubikvitinaci proteinů, které mají dopad na morfologický tvar hlavičky spermie (Zhao a spol. 2013, 7). RNF19 patří do skupiny RING-ubikvitin ligáz, které byly detekované v proakrozomálním veziklu, na vnější membráně akrozomu a na akroplaxomu ve spermatidách. Pravděpodobně se RNF19 účastní tvorby bičíku a podílí se na intraflagelárním transportu (Rivkin a spol. 2009).

Ubikvitinace mitochondrií je důležitým krokem pro vznik střední části spermie tzv. mid-piece, který je plný mitochondrií. MITOL, neboli MARCH5, kontroluje mitochondriální dynamiku prostřednictvím přímé vazby a ubikvitinace proteinu FIS1 (mitochondrial fission 1 protein) a DRP1 (dynamin-1-like protein), tím reguluje aktivitu mitochondriální fúze a štěpení (Yonashiro a spol. 2006).

3. Cíle práce

- Vytvořit experimentální kohortu z myšího modelu připraveného ve spolupráci s transgenním servisním pracovištěm a ověřit tento připravený kmen pomocí PCR a sekvenace
- Popsat fitness a fenotyp myší deficientních na protein FBXO38
- Pomocí imunofluorescence identifikovat testikulární buněčné typy a fáze spermatogeneze, ve kterých je exprimován protein FBXO38
- Pomocí imunoblotingu a imunofluorescence analyzovat vliv ztráty FBXO38 na hladinu exprese jeho substrátu
- S využitím diferenciačních markerů definovat vliv ztráty FBXO38 na dynamiku spermatogeneze

4. Materiál a metody

4.1 Péče o myši

Myši kmene C57BL/6N byly chovány v kontrolovaném prostředí Chovného zařízení v rámci ÚMG AV ČR ve Vestci (Ústavu molekulární genetiky Akademie věd České Republiky). Všechny experimenty prováděné na zvířatech byly schváleny Výborem pro péči a použití zvířat ÚMG AV ČR podle protokolu 115/2016 a byly v souladu s českým zákonem č. 246/1992 a evropskými směrnici 2010/63/EU.

4.1.1 Genotypování myši

Pro genotypování byla použita DNA izolovaná ze špičky ocásku dlouhého přibližně 3 mm. Ocásky byly přes noc štěpeny při teplotě 55 °C v 500 µl lyzačního pufru s přidáním Proteinázou K o finální koncentraci 0,2 mg/ml.

Lyzační pufr na izolaci DNA

100mM Tris HCl (pH 8,5)

200mM NaCl

5mM EDTA

0,2% SDS (Sodium dodecyl sulfate)

Následně byly vzorky neutralizovány pomocí 500 µl roztoku fenol/chloroform/isoamyl alkoholu (v poměru 25:24:1), protřepány a stočeny na 13 000 rpm po dobu 5 minut. DNA byla precipitována přidáním 500 µl 98% etanolu. Peleta DNA byla následně promyta pomocí vychlazeného 70% etanolu, vysušena při 37 °C a rozpuštěna ve 200 µl TE pufru (10mM Tris-HCl pH 8, 1mM EDTA (Ethylenediaminetetraacetic acid)).

Takto připravené vzorky byly použity pro PCR (Polymerase chain reaction). Jedna reakce obsahovala 10 µl 2x DreamTaq Green PCR Master Mix (DreamTaq DNA polymeráza, pufr, směs deoxynukleotid trifosfátů (dNTPs) a MgCl₂; Thermo Scientific), směs primerů o finální koncentraci 0,5µM a 1 µl DNA.

Sekvence primerů použitých pro genotypování

Forward	GGCTGTTCTCCTCTTTGTGC
Reverse	TCCTTCCTCCTGCTAGACTCT

PCR byla provedena v termocykleru (T100, BioRad) s následujícím nastavením:

Počáteční denaturace	95 °C	5 min
Denaturace	95 °C	30 s
Nasedání primerů	60 °C	30 s
Elongace	72 °C	1 min
Finální extenze	72 °C	5 min
Celkový počet cyklů	35	

Vzniklý PCR produkt byl rozdělen na 1% agarózovém gelu a vizualizován pomocí ethidium bromidu. Velikost WT produktu byla 824 bp, velikost mutantního produktu 184 bp.

4.1.2 Stanovení počtu spermií (sperm count)

Počet spermií byl stanoven z izolovaných nadvarlat, které byly ve zkumavce s 500 μ l PBS (Phosphate-buffered saline) rozstříhány pomocí pitevních nůžek definovaným počtem stříhů. Následně byly spermie ze vzorků vyklepány a vzorky byly přibližně 3 minuty zanechány v klidu pro usazení okolní tkáně. Sperm count byl proveden pomocí Bürkerovy komůrky z 10 μ l suspenze odebrané ze vzniklé mezifáze. Mikromřížka této počítací komůrky je hluboká 0,1 mm a je složena z 9 větších čtverců o ploše 1 mm², které jsou dále rozděleny na 16 menších čtverců o ploše 0,04 mm². Pro stanovení počtu spermií byly počítány hlavičky ve 12 malých čtvercích ve dvou řádcích a jeden čtverec navíc, tj. celkem 12+12+1 čtverec. Tj. počet buněk ve 25 malých čtvercích vynásoben 10 000x (případně počtem ředění) udává počet buněk v 1 ml.

4.1.3 Hodnocení motility spermií

Vyhodnocení motility spermií bylo provedeno ve spolupráci s transgenním servisním modulem Ústavu molekulární genetiky AV ČR. Čerstvě izolované spermie z ocasu nadvarlete (kauda) byly inkubovány v MBCD médiu (methyl- β -cyklodextrin) při teplotě 37 °C v CO₂ inkubátoru po dobu 30 minut. MBCD médium podporuje kapacitaci a motilitu spermií na periferii kapky. Motilní spermie z periferie byly přeneseny do čisté kapky MBCD, z čehož bylo 30 μ l suspenze přeneseno do komůrky Leja Standard Count 2 Chamber Slide a celá komůrka byla umístěna na vyhřívací podložku Hamilton Thorne MiniTherm pod mikroskop. Počítání motility spermií bylo provedeno pomocí programu Hamilton Thorne MouseTraxx (Animal motility program). Aby bylo procento motility spolehlivé, počet spermií musel být minimálně 1000.

4.1.4 Umělé oplození (in vitro fertilizace)

Ve spolupráci s transgenním servisním modulem Ústavu molekulární genetiky AV ČR, jsme provedli *in vitro* oplození, abychom zjistili, zda jsou spermie Fbxo38^{-/-} myši schopné oplodnit oocyt a zahájit jeho embryonální vývoj. Izolovaná kauda z nadvarlete usmrčených samců byla očištěna od tuku a cév a umístěna do kultivační misky o průměru 35 cm s minerálním olejem, který překrýval kapku tvořenou MBCD médiem. Kauda byla nastříhnutá a přenesena do 90 μ l kapky MBCD média. Následně byly spermie uvolněny z kaudy, tkáň byla odstraněna a spermie byly inkubovány při 37 °C po dobu 60 minut. Mezitím bylo připraveno GSH médium s redukováným obsahem gluathionu o finální koncentraci 0,25 mM. Vzniklý roztok byl přefiltrován a z takto připraveného roztoku byly vytvořené kapky na Petriho misce o objemu 200 μ l, do kterých byly v dalším kroku přeneseny izolované spermie i oocyty. Takto vytvořené kapky byly inkubovány při teplotě 37 °C v 5% CO₂ po dobu 20 minut. Oocyty, které měly být oplozeny spermii mutantních samců, byly izolovány ze superovulujících samic a byly přeneseny do minerálního oleje. Pomocí skalpelu byly oocyty zbaveny kumulárních buněk a přetáhnuty do fertilizační kapky. Motilní spermie z okrajů kapky MBCD média byly přeneseny do fertilizační kapky k oocytům. Fertilizační kapky se spermii a oocytem se inkubovaly ve 37 °C po dobu 3 hodin, aby mohlo dojít k oplození. Poté se oplozené oocyty přenesly do nově připravených

kapek s HTF (human tubular fluid) médiem (bez GSH), aby byly zbaveny nečistot. Přenesené oplozené oocyty byly inkubovány přes noc do druhého dne do stádia dvoubuněčného embrya.

4.1.5 Histochemie

Orgány izolované z myší byly přeneseny do kazet a fixovány přes noc ve 4 °C v Davidsonovu fixačním roztoku. Následující den byly tkáně přeneseny do 70% etanolu a dále převedeny do xylenu/parafinu pomocí automatického tkáňového procesoru. Po zalití parafinem na zalévací lince byly tkáně nařezány na rotačním mikrotomu na řezy o tloušťce 4-6 µm.

Davidsonův fixační roztok

12% Formaldehyd

15% EtOH

5% Kyselina octová

4.1.5.1 Hematoxilin-eosinové barvení

Připravené preparáty byly deparafinizovány zavodňovací řadou:

Xylen I.	8 min
Xylen II.	8 min
Isopropanol	3-5 min
100% EtOH I.	5 min
100% EtOH II.	5 min
96% EtOH	3 min
70% EtOH	3 min
dH₂O	3 min

Řezy byly barveny hematoxylinem po dobu 30 sekund, přebytečné barvivo bylo omyto dH₂O a následně byly řezy barveny eosinem po dobu 1 minuty a opět promyty pomocí dH₂O. Poté byla sklíčka dehydratována stejnou řadou v obráceném pořadí a zamontována v bezvodém montovacím médiu na xylenové bázi (DPX, MERCK).

4.1.5.2 Imunofluorescenční barvení

Preparáty pro imunofluorescenční barvení byly připraveny stejným způsobem tak, jak je uvedeno výše. Po zavodnění byly epitopy odmaskovány v citrátovém pufru (10mM citrátový pufr, pH 6) povařením v tlakovém hrnci po dobu 18 minut. Sklíčka byla zchlazena pod tekoucí vodou, promyta PBS a řezy byly poté permeabilizovány pomocí 0,2% Tritonu X-100 v PBS po dobu 10 minut. Po promytí následovalo blokování endogenních imunoglobulinů pomocí 2,5% koňského a 2,5% kozího séra v PBS po dobu 30 minut ve vlhké komůrce. Poté byly řezy přes noc inkubovány ve 4 °C roztokem primárních protilátek ředěných v blokačním séru. Následující den byly řezy omyty 0,01% Tritonem X-100 v PBS a třikrát v PBS. Řezy byly poté inkubovány roztokem sekundárních protilátek a DNA interkalačního činidla DAPI (4',6-diamidin-2-fenylindol) ředěným v blokačním séru. Skla byla inkubována v zatemněné vlhké komůrce po dobu 30 minut, třikrát promyta a zamontována montovacím médiem ProLong Gold Antifade Mountant (Invitrogen).

4.1.6 TUNEL esej

TUNEL esej (Terminal deoxynucleotidyl transferase dUTP nick end labeling) detekuje apoptotické buňky na základě zvýšené hladiny fragmentované DNA s odhalenými 3'OH konci dvouřetězcových zlomů. Za tímto účelem byl použit TACS 2 TdT-DAB *In Situ* Apoptosis Detection Kit (Trevigen). Parafinové řezy byly deparafinizovány zavodňovací řadou, inkubovány po dobu 30 minut v 50x ředěném roztoku Proteinázy K a dvakrát promyty v dH₂O. Promývání následovalo po každém kroku inkubace, ale pokaždé s jinými roztoky (dH₂O, PBS). Řezy byly po dobu 5 minut inkubovány v 3% H₂O₂ v methanolu. Následovala inkubace s tzv. Labeling pufrům po dobu 5 minut. Na vzorky byl poté aplikován tzv. Labeling reakční mix připravený z TdT Labeling pufru, směsí TdT dNTP, TdT enzymu

a Mn^{2+} kationtů a řezy byly takto inkubovány ve vlhké komůrce při 37 °C po dobu 60 minut. Reakce byla zastavena TdT Stop pufrem. Řezy byly poté inkubovány Streptavidinem konjugovaným s křenovou peroxidázou při teplotě 37 °C ve vlhké komůrce po dobu 10 minut. Pro vizualizaci barvení byl použit roztok DAB (3,3'-diaminobenzidin) obsahující DAB, zesilovač signálu a 0,03% H_2O_2 . Jádra byla kontrastně nabarvena methylzelení, po čemž následovalo omytí ve vodě. Skla byla dehydratována a zamontována pomocí montovacího média na xylenové bázi (DPX, MERCK).

4.1.7 Biotinová esej

Biotinová esej byla prováděna ve spolupráci s laboratoří imunobiologie ÚMG AV ČR. Izolovaná varlata byla skrz vstup chámovod injikována 50 μ l roztoku EZ-Link Sulfo-NHS-LC-Biotin (Pierce, Rockford, IL) o finální koncentraci 10mg/ml v PBS s 10mM $MgCl_2$. Jako kontrola bylo použito druhé varle injikované 10mM $MgCl_2$ v PBS. Varlata byla po dobu 30 minut inkubována na ledu a poté ihned fixována Davidsonovým fixačním roztokem. Tkáně byly dále procesovány podle protokolu pro přípravu parafinových řezů. Pro vizualizaci biotinu byl použit Streptavidin konjugovaný s AlexaFluor568 spolu s DAPI pro vizualizaci DNA. Takto připravené preparáty byly zamontovány médiem ProLong Gold Antifade Mountant (Invitrogen).

4.2 Použité buněčné kultury a jejich kultivace

Buněčné kultury byly kultivovány při 37 °C v inkubátoru s 5% CO_2 . Jako živné médium bylo použito kompletní DMEM (Dulbecco's Modified Eagle's Medium) (Sigma-Aldrich). Pro pasážování buněk byl použit roztok 0,25% trypsinu a 0,01% EDTA v poměru.

Kompletní DMEM

10% FBS (fetal bovine serum)

Penicilin, gentamicin, streptomycin

4.2.1 Myší embryonální fibroblasty

Embrya vzniklá křížením heterozygotních myší kmene Fbxo38 byla izolována ve E13,5 (embryonic days). Pro přípravu MEF (Mouse embryonic fibroblasts) byla embrya zbavena vnitřností obsahujícími velké množství krve (játra, srdce) a hlavičky, a propláchnuta PBS. Kousek hlavičky byl použit pro genotypování. Embrya byla umístěna na Petriho misky s roztokem 0,25% trypsinu a EDTA a pomocí nůžek nastříhána. Tkáň byla dále resuspendována pipetou a inkubována ve 37 °C po dobu 10 minut. Takto připravená disociovaná tkáň byla zbavena větších kusů a vyseta na 10cm kultivační misky s kompletním MEF médiem.

MEFs médium

10% FBS

Penicilin, gentamicin, streptomycin

2mM L-glutamin

4.2.2 Izolace proteinů a imunoblotování

Buňky pro izolaci proteinů byly seškrábány pomocí špachtle, promyty PBS a vysušeny. Peleta byla lyzována na ledu po dobu 30 minut lyzačním pufrem se směsí inhibitorů fosfatáz a proteáz (MedChem Express) a s endonukleázou Benzonázou (0,125U/μl; Santa Cruz). Lyzáty byly poté smíchány se stejným objemem 2% SDS v 50mM Tris-HCl, pH 8, zahřáty na 95 °C po dobu 5 minut a stočeny na maximální rychlost. Zdegradovaná DNA klesla na dno a vrchní vrstva obsahovala proteiny, které byly přeneseny do nových stripů. Pro izolaci proteinů z tkání byly kusy tkáně o definované hmotnosti přeneseny do zkumavek s kulatým dnem a lyzačním pufrem. Tkáně byly homogenizovány v přístroji Tissue Lyser II. (Qiagen) s pomocí kuliček o průměru 0,5 cm po dobu 2 minut s 20 kmity za sekundu. Po homogenizaci byly tkáně lyzovány stejným způsobem jako je uvedeno výše.

Lyzační pufr

150 mM NaCl

50mM Tris (pH 7,5)

1mM EDTA

0,4% Triton X-100

2mM CaCl₂2mM MgCl₂

Pro rozdělení proteinů na solubilní a chromatinovou (insolubilní) frakci, byly buňky lyzovány ve dvou krocích. Po sebrání buněk z kultivační misky byly buňky lyzovány v pufru se směsí inhibitorů fosfatáz a proteáz (tentokrát bez endonukleázy Benzonázy) na ledu po dobu 10 minut a stočeny na 3000 rpm po dobu 5 minut. Vrchní část se solubilními proteiny byla odebrána do nové zkumavky, v peletě zůstaly proteiny asociované s DNA. Tato frakce byla lyzována v pufru s endonukleázou Benzonázou na ledu po dobu 10 minut. Frakce byla poté smíchána s 2% SDS v 50mM Tris-HCl a uvařena na 95 °C po dobu 5 minut. Solubilní frakce byla ponechána na ledu.

Koncentrace proteinových lyzátů byla stanovena metodou BCA (bicinchoninic acid assay) pomocí PierceTM BCA Protein Assay Kitu (ThermoFisher Scientific) a změřena na Multiskan FCTM Microplate fotometru (ThermoFisher Scientific). Vzorky (30 µg proteinů) byly připraveny do pufru BoltTM LDS Sample Buffer (Thermo Fishr Scientific) a 10% β-merkaptoetanolem (Sigma Aldrich) a zahřáty na 95 °C po dobu 5 minut. Proteiny byly rozděleny na NuPAGETM 4-12% gradientovém Bis-Tris gelu (Invitrogen) v NuPAGE MES SDS Running pufru při 100 V. Poté byly proteiny přenášeny na PVDF (polyvinylidenfluorid) membránu (Amersham) v Bio-Rad CriterionTM Blotter aparátu s chlazeným transfer pufrům při 65 V po dobu 1 hodiny. Pro kontrolu množství nanesených proteinů byla membrána barvena ponceau S.

Transfer pufr

25mM Tris

192mM Glycin

20% methanol

dH₂O

Membrána byla blokována 5% mlékem (ChemCruz) v TBS-T (Tris-buffer saline Tween) po dobu 30 minut, omyta a přes noc inkubována s primárními protilátkami naředěnými v 3% BSA (bovine serum albumin) (PanReac AppliChem) v TBS-T při 4 °C. Poté byly membrány třikrát promyty TBS-T po dobu 10 minut a inkubovány se sekundárními protilátkami konjugovanými s HRP (horseradish peroxidase) (Cell Signaling) ředěnými 1:4000 v 5 % mléku s TBS-T. Po každém přidání protilátky byla membrána 3x promyta po dobu 10 minut v TBS-T. Inkubace probíhala po dobu 1 hodiny v pokojové teplotě, poté byly membrány opět třikrát promyty TBS-T po dobu 10 minut a jednou PBS. Signál byl vyvíjen pomocí SuperSignal™ West Femto Maximum Sensitivity Substrate (Thermo Scientific) nebo WesternBright ECL (Advansta) a detekován přístrojem ChemiDoc™ MP Imaging System (Bio-Rad).

TBS-T

20mM Tris

135mM NaCl

0,05% Tween-20

4.2.3 Použitý software, mikroskop a statistická analýza

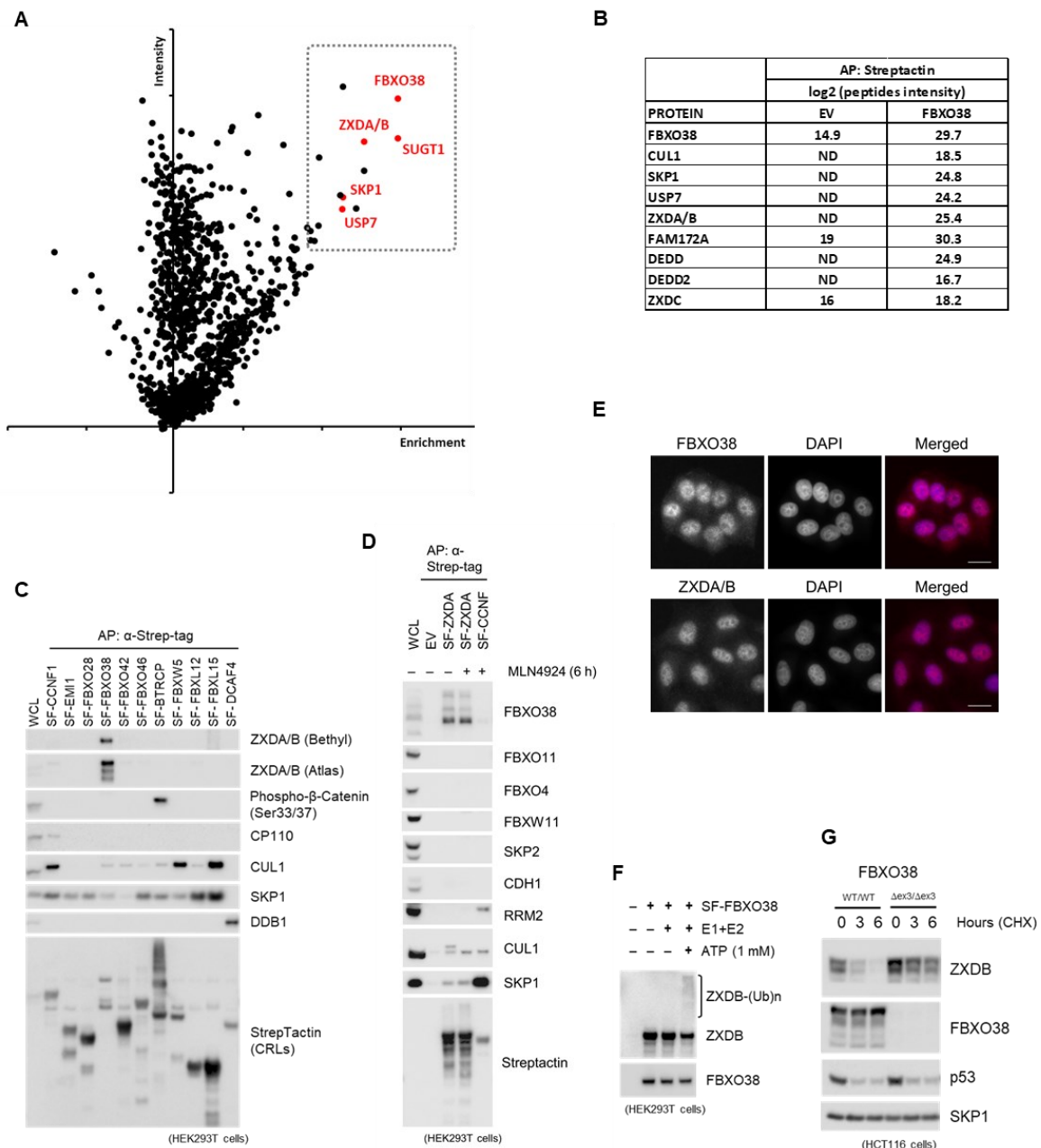
Výsledky byly statisticky vyhodnoceny nepárovým dvoustranným Studentovým t-testem, kde hodnota p menší než 0,05 byla považována za mírně signifikantní a hodnota menší než 0,001 byla považována za vysoce signifikantní. Genetická analýza byla počítána Chí testem pomocí graphpad.com stejně jako Studentův t-test. Grafy byly vytvořeny prostřednictvím programu OriginLab Professional 2021b. Mikroskopické snímky byly pořízeny na fluorescenčním mikroskopu Zeiss Axio Imager.Z2, který byl vybaven softwarem ZEN. Na tomto softwaru se i veškeré snímky analyzovaly a upravovaly. Ilustrace uvedené v této diplomové práci byly vytvořené v BioRender.com a PowerPointu.

4.2.4 Protilátky použité při IF (immunofluorencence) a WB (western blotting)

	Protilátky	Ředění (IF/WB)	Původ	Použití
Primární protilátky	FBXO38 (Atlas Antibodies)	1:100/1:2000	Králík	IF/WB
	ZXDB (Atlas Antibodies)	1:100/1:2000	Králík	IF/WB
	WT1 (Novus Biologicals)	1:200/1:2000	Myš	IF/WB
	Vimentin (Cell Signaling)	1:200	Králík	IF
	SCP-3 (Santa Cruz)	1: 200/1:2000	Myš	IF/WB
	PLZF (Atlas Antibodies)	1:200/1:2000	Králík	IF/WB
	SALL4 (Santa Cruz)	1:200/1:2000	Myš	IF/WB
	PITX2 (Santa Cruz)	1:200	Myš	IF
	STRA8 (Abcam)	1:1000	Králík	IF
	SKP1 (Cell Signaling)	– /1:2000	Králík	WB
	Claudin-11	1:200	Myš	IF
Sekundární protilátky	Donkey Anti-rabbit IgG konjugovaný s Alexa Fluor 555 (Abcam)	1:1000		IF
	Donkey Anti-mouse IgG konjugovaný s Alexa Fluor 555 (Abcam)	1:1000		IF
	Goat Anti-mouse IgG konjugovaný s Alexa Fluor 647 (Abcam)	1:1000		IF
	Donkey Anti-rabbit IgG konjugovaný s Alexa Fluor 647 (Abcam)	1:1000		IF
	Donkey Anti-rabbit IgG konjugovaný s Alexa Fluor 488 (Abcam)	1:1000		IF
	Goat Anti-mouse IgG konjugovaný s DyLight™488 (Invitrogen)	1:1000		IF
	Anti-mouse IgG konjugovaný s HRP (Cell Signaling Technology)	1:3000		WB
	Anti-rabbit IgG konjugovaný s HRP (Cell Signaling Technology)	1:3000		WB

5. Předběžná data a metody využité k jejich dosažení

Předkládaná diplomová práce je součástí projektu, který je zaměřený na studium fyziologické funkce ubikvitin ligázy SCF^{FBXO38} a jejího substrátu proteinu ZXDA/B (zinc finger, X-linked, duplicated family member A/B). Tato funkční interakce byla studována jak *in vitro*, tak *in vivo* modelech. Projekt byl inicializován identifikací potenciálních substrátů proteinu FBXO38. Stabilní HeLa buněčná linie produkující doxycyklinem indukovatelný protein FBXO38 označený TwinStrep-FLAG peptidem (tagem) byla inkubována po dobu 6 hodin inhibitorem MLN4924. Ten blokuje aktivaci proteinu NAE1 zodpovědného za neddylaci a aktivaci cullinové podjednotky SCF komplexu (Obr. 6). Protein FBXO38 byl následně izolovaný z buněčného lyzátu pomocí afinitní purifikace na Strep-Tactinových kuličkách. Identita proteinů eluovaných pomocí desthiobiotinu byla zjištěna prostřednictvím kapalinové chromatografie s hmotnostní spektrometrií (Liquid Chromatography with Tandem Mass-Spectrometry, LC-MS/MS; Obr. 13A,B). Kromě známých interakčních partnerů FBXO38 (USP7) byly identifikovány proteiny DEDD1/2 a proteiny ZXDA/B obsahující deset zinkových prstů typu C2H2. Specifická interakce mezi FBXO38 a ZXDA/B byla potvrzena pomocí afinitní purifikace jedenácti substrátových receptorů (CRL1, CRL4). Endogenní proteiny ZXDA/B interagovaly pouze s FBXO38 (Obr. 13C). V komplementární eseji interagoval afinitně purifikovaný protein ZXDA pouze s endogenním FBXO38 (Obr. 13D). Oba tyto proteiny (FBXO38 a ZXDA/B) jsou jaderné (Obr. 13E) a pomocí ubikvitinační eseje byla potvrzena funkce FBXO38 jako ubikvitin ligázy zodpovědné za ubikvitinaci ZXDA/B (Obr. 13F). Tato ubikvitinace vedla k proteinové degradaci a destabilizaci proteinů ZXDA/B. Stabilita proteinů ZXDA/B byla studována pomocí inhibitoru translace cykloheximidu. V porovnání s parentální linií měla buněčná linie s absencí FBXO38 signifikantně zvýšenou stabilitu endogenních proteinů ZXDA/B (Obr. 13G). Logickým pokračováním těchto předběžných výsledků bylo ověřit tuto biochemickou dráhu v myším modelu s absencí exprese FBXO38.



Obrázek 13: ZXDA/B je nový substrát ubikvitin ligázy SCF^{FBXO38}

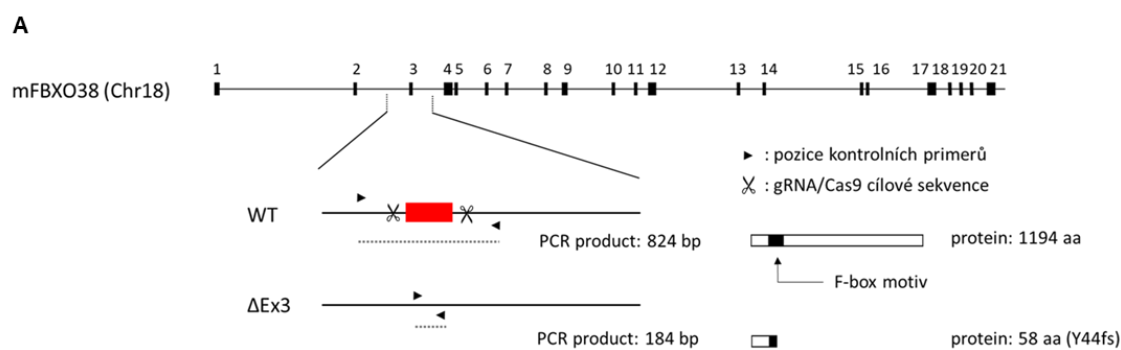
(A,B) Proteiny interagující s FBXO38 izolované z HeLa buněk s inducibilní expresí TwinStrep-FLAG značeného proteinu FBXO38. Kopurifikované proteiny byly identifikovány prostřednictvím LC-MS/MS. Proteiny jsou vyznačeny v grafu a v souhrnné tabulce. (C) Expresa a purifikace Strep-FLAG značených receptorů ubikvitin ligáz a detekce jejich endogenních interakčních partnerů. Jako pozitivní kontroly byly použity konstitutivní podjednotky těchto ligáz – CUL1, DDB1 a SKP1. (D) Expresa a purifikace proteinu ZXDA označeného pomocí Strep-FLAG. Jako negativní kontrola byl využit CCNF. (E) Imunofluorescenční barvení proteinů FBXO38 a ZXDA/B v HeLa buňkách. (F) Afinitně purifikovaný protein FBXO38 byl podroben *in vitro* ubikvitinaci při postupném přidávání enzymů E1, E2 a ATP. Kopurifikovaný endogenní protein ZXDA/B a jeho ubikvitinované formy byly vizualizované pomocí protilátky pro ZXDA/B. (G) Stabilita proteinu ZXDA/B byla testována prostřednictvím inkubace HCT116 buněk s inhibitorem translace cykloheximidem,

6. Výsledky

6.1 Příprava myšního kmene deficientního na *Fbxo38*

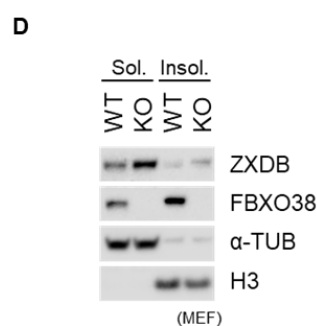
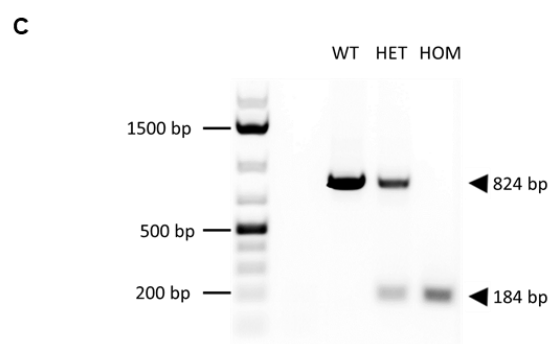
Gen *Fbxo38* byl inaktivován v myším modelu ve spolupráci s transgenním servisním modulem ÚMG AV ČR. Zygoty myšního kmene C57BL/6N byly injikovány směsí rekombinantního Cas9 proteinu a dvou gRNA (guide RNA) cílících na sekvence lokalizované v 5' a 3' oblastech sousedících s třetím exonem (Obr. 14A). Předpokládaná delece třetího exonu vedla k posunu čtecího rámce a vzniklý proteinový produkt byl podle *in silico* predikcí signifikantně kratší. Z celkového počtu narozených zvířat (6) byla u pěti detekována pomocí PCR metody delece v příslušném exonu (Obr. 14C). Sekvence PCR produktů vedla k identifikaci samce ("founder"), který byl použit k dalšímu křížení. Po dvojím prokřížení na pozadí stejného kmene (C57BL/6N) byla zvířata namnožena na experimentální kohortu. Delece exonu a tím daná inaktivace genu *Fbxo38* nebyla esenciální během embryonálního vývoje a myši deficientní na *Fbxo38* se rodily, i když s menší frekvencí. Po namnožení dostatečného počtu experimentálních zvířat jsme spočítali signifikanci tohoto úbytku a odchylku od očekávaného poměru 1:2:1 (WT: HET: HOM) (Obr. 14B). Pro zjednodušení je dále uváděn akronym WT (wild type) pro parentální kmen a KO (knock-out) pro zvířata s delecí *Fbxo38* na obou alelách. Delece třetího exonu byla potvrzena PCR genotypováním a ztráta exprese proteinu FBXO38 byla ověřena u myších embryonálních fibroblastů imortalizovaných SV40T antigenem (Obr. 14D).

V prvním stádiu našeho projektu jsme připravili myší kohortu deficientní na gen *Fbxo38*. Analýza frekvencí jednotlivých genotypů vedla k závěru, že absence proteinu FBXO38 má vliv na fitness těchto zvířat a vede pravděpodobně k vyšší prenatalní letalitě.



B

Genotyp	Celkem		Samci		Samičky	
	Očekávané	Pozorované	Očekávané	Pozorované	Očekávané	Pozorované
<i>Fbxo38</i> ^{+/+}	173 (25%)	202 (29,1%)	85 (25%)	101 (29,6%)	88 (25%)	101 (28,7%)
<i>Fbxo38</i> ^{+/-}	347 (50%)	370 (53,4%)	171 (50%)	172 (50,4%)	176 (50%)	198 (56,3%)
<i>Fbxo38</i> ^{-/-}	173 (25%)	121 (17,5%)	85 (25%)	68 (19,9%)	88 (25%)	53 (15,1%)
<i>p</i> -hodnota		0,0001		0,0405		0,0001
χ^2		22,123		6,413		18,591

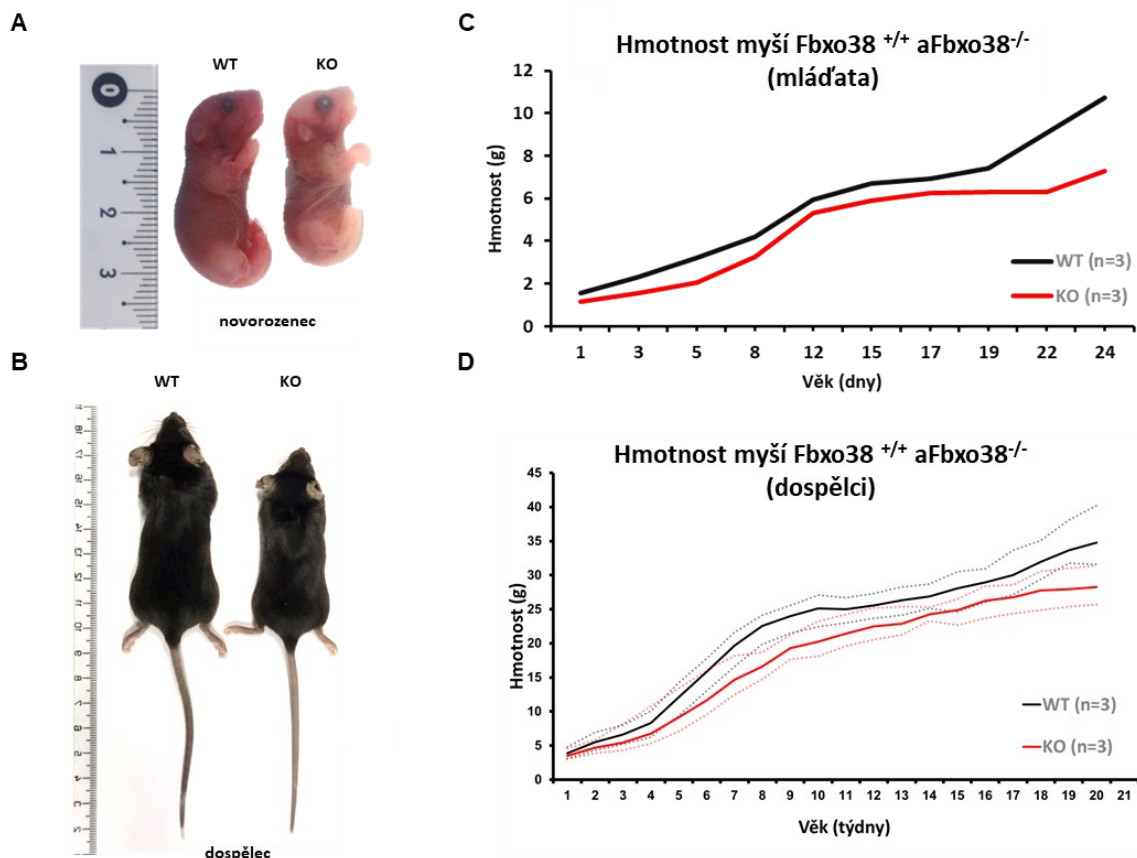


Obrázek 14: Příprava myšičího kmene deficientního na *Fbxo38*

(A) Schéma ukazující lokus *Fbxo38*, pozice gRNA, primerů a *in silico* analýzu translačního produktu. (B) V tabulce je uveden počet narozených mláďat podle genotypu a genderu. Ve spodní části jsou uvedené statistické analýzy rozdílu mezi očekávaným a pozorovaným genotypovým štěpným poměrem. (C) Příklad PCR analýzy myšičí genomové DNA izolované z ocásku. (D) Vliv delece třetího exonu genu *Fbxo38* na proteinovou expresi v immortalizovaných embryonálních fibroblastech (E13.5). V levé části imunoblotu je solubilní frakce (Sol.) lyzáty z WT a KO buněk. V pravé části jsou lyzáty získané extrakcí nerozpustné pelety (Insol.) pomocí Benzozávy, SDS a teplotní denaturace. Jako kontrolu pro srovnání celkového množství proteinu byly použity protilátky α -tubulinu (pro solubilní frakci) a proti histonu H3 (pro insolubilní frakci).

6.2 Absence FBXO38 vede k poruchám růstu

Delece *Fbxo38* vede k výrazné inhibici růstu a snížené hmotnosti zvířat (Obr. 15B,D). Odlišná hmotnost je pozorovatelná od narození (Obr. 15A,C). U dospělců je kromě délky těla a hmotnosti signifikantní nepoměr ve velikosti některých orgánů a tukové složky asociované s peritoneem.

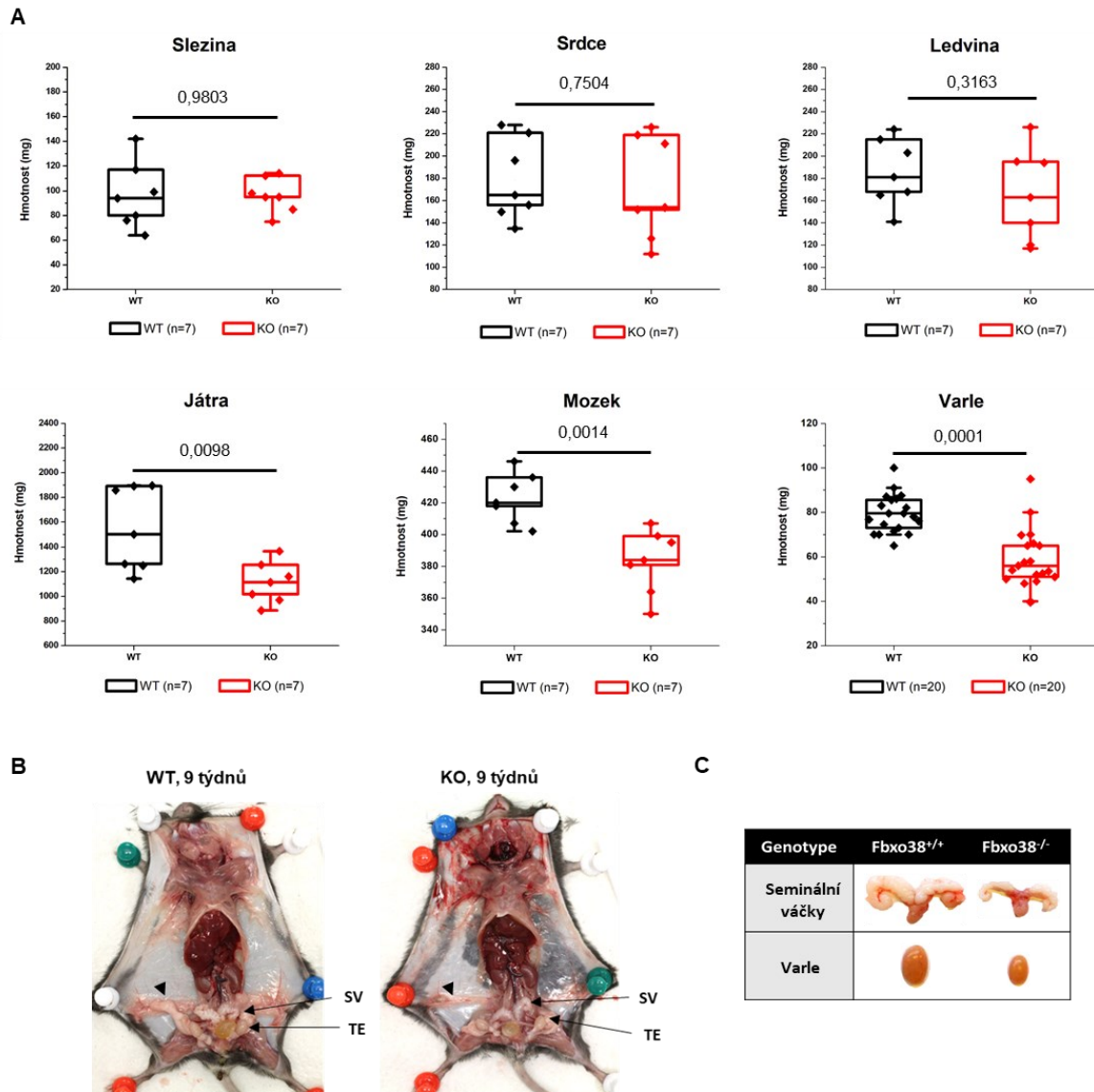


Obrázek 15: Absence FBXO38 vede k poruchám růstu

(A,B) Delece genu *Fbxo38* vede u myší ke zpomalení růstu, které je pozorovatelné již od prvního postnatálního dne. (C) Graf zachycuje každodenní měření nově narozených mláďat (samců) v průběhu prvních 24 dní. (D) Graf hmotnosti samců měřený v průběhu dospívání.

Z experimentální kohorty samců byly izolovány a zváženy jednotlivé orgány pro přesnou analýzu vlivu delece *Fbxo38* na jejich růst. Hmotnostní rozdíly u sleziny, srdce a ledvin nebyly významné. Signifikantní posun jsme pozorovali u hmotnosti mozku, jater a u reprodukčních orgánů samců, hlavně varlat (Obr. 16A-C).

V této části projektu jsme se zaměřili na celkový fenotyp mutantních myší. Pozorovali jsme u nich menší tělesnou hmotnost, kratší stavbu těla a zejména signifikantní rozdíly ve velikosti některých orgánů v porovnání s WT myšmi.



Obrázek 16: Absence FBXO38 vede k poruchám růstu orgánů

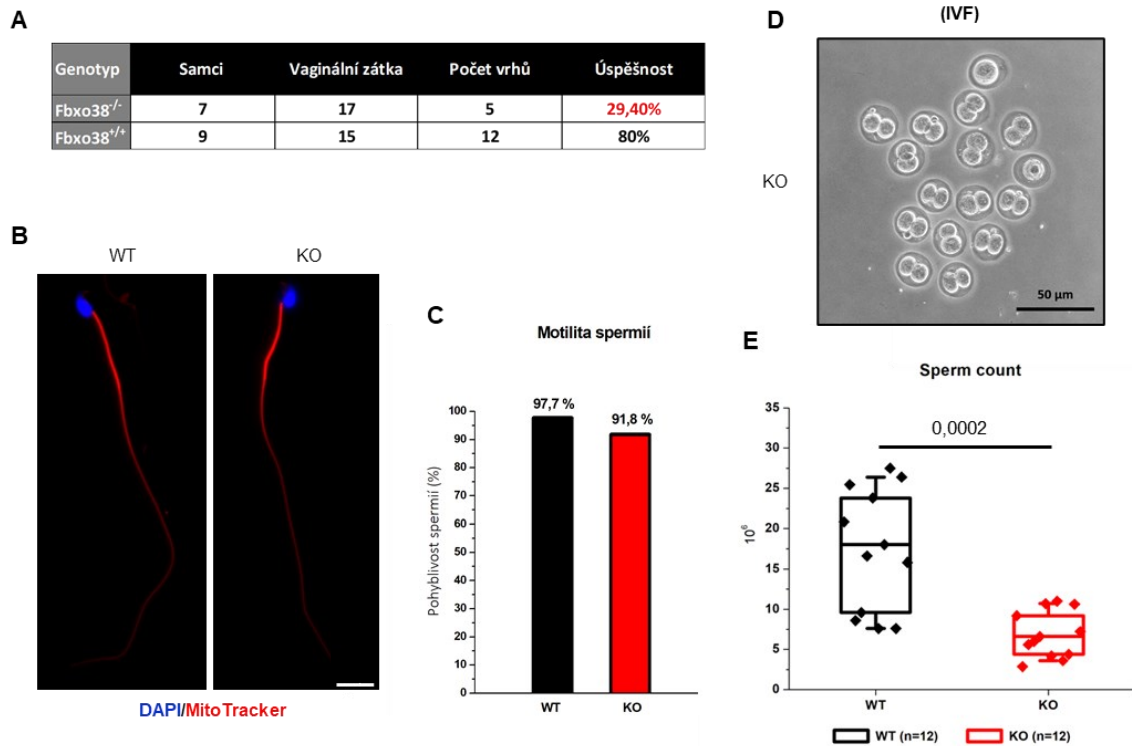
Detailní analýza hmotnosti jednotlivých orgánů u WT a KO myší. (A) Analýza hmotnosti orgánů u dospělých samců (~20 týdnů). (B) Peritoneální dutina a asociovaný tuk (šipka v levé části). Varlata (TE) a seminální váčky (SV) jsou označeny pomocí šipek z pravé strany. (C) Reprezentativní znázornění seminálních váček a varlat.

6.3 FBXO38 se podílí na produkci maturovaných spermií

Samci myši s inaktivním genem *Fbxo38* jsou semisterilní. Pouze 30 % samic, u kterých se po páření s KO samic vytvořila tzv. vaginální, nebo také kopulační zátka, zabřezlo. Po páření s WT samci se tato úspěšnost pohybovala kolem 80 % (Obr. 17A).

Analýza struktury spermií pocházejících z mutantních zvířat neprokázala žádné významné morfologické abnormality pozorované u některých myších kmenů s poruchou samčí fertility (např. dvojitá hlavička či zdvojený bičík) (Khan a spol. 2015; Obr. 17B). Spermie mutantních samců měly normální progresivní pohyb a jejich motilita byla ovlivněna pouze minimálně (Obr. 17C). Následně jsme izolovali mutantní spermie a testovali jejich schopnost oplodnit oocyty pomocí IVF (in vitro fertilization; ve spolupráci s transgenní jednotkou). Nepozorovali jsme žádné významné odchylky od WT spermií a u vyvíjejících se embryí docházelo po 24 hodinách ke standardnímu časnému rýhování (Obr. 17D). Dalším krokem byla analýza celkové produkce spermií. Spermie izolované z nadvarlat dvanácti samců (WT a KO) byly kvantifikovány a jejich počty porovnány. U mutantních samců byl pozorován významný pokles celkového počtu spermií (Obr. 17E).

Detailní analýzou spermií samců deficientních na *Fbxo38* jsme dospěli k závěru, že protein FBXO38 není důležitý pro morfologii či funkční schopnosti spermií, ale kontroluje jejich celkovou produkci a účastní se tudíž brzkých diferenciačních stádií spermatogeneze.

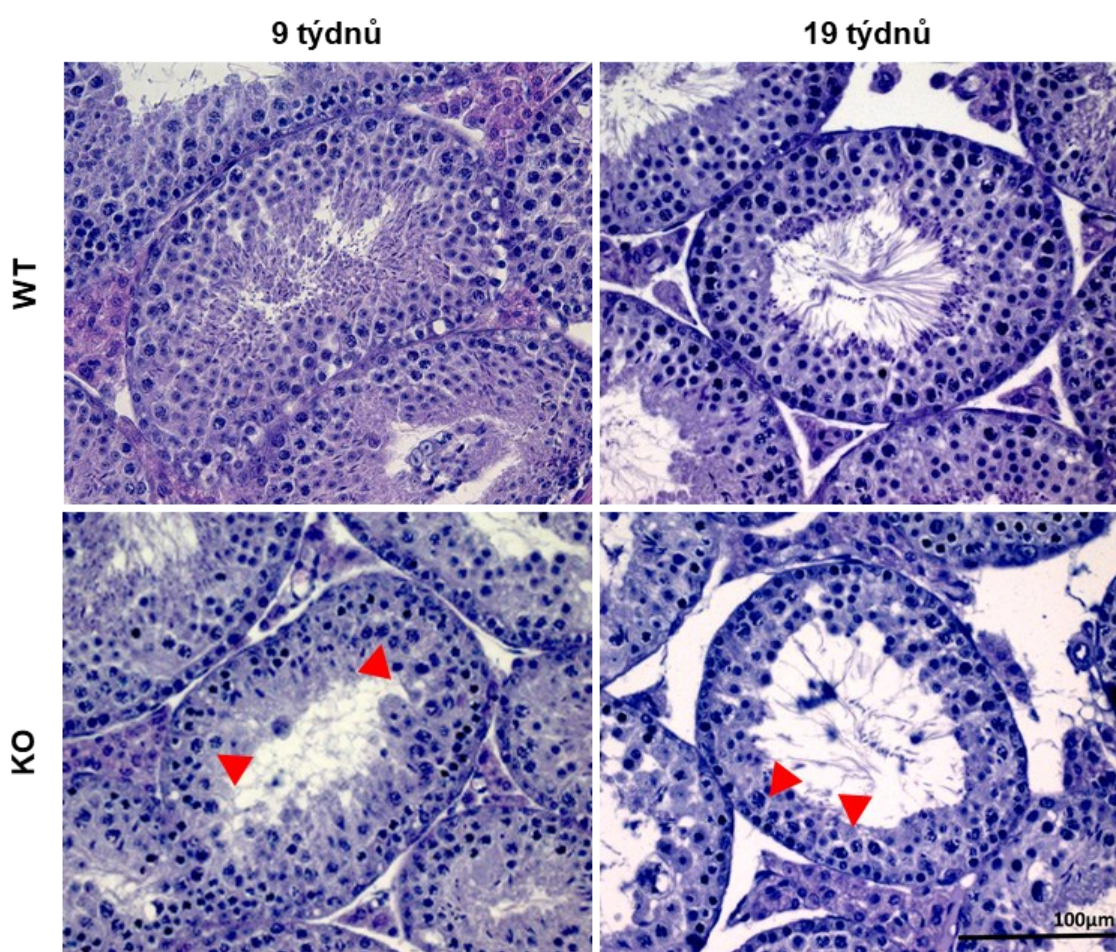


Obrázek 17: FBXO38 se podílí na produkci maturovaných spermií

(A) Tabulka úspěšnosti křížení mutovaných samců s WT samicemi. (B) Reprezentativní znázornění WT a KO spermií vizualizované pomocí MitoTrackeru (fluorescenční barvivo značící aktivní mitochondrie) a interkalačního agens DAPI (vizualizace DNA). Měřítko = 10μm. (C) Porovnání motility mutovaných a WT spermií. (D) Oocyty oplodněné KO spermiemi (24 hodin po oplodnění). (E) Porovnání počtu spermií izolovaných z nadvarlat.

6.4 Absence *Fbxo38* u myši způsobuje strukturální poruchy semenotvorného tubulu

Pro detailní analýzu jednotlivých fází spermatogeneze jsme využili histochemická barvení tenkých řezů myších varlat. Struktura semenotvorných tubulů byla nejprve vizualizována pomocí hematoxylin-eosinového barvení. Na řezech mutantních myši jsme pozorovali strukturální abnormality v těchto tubulech. Mutované myši měly nižší počet diferenciovaných spermatických buněk účastnících se spermatogeneze (Obr. 18).

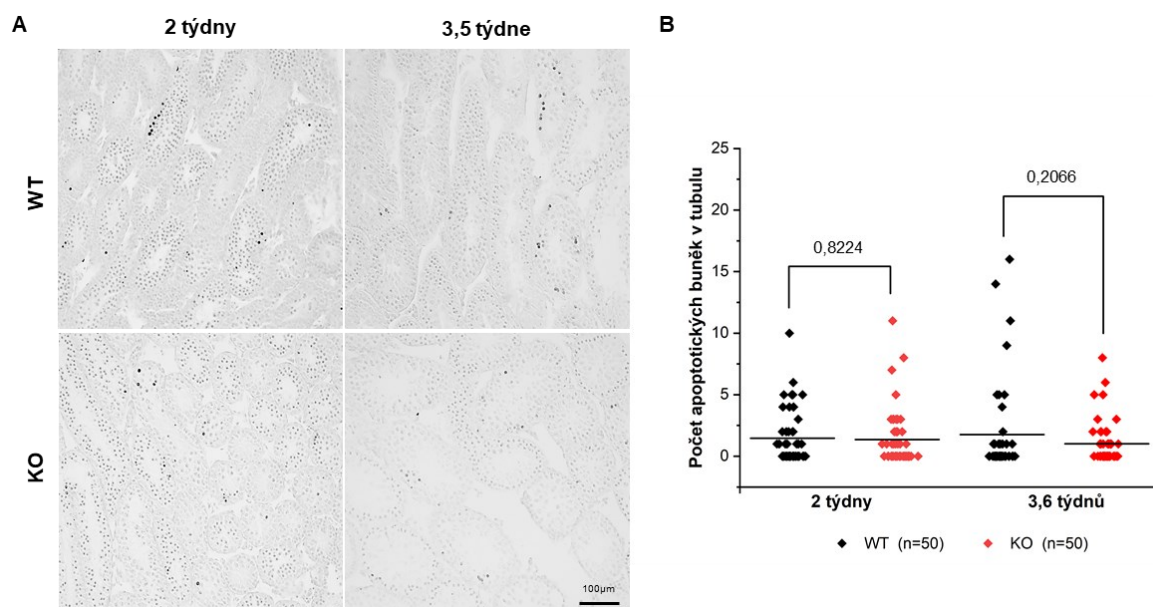


Obrázek.18: Absence *Fbxo38* u myši způsobuje strukturální poruchy semenotvorného tubulu

Hematoxylin-eosinové barvení semenotvorných kanálků. V levé části jsou tubuly mladých samců (9 týdnů) a v pravé části tubuly dospělých samců (19 týdnů). Nižší celularita a patologické struktury jsou označeny červenými šipkami.

Tento pokles nebyl způsoben vyšší apoptotickou aktivitou. Mrtvé a odumírající buňky byly identifikovány pomocí TUNEL eseje, která slouží k vizualizaci fragmentované DNA v apoptotických buňkách. Zvýšená apoptóza nebyla pozorována ani u jiných stádií a somatických buněk lokalizovaných v semenotvorných tubulech (Obr. 19A,B).

V tomto kroku jsme identifikovali strukturální abnormality a hypocelularitu v semenotvorných kanálcích. Za nižší počet buněk v tubulech nebyla zodpovědná vyšší hladina apoptózy.



Obrázek 19: Apoptická aktivita v semenotvorných kanálech

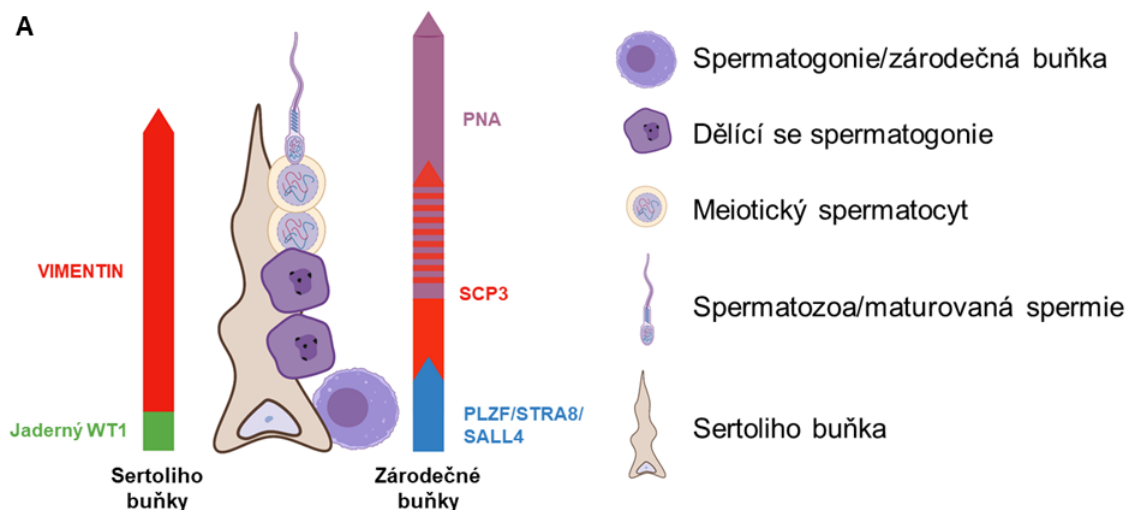
(A) Detekce fragmentované DNA ve varlatech WT a KO samců pomocí TUNEL eseje. Apoptotické buňky jsou vizualizovány pomocí DAB hnědě, jádra jsou označena methylzelení. (B) Průměrný počet apoptotických buněk na jeden semenotvorný tubul.

6.5 Protein FBXO38 je funkčně exprimován v Sertoliho buňkách

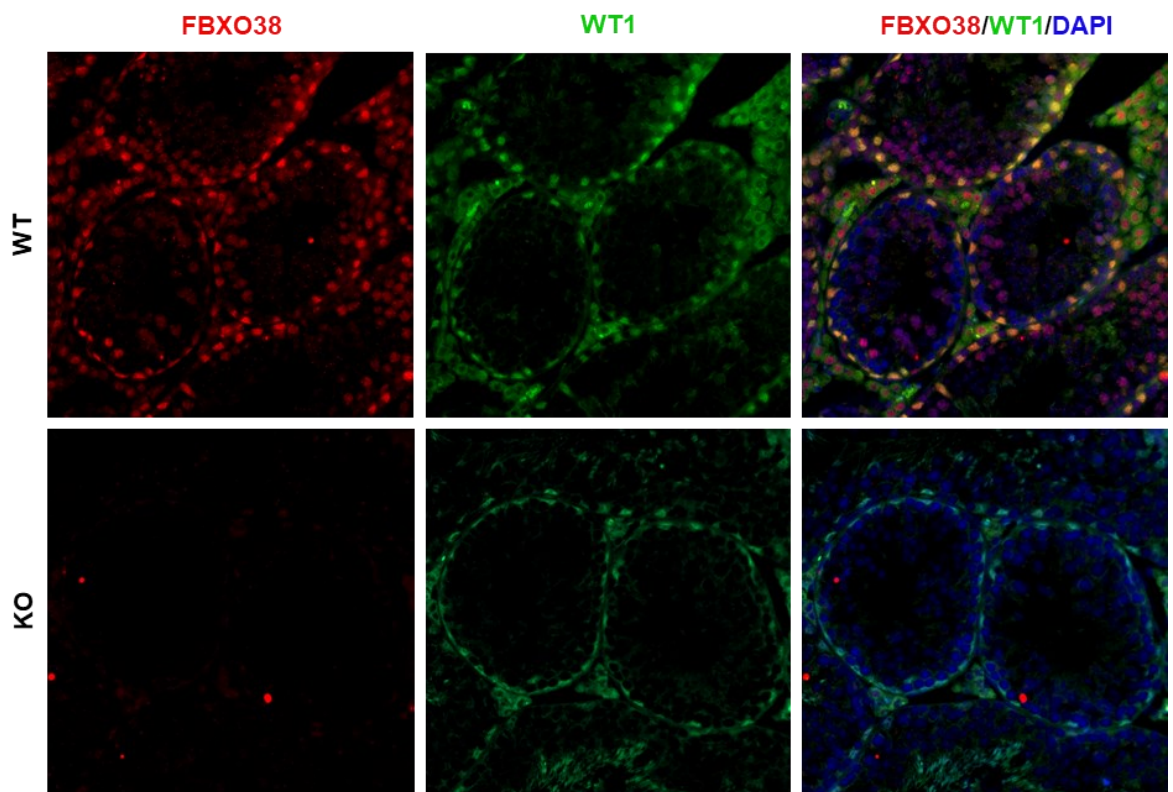
V další fázi jsme se zaměřili na identifikaci buněčné populace ve varlatech exprimující protein FBXO38. Jednotlivé buněčné typy byly označeny pomocí specifických markerů. Kromě FBXO38 jsme zjišťovali, zda je ve varlatech exprimovaný i substrát ubikvitin ligázy SCF^{FBXO38} ZXDB a zda je jeho exprese zvýšená u KO samců v souvislosti s deficiencí genu *Fbxo38*.

Zjistili jsme, že oba tyto proteiny (FBXO38 a ZXDB) jsou dominantně exprimovány v Sertoliho buňkách. Jako pozitivní kontrolu jsme použili protilátku proti WT1 (Wilms tumor 1), což je tumor supresorový transkripční faktor lokalizovaný v jádrech Sertoliho buněk (Obr. 20B,C). ZXDB byl zřetelně stabilizovaný v Sertoliho buňkách deficientních na protein FBXO38 (Obr. 20C). Kromě Sertoliho buněk jsme testovali i další populace buněk účastnících se spermatogeneze. Pro vizualizaci meiotických spermatocytů jsme využili barvení pomocí protilátky proti SCP3 (Obr. 20D). Maturované spermatidy a spermie jsme detekovali s využitím rekombinantního PNA (peanut aglutinin) lektinu, vázajícího specifické sacharidy lokalizované v akrosomální oblasti těchto buněk (Obr. 20E). Žádná z uvedených populací neexprimovala FBXO38 ani ZXDB. Kromě výše zmíněných markerů jsme využili i protilátky proti proteinům, které jsou exprimované v různých fázích spermatogonií jako jsou PLZF, SALL4 nebo STRA8. Ani tyto proteiny nekolokalizovaly s FBXO38 či ZXDB (data nejsou součástí výsledků).

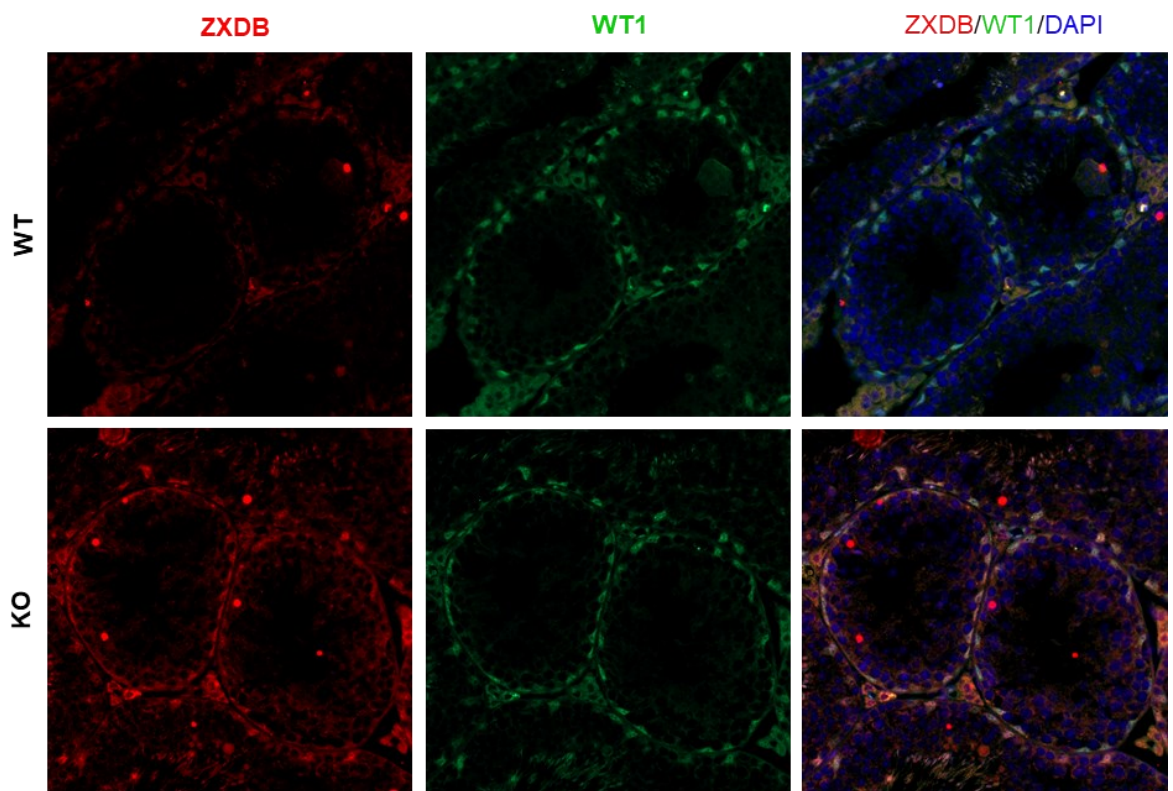
Zjistili jsme lokalizaci proteinů FBXO38 a ZXDB v jádrech Sertoliho buněk a zároveň jsme v nich, v závislosti na expresi FBXO38, potvrdili stabilizaci ZXDB proteinu.



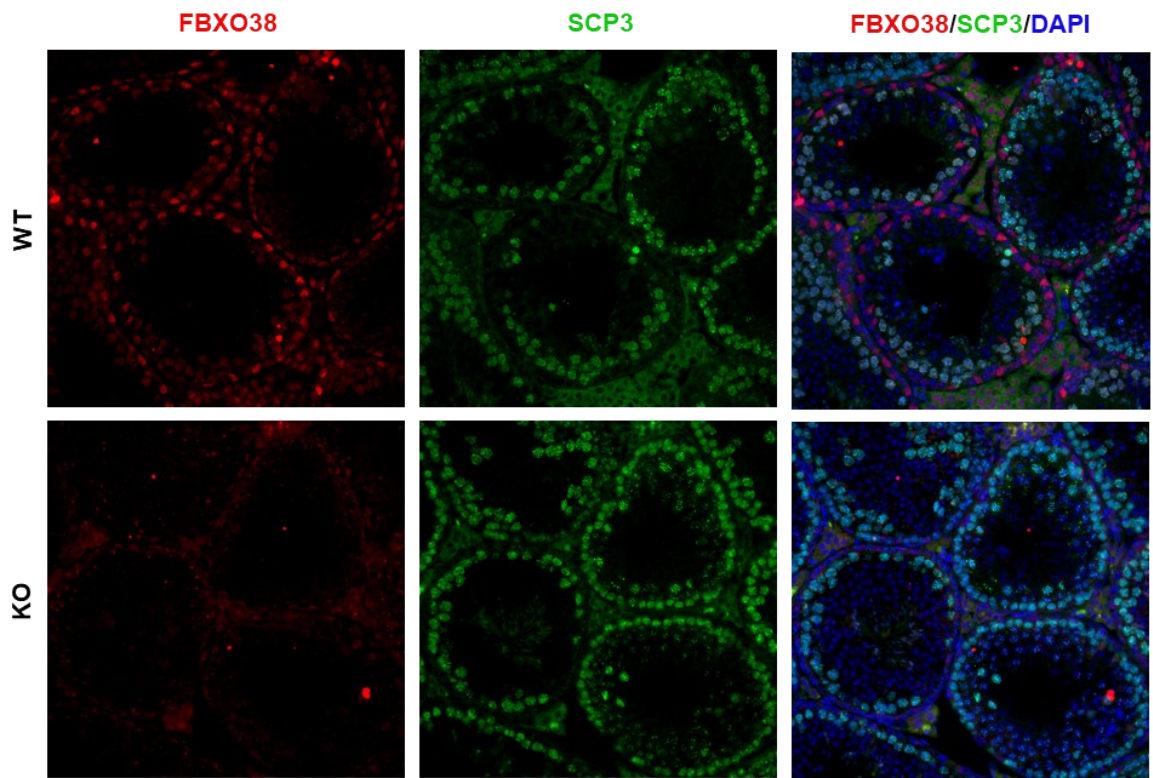
B



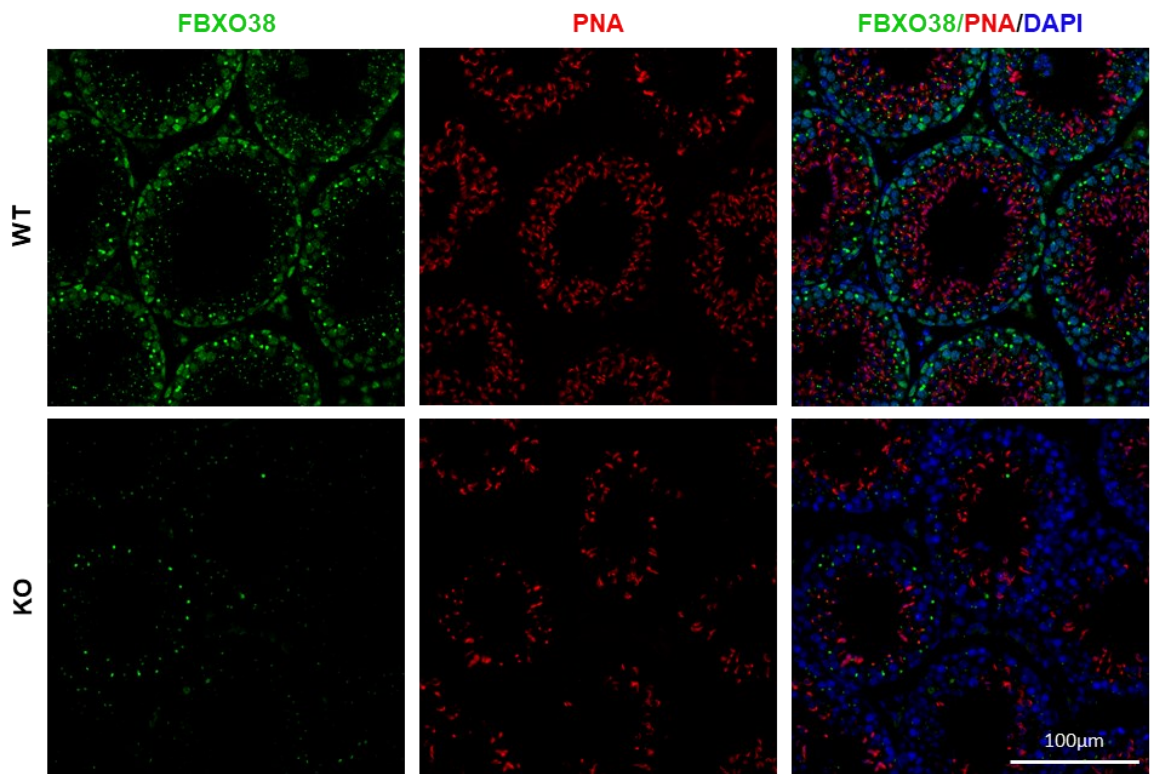
C



D



E



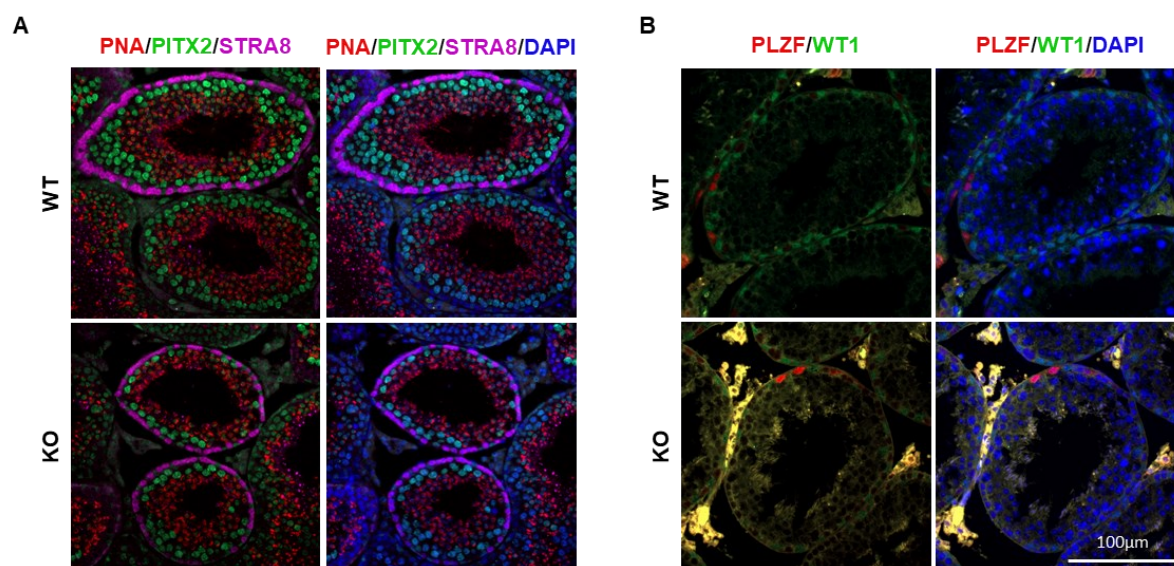
Obrázek 20: Lokalizace FBXO38 a ZXDB v semenotvorných kanálcích

(A) Schéma znázorňující použité protilátky proti různým typům buněk účastnící se spermatogeneze. *Vytvořeno v BioRender.com.* (B) Imunofluorescenční barvení proteinu FBXO38 s markerem jader Sertoliho buněk WT1 u mladých myší (10 týdnů). (C) Imunofluorescenční barvení proteinu ZXDB s WT1 u mladých myší (10 týdnů). (D) Imunofluorescenční barvení proteinu FBXO38 s markerem profáze I. spermatocytů SCP3 u mladých myší (10 týdnů). (E) Imunofluorescenční barvení proteinu FBXO38 s markerem maturovaných spermií (PNA lektin) u dospělých myší (18 týdnů).

6.6 Absence FBXO38 způsobuje poruchy spermatogeneze

Výsledky z hematoxolin-eosinového barvení naznačovaly, že složení semenotvorného tubulu u mutantních myší se liší z hlediska zastoupení jednotlivých fází spermatogeneze. Rozhodli jsme se proto vizualizovat jednotlivá stádia spermií a porovnávat jejich počet u WT a KO myší. Prostřednictvím PNA konjugované protilátky jsme potvrdili nižší počet maturovaných spermií u myší deficientních na *Fbxo38* (Obr. 21A). S nižším počtem spermií souvisí i nižší počet meiotických buněk v tubulech, které jsme detekovali markerem PITX2 (Obr. 21A). Protein STRA8 je důležitým transkripčním faktorem nezbytným pro meiotickou iniciaci spermatocytů a spermatogoniální diferenciaci. Jeho exprese v KO tubulech byla nižší než u myší divokého typu (Obr. 21A). Následně jsme detekovali spermatogoniální kmenové buňky markerem PLZF, který je zodpovědný za udržení zárodečných buněk v nediferenciovaném stavu. Značené buňky nevykazovaly žádné abnormality a jejich počet byl shodný s WT kmenem (obr. 21B). Exprese transkripčního faktoru WT1, markeru Sertoliho buněk, byla nižší u varlat mutovaných myší. Počet Sertoliho buněk se ale neměnil (obr. 21B).

Deficience proteinu FBXO38 vedla ke snížení počtu meiotických spermatocytů a maturovaných spermií.



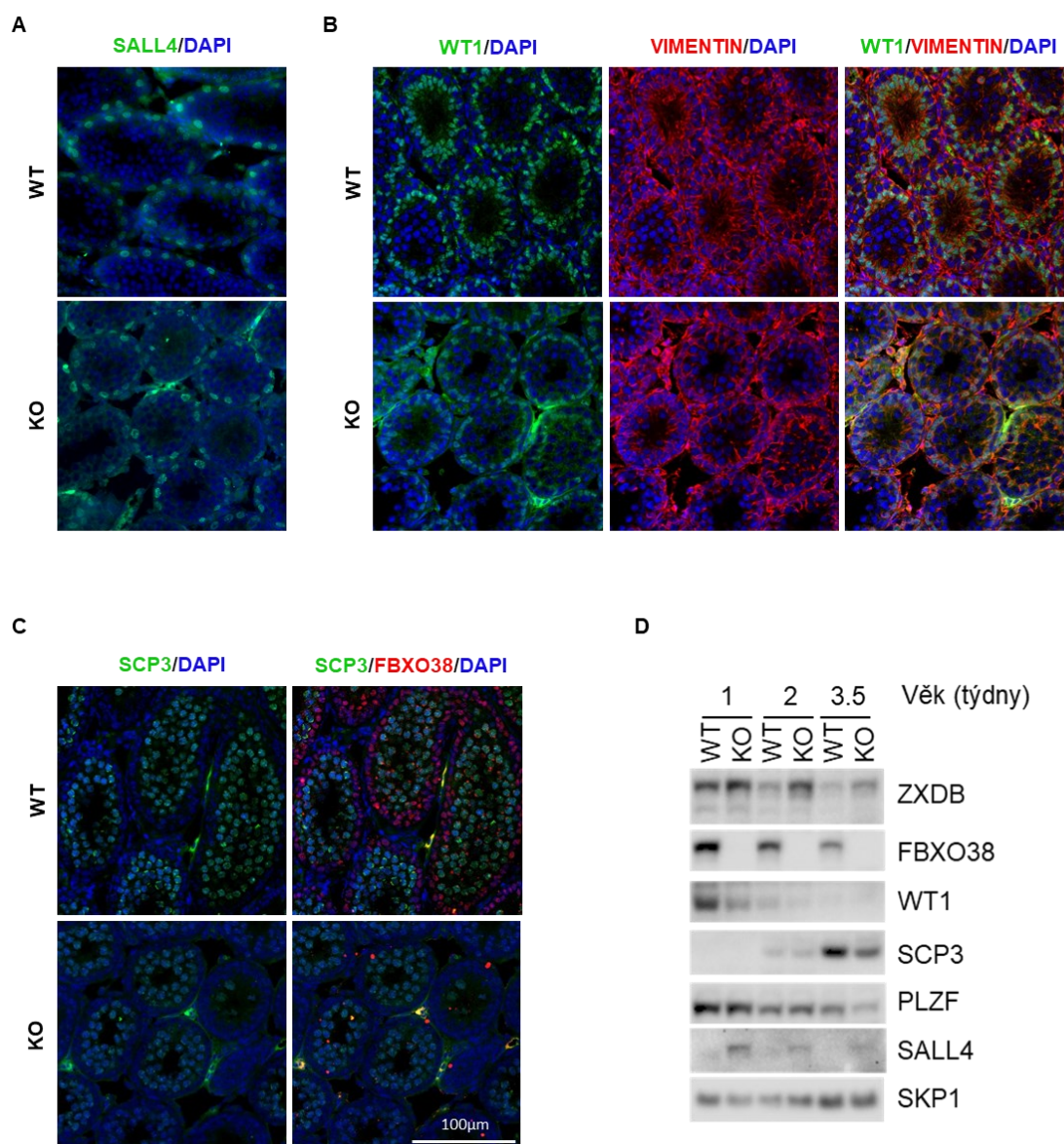
Obrázek 21: Absence FBXO38 způsobuje poruchy spermatogeneze

- (A) Tkáňové řezy varlat dospělých samců (18 týdnů) barvené protilátkami PITX2, STRA8 a PNA lektinem.
 (B) Tkáňové řezy varlat mladých samců (10 týdnů) barvené PLZF a WT1 protilátkami.

6.7 Dynamika první vlny spermatogeneze je u *Fbxo38*^{-/-} samců zpožděna

Snížený počet spermií mladších KO samců (7-8 týdnů) naznačoval, že absence proteinu FBXO38 vede ke změnám v první vlně spermatogeneze. Abychom ověřili tuto hypotézu, analyzovali jsme strukturu a složení semenotvorných tubulů samců ve věku jednoho až čtyř týdnů. Nejdříve jsme srovnali histologii varlat WT a KO myši starých 14 dní. Tento věk se shoduje se začátkem první vlny spermatogeneze a s výskytem prvních spermatocytů. Zatímco u WT myši byla přítomnost spermatocytů barvených SCP3 meiotickým markerem uniformní, KO samci vykazovali rozdílnou pozitivitu a obecně slabší SCP3 signál (Obr. 22C). Na úrovni spermatogonií jsme detekovali vyšší hladinu exprese proteinu SALL4 (Obr. 22A) a naopak nižší hladinu signálu proteinu WT1 u KO myši (Obr. 22B). Tato pozorování jsme potvrdili i analýzou proteinové exprese pomocí imunoblotu. V proteinových lyzátech samců starých 25 dnů jsme kromě absence FBXO38 a stabilizovaného ZXDB pozorovali signifikantní pokles SCP3 a WT1 a zvýšenou hladinu proteinu SALL4 naznačující rozdílnou transkripční aktivitu genů zodpovědných za udržení a diferenciaci germinálních kmenových buněk.

V souhrnu jsem pozorovali, že během první vlny spermatogeneze, která začíná již kolem 10. dne po narození, vykazovala varlata mutovaných myší rozdílnou expresi jednotlivých markerů spermatogeneze.



Obrázek 22: Dynamika první vlny spermatogeneze je u *Fbxo38*^{-/-} samců zpožděna

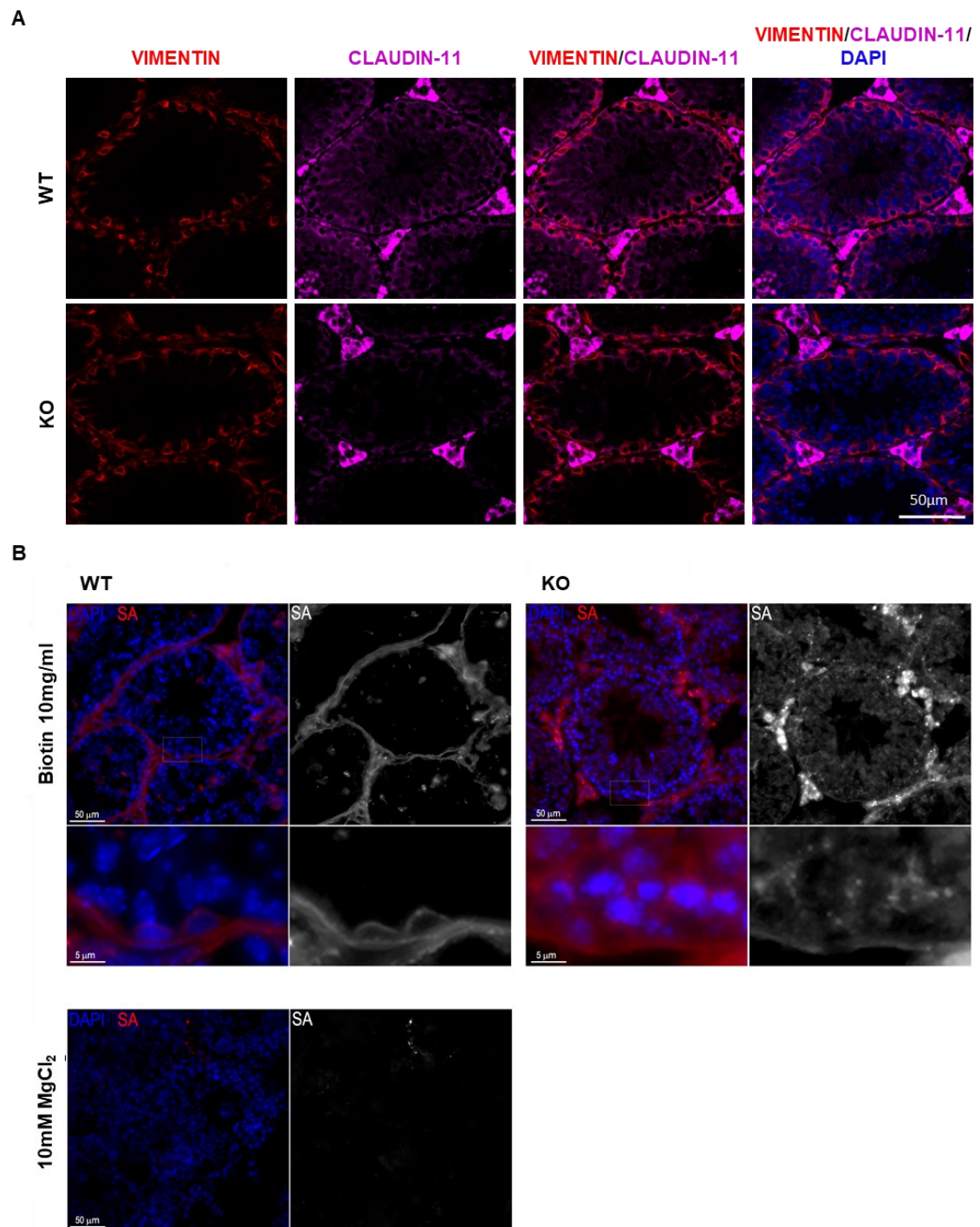
(A) Tkáňové řezy varlat (14 dpp) barvené SALL4 protilátkou. (B) Detekce Sertolihových buněk na tkáňových řezech varlat (14 dpp) pomocí WT1 a vimentinové protilátky. (C) Expres detekčního markeru spermatocytů SCP3 na tkáňových řezech varlat (14 dpp). (D) Imunoblot z lyzátu varlat pohlavně nezralých myší v různém věku. Jako kontrolu pro srovnání celkového množství proteinu byla použita protilátka proti SKP1.

6.8 SCF^{FBXO38} je nezbytná pro integritu hematotestikulární bariéry

BTB je nedílnou součástí při tvorbě specifického prostředí semenotvorného kanálku. Proto jsme se, po zjištění lokalizace proteinu FBXO38 v Sertoliho buňkách a abnormálního průběhu spermatogeneze, zaměřili právě na BTB, která je tvořena převážně těsnými spoji. Detekovali jsme podjednotku těchto spojů claudin-11 prostřednictvím IF a u KO myši jsme pozorovali její významné snížení na úrovni proteinové exprese (Obr. 23A).

Integrita BTB byla také testována pomocí injekce biotinového indikátoru. V případě neporušené integrity bariéry by indikátor měl zůstat v intersticiálním prostředí a basálním epitelu semenotvorných kanálků. Tento profil byl pozorován u WT myši. Naopak při narušení bariéry je biotin schopný proniknout do lumen semenotvorného kanálku. Toto jsme potvrdili u samců deficientních na FBXO38 (Obr. 23B).

Jak detekce proteinů nezbytných pro správnou funkci BTB, tak funkční esej na ověření její integrity prokázala dysfunkci této bariéry tvořené basálním epitelem semenotvorných kanálků.



Obrázek 23: SCF^{FBXO38} je nezbytná pro integritu hematotestikulární bariéry

(A) Imunofluorescenční vizualizace BTB pomocí protilátky proti claudin 11 u dospělých myší (44 týdnů).
 (B) Permeabilita hematotestikulární bariéry byla testována biotinovým indikátorem, který byl vizualizován biotinovou protilátkou u dospělých myší (20 týdnů).

7. Diskuze

Protein FBXO38 patří do velké skupiny substrátových receptorů, které se účastní specifické proteinové degradace zprostředkované mnohapoljudnotkovými RING ubikvitin ligázami. Skrze F-box motiv se váže do komplexu SKP1-CUL1-RBX1 a následně prostřednictvím své C-terminální oblasti na cílové substráty (Wang a spol. 2014). Jediným dosud publikovaným substrátem SCF^{FBXO38} je PD-1, transmembránový receptor, který je exprimován na povrchu T-buněk (Meng a spol. 2018). Mutace v genu *FBXO38* vedou u lidí k autosomálně recesivní a autosomálně dominantní formě svalové atrofie. Tato distální spinální svalová atrofie je dědičným onemocněním, které se projevuje patologickým odumíráním alfa motorických neuronů v předním rohu míchy a progresivní symetrickou slabostí horních nebo dolních končetin.

Součástí předběžných výsledků byla identifikace nových potencionálních substrátů. Pro jejich izolaci a identifikaci byly využity HeLa buňky s indukibilní expresí Strep-FLAG značeného proteinu FBXO38. Tento rekombinantní protein byl afinitně purifikován a pomocí hmotnostní spektrometrie byli identifikováni jeho vazební partneři. PD-1 jsme mezi proteiny kopurifikovanými s FBXO38 neidentifikovali vzhledem k tomu, že se jedná o protein specificky exprimovaný v T-buněčných liniích (Keir a spol. 2008). Seznam těchto potenciálních substrátů nicméně obsahoval námi dále zkoumaný protein ZXDA/B.

ZXDA a ZXDB (ZXDA/B) jsou téměř identické proteiny, jejichž geny se nacházejí na krátkém raménku X chromozomu. Jsou to nukleární proteiny s deseti zinkovými prsty. To jim pravděpodobně umožňuje vazbu na RNA či DNA (Grelg a spol. 1993). Zatímco ZXDA vznikl duplikací ZXDB, ZXDB je velice pravděpodobně původně vzniklý retropozicí genu ZXDC. ZXDA a ZXDB jsou v primární struktuře z 97 % identické, zatímco ZXDC má podobnost mnohem nižší. Fyziologická role těchto proteinů je minimálně popsána a kromě jejich potenciální úlohy v regulaci transkripce genů pro MHC glykoproteiny II. třídy, nejsou dostupné žádné další detailní informace naznačující biochemické dráhy, jichž se účastní (Al-Kandari, Koneni, a spol. 2007; Al-Kandari, Jambunathan, a spol. 2007).

Stabilita ZXDA/B byla výrazně zvýšena v buňkách s absencí FBXO38. Specifická degradace ZXDA/B prostřednictvím FBXO38 byla potvrzena *in vitro* ubikvitinační esejí,

kdy po přidání enzymů E1, E2 a ATP byl protein ZXDA/B nacházející se v komplexu s FBXO38 silně ubikvitinován (viz kapitola 5).

Abychom lépe pochopili fyziologickou funkci lidského genu *Fbxo38*, rozhodli jsme se vytvořit myši model deficientní na *Fbxo38*. Model byl vytvořen ve spolupráci s transgenní jednotkou ÚMG AV ČR, a to pomocí CRISPR-Cas9 metody (viz kapitola 6.1). Purifikovaný Cas9 protein byl společně se specifickou gRNA injikován do zygotického stádia C57BL6/N myši. Správné vystřihnutí třetího exonu vedlo k posunu čtecího rámce a ke vzniku kratšího produktu tohoto proteinu, který postrádá kompletní C-koncovou oblast zodpovědnou za vazbu substrátu. Delece *Fbxo38* byla potvrzena prostřednictvím PCR genotypování a následné sekvenace PCR produktu. Na imortalizovaných myších embryonálních fibroblastech jsme potvrdili ztrátu proteinu FBXO38. Tato ztráta vedla ke zvýšení exprese proteinu ZXDB, což potvrdilo evoluční konzervaci funkčního vztahu těchto dvou faktorů. Myši s delecí *Fbxo38* byly životaschopné. Homozygoti se nicméně rodili s nižší frekvencí než heterozygoti a WT myši (viz kapitola 6.1). Tato mortalita mohla být důsledkem růstového deficitu a nižší prenatalní a postnatální fitness embryí a mláďat. Podobně je tomu u myši deficientních na ubikvitin ligázový receptor FBXW8, u kterých bylo pozorováno snížené procento narozených mutovaných myši, a to až o 70 % (Tsutsumi a spol. 2008). FBXW8 je substrátový receptor pro CUL7 jehož absence také způsobuje vysokou postnatální letalitu, která je zapříčiněna respiračním selháním u novorozených myši (Arai a spol. 2003).

Menší vzrůst těla souvisí s růstem kostí, zatímco nižší tělesná hmotnost je dána především nižším rozsahem tukové tkáně u mutovaných myši. (Paganini a spol. 2019; Ingalls, Dickie, a Snell 1950). Myši se ztrátou genu *Fbxo38* byly růstově retardované již od prvních dnů po narození (viz kapitola 6.2). Podobný fenotyp byl pozorován u několika dalších myších kmenů deficientních na příbuzné ubikvitin ligázy. Již zmíněná deficiencie *Fbxw8* i *Cul7* vede k postnatální a prenatalní retardaci růstu myši. To můžeme pozorovat i u proto-onkogenu SKP2, který je zodpovědný za degradaci inhibitorů kináz CDK – p21 a p27. U myšičího kmene s absencí *Skp2* dochází k aberantní stabilizaci těchto proteinů a zastavení buněčného cyklu v G1 fázi, což vede k růstové retardaci mutantních zvířat. Současná absence obou těchto genů (*p27* a *Skp2*) vede ke kompletní reverzi růstového fenotypu (Kossatz a spol. 2004; Carrano a spol. 1999). Zpomalený růst jedinců tedy může naznačovat roli FBXO38 v regulaci buněčného cyklu. Tomu napovídá i publikovaná role FBXO38 v cytokinezi (Georges a spol. 2019).

Nižší hmotnost mutovaných myši souvisí také s nižší hmotností některých orgánů. Největší a nejsignifikantnější rozdíly byly v hmotnosti mozku a samčí reprodukční soustavy, zejména varlat. Nižší signifikanci jsme pozorovali také u rozdílu v hmotnosti ledvin, ale orgány jako plíce, srdce či slezina nebyly významně rozdílné mezi WT a KO myšmi (viz kapitola 6.2).

V rámci projektu prezentovaném v této diplomové práci jsme se zaměřili na studium vlivu absence *Fbxo38* na velikost a funkci samčích pohlavních orgánů, a to zejména na proces spermatogeneze a studium fertility. Jejich sníženou reprodukční schopnost jsme potvrdili opakovaným křížením *Fbxo38*^{-/-} samců s WT samicemi. Po páření se samicím ve většině případů vytvořila vaginální zátka. Počet zabřeznutí a vrhů byl ale u samic oplodněných KO samci mnohem nižší než u samic, které se pářily s WT samci. Snížená samčí fertilita může být způsobena více faktory. Jedním z nich je neschopnost spermií penetrovat do oocytu a následně ho oplodnit a zahájit embryonální vývoj, což může souviset s defektem v progresivní motilitě nebo ve špatné morfologii spermií, neschopnosti kapacitace či akrozomální reakce. Morfologii spermií jsme vizualizovali pomocí IF. Mitochondrie asociované s bičíkem jsme barvili Mitotrackerem a DNA v oblasti hlavičky pomocí DAPI. Žádné morfologické defekty u spermií jsme nepozorovali a spermie KO myši se nijak nelišily od spermií myši divokého typu. Schopnost spermií oplodnit oocyt byla dále testována prostřednictvím IVF. Ani tato metoda neprokázala žádné výrazné defekty v koncepci oocytu a tudíž ve vývoji spermií. Je nutné dodat, že tyto metody nejsou kvantitativní a neumožnily nám identifikovat problémy s kapacitací a následnou akrozomální reakcí, jelikož u IVF jsou tyto kroky vyvolány uměle.

Kvantitativní měření spermatogeneze odhalilo značný pokles spermií v nadvarlatech (viz kapitola 6.3). U člověka je normální počet spermií 15 milionů na mililitr a snížený počet spermií, takzvaná oligozoospermie, vede k poruchám fertility. Myši divokého typu měly průměrný počet spermií kolem 17 milionů. U mutovaných myši byl tento počet o 60 % nižší. Počet spermií může tedy hrát důležitou roli ve schopnosti oplodnit samici a vysvětlovalo by to nižší počet vrhů po kopulaci s mutovanými samci. Tento efekt je amplifikován faktem, že do reprodukčního traktu samice se dostane pouze 10 % spermií z celého ejakulátu. Schopnost kapacitace a následné akrozomální reakce je tak omezena pouze na malé množství spermií.

Vliv na spermatogenezi byl pozorován u mnoha ubikvitin ligáz. Typickým příkladem je fenotyp myši deficientních na *Dcaf17*. Tento substrátový adaptér pro CUL4 sice nemá vliv na velikost reprodukční soustavy samců, ale je zodpovědný za morfologii a pohyblivost maturovaných spermií. Hlavní příčinou sterility u samců deficientních na *Dcaf17* byla neschopnost vytvořit funkční akrozom, ale také zvýšená apoptotická aktivita zárodečných buněk (Ali a spol. 2018). Vyšší apoptotickou aktivitu v semenotvorných kanálcích u *Fbxo38*^{-/-} myši jsme vyloučili na základě výsledků z TUNEL eseje, s jejíž pomocí jsme vizualizovali fragmentovanou DNA charakteristickou pro apoptotický proces. Statistická analýza TUNEL pozitivních buněk neodhalila žádné signifikantní rozdíly mezi WT a KO zvířaty (viz kapitola 6.4).

V dalším kroku jsme se zaměřili na samotná varlata, jejich strukturu a detekci jednotlivých stádií spermatid v semenotvorných kanálcích. Histologické řezy varlat jsme barvili hematoxylin-eosinem a identifikovali jsme jednotlivá stádia ve všech fázích spermatogeneze. U varlat mutovaných myši byly pozorovány odlišnosti v uspořádání zárodečných buněk a hypocelularita, tedy nižší počet diferenciovaných spermatických buněk, které se účastní spermatogeneze (viz kapitola 6.4). Nízký počet buněk účastnících se spermatogeneze může souviset s jejich vývojem a maturací, jako je tomu například u deficiencie proteinů CUL4A a CUL4B. Oba tyto strukturní proteiny ubikvitin ligáz hrají zásadní roli ve spermatogenezi, ale každý z nich je exprimován v odlišných buněčných a diferenciacních stádiích. Na rozdíl od CUL4A, který je exprimován pouze ve spermatocytech I. a II. řádu, CUL4B je exprimován převážně ve spermatogoniích, kulatých spermatidách a zejména pak v Sertoliho buňkách (Lin a spol. 2016; Yin a spol. 2011). Právě na Sertoliho buňkách je plně závislá maturace a vývoj spermatid. Sertoliho buňky jsou takzvané mateřské nebo nutriční buňky, které jsou lokalizovány na basální membráně semenotvorného kanálku. Jejich cytoplazma sahá až do lumen tubulu. Obklopují, vyživují a hormonálně ovlivňují spermatické buňky, regulují jejich diferenciaci, načasování vývoje a díky jejich fagocytické schopnosti se podílejí také na tvarování spermatozoí, kdy pohlcují cytoplazmu maturujících buněk (Neto a spol. 2016). Prostřednictvím těsných spojů rozdělují Sertoliho buňky semenotvorný tubul na apikální a basální část (Cheng a Mruk 2012; Mruk a Cheng 2015). Systém těsných, adhezních a mezerových spojů kontroluje integritu semenotvorného kanálku a navzájem pospojované Sertoliho buňky spolu tvoří takzvanou BTB. Ta vytváří specifické imunoprivilegované prostředí semenotvorného tubulu, které umožňuje imunitnímu systému tolerovat antigeny, které jsou přítomné na vyvíjejících se

spermatických buňkách. Specifickou expresi proteinů FBXO38 a ZXDB jsme detekovali právě v jádrech Sertoliho buněk, kde jsme pozorovali kolokalizaci signálů těchto proteinů s markerem jader Sertoliho buněk – tumor supresorovým transkripčním faktorem WT1. KO myši, podle předpokladu, neměly detekovatelnou expresi FBXO38 a zároveň jsme u nich pozorovali vyšší hladinu stabilizovaného ZXDA/B (viz kapitola 6.5). Toto vyplývá z faktu, že u KO myši nemůže docházet k cílené degradaci ZXDA/B prostřednictvím SCF^{FBXO38} a dochází tak k jeho akumulaci.

První vlna spermatogeneze v postnatální části života je důležitá pro celý proces spermatogeneze. Během prvního postnatálního týdne u myši nedochází ke spermatogenezi a ve varlatech jsou přítomné pouze Sertoliho buňky a spermatogonie. U lidí je první vlna spermatogeneze iniciována až v pubertě, u myši nastává již okolo 10. dne po narození. Pro správné načasování této fáze je nutná souhra dvou faktorů. Iniclace diferenciace zárodečných buněk a ustanovení prostředí (niky – z anglického “niche”), ve kterém se tyto buňky začnou diferenciovat ve stanovenou dobu. Při nesouhře těchto faktorů a dysfunkci některých důležitých genů dochází k dramatickému dopadu na spermatogenezi a plodnost jedince. Vzhledem k tomu, že se jedná o synchronní vlnu, lze na ni pozorovat jednotlivá stádia spermatogeneze. Důležitost první vlny dokazují některé myší modely deficientní na nepostradatelné geny, které ovlivňují tento proces. Myší kmen s delecí genu *Rhox13* má narušenou právě první vlnu spermatogeneze a výrazně zvýšenou apoptotickou aktivitu zárodečných buněk. Tato dysfunkce vede k nízkému počtu spermií v nadvarlatech dospělých myši (Busada a spol. 2016). Zpožděnou vlnu spermatogeneze lze pozorovat i u myši deficientních na receptor FSH, u kterých docházelo nejen k výraznému zpoždění první vlny spermatogeneze, ale také k signifikantním rozdílům ve velikosti varlat a výraznému poklesu spermií (Krishnamurthy a spol. 2001). U *Fbxo38*^{-/-} myši jsme jak na IF řezech, tak na imunoblotu pozorovali abnormality v expresi různých proteinů a zároveň jsme znovu potvrdili deficienci proteinu FBXO38 a zvýšenou stabilitu ZXDB. U mutovaných myši jsme po jednom týdnu detekovali nižší expresi WT1, což může naznačovat nižší počet Sertoliho buněk, nebo změnu v transkripčním programu těchto buněk. Vliv WT1 na funkci Sertoliho buněk je zřejmý díky myšimu kmenu s delecí tohoto faktor. Vzhledem k tomu, že se jedná o esenciální gen, byl tento model připraven pomocí Cre-Lox systému specificky v Sertoliho buňkách. Deficience WT1 v Sertoliho buňkách vedla ke ztrátě zárodečných buněk a dramatickému poklesu Sertoliho buněk. Pokles těchto buněk nebyl zapříčiněn apoptózou a ztráta nejspíše korelovala s částečným zastavením proliferace buněk a ztrátou interakce

spermatických a Sertoliho buněk. Varlata deficientních myší vykazovala pouze 10% velikost varlat WT myší (Gao a spol. 2006).

Pro analýzu spermatogoniální populace jsme využili dva její markery PLZF a SALL4. Oba to jsou transkripční faktory nezbytné pro sebeobnovování germinálních kmenových buněk a iniciaci jejich diferenciaci (Hobbs a spol. 2012). PLZF je tak nezbytný pro plynulý a repetitivní průběh spermatogeneze. Pokud by došlo k narušení exprese PLZF, spermatogeneze by u mladších jedinců probíhala bez obtíží, ale došlo by k rychlé depleci zárodečných buněk a tudíž k neplodnosti dospělých jedinců (Costoya a spol. 2004). Během první vlny spermatogeneze se hladina PLZF na imunoblotu nijak výrazně nelišila od WT vzorků, zatímco exprese SALL4 byla u KO myší výrazně vyšší, což může souviset s dysregulací diferenciaci progenitorů vznikajících z kmenových buněk. Tomu odpovídala i nižší hladina exprese spermatocytárního markeru SCP3 u mutovaných myší (viz kapitola 6.7).

Specifické barvení spermatogoniálního kompartmentu u dospělých myší vedlo ke zjištění, že deficiencie *Fbxo38* nemá vliv na počet spermatogoniálních kmenových buněk, na rozdíl od ubikvitin ligázy SCF^{FBXW7}, která byla detekována ve spermatogoniích. Expese FBXW7 negativně ovlivňuje sebeobnovu kmenových buněk, a to prostřednictvím specifické degradace proto-onkogenu MYC. Pokud dojde ke snížení aktivity SCF^{FBXW7} dochází k akumulaci nediferenciováných spermatogonií, při zvýšené aktivitě k potlačení jejich aktivity (Kanatsu-Shinohara et al. 2014). Další marker, který jsme využili u dospělých zvířat je STRA8, který aktivuje transkripční program nezbytný pro meiózu. Jedná se o gen regulovaný RA, která je v Sertoliho buňkách syntetizovaná z vitamínu A. Myší model deficientní na STRA8 je sterilní a postrádá meiotické spermatocyty (Endo a spol. 2015; Mark a spol. 2008). V našem případě jsme pozorovali nižší expresi STRA8 u mutantních myší, což by napovídalo defektu v produkci RA a vysvětlovalo by to nižší počet meiotických spermatid a maturovaných spermii (viz. kapitola 6.6).

Rozdělení semenotvorného kanálku na basální a apikální část prostřednictvím těsných spojů je nezbytné pro dynamiku a oddělení jednotlivých fází spermatogeneze. V basální části probíhá obnova a diferenciaci spermatogonií a mitotické dělení až do preleptotenního stádia spermatocyty, v apikální části je následné meiotické dělení od pachytenního spermatocyty až do spermiogeneze. Jak je zmíněno výše, BTB je tvořena více typy spojů, které jsou složené z různých spojovacích a adaptérových proteinů. V případě

nedostatku těchto strukturních proteinů dochází k poškození integrity BTB. Existuje několik myších modelů BTB dysfunkce. Například ztráta ocludinu je spojena s atrofií tubulů, která má pomalý nástup korelující se stárnutím myši. Staré myši nemají žádné spermatogonie a cytoplasma jejich Sertoliho buněk je výrazně omezena pouze na basální část tubulu (Saitou a spol. 2000). Delece některých claudinů (Claudin-3,5 a 11) vede k těžkým defektům ve spermatogenezi (J. Meng a spol. 2005; Morrow a spol. 2009; Mazaud-Guittot a spol. 2010). Semenotvorné tubuly u mutovaných myši jsou užší než u WT myši a neobsahují zralé spermie. Narušení BTB vede k omezení diferenciaci časných spermatocytů i přesto, že samotná absence některých claudinů nevede ke kompletnímu rozvolnění těchto spojů (Gow a spol. 1999). Absence claudinu-11 v těsných spojích má výrazný vliv na maturaci Sertoliho buněk, které vykazují nezralost, ztrácejí kontakt s basální laminou a mění svou typickou morfologii. V těchto modelech také dochází k masivní apoptóze spermatogonií (Mazaud-Guittot a spol. 2010). V našem případě nedochází ani k masivní apoptotické aktivitě a Sertoliho buňky se zdají být plně asociované s basální membránou, zároveň ale pozorujeme menší velikost varlat, hypocelularitu a nižší počet spermií a tyto defekty mohou být spojeny s nesprávnou funkcí BTB. Abychom ověřili tuto hypotézu, imunofluorescenčním barvením jsme detekovali expresi a lokalizaci jednotlivých komponentů těsných spojů, přesněji claudinu-11 a proteinu ZO-1. Claudin vytváří síť těsných spojů a ZO1 je adaptorový protein nasedající na intracelulární části těchto transmembránových proteinů. Barvení ZO-1 se u mutantních myši nijak nelišilo od WT (data nejsou ukázána). Oproti tomu barvení claudinu zřetelně prokázalo úbytek tohoto proteinu v oblastech BTB u KO myši (viz kapitola 6.8).

Porušená integrita BTB, její propustnost a dysfunkce byla také testována prostřednictvím biotinové eseje. Pomocí BTB je omezen transport parakrinních hormonů a faktorů, vody, toxických látek, ale i léků. Biotinová esej je založena na neschopnosti difúze biotinylačního činidla. Při správné funkci bariery je biotin detekován pouze na membránách v intersticiálním prostoru a basální části tubulárního epitelu. BTB brání difúzi biotinu do lumen semenotvorného tubulu. U mutovaných myši je zřetelné, že biotin difundoval snáze skrze tuto bariéru, což dokazuje její narušení (viz kapitola 6.8).

V souhrnu, absence proteinu FBXO38 u myšního modelu vedla ke snížené fertilitě. Cílem tohoto projektu bylo zjistit, na jaké úrovni v rámci spermatogeneze dochází k této dysregulaci. Výsledky naznačují, že u těchto zvířat dochází ke špatnému vyvinutí a udržování hematotestikulární bariéry, a že tento fakt může souviset s dysfunkcí Sertoliho

buněk, ve kterých jsme detekovali specifickou expresi proteinu FBXO38. Abnormální Sertoliho buňky a jejich dysfunkce vede k poruše integrity hematotestikulární bariéry, což má pravděpodobně za následek narušený průběh spermatogeneze a nižší počet meiotických spermatocytů a maturovaných spermií.

8. Závěr

- Popsali jsme fenotyp myši s delecí *Fbxo38*
- Delece *Fbxo38* vedla u myši ke snížené fertilitě a negativně ovlivnila proces spermatogeneze.
- Lokalizovali jsme protein FBXO38 a jeho substrát ZXDB v jádrech Sertoliho buněk.
- Defektní proces spermatogeneze je částečně způsoben nesprávnou funkcí Sertoliho buněk a na nich závislé tvorbě hematotestikulární bariéry.

9. Seznam literatury:

- Akçimen, Fulya, Atay Vural, Hacer Durmuş, Arman Çakar, Henry Houlden, Yeşim G. Parman, a A. Nazlı Başak. 2019. „A Novel Homozygous FBXO38 Variant Causes an Early-Onset Distal Hereditary Motor Neuronopathy Type IID". *Journal of Human Genetics* 64 (11): 1141–44.
- Ali, Asmaa, Bhavesh V. Mistry, Hala A. Ahmed, Razan Abdulla, Hassan A. Amer, Abdelbary Prince, Anas M. Alazami, Fowzan S. Alkuraya, a Abdullah Assiri. 2018. „Deletion of DDB1- and CUL4- Associated Factor-17 (Dcaf17) Gene Causes Spermatogenesis Defects and Male Infertility in Mice". *Scientific Reports* 8 (1): 9202.
- Al-Kandari, Wafa, Srikarthika Jambunathan, Vandana Navalgund, Rupa Koneni, Margot Freer, Neeta Parimi, Rajini Mudhasani, a Joseph D. Fontes. 2007. „ZXDC, a novel zinc finger protein that binds CIITA and activates MHC gene transcription". *Molecular immunology* 44 (4): 311–21.
- Al-Kandari, Wafa, Rupa Koneni, Vandana Navalgund, Anastasiia Aleksandrova, Srikarthika Jambunathan, a Joseph D. Fontes. 2007. „The zinc finger proteins ZXDA and ZXDC form a complex that binds CIITA and regulates MHC II gene transcription". *Journal of molecular biology* 369 (5): 1175–87.
- Arai, Takehiro, Jocelyn S. Kasper, Jeffrey R. Skaar, Syed Hamid Ali, Chiaki Takahashi, a James A. DeCaprio. 2003. „Targeted disruption of p185/Cul7 gene results in abnormal vascular morphogenesis". *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 100 (17): 9855–60.
- Arendt, Cassandra S., a Mark Hochstrasser. 1997. „Identification of the Yeast 20S Proteasome Catalytic Centers and Subunit Interactions Required for Active-Site Formation". *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 94 (14): 7156.
- Arnason, T, a M J Ellison. 1994. „Stress resistance in *Saccharomyces cerevisiae* is strongly correlated with assembly of a novel type of multiubiquitin chain." *Molecular and Cellular Biology* 14 (12): 7876–83.
- Bai, C, R Richman, a S J Elledge. 1994. „Human cyclin F." *The EMBO Journal* 13 (24): 6087–98.

- Bai, Chang, Partha Sen, Kay Hofmann, Lei Ma, Mark Goebel, J. Wade Harper, a Stephen J. Elledge. 1996. „SKP1 Connects Cell Cycle Regulators to the Ubiquitin Proteolysis Machinery through a Novel Motif, the F-Box". *Cell* 86 (2): 263–74.
- Ballabio, Andrea, a Juan S. Bonifacino. 2020. „Lysosomes as Dynamic Regulators of Cell and Organismal Homeostasis". *Nature Reviews Molecular Cell Biology* 21 (2): 101–18.
- Baloghova, Nikol, Tomas Lidak, a Lukas Cermak. 2019. „Ubiquitin Ligases Involved in the Regulation of Wnt, TGF- β , and Notch Signaling Pathways and Their Roles in Mouse Development and Homeostasis". *Genes* 10 (10).
- Bard, Jared A.M., Ellen A. Goodall, Eric R. Greene, Erik Jonsson, Ken C. Dong, a Andreas Martin. 2018. „Structure and Function of the 26S Proteasome". *Annual review of biochemistry* 87 (červen): 697–724.
- Baudat, Frédéric, Yukiko Imai, a Bernard de Massy. 2013. „Meiotic Recombination in Mammals: Localization and Regulation". *Nature Reviews Genetics* 14 (11): 794–806.
- Bellve, A. R., J. C. Cavicchia, C. F. Millette, D. A. O'Brien, Y. M. Bhatnagar, a M. Dym. 1977. „Spermatogenic Cells of the Prepuberal Mouse: Isolation and Morphological Characterization". *The Journal of Cell Biology* 74 (1): 68.
- Benton, Lauri, Li-Xin Shan, a Matthew P. Hardy. 1995. „Differentiation of Adult Leydig Cells". *The Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology, Hormonal Steroids*, 53 (1): 61–68.
- Borg, Claire L., Katja M. Wolski, Gerard M. Gibbs, a Moira K. O'Bryan. 2010. „Phenotyping male infertility in the mouse: how to get the most out of a 'non-performer'". *Human Reproduction Update* 16 (2): 205–24.
- Buetow, Lori, a Danny T. Huang. 2016. „Structural insights into the catalysis and regulation of E3 ubiquitin ligases". *Nature reviews. Molecular cell biology* 17 (10): 626–42.
- Busada, Jonathan T., Ellen K. Velte, Nicholas Serra, Kenneth Cook, Bryan A. Niedenberger, William D. Willis, Eugenia H. Goulding, Edward M. Eddy, a Christopher B. Geyer. 2016. „RhoX13 Is Required for a Quantitatively Normal First Wave of Spermatogenesis in Mice". *Reproduction* 152 (5): 379–88.
- Carrano, Andrea C., Esther Eytan, Avram Hershko, a Michele Pagano. 1999. „SKP2 Is Required for Ubiquitin-Mediated Degradation of the CDK Inhibitor P27". *Nature Cell Biology* 1 (4): 193–99.

- Ciechanover, A., S. Elias, H. Heller, a A. Hershko. 1982. „Covalent Affinity' Purification of Ubiquitin-Activating Enzyme." *Journal of Biological Chemistry* 257 (5): 2537–42.
- Cooper, Geoffrey M. 2000. „Protein Degradation". *The Cell: A Molecular Approach. 2nd Edition*.
- Costoya, José A., Robin M. Hobbs, Maria Barna, Giorgio Cattoretti, Katia Manova, Meena Sukhwani, Kyle E. Orwig, Debra J. Wolgemuth, a Pier Paolo Pandolfi. 2004. „Essential Role of Plzf in Maintenance of Spermatogonial Stem Cells". *Nature Genetics* 36 (6): 653–59.
- Deveraux, Q., V. Ustrell, C. Pickart, a M. Rechsteiner. 1994. „A 26 S Protease Subunit That Binds Ubiquitin Conjugates". *The Journal of Biological Chemistry* 269 (10): 7059–61.
- Dickins, Ross A., Ian J. Frew, Colin M. House, Moira K. O'Bryan, Andrew J. Holloway, Izhak Haviv, Nadia Traficante, David M. de Kretser, a David D. L. Bowtell. 2002. „The Ubiquitin Ligase Component Siah1a Is Required for Completion of Meiosis I in Male Mice". *Molecular and Cellular Biology* 22 (7): 2294–2303.
- Dufau, Maria L., a Kevin J. Catt. 1979. „Gonadotropin Receptors and Regulation of Steroidogenesis in the Testis and Ovary". In *Vitamins & Hormones*, editoval Paul L. Munson, Egon Diczfalusy, John Glove, a Robert E. Olson, 36:461–592. Academic Press.
- Dym, M. 1994. „Spermatogonial stem cells of the testis." *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 91 (24): 11287–89.
- Ebner, V. v. 1887. „Zur Spermatogenese bei den Säugethieren". *Archiv für mikroskopische Anatomie* 31 (1): 236–92.
- Endo, Tsutomu, Katherine A. Romer, Ericka L. Anderson, Andrew E. Baltus, Dirk G. de Rooij, a David C. Page. 2015. „Periodic Retinoic Acid–STRA8 Signaling Intersects with Periodic Germ-Cell Competencies to Regulate Spermatogenesis". *Proceedings of the National Academy of Sciences* 112 (18): E2347–56.
- Enchev, Radoslav I., Brenda A. Schulman, a Matthias Peter. 2015. „Protein Neddylaton: Beyond Cullin–RING Ligases". *Nature Reviews Molecular Cell Biology* 16 (1): 30–44.
- Etlinger, J D, a A L Goldberg. 1977. „A soluble ATP-dependent proteolytic system responsible for the degradation of abnormal proteins in reticulocytes." *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 74 (1): 54–58.

- Farrar, Michelle A., a Matthew C. Kiernan. 2015. „The Genetics of Spinal Muscular Atrophy: Progress and Challenges". *Neurotherapeutics* 12 (2): 290–302.
- Ferrington, Deborah A., a Dale S. Gregerson. 2012. „Immunoproteasomes: Structure, Function, and Antigen Presentation". *Progress in molecular biology and translational science* 109: 75–112.
- Finley, Daniel. 2009. „Recognition and Processing of Ubiquitin-Protein Conjugates by the Proteasome". *Annual review of biochemistry* 78: 477–513.
- Gao, Fei, Sourindra Maiti, Nargis Alam, Zhen Zhang, Jian Min Deng, Richard R. Behringer, Charlotte Lécureuil, Florian Guillou, a Vicki Huff. 2006. „The Wilms Tumor Gene, Wt1, Is Required for Sox9 Expression and Maintenance of Tubular Architecture in the Developing Testis". *Proceedings of the National Academy of Sciences* 103 (32): 11987–92.
- Georges, Anna, Etienne Coyaud, Edyta Marcon, Jack Greenblatt, Brian Raught, a Lori Frappier. 2019. „USP7 Regulates Cytokinesis through FBXO38 and KIF20B". *Scientific Reports* 9 (únor).
- Gerber, Jonathan, Julia Heinrich, a Ralph Brehm. 2016. „Blood–Testis Barrier and Sertoli Cell Function: Lessons from SCCx43KO Mice". *Reproduction* 151 (2): R15–27.
- Germani, Antonia, Heriberto Bruzzoni-Giovanelli, Arlette Fellous, Sylvie Gisselbrecht, Nadine Varin-Blank, a Fabien Calvo. 2000. „SIAH-1 Interacts with α -Tubulin and Degrades the Kinesin Kid by the Proteasome Pathway during Mitosis". *Oncogene* 19 (52): 5997–6006.
- Goldstein, G, M Scheid, U Hammerling, D H Schlesinger, H D Niall, a E A Boyse. 1975. „Isolation of a polypeptide that has lymphocyte-differentiating properties and is probably represented universally in living cells." *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 72 (1): 11–15.
- Gow, Alexander, Cherie M. Southwood, Jing Song Li, Milena Pariali, Gavin P. Riordan, Scott E. Brodie, John Danias, Jeff M. Bronstein, Bechara Kachar, a Robert A. Lazzarini. 1999. „CNS Myelin and Sertoli Cell Tight Junction Strands Are Absent in Osp/Claudin-11 Null Mice". *Cell* 99 (6): 649–59.
- Grelg, Gillian M., Cecll B. Sharp, Laura Carrel, a Huntington F. Willard. 1993. „Duplicated zinc finger protein genes on the proximal short arm of the human X chromosome: isolation, characterization and X-inactivation studies". *Human Molecular Genetics* 2 (10): 1611–18.

- Griswold, Michael D. 2016. „Spermatogenesis: The Commitment to Meiosis". *Physiological Reviews* 96 (1): 1–17.
- Haberlová, Jana, Alžběta Slabá, Petra Hedvičáková, a Tereza Doušová. 2016. „Spinal muscular atrophy - diagnostics, therapy, research". *Neurologie pro praxi* 17 (6): 349–53.
- Hershko, A., H. Heller, S. Elias, a A. Ciechanover. 1983. „Components of Ubiquitin-Protein Ligase System. Resolution, Affinity Purification, and Role in Protein Breakdown." *Journal of Biological Chemistry* 258 (13): 8206–14.
- Hershko, Avram, a Aaron Ciechanover. 1998. „The Ubiquitin System". *Annual Review of Biochemistry* 67 (1): 425–79.
- Hobbs, Robin M., Sharmila Fagoonee, Antonella Papa, Kaitlyn Webster, Fiorella Altruda, Ryuichi Nishinakamura, Li Chai, a Pier Paolo Pandolfi. 2012. „Functional antagonism between Sall4 and Plzf define germline progenitors". *Cell Stem Cell* 10 (3): 284–98.
- Hogarth, Cathryn A., a Michael D. Griswold. 2010. „The key role of vitamin A in spermatogenesis". *The Journal of Clinical Investigation* 120 (4): 956–62.
- Hou, Cong-Cong, a Wan-Xi Yang. 2013. „New Insights to the Ubiquitin–Proteasome Pathway (UPP) Mechanism during Spermatogenesis". *Molecular Biology Reports* 40 (4): 3213–30.
- Hough, R., G. Pratt, a M. Rechsteiner. 1987. „Purification of Two High Molecular Weight Proteases from Rabbit Reticulocyte Lysate." *Journal of Biological Chemistry* 262 (17): 8303–13.
- Husnjak, Koraljka, Suzanne Elsassner, Naixia Zhang, Xiang Chen, Leah Randles, Yuan Shi, Kay Hofmann, Kylie Walters, Daniel Finley, a Ivan Dikic. 2008. „Proteasome subunit Rpn13 is a novel ubiquitin receptor". *Nature* 453 (7194): 481–88.
- Chau, V., J. W. Tobias, A. Bachmair, D. Marriott, D. J. Ecker, D. K. Gonda, a A. Varshavsky. 1989. „A Multiubiquitin Chain Is Confined to Specific Lysine in a Targeted Short-Lived Protein". *Science* 243 (4898): 1576–83.
- Chen, Ping, a Mark Hochstrasser. 1996. „Autocatalytic Subunit Processing Couples Active Site Formation in the 20S Proteasome to Completion of Assembly". *Cell* 86 (6): 961–72.
- Cheng, C. Yan, a Dolores D. Mruk. 2012. „The Blood-Testis Barrier and Its Implications for Male Contraception". *Pharmacological Reviews* 64 (1): 16–64.

- Cheng, C. Yan, Elissa W.P. Wong, Helen H. N. Yan, a Dolores D. Mruk. 2010. „Regulation of Spermatogenesis in the Microenvironment of the Seminiferous Epithelium: New Insights and Advances". *Molecular and cellular endocrinology* 315 (1–2): 49–56.
- Ingalls, Ann M., Margaret M. Dickie, a G. D. Snell. 1950. „OBESE, A NEW MUTATION IN THE HOUSE MOUSE". *Journal of Heredity* 41 (12): 317–18.
- Iyengar, Prasanna Vasudevan, Tsuyoshi Hirota, Shigehisa Hirose, a Nobuhiro Nakamura. 2011. „Membrane-associated RING-CH 10 (MARCH10 Protein) Is a Microtubule-associated E3 Ubiquitin Ligase of the Spermatid Flagella". *The Journal of Biological Chemistry* 286 (45): 39082–90.
- Kaindl, Angela M., Ulf-Peter Guenther, Sabine Rudnik-Schöneborn, Raymonda Varon, Klaus Zerres, Markus Schuelke, Christoph Hübner, a Katja von Au. 2007. „Spinal Muscular Atrophy With Respiratory Distress Type 1 (SMARD1)": *Journal of Child Neurology*, prosinec.
- Kanarek, Naama, Elad Horwitz, Inbal Mayan, Michael Leshets, Gady Cojocaru, Matti Davis, Ben-Zion Tsuberi, Eli Pikarsky, Michele Pagano, a Yinon Ben-Neriah. 2010. „Spermatogenesis rescue in a mouse deficient for the ubiquitin ligase SCF β -TrCP by single substrate depletion". *Genes & Development* 24 (5): 470–77.
- Kanatsu-Shinohara, Mito, Ichiro Onoyama, Keiichi I. Nakayama, a Takashi Shinohara. 2014. „Skp1-Cullin-F-Box (SCF)-Type Ubiquitin Ligase FBXW7 Negatively Regulates Spermatogonial Stem Cell Self-Renewal". *Proceedings of the National Academy of Sciences* 111 (24): 8826–31.
- Keir, Mary E., Manish J. Butte, Gordon J. Freeman, a Arlene H. Sharpe. 2008. „PD-1 and Its Ligands in Tolerance and Immunity". *Annual Review of Immunology* 26 (1): 677–704.
- Khan, Shahanshah, Jawahar Singh Adhikari, Moshahid Alam Rizvi, a Nabo Kumar Chaudhury. 2015. „Radioprotective potential of melatonin against 60Co γ -ray-induced testicular injury in male C57BL/6 mice". *Journal of Biomedical Science* 22 (1): 61.
- Komander, David. 2009. „The emerging complexity of protein ubiquitination". *Biochemical Society Transactions* 37 (5): 937–53.
- Kopanja, Dragana, Nilotpal Roy, Tanya Stoyanova, Rex A. Hess, Srilata Bagchi, a Pradip Raychaudhuri. 2011. „Cul4A is Essential for Spermatogenesis and Male Fertility". *Developmental biology* 352 (2): 278–87.

- Kossatz, Uta, Nils Dietrich, Lars Zender, Jan Buer, Michael P. Manns, a Nisar P. Malek. 2004. „Skp2-dependent degradation of p27kip1 is essential for cell cycle progression". *Genes & Development* 18 (21): 2602–7.
- Koubova, Jana, Douglas B. Menke, Qing Zhou, Blanche Capel, Michael D. Griswold, a David C. Page. 2006. „Retinoic acid regulates sex-specific timing of meiotic initiation in mice". *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 103 (8): 2474–79.
- Kretser, D.M. de, K.L. Loveland, A. Meinhardt, D. Simorangkir, a N. Wreford. 1998. „Spermatogenesis". *Human Reproduction* 13 (suppl_1): 1–8.
- Krishnamurthy, Hanumanthappa, Poda Suresh Babu, Carlos R. Morales, a M. Ram Sairam. 2001. „Delay in Sexual Maturity of the Follicle-Stimulating Hormone Receptor Knockout Male Mouse1". *Biology of Reproduction* 65 (2): 522–31.
- Kulathu, Yogesh, a David Komander. 2012. „Atypical Ubiquitylation — the Unexplored World of Polyubiquitin beyond Lys48 and Lys63 Linkages". *Nature Reviews Molecular Cell Biology* 13 (8): 508–23.
- Kumari, Nishi, Patrick William Jaynes, Azad Saei, Prasanna Vasudevan Iyengar, John Lalith Charles Richard, a Pieter Johan Adam Eichhorn. 2017. „The Roles of Ubiquitin Modifying Enzymes in Neoplastic Disease". *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Reviews on Cancer* 1868 (2): 456–83.
- Kwon, Yong Tae, a Aaron Ciechanover. 2017. „The Ubiquitin Code in the Ubiquitin-Proteasome System and Autophagy". *Trends in Biochemical Sciences* 42 (11): 873–86.
- Kwon, Yong Tae, Zanzian Xia, Jee Young An, Takafumi Tasaki, Ilia V. Davydov, Jai Wha Seo, Jun Sheng, Youming Xie, a Alexander Varshavsky. 2003. „Female Lethality and Apoptosis of Spermatocytes in Mice Lacking the UBR2 Ubiquitin Ligase of the N-End Rule Pathway". *Molecular and Cellular Biology* 23 (22): 8255–71.
- Lammer, Doug, Neal Mathias, Jose M. Laplaza, Weidong Jiang, Yun Liu, Judy Callis, Mark Goebel, a Mark Estelle. 1998. „Modification of yeast Cdc53p by the ubiquitin-related protein Rub1p affects function of the SCFCdc4 complex". *Genes & Development* 12 (7): 914–26.
- Lan, Huiyin, Zaiming Tang, Hongchuan Jin, a Yi Sun. 2016. „Neddylation Inhibitor MLN4924 Suppresses Growth and Migration of Human Gastric Cancer Cells". *Scientific Reports* 6 (1): 24218.

- Li, Wei, a Yihong Ye. 2008. „Polyubiquitin chains: functions, structures, and mechanisms". *Cellular and molecular life sciences : CMLS* 65 (15): 2397–2406.
- Lin, Chien-Yu, Chun-Yu Chen, Chih-Hsiang Yu, I-Shing Yu, Shu-Rung Lin, June-Tai Wu, Ying-Hung Lin, Pao-Lin Kuo, Jui-Ching Wu, a Shu-Wha Lin. 2016. „Human X-linked Intellectual Disability Factor CUL4B Is Required for Post-meiotic Sperm Development and Male Fertility". *Scientific Reports* 6 (únor): 20227.
- Liu, Zhiqian, Rose Oughtred, a Simon S. Wing. 2005. „Characterization of E3Histone, a Novel Testis Ubiquitin Protein Ligase Which Ubiquitinates Histones". *Molecular and Cellular Biology* 25 (7): 2819–31.
- Lu, Lin-Yu, Jiaxue Wu, Lin Ye, Galina B. Gavrulina, Thomas L. Saunders, a Xiaochun Yu. 2010. „RNF8-dependent histone modifications regulate nucleosome removal during spermatogenesis". *Developmental cell* 18 (3): 371–84.
- Mark, Manuel, Hugues Jacobs, Mustapha Oulad-Abdelghani, Christine Dennefeld, Betty Féret, Nadège Vernet, Carmen-Alina Codreanu, Pierre Chambon, a Norbert B. Ghyselinck. 2008. „STRA8-deficient spermatocytes initiate, but fail to complete, meiosis and undergo premature chromosome condensation". *Journal of Cell Science* 121 (19): 3233–42.
- Matsumoto, Nobukyuki, Friedrich Laub, Rafael Aldabe, Wen Zhang, Francesco Ramirez, Teruhiko Yoshida, a Masaaki Terada. 1998. „Cloning the CDNA for a New Human Zinc Finger Protein Defines a Group of Closely Related Krüppel-like Transcription Factors". *Journal of Biological Chemistry* 273 (43): 28229–37.
- Maupin-Furlow, Julie A. 2013. „Archaeal Proteasomes and Sampylation". *Sub-cellular biochemistry* 66: 297–327.
- Mazanec, MUDr Radim, MUDr Veronika Potočková, MUDr Petra Laššuthová, a MUDr Pavel Seeman. 2016. „Hereditární motorické neuropatie", 5.
- Mazaud-Guittot, S., E. Meugnier, S. Pesenti, X. Wu, H. Vidal, A. Gow, a B. Le Magueresse-Battistoni. 2010. „Claudin 11 Deficiency in Mice Results in Loss of the Sertoli Cell Epithelial Phenotype in the Testis". *Biology of Reproduction* 82 (1): 202–13.
- Meng, Jing, Robert W. Holdcraft, James E. Shima, Michael D. Griswold, a Robert E. Braun. 2005. „Androgens regulate the permeability of the blood–testis barrier". *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 102 (46): 16696–700.

- Meng, Xiangbo, Xiwei Liu, Xingdong Guo, Shutan Jiang, Tingting Chen, Zhiqiang Hu, Haifeng Liu, et al. 2018. „FBXO38 Mediates PD-1 Ubiquitination and Regulates Anti-Tumour Immunity of T Cells". *Nature* 564 (7734): 130–35.
- Metzger, Meredith B., Jonathan N. Pruneda, Rachel E. Klevit, a Allan M. Weissman. 2014. „RING-type E3 ligases: Master manipulators of E2 ubiquitin-conjugating enzymes and ubiquitination". *Biochimica et biophysica acta* 1843 (1): 47–60.
- Mitranond, V., P. Sobhon, P. Tosukhowong, a W. Chindaduangrat. 1979. „Cytological Changes in the Testes of Vitamin-A-Deficient Rats. I. Quantitation of Germinal Cells in the Seminiferous Tubules". *Acta Anatomica* 103 (2): 159–68.
- Morrow, Carla M.K., Gaurav Tyagi, Liz Simon, Kay Carnes, Kenneth M. Murphy, Paul S. Cooke, Marie-Claude C. Hofmann, a Rex A. Hess. 2009. „Claudin 5 Expression in Mouse Seminiferous Epithelium Is Dependent upon the Transcription Factor Ets Variant 5 and Contributes to Blood-Testis Barrier Function". *Biology of Reproduction* 81 (5): 871–79.
- Mruk, Dolores D., a C. Yan Cheng. 2015. „The Mammalian Blood-Testis Barrier: Its Biology and Regulation". *Endocrine Reviews* 36 (5): 564–91.
- Murata, Shigeo, Katsuhiko Sasaki, Toshihiko Kishimoto, Shin-ichiro Niwa, Hidemi Hayashi, Yousuke Takahama, a Keiji Tanaka. 2007. „Regulation of CD8+ T Cell Development by Thymus-Specific Proteasomes". *Science* 316 (5829): 1349–53.
- Nakamura, Nobuhiro. 2013. „Ubiquitination Regulates the Morphogenesis and Function of Sperm Organelles". *Cells* 2 (4): 732–50.
- Nakanishi, Yoshinobu, a Akiko Shiratsuchi. 2004. „Phagocytic Removal of Apoptotic Spermatogenic Cells by Sertoli Cells: Mechanisms and Consequences". *Biological & Pharmaceutical Bulletin* 27 (1): 13–16.
- Nakayama, Keiichi I., a Keiko Nakayama. 2006. „Ubiquitin Ligases: Cell-Cycle Control and Cancer". *Nature Reviews Cancer* 6 (5): 369–81.
- Neto, Filipe Tenorio Lira et al. 2016. „Spermatogenesis in humans and its affecting factors". *Seminars in Cell & Developmental Biology* 59 (listopad): 10–26.
- Oakberg F. Eugene. 1956a. „A Description of Spermiogenesis in the Mouse and Its Use in Analysis of the Cycle of the Seminiferous Epithelium and Germ Cell Renewal". *American Journal of Anatomy* 99 (3): 391–413.
- Oakberg Eugene F. 1956b. „Duration of Spermatogenesis in the Mouse and Timing of Stages of the Cycle of the Seminiferous Epithelium". *American Journal of Anatomy* 99 (3): 507–16.

- Oakberg Eugene F. 1971. „Spermatogonial Stem-Cell Renewal in the Mouse". *The Anatomical Record* 169 (3): 515–31.
- O'Donnell, Liza. 2015. „Mechanisms of spermiogenesis and spermiation and how they are disturbed". *Spermatogenesis* 4 (2).
- Paganini, Chiara, Luca Monti, Rossella Costantini, Roberta Besio, Silvia Lecci, Marco Biggiogera, Kun Tian, et al. 2019. „Calcium activated nucleotidase 1 (CANT1) is critical for glycosaminoglycan biosynthesis in cartilage and endochondral ossification". *Matrix Biology* 81 (srpen): 70–90.
- Pan, Zhen-Qiang, Alex Kentsis, Dora C. Dias, Kosj Yamoah, a Kenneth Wu. 2004. „Nedd8 on Cullin: Building an Expressway to Protein Destruction". *Oncogene* 23 (11): 1985–97.
- Pelletier, R.-Marc. 1995. „The Distribution of Connexin 43 Is Associated With the Germ Cell Differentiation and With the Modulation of the Sertoli Cell Junctional Barrier in Continual (Guinea Pig) and Seasonal Breeders' (Mink) Testes". *Journal of Andrology* 16 (5): 400–409.
- Peters, Jan-Michael. 1994. „Proteasomes: protein degradation machines of the cell". *Trends in Biochemical Sciences* 19 (9): 377–82.
- Qiao, Huanyu, H.B.D. Prasada Rao, Ye Yang, Jared H. Fong, Jeffrey M. Cloutier, Dekker C. Deacon, Kathryn E. Nagel, et al. 2014. „Antagonistic roles of ubiquitin ligase HEI10 and SUMO ligase RNF212 regulate meiotic recombination". *Nature genetics* 46 (2): 194–99.
- Rabut, Gwénaél, a Matthias Peter. 2008. „Function and regulation of protein neddylation. ‘Protein Modifications: Beyond the Usual Suspects’ Review Series". *EMBO Reports* 9 (10): 969–76.
- Rajapurohitam, Venkatesh, Nathalie Bedard, a Simon S. Wing. 2002. „Control of ubiquitination of proteins in rat tissues by ubiquitin conjugating enzymes and isopeptidases". *American Journal of Physiology-Endocrinology and Metabolism* 282 (4): E739–45.
- Rajapurohitam, Venkatesh, Carlos R. Morales, Mohamed El-Alfy, Stephane Lefrançois, Nathalie Bedard, a Simon S. Wing. 1999. „Activation of a UBC4-Dependent Pathway of Ubiquitin Conjugation during Postnatal Development of the Rat Testis". *Developmental Biology* 212 (1): 217–28.

- Ranjha, Lepakshi, Sean M. Howard, a Petr Cejka. 2018. „Main Steps in DNA Double-Strand Break Repair: An Introduction to Homologous Recombination and Related Processes". *Chromosoma* 127 (2): 187–214.
- Richburg, John H., Jessica L. Myers, a Shawn B. Bratton. 2014. „THE ROLE OF E3 LIGASES IN THE UBIQUITIN-DEPENDENT REGULATION OF SPERMATOGENESIS". *Seminars in cell & developmental biology* 0 (červen): 27–35.
- Rivkin, Eugene, Abraham L. Kierszenbaum, Mara Gil, a Laura L. Tres. 2009. „Rnf19a, a Ubiquitin Protein Ligase, and Psmc3, a Component of the 26S Proteasome, Tether to the Acrosome Membranes and the Head–Tail Coupling Apparatus during Rat Spermatid Development". *Developmental Dynamics* 238 (7): 1851–61.
- Römisch, Karin. 2005. „Endoplasmic reticulum–associated degradation". *Annual Review of Cell and Developmental Biology* 21 (1): 435–56.
- Rossor, Alexander M., Bernadett Kalmar, Linda Greensmith, a Mary M. Reilly. 2012. „The Distal Hereditary Motor Neuropathies". *Journal of Neurology, Neurosurgery & Psychiatry* 83 (1): 6–14.
- Rotin, Daniela, a Sharad Kumar. 2009. „Physiological Functions of the HECT Family of Ubiquitin Ligases". *Nature Reviews Molecular Cell Biology* 10 (6): 398–409.
- Saferali, Aabida, Jeong H. Yun, Margaret M. Parker, Phuwanat Sakornsakolpat, Robert P. Chase, Andrew Lamb, Brian D. Hobbs, et al. 2019. „Analysis of Genetically Driven Alternative Splicing Identifies FBXO38 as a Novel COPD Susceptibility Gene". *PLoS Genetics* 15 (7).
- Saitou, Mitinori, Mikio Furuse, Hiroyuki Sasaki, Jörg-Dieter Schulzke, Michael Fromm, Hiroshi Takano, Tetsuo Noda, a Shoichiro Tsukita. 2000. „Complex Phenotype of Mice Lacking Occludin, a Component of Tight Junction Strands". *Molecular Biology of the Cell* 11 (12): 4131–42.
- Sertoli, Enrico. 2018. „The Structure of Seminiferous Tubules and the Development of [Spermatids] in Rats". *Biology of Reproduction* 99 (3): 482.
- Skaar, Jeffrey R., Julia K. Pagan, a Michele Pagano. 2013. „Mechanisms and function of substrate recruitment by F-box proteins". *Nature reviews. Molecular cell biology* 14 (6).
- Skowyra, Dorota, Karen L. Craig, Mike Tyers, Stephen J. Elledge, a J. Wade Harper. 1997. „F-Box Proteins Are Receptors That Recruit Phosphorylated Substrates to the SCF Ubiquitin-Ligase Complex". *Cell* 91 (2): 209–19.

- Smaldone, Silvia, Friedrich Laub, Cindy Else, Cecilia Dragomir, a Francesco Ramirez. 2004. „Identification of MoKA, a Novel F-Box Protein That Modulates Krüppel-Like Transcription Factor 7 Activity". *Molecular and Cellular Biology* 24 (3): 1058–69.
- Smaldone, Silvia, a Francesco Ramirez. 2006. „Multiple pathways regulate intracellular shuttling of MoKA, a co-activator of transcription factor KLF7". *Nucleic Acids Research* 34 (18): 5060–68.
- Soucy, Teresa A., Peter G. Smith, Michael A. Milhollen, Allison J. Berger, James M. Gavin, Sharmila Adhikari, James E. Brownell, et al. 2009. „An Inhibitor of NEDD8-Activating Enzyme as a New Approach to Treat Cancer". *Nature* 458 (7239): 732–36.
- Striebel, Frank, Frank Imkamp, Dennis Özcelik, a Eilika Weber-Ban. 2014. „Pupylation as a Signal for Proteasomal Degradation in Bacteria". *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Cell Research, Ubiquitin-Proteasome System*, 1843 (1): 103–13.
- Sumner, Charlotte J., Constantin d'Ydewalle, Joe Wooley, Katherine A. Fawcett, Dena Hernandez, Alice R. Gardiner, Bernadett Kalmar, et al. 2013. „A Dominant Mutation in FBXO38 Causes Distal Spinal Muscular Atrophy with Calf Predominance". *American Journal of Human Genetics* 93 (5): 976–83.
- Suzuki, Hiroshi, Tomoki Chiba, Masato Kobayashi, Masahiro Takeuchi, Toshiaki Suzuki, Arata Ichiyama, Tsuneo Ikenoue, Masao Omata, Kiyoshi Furuichi, a Keiji Tanaka. 1999. „I κ B α Ubiquitination Is Catalyzed by an SCF-like Complex Containing Skp1, Cullin-1, and Two F-Box/WD40-Repeat Proteins, BTrCP1 and BTrCP2". *Biochemical and Biophysical Research Communications* 256 (1): 127–32.
- Tanaka, Keiji. 2009. „The proteasome: Overview of structure and functions". *Proceedings of the Japan Academy. Series B, Physical and Biological Sciences* 85 (1): 12–36.
- Tsutsumi, Takeya, Hiroshi Kuwabara, Takehiro Arai, Yonghong Xiao, a James A. DeCaprio. 2008. „Disruption of the Fbxw8 Gene Results in Pre- and Postnatal Growth Retardation in Mice". *Molecular and Cellular Biology* 28 (2): 743–51.
- Turk, Vito, Veronika Stoka, Olga Vasiljeva, Miha Renko, Tao Sun, Boris Turk, a Dušan Turk. 2012. „Cysteine cathepsins: From structure, function and regulation to new frontiers". *Biochimica et Biophysica Acta. Proteins and Proteomics* 1824 (1): 68–88.
- Verma, Rati, L. Aravind, Robert Oania, W. Hayes McDonald, John R. Yates, Eugene V. Koonin, a Raymond J. Deshaies. 2002. „Role of Rpn11 Metalloprotease in

- Deubiquitination and Degradation by the 26S Proteasome". *Science* 298 (5593): 611–15.
- Wang, Zhiwei, Pengda Liu, Hiroyuki Inuzuka, a Wenyi Wei. 2014. „Roles of F-box proteins in cancer". *Nature reviews. Cancer* 14 (4): 233–47.
- Wee, Claribel D., Lingling Kong, a Charlotte J. Sumner. 2010. „The genetics of spinal muscular atrophies". *Current Opinion in Neurology* 23 (5): 450.
- Wen, Qing, Elizabeth I. Tang, Wing-yeek Lui, Will M. Lee, Chris K. C. Wong, Bruno Silvestrini, a C. Yan Cheng. 2018. „Dynein 1 supports spermatid transport and spermiation during spermatogenesis in the rat testis". *American Journal of Physiology - Endocrinology and Metabolism* 315 (5): E924–48.
- Yamashita, Kentaro, Miki Shinohara, a Akira Shinohara. 2004. „Rad6-Bre1-mediated histone H2B ubiquitylation modulates the formation of double-strand breaks during meiosis". *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 101 (31): 11380–85.
- Yin, Yan, Congxing Lin, Sung Tae Kim, Ignasi Roig, Hong Chen, Liren Liu, George Michael Veith, et al. 2011. „The E3 Ubiquitin Ligase Cullin 4A Regulates Meiotic Progression in Mouse Spermatogenesis". *Developmental biology* 356 (1): 51–62.
- Yonashiro, Ryo, Satoshi Ishido, Shinkou Kyo, Toshifumi Fukuda, Eiji Goto, Yohei Matsuki, Mari Ohmura-Hoshino, et al. 2006. „A novel mitochondrial ubiquitin ligase plays a critical role in mitochondrial dynamics". *The EMBO Journal* 25 (15): 3618–26.
- Zhao, Boqiang, Kunitoshi Ito, Prasanna Vasudevan Iyengar, Shigehisa Hirose, a Nobuhiro Nakamura. 2013. „MARCH7 E3 Ubiquitin Ligase Is Highly Expressed in Developing Spermatids of Rats and Its Possible Involvement in Head and Tail Formation". *Histochemistry and Cell Biology* 139 (3): 447–60.
- Zheng, Ning, a Nitzan Shabek. 2017. „Ubiquitin Ligases: Structure, Function, and Regulation". *Annual Review of Biochemistry* 86 (1): 129–57.
- Zhou, Rui, Jingrouzi Wu, Bang Liu, Yiqun Jiang, Wei Chen, Jian Li, Quanyuan He, a Zuping He. 2019. „The Roles and Mechanisms of Leydig Cells and Myoid Cells in Regulating Spermatogenesis". *Cellular and Molecular Life Sciences* 76 (14): 2681–95.
- Zimmermann, Céline, Isabelle Stévant, Christelle Borel, Béatrice Conne, Jean-Luc Pitetti, Pierre Calvel, Henrik Kaessmann, Bernard Jégou, Frédéric Chalmel, a Serge Nef. 2015. „Research Resource: The Dynamic Transcriptional Profile of Sertoli Cells

During the Progression of Spermatogenesis". *Molecular Endocrinology* 29 (4): 627–42.

Zirkin, Barry R, a Vassilios Papadopoulos. 2018. „Leydig cells: formation, function, and regulation". *Biology of Reproduction* 99 (1): 101–11.