

**Univerzita Karlova**

**Přírodovědecká fakulta**

Studijní program: Molekulární biologie a biochemie organismů



**Nika Svobodová**

Charakterizace proteinů, jejichž degradace je nezbytně nutná pro správný průběh  
embryonální genomové aktivace u savců

Characterisation of proteins whose degradation is necessary for normal course of embryonic  
genome activation in mammals

Bakalářská práce

Školitel: Mgr. Tereza Toralová, Ph.D.

Praha, 2024

**Prohlášení:**

Prohlašuji, že jsem tuto bakalářskou práci vypracovala 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 dne 29.04.2024

Nika Svobodová

**Poděkování:**

Zdaleka největší poděkování patří mé školitelce Mgr. Tereze Toralové, Ph.D. za nekonečnou ochotu, trpělivost, pečlivost, cenné rady a čas, který mi při psaní této bakalářské práce věnovala. Také děkuji svým nejbližším za podporu, pochopení a trpělivost během celého mého studia.

## **ABSTRAKT**

Raný embryonální vývoj je řízen maternálními mRNA a proteiny, které byly nasyntetizovány během oogeneze. Klíčovým obdobím pro preimplantační vývoj je přechod od maternální kontroly vývoje k embryonální. Tento proces, známý spíše pod anglickým názvem maternal-to-zygotic transition (MZT), vyžaduje koordinovanou degradaci nahromaděných maternálních mRNA a proteinů a následnou aktivaci embryonálního genomu (EGA). Maternální mRNA jsou z embrya postupně odstraněny, degradace maternálních proteinů však zatím není příliš dobře objasněna. U savců je známo pouze několik málo proteinů, jejichž degradace je nezbytná pro správný průběh EGA. Aktivace embryonálního genomu velmi úzce souvisí s reorganizací struktury chromatinu. Spuštění genové exprese vyžaduje rozvolnění chromatinu v oblasti genu a také přítomnost příslušných transkripčních faktorů. Maternální proteiny, které je nutné degradovat pro správný průběh EGA u savců, se podílejí právě na regulaci struktury chromatinu a translokaci potřebných faktorů.

Cílem této bakalářské práce je charakterizovat vybrané proteiny (PIASy, CBX5, TAB1 a H1FOO) a popsat úlohu, kterou hrají během přechodu od maternální k embryonální kontrole vývoje. Zatímco PIASy, CBX5 a H1FOO je nutné degradovat pro rozvolnění struktury chromatinu umožňující spuštění embryonální genové exprese, degradace TAB1 je nezbytná pro translokaci transkripčního faktoru NF- $\kappa$ B do jádra a aktivaci NF- $\kappa$ B signální dráhy. Pokud nejsou tyto proteiny ve správný čas odbourány, je vývoj embryí zastaven v době EGA.

V práci jsou také stručně popsány mechanismy degradace maternálních proteinů a proces embryonální genomové aktivace. Pro pochopení celého tématu degradace maternálních proteinů během preimplantačního vývoje je zároveň potřeba stručně shrnout samotný preimplantační vývoj a jemu předcházející maturaci oocytů.

**Klíčová slova:** aktivace embryonálního genomu, degradace, maternální proteiny, preimplantační vývoj

## **ABSTRACT**

Early embryonic development is controlled by maternal mRNAs and proteins synthesized during oogenesis. A key period for preimplantation development is the transition from maternal control of development to embryonic control. This process, known as maternal-to-zygotic transition (MZT), requires the coordinated degradation of accumulated maternal mRNAs and proteins and subsequent embryonic genome activation (EGA). Maternal mRNAs are gradually removed from the embryo, but the degradation of maternal proteins is not well understood yet. In mammals, only a few proteins are known whose degradation is necessary for normal course of EGA. The activation of the embryonic genome is closely related to the reorganization of chromatin structure. The initiation of gene expression requires the loosening of chromatin at the gene region and the presence of appropriate transcription factors. Maternal proteins that need to be degraded for the normal course of EGA are involved in regulating chromatin structure and the translocation of necessary factors.

This thesis aims to characterize selected proteins (PIASy, CBX5, TAB1 and H1FOO) and describe the role they play during the transition from maternal to embryonic control of development. While PIASy, CBX5, and H1FOO need to be degraded to loosen the chromatin structure allowing the initiation of embryonic gene expression, the degradation of TAB1 is necessary for the translocation of the transcription factor NF- $\kappa$ B into the nucleus and the initiation of the NF- $\kappa$ B signaling pathway. If these proteins are not degraded at the right time, embryonic development is arrested at the time of EGA.

The work also briefly describes the mechanisms of degradation of maternal proteins and the process of embryonic genome activation. To understand the whole topic of maternal protein degradation during preimplantation development, it is also necessary to briefly summarize preimplantation development itself and the preceding oocyte maturation.

**Key words:** early embryonic development, embryonic genome activation, degradation, maternal proteins

## SEZNAM ZKRATEK

Atg5	autophagy protein 5	autofagický protein 5
ATP	adenosine triphosphate	adenosintrifosfát
CBX5	chromobox protein 5 (obdobně pro další CBX proteiny)	
CD	chromo domain	chromo doména
CDC6	cell division cycle 6	cyklus buněčného dělení 6
CSD	chromo shadow domain	chromoshadow doména
DBF4	dumbbell former 4	
dBigH1	embryonic linker histone H1 variant of <i>Drosophila melangoster</i>	embryonální varianta linkerového histonu H1 u <i>Drosophila melangoster</i>
DNA	deoxyribonucleic acid	deoxyribonukleová kyselina
EGA	embryonic genome activation	embryonální genomová aktivace
ER	endoplasmatic reticulum	endoplazmatické retikulum
FBXO30	F-box protein 30 (obdobně pro FBXO34)	
GV	germinal vesicle	zárodečný váček
GVBD	germinal vesicle breakdown	rozpad zárodečného váčku
G2	gap 2 phase	G2 fáze buněčného cyklu
HECT	homologous to the E6-AP0 carboxyl terminus	
HP1	heterochromatin protein 1	
H1FOO	H1 histone family, member O, oocyte specific	varianta linkerového histonu H1 specifická pro oocyty
H3K4	histone H3 lysine 4 (obdobně pro H3K9, H3K27, H3K36, H3K79)	4. lysin na histonu H3
H3K27ac	histone H3 lysine 27 acetylation (obdobně u H4K16ac)	acetylace 27. lysinu na histonu H3
H3K9me3	histone H3 lysine 9 trimethylation (obdobně u H3K27me3)	trimethylace 9. lysinu histonu H3
H3K9me2	histone H3 lysine 9 dimethylation	dimethylace 9. lysinu histonu 3
ICM	inner cell mass	vnitřní buněčná hmota
IκB	inhibitor of kappa B	inhibitor kappa B
LEF1	lymphoid enhancer binding factor 1	lymfoidní zesilující vazebný faktor 1

MAP3K7	mitogen activated protein kinase kinase kinase 7	mitogenem aktivovaná proteinová kináza kináza kináza 7
MBT	midblastula transition	přechod ve stádiu střední blastuly
MII	metaphase II	metafáze II
mRNA	messenger ribonucleic acid	mediátorová ribonukleová kyselina
MZT	maternal-to-zygotic transition	přechod z mateřské kontroly na zygotickou
NF-κB	nuclear factor kappa B	nukleární faktor kappa B
OBOX	oocyte-specific homeobox	oocyt-specifický homeobox
PcG proteins	Polycomb-group proteins	proteiny skupiny Polycomb
PIAS	protein inhibitor of activated STAT	proteinový inhibitor aktivovaného STAT
PIASy	protein inhibitor of activated STAT y	proteinový inhibitor aktivovaného STAT y
RBR	RING-in-between-RING	
RBX1	RING-box protein 1	
RING	really interesting new gene	opravdu zajímavý nový gen
RNF114	ring finger protein 114	
SCF	SKP1-CUL1-F-box protein	
SCMC	subcortical maternal complex	subkortikální maternální komplex
SKP1	S-phase kinase associated protein 1	protein 1 asociovaný s kinázou S-fáze
SLBP	stem-loop-binding protein	
SP-RING	Siz/PIAS RING	
STAT	signal transducer and activator of transcription	převodník signálu a aktivátor transkripce
SUMO	small ubiquitin-like modifier	malý modifikační protein podobný ubiquitinu
SUV39H1	suppressor of variegation 3-9 homolog 1	methyltransferáza specificky methylující H3K9
TAB1	TAK1 binding protein	TAK1 vazebný protein
TAK1	transforming growth factor-β-activated kinase 1	kináza aktivovaná transformujícím růstovým faktorem beta
TE	trophectoderm	trofektoderm
TGF-beta	transforming growth factor-beta	transformující růstový faktor beta
UPS	ubiquitin–proteasome systém	ubiquitin-proteazomový systém
ZNF313	zinc finger protein 313	
ZP	zona pellucida	
5mC	5-methylcytosin	

# OBSAH

<b>1. Úvod</b> .....	<b>1</b>
<b>2. Preimplantační vývoj savců</b> .....	<b>2</b>
2.1. Maturace oocytů .....	2
2.2. Od oplození po implantaci.....	2
2.3. Embryonální genomová aktivace .....	3
<b>3. Mechanismy degradace maternálních proteinů</b> .....	<b>7</b>
3.1. Ubiquitin-proteazomový systém.....	7
3.1.1. SCF ligázy.....	8
3.1.2. RNF114.....	9
3.2. Autofágie.....	9
<b>4. Charakterizace vybraných proteinů</b> .....	<b>11</b>
4.1. PIASy .....	11
4.1.1. Role PIASy v preimplantačním vývoji .....	12
4.2. CBX5.....	13
4.2.1. Role CBX5 během preimplantačního vývoje.....	14
4.3. TAB1 .....	15
4.3.1. Role TAB1 v preimplantačním vývoji .....	15
4.4. H1FOO .....	16
4.4.1. Exprese H1FOO během preimplantačního vývoje.....	17
4.4.2. Role H1FOO v preimplantačním vývoji .....	17
<b>5. Závěr</b> .....	<b>19</b>
<b>6. Seznam použité literatury</b> .....	<b>22</b>



# 1. Úvod

Embryonální vývoj představuje nesmírně složitý proces, ve kterém z jediné oplozené buňky vzniká komplexní organismus. Jednou z klíčových událostí raného embryonálního vývoje je přechod od maternální kontroly k embryonální. Tento proces je známý spíše pod anglickým názvem maternal-to-zygotic transition (MZT). Během MZT dochází k degradaci maternální mRNA a proteinů, které byly nasyntetizovány během oogeneze. Následně dochází k aktivaci embryonálního genomu (EGA), kdy embryonální geny začínají být transkribovány a přebírají kontrolu nad dalším vývojem embrya od maternálních genů. Dříve byla pozornost zaměřena spíše na degradaci maternální mRNA. V posledních letech se ale stále více zkoumá také nutnost degradace maternálních proteinů a byly identifikovány konkrétní proteiny, jejichž degradace před hlavní vlnou EGA je nezbytná pro normální průběh preimplantačního vývoje.

V této práci se zaměřím na savčí modely, které umožňují hlubší pohled na tyto procesy v kontextu, který je nejbližší člověku. Nejvíce využívaným modelem je, vzhledem ke své malé velikosti a relativně nenáročnému chovu, myš domácí. Myš domácí je preferována nejen kvůli možnosti snadných genetických úprav a krátkému reprodukčnímu cyklu, ale také kvůli rozsáhlému genetickému a biologickému pochopení, které poskytuje dobrý základ pro studium embryonálního vývoje. Dalšími využívanými savčími modely jsou skot a prasata. Skot a prasata jsou fyziologicky podobnější člověku v reprodukčních a vývojových procesech a jsou tak obzvláště cenné pro větší pochopení lidské reprodukční a vývojové biologie. Raný embryonální vývoj a degradace maternálních proteinů jsou ale mnohem více popsány u nižších organismů, především u *Drosophila melanogaster*, *Xenopus laevis* a *Danio rerio*. Proto budu ve své bakalářské práci občas využívat také data získaná na jiných než savčích modelových organismech. U obojživelníků, ryb a bezobratlých je vhodnější pro přechod od maternální k embryonální kontrole vývoje používat termín midblastula transition (MBT; česky přechod ve stádiu střední blastuly).

Tato práce si klade za cíl shrnout dosavadní znalosti o maternálních proteinech, jejichž degradace je nezbytně nutná pro správný průběh EGA. Větší pochopení degradace specifických maternálních proteinů pro úspěšný preimplantační vývoj může odhalit nové možnosti pro další výzkum a potenciální aplikace v oblasti reprodukční biologie a medicíny.

## 2. Preimplantační vývoj savců

Jako preimplantační vývoj označujeme období od oplození po vznik blastocysty, což je u savců stádium, kdy dochází k implantaci embrya do děložní sliznice. V této práci se budu stručně věnovat také maturaci oocytů, která preimplantačnímu období předchází a jejíž pochopení je pro správné porozumění tématu degradace proteinů během preimplantačního vývoje důležité.

### 2.1. Maturace oocytů

Oocyt, samičí pohlavní buňka, představuje největší buňku v těle savců. Maturace neboli zrání oocytů zahrnuje jaderné zrání a cytoplazmatické zrání.

Během jaderného zrání dochází k obnově meiózy, která pokračuje až do metafáze II. Meióza oocytu je totiž zahájena ještě před narozením jedince během embryonálního vývoje, ale je zastavena v profázi I. Oocyt je v tu chvíli ve stádiu zárodečného váčku (GV – germinal vesicle), pro které je charakteristické velké jádro obklopené jadernou membránou. S nástupem ovulace je meióza obnovena. Dochází k rozpadu jaderné membrány (GVBD – germinal vesicle breakdown) a kondenzaci chromozomů. Po sestavení dělicího vřeténka přichází první meiotické dělení. Meióza I je ukončena vydělením prvního pólového tělíska, které obsahuje druhou sadu chromozomů. Následně je zahájeno druhé meiotické dělení oocytu, které je zastaveno v metafázi II. Teprve po oplození spermií oocyt dokončí meiózu vydělením druhého pólového tělíska (shrnuto v Fan a Sun, 2019; He *et al.*, 2021; Jiang *et al.*, 2023).

Cytoplazmatické zrání oocytu začíná ještě před jaderným zráním. Během svého růstu oocyt syntetizuje a shromažďuje velké množství mRNA, proteinů a dalších molekul. Množství materiálu nahromaděného během cytoplazmatického zrání je tak velké, že oocyt zvětší 200 až 300krát svou velikost (Hyttel *et al.*, 1997). V průběhu jaderného zrání se oocyt mění v oplození schopné vajíčko, ale bez těchto maternálních faktorů není schopné dokončit svůj vývoj. Cytoplazmatické zrání je jedním z klíčových dějů určujících kvalitu oocytu a je zásadní pro začátek preimplantačního vývoje.

### 2.2. Od oplození po implantaci

Oplozením vajíčka spermií vzniká diploidní zygota, základní embryonální buňka. Následně dochází k několika mitotickým buněčným dělením (rýhování), které vedou k nárůstu počtu buněk (blastomer), zatímco celkový objem embrya zůstává stejný (Molè *et al.*, 2020). V průběhu prvních 3-4 dělení se vytvářejí volně spojené blastomery, které jsou morfologicky nerozlišitelné a mají potenciál diferencovat se do jakéhokoli typu buňky. Blastomery pak zvýší expresi adhezních molekul, konkrétně E-kadherinu, na svém povrchu, začnou se těsněji spojovat a vzájemně komunikovat (Shirayoshi, *et al.*, 1983). Dochází ke kompaktaci blastomer za vzniku moruly. Blastomery také získávají určitou míru polarizace, která je důležitá pro pozdější diferenciaci blastomer (Ducibella *et al.*, 1977; Posfai *et al.*, 2019).

Embryo se poté transformuje z moruly do struktury známé jako blastocysta, která se vyznačuje vznikem vnitřního dutého prostoru vyplněného tekutinou (blastocoel). Dochází k diferenciaci buněk na dva hlavní typy: buňky vnitřní buněčné hmoty (ICM – inner cell mass) a vnější vrstva buněk, tzv. trofektoderm (TE). Z ICM později vzniká vlastní embryo, zatímco trofektoderm se vyvine v placentu a další podpůrné struktury. Oblast, kde je ICM připojena k trofektodermu, se nazývá embryonální pól, který je rozhodujícím místem pro interakci blastocysty s endometriem (Gauster *et al.*, 2022). Časné embryo je obaleno glykoproteinovým obalem (tzv. zona pellucida; ZP), který se vytvořil již během oogeneze. Zona pellucida poskytuje embryu fyzickou ochranu před poškozením, zabraňuje předčasné implantaci ve vejcovodu a zajišťuje stabilní prostředí pro jeho vývoj. Také chrání oocyt před oplozením více než jednou spermií, tzv. polyspermie. Pro implantaci do děložní sliznice ale musí embryo ZP opustit. Tento proces se nazývá hatching. Činností vnějších buněk TE je do blastocoelu pumpována tekutina, embryo zvětšuje svůj objem a ZP se v důsledku toho ztenčuje. Buňky TE také produkují enzymy, které ZP oslabují. V důsledku mechanického tlaku a působení enzymů nakonec ZP praskne a embryo je volně v děložní dutině, kde se může implantovat do děložní sliznice a pokračovat ve svém vývoji (Ma *et al.*, 2024).

U člověka dochází k implantaci embrya kolem 7. - 8. dne po oplození (Wilcox, 1999), u myši přibližně 5. den po oplození (Paria *et al.*, 1993). U prasete implantace začíná okolo 15. dne po oplození (Tian *et al.*, 2022). Zajímavé je, že u přežvýkavců se sice blastocysta formuje přibližně 8. den po oplození, ale implantace embrya začíná až kolem 21. dne po oplození. Nedochází totiž k implantaci embrya ve stádiu kulovité blastocysty, místo toho embryo pokračuje v růstu v děloze po dobu přibližně 2 týdnů. Během tohoto období, v procesu známém jako elongace, dochází k růstu embrya a k diferenciaci extraembryonálních tkání. Embryo se postupně prodlužuje, až získá konečný vláknitý tvar a implantuje se do dělohy. Proces elongace je důležitý pro úspěšnou implantaci embrya (Degrelle *et al.*, 2024).

### **2.3. Embryonální genomová aktivace**

Po oplození je embryo transkripčně neaktivní a jeho vývoj je řízen maternálními proteiny a mRNA, které se v cytoplazmě oocyty nahromadily během cytoplazmatického zrání. Proces, během kterého je kontrola nad vývojem embrya předávána z maternálních faktorů na embryonální genom, se nazývá maternal-to-zygotic transition (MZT). MZT zahrnuje dva vzájemně propojené procesy. Zprvė dochází k degradaci maternální mRNA a proteinů, zadruhé dochází k aktivaci embryonálního genomu (EGA) (Tadros a Lipshitz, 2009). Tento složitý proces umožňuje, aby terminálně diferencované buňky, vajíčko a spermie, mohly být přeprogramovány do totipotentního stavu a vznikající organismus se mohl diferencovat do všech buněčných typů (Schulz a Harrison, 2019). Tato změna v genové expresi probíhá postupně. Menší vlna (minor wave) aktivace embryonálního genomu v raných stádiích dělení embryí vede k nízkým úrovním transkripce. Následuje hlavní vlna (major wave) EGA, která zahrnuje

rozsáhlou transkripci embryonálních genů. Načasování obou vln EGA je druhově specifické (Halstead *et al.*, 2020). U myši nastupují obě vlny relativně rychle po sobě. Menší vlna genomové aktivace přichází v pozdním 1buněčném stádiu, hlavní vlna je pak spuštěna v časném 2buněčném stádiu (Abe *et al.*, 2018). Oproti tomu u skotu je doba mezi začátkem embryonální transkripce a hlavní vlnou EGA delší. Menší vlna EGA začíná již v 2buněčném stádiu, ale k hlavní vlně dochází až v pozdním 8buněčném stádiu (Memili *et al.*, 1998).

EGA je úzce spjata s reorganizací struktury chromatinu. Přístupnost chromatinu transkripčním faktorům a dalším regulačním molekulám je regulována uspořádáním nukleozomů, což je ovlivňováno prostřednictvím různých variant histonů a posttranslačních modifikací jejich N-konců. Mezi tyto histonové posttranslační modifikace patří methylace, acetylce, fosforylace, SUMOylace nebo ubiquitinylace. Klíčové jsou zejména methylace a acetylce (shrnuto v Sotomayor-Lugo *et al.*, 2024).

Methylace může mít na genovou expresi aktivační i represivní účinek, záleží na konkrétním histonu a jeho methylovaném aminokyselinovém zbytku. Typicky aktivační jsou methylace H3K4, H3K36 a H3K79, naopak typicky represivními methylacemi jsou H3K9 nebo H3K27. Záleží také na stupni methylace. Zatímco H3K9me3 je charakteristický znak heterochromatinu, H3K9me2 se častěji vyskytuje u neaktivních nebo málo exprimovaných genů v euchromatinu (shrnuto v Jambhekar *et al.*, 2019). Mezi živočišnými druhy se dynamika methylace histonů během EGA liší. V pozdější části práce bude rozebráno, jak maternální proteiny PIASy a CBX5 ovlivňují správný průběh EGA právě trimethylací H3K9.

Acetylce histonů rozvolňuje chromatin a podporuje tak jeho transkripci. Míra acetylce lysinu H3K27 se zvyšuje od oocyty až po EGA u více živočichů (myš, *Drosophila melanogaster*, *Danio rerio* i člověk). H3K27ac (acetylovaný H3K27) se zdá být společným rysem EGA napříč organismy (shrnuto v Sotomayor-Lugo *et al.*, 2024; Schulz a Harrison, 2019).

Struktura chromatinu je také ovlivňována výměnou histonů za jejich jiné varianty. Varianta histonu H3.3 je klíčový maternální faktor pro přestavbu obou rodičovských genomů během raných fází embryonálního vývoje (Wen *et al.*, 2014). U *Drosophila melanogaster* je pro reorganizaci chromatinu během EGA důležitá histonová varianta H2A.Z. Vzhledem k vysoké evoluční konzervovanosti této varianty histonu mezi živočichy lze předpokládat, že by tento histon mohl mít významnou roli během EGA také u savců (Ibarra-Morales *et al.*, 2021). Dále je zkoumána důležitost výměny linkerového histonu specifického pro oocyty H1FOO. Role H1FOO během časného preimplantačního vývoje bude podrobněji popsána v pozdější části této práce.

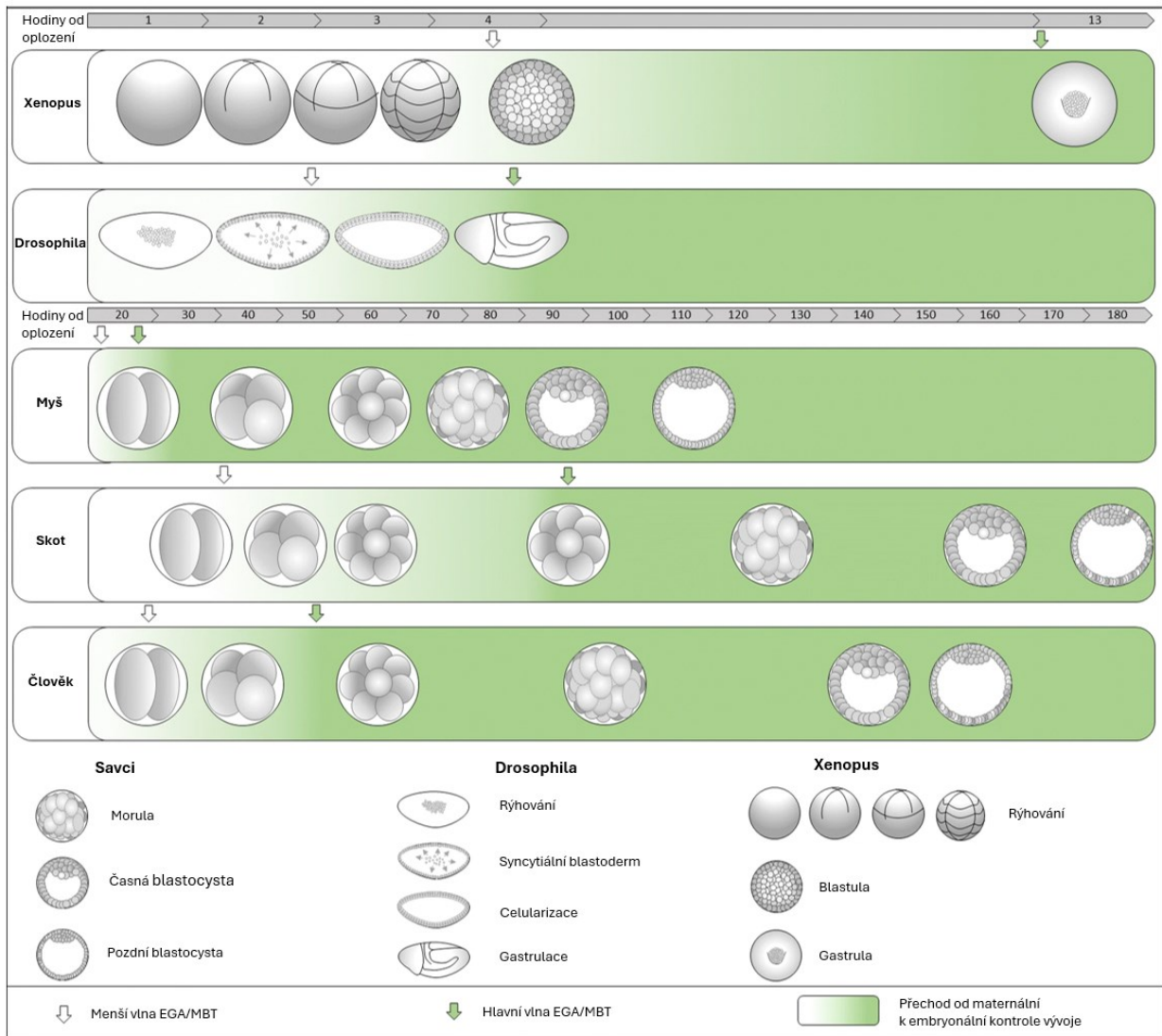
Další důležitý mechanismus epigenetické regulace u savců je methylace DNA, především methylace pátého uhlíku cytosinu (5mC). Somatické buňky mají vysokou úroveň 5mC, vajíčka a spermie mají mírnou až střední metylaci DNA. Embrya v raných stádiích procházejí rozsáhlou globální demethylací DNA od zygoty až po blastocystu, než je methylace DNA znovu obnovena během gastrulace (Eckersley-Maslin *et al.*, 2018).

Jak funguje načasování a přesný mechanismus spuštění EGA není ještě plně prozkoumáno. Zdá se ale, že načasování EGA je regulováno více mechanismy. Jedním z nich je působení maternálně dodaných represorů, které brání transkripci v raných fázích embrya. S každým dělením buňky, kdy se zvyšuje poměr genetického materiálu vůči cytoplazmě (N:C ratio), dochází k postupnému vyčerpání tohoto represoru. Jakmile jeho koncentrace klesne pod určitou hranici, začíná embryonální transkripce. Například u *Danio rerio* jsou tímto represorem core histony. Po oplození je v embryu nahromaděn velký přebytek nevázaných histonů. S narůstajícím množstvím DNA se zvyšuje potřeba nukleozomů a volné histony jsou postupně vyčerpávány. Transkripce začíná až ve chvíli, kdy koncentrace histonů nevázaných na DNA klesne a transkripční faktory získají přístup k DNA. Pro přechod od represe genové exprese k její aktivaci je zásadní změna v relativních koncentracích volných histonů a transkripčních faktorů, ve prospěch těchto faktorů (Joseph *et al.*, 2017).

Naopak, aktivace některých genů závisí na hromadění klíčového transkripčního aktivátoru, který se akumuluje díky translaci maternálně dodané mRNA. Ve chvíli, kdy je tohoto aktivátoru nasyntetizováno dostatečné množství, aktivátor spustí transkripci cílového genu. U myši je jedním z takových transkripčních aktivátorů regulujících EGA rodina transkripčních faktorů OBOX (oocyte-specific homeobox). OBOX pomáhají překonfigurovat polymerázu II. Ta se z původních cílů v jednobuněčném stádiu přemísťuje na promotory genů EGA, a to vede k jejich aktivaci. OBOX také působí na rozvolnění chromatinu v těchto místech. Vývoj OBOX deficientních myších embryí byl zastaven ve dvoubuněčném stádiu (v době EGA). OBOX tak hraje zásadní roli při aktivaci klíčových embryonálních genů (Ji *et al.*, 2023).

Pro průběh EGA je také důležité zpomalení buněčného cyklu, kdy je po sérii rychlých dělení zavedena G2 fáze, což dává více času na transkripci. Zpomalení buněčného cyklu je koordinováno spolu s hlavní vlnou EGA a společně umožňují, aby se v raném embryu spustila transkripce embryonálního genomu (Schulz a Harrison, 2019).

Načasování EGA se výrazně liší mezi živočichy, ale v rámci jednoho druhu je načasování přísně kontrolováno. U rychle se vyvíjejících druhů, jako je *Drosophila melanogaster* nebo *Xenopus laevis*, dochází k EGA a následně ke gastrulaci jen pár hodin po oplození. Například u *Xenopus laevis* dochází k prvnímu buněčnému dělení již 90 minut po oplození, po kterém následuje 11 dalších dělení každých 30 minut. Oproti tomu buněčný cyklus embrya savců trvá mnohem déle. K prvnímu dělení dochází 18-36 hodin po oplození a další dělení následují každých 12-24 hodin (Jukam *et al.*, 2017). K hlavní vlně embryonální genomové aktivace u myši dochází v 2buněčném stádiu, u lidí, skotu a prasat k aktivaci dochází o něco později, ve stádiu 4 až 8 buněk (Graf *et al.*, 2014; Zhai *et al.*, 2022). S ohledem na dobu od oplození dochází k EGA u savců mnohem později než u *Xenopus laevis* a *Drosophila melanogaster*, ale vzhledem ke stádiu vývoje je to naopak. V době EGA jsou embrya *Drosophila melanogaster* i *Xenopus laevis* vývojově mnohem dále než embrya savců (Obrázek 1).



**Obrázek 1:** Porovnání načasování menší a hlavní vlny EGA/MBT mezi rychle se vyvíjejícími druhy (*Drosophila melanogaster* a *Xenopus laevis*) a vybranými savci (myš, skot, člověk) s ohledem na počet hodin, které uběhly od oplození a stádium vývoje. (Převzato z: Toralova *et al.*, 2020; přeloženo.)

### 3. Mechanismy degradace maternálních proteinů

Raný embryonální vývoj je řízen maternálními faktory, mezi které patří především mRNA a proteiny syntetizované v průběhu oogeneze a uchovávané v cytoplazmě oocytů. Tyto maternální faktory je nutné po oplození degradovat, aby mohlo dojít k přechodu od oocytu k embryu a následné aktivaci embryonálního genomu. V minulosti byla pozornost věnována degradaci maternálních mRNA, v posledních letech se zájem rozšiřuje také na potřebu degradace maternálních proteinů. Zatímco degradace mRNA je všeobecný proces, degradace maternálních proteinů je řízena spíše individuálně. Velmi důležité je také přesné načasování degradace jednotlivých proteinů. (Toralova *et al.*, 2020). Přestože mechanismy degradace maternálních proteinů během preimplantačního vývoje nejsou zcela prozkoumány, za zásadní jsou považovány dráhy ubiquitin-proteazomového systému a autofágie (Tsukamoto a Tatsumi, 2018).

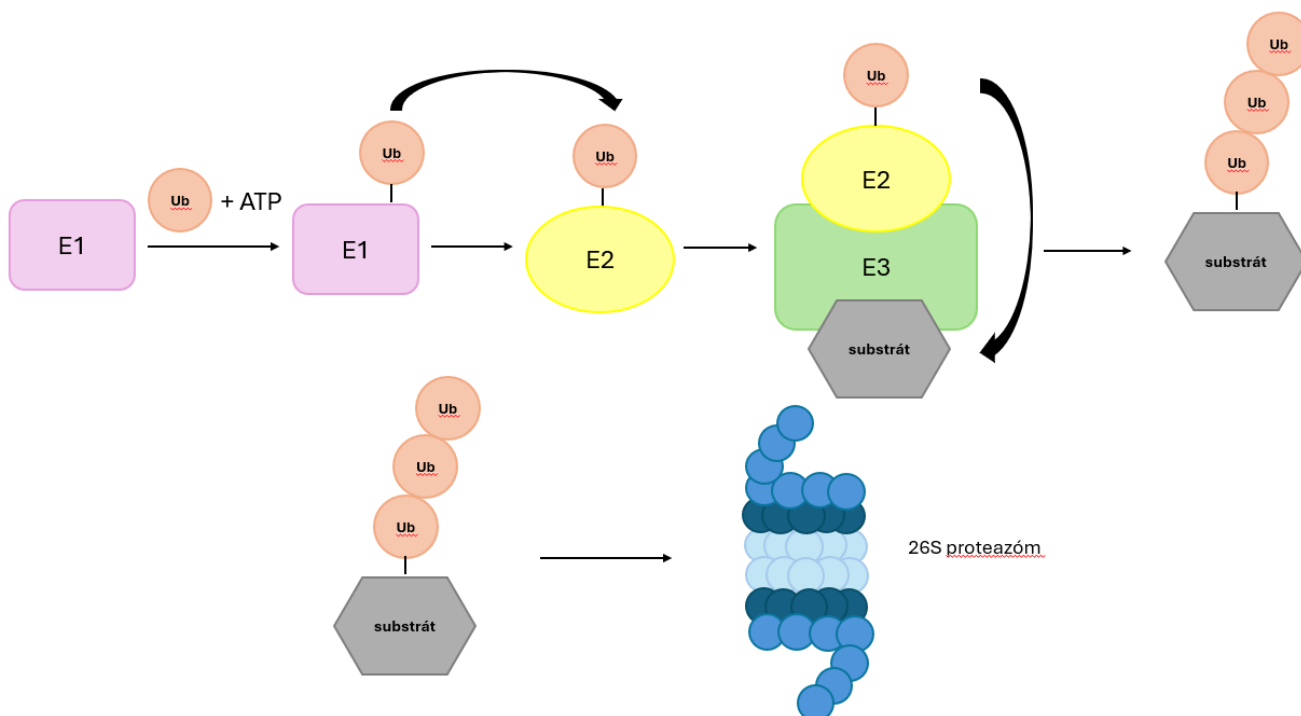
#### 3.1. Ubiquitin-proteazomový systém

Ubiquitin-proteazomový systém (UPS) je klíčový mechanismus používaný buňkami nejen při degradaci maternálních proteinů. Degradací specifických proteinů se podílí také na regulaci buněčného cyklu, opravách DNA, odpovědi na stres, regulaci transkripce, imunitní odpovědi a celé řadě dalších buněčných procesů (Glickman a Ciechanover, 2002).

Degradace proteinů pomocí UPS je založená na procesu zvaném ubiquitylaci. Ubiquitin je malý regulační protein, který se kovalentně váže na lysinové zbytky cílových proteinů. Vazba ubiquitinu na cílový protein je zprostředkována třemi enzymatickými komplexy: ubiquitin-aktivující enzym E1, ubiquitin-konjugující enzym E2 a ubiquitin-ligáza E3. Enzym E1 aktivuje ubiquitin za použití ATP. Aktivovaný ubiquitin je potom přemístěn na thiolovou skupinu enzymu E2. Na tento komplex se poté připojí E3 ligáza, která specificky rozpoznává substrát a zprostředkovává interakci mezi ubiquitinem a substrátem. Ubiquitin je pak přemístěn z enzymu E2 na cílový protein (Obrázek 2). U lidí jsou známy 2 E1 enzymy, přibližně 70 E2 enzymů a kolem 700 E3 ligáz (Park *et al.*, 2020). Právě početné množství různých E3 ligáz umožňuje specifickou degradaci velkého množství proteinů. Teprve po připojení více molekul ubiquitinu (tzv. polyubiquitylace) k substrátu dojde k rozpoznání substrátu 26S proteazomem a dojde k jeho degradaci (shrnuto v Glickman a Ciechanover, 2002; Fuchs, 2005; Kinterová *et al.*, 2022).

E3 ligázy se dělí na tři hlavní skupiny na základě charakteristických domén a mechanismů přenosu ubiquitinu: RING E3 ligázy, které přímo přenášejí ubiquitin na substrát, HECT E3 ligázy, které se účastní přenosu ubiquitinu prostřednictvím meziprojektu, a RBR E3 ligázy, jež kombinují charakteristiky obou předchozích skupin (Zheng a Shabek, 2017).

V následujících odstavcích se zaměřím na E3 ligázy, jejichž roli během preimplantačního vývoje savců považuji za zásadní (SCF komplex, RNF114), a to kvůli jejich expresi během preimplantačního vývoje a substrátové specifčnosti.



**Obrázek 2.** Ubiquitinylace – aktivaci a vazbu ubiquitinu zprostředkovávají 3 enzymatické komplexy – E1, E2 a E3. Když je substrát polyubiquitinylován, dojde k jeho degradaci 26S proteazomem. (vlastní zpracování)

### 3.1.1. SCF ligázy

Komplex SCF je E3 ubiquitin ligáza, která je tvořena Cullinem1, SKP1 (S-phase kinase associated protein 1), RBX1 (RING-box protein 1) a F-box proteinem. F-box určuje specifčnost komplexu vůči substrátu (Skowrya *et al.*, 1997). Velká rozmanitost F-box proteinů zajišťuje interakci se širokou škálou substrátů. V myších oocytech a embryích jsou SCF komplexy velmi hojné a jsou aktivní po celou dobu preimplantačního vývoje. Inhibice aktivity SCF ligáz navíc způsobuje zvýšení celkové hladiny proteinů (Kinterova, 2019). Tyto poznatky naznačují, že SCF ligázy se pravděpodobně významně podílejí na degradaci maternálních proteinů během preimplantačního vývoje (shrnutí v Toralova *et al.*, 2020).

SCF ligázy jsou během maturace oocytů u myši velmi důležité. Například byl nalezen protein FBXO30, člen F-box proteinů, který se hojně nachází v myších oocytech, ale jeho množství klesá po metafázi I. Substrátem FBXO30 je protein SLBP (stem-loop-binding protein), který se váže na histonovou mRNA. Při depleci FBXO30 dochází k nedostatečné degradaci SLBP, a to vede k nadměrné produkci histonu H3. Následkem toho je zvýšená kondenzace chromozomů a selhání jejich segregace. Vývoj oocytu je pak zastaven v metafázi I (Jin *et al.*, 2019). Další F-box protein, FBXO34, zase reguluje přechod G2/M a vstup do anafáze v meiotických oocytech (Zhao *et al.*, 2021).

V poslední době je zkoumána také role SCF ligáz během časně embryogeneze savců. Studie exprese mRNA a proteinů základních složek komplexu SCF (Cullin 1, SKP1 a RBX1) u embryí skotu ukazuje, že všechny tyto složky jsou důležité pro normální preimplantační vývoj skotu



(Benesova *et al.*, 2017). Inhibice SCF komplexu u embryí skotu mezi 4buněčným a 8buněčným stádiem způsobila statisticky významné zpoždění v jejich vývoji, ačkoli některá z embryí i přesto byla později schopná dosáhnout blastocysty (Kinterova, 2019).

Zdá se, že ligázy SCF jsou potřebné ve všech fázích vývoje, od vzniku oocyty přes oplození, aktivaci embryonálního genomu až po implantaci embrya.

### 3.1.2. RNF114

Protein RNF114 (ring finger protein 114), známý také jako ZNF313 (zinc finger protein 313) patří mezi RING E3 ligázy. Hraje klíčovou roli v regulaci buněčného cyklu, diferenciaci a senescenci (Han *et al.*, 2013; Rodriguez *et al.*, 2014). U myši je RNF114 exprimován převážně v oocytech a raných embryích (především od GV po blastocystu) a je celkově jedním z nejhojněji exprimovaných proteinů v pozdní fázi zrání oocytů (Zhang *et al.*, 2009; Yang *et al.*, 2017). RNF114 hraje zásadní roli v raném embryonálním vývoji myši prostřednictvím degradace proteinu TAB1 a CBX5. To napovídá, že RNF114 má pravděpodobně širší roli v regulaci degradace proteinů během preimplantačního vývoje. Inhibice RNF114 způsobuje zastavení vývoje myších embryí v 2buněčném stádiu.

Yang a spol. studovali více než 9000 proteinů, z nichž do podrobnější studie vybrali 13 kandidátů a jako substrát RNF114 identifikovali pouze protein TAB1, jehož degradace je nezbytná pro správný průběh EGA. To naznačuje, že pro zahájení EGA je důležitá spíše specifická degradace jednotlivých proteinů než hromadná degradace všech maternálních proteinů (Yang *et al.*, 2017). Degradace proteinů TAB1 a CBX5 během preimplantačního vývoje myších embryí bude podrobněji popsána v kapitole Charakterizace vybraných proteinů.

## 3.2. Autofágie

Autofágie je buněčný proces, který umožňuje masivní degradaci cytoplazmatických komponent, jako jsou proteiny a organely, prostřednictvím lyzozomu. Proces začíná tvorbou izolační membrány, která se rozvíjí do struktury zvané autofagozom, pohlcující cytoplazmatické komponenty. Autofagozom se poté spojí s lyzozomem a vytvoří autolyzozom. V autolyzozomu jsou izolované cytoplazmatické komponenty degradovány lyzozomálními enzymy (Obrázek 3). Proteiny a lipidy jsou degradovány na aminokyseliny a mastné kyseliny, a produkty degradace mohou být v buňce znovu využity. Tento proces je klíčový pro buněčnou homeostázu a ovlivňuje řadu fyziologických procesů buňky, včetně reakce na hladovění, potlačení tumorů, odpovědi na infekce, stárnutí a buněčnou smrt (shrnutí v Mizushima, 2007; Tsukamoto a Tatsumi, 2018).

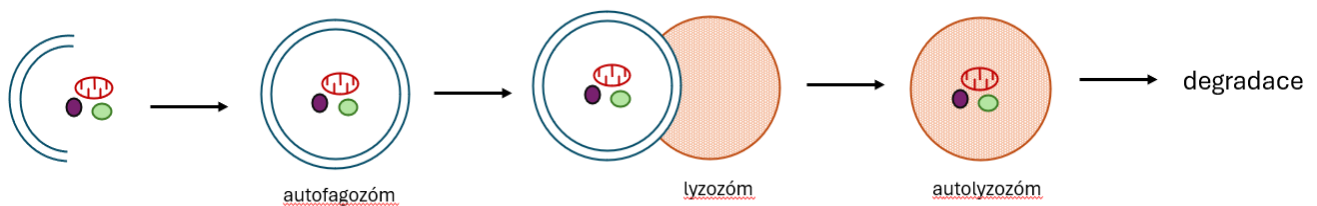
Autofágie má pro preimplantační vývoj myších embryí zásadní význam. Oocyty s knock-outem genu *Atg5* (esenciální protein pro tvorbu autofagozomu) se po oplození spermiemi se stejnou genetickou modifikací nevyvíjely dále než do 4 až 8buněčného stádia. Naopak, oplození stejných oocytů spermiemi bez této genetické modifikace vedlo k normálnímu vývoji embryí. Tento výsledek

poukazuje na kritickou roli autofágie v časných stádiích embryonálního vývoje. Autofágie je v myších oocytech aktivována ihned po oplození a je aktivní do pozdního 1buněčného stádia. Je znovu reaktivována v 2buněčném stádiu a zůstává aktivní až do 8buněčného stádia (Tsukamoto *et al.*, 2008).

Autofágie hraje klíčovou roli také v raném vývoji embryí prasat, konkrétně tím, že ovlivňuje aktivaci embryonálního genomu prostřednictvím degradace maternální mRNA a regulace epigenetických modifikací (regulací exprese DNA methyltransferázy). V prasečích embryích je autofágie aktivní především v 2buněčném stádiu (Chi *et al.*, 2017).

Studie na bovinních embryích ukázala vztah mezi autofágií a stresem endoplazmatického retikula (ER) během raného vývoje embryí skotu. Stres ER je způsoben hromaděním špatně sbalených proteinů a může vést až k buněčné smrti (Xu, 2005). Indukce autofágie tento stres ER snížila a zlepšila tím kvalitu embryí, což se projevilo růstem blastocyst, zvýšením počtu buněk trofoektodermu a zlepšením přežití blastomer. Naopak, inhibice nebo nadměrná indukce autofágie tyto parametry snížila. Správná regulace autofágie a stresu ER je důležitá pro optimální vývoj embryí (Song *et al.*, 2012).

Z dostupných výzkumů na myších, prasečích i kravských embryích se celkově zdá, že vyšší míra autofágie koreluje s vyšší kvalitou embryí (Toralova *et al.*, 2020).



**Obrázek 3.** Autofágie – cytoplazmatické komponenty jsou obklopeny dvojitou membránou za vzniku autofagozomu, který později splyne s lyzozomem za vzniku autolyzozomu. V autolyzozomu dojde k degradaci cytoplazmatických komponent lyzozomálními enzymy. (vlastní zpracování)

Pro úspěšný preimplantační vývoj savců je klíčové udržet rovnováhu mezi degradací maternálních proteinů a tvorbou nových proteinů syntetizovaných z embryonálního genomu. Ubiquitin-proteazomový systém a autofágie spolupracují na udržení této rovnováhy. UPS je vysoce selektivní dráha degradace proteinů. Autofágie je spíše nespecifický a více masivní proces degradace proteinů, čímž mimo jiné zajišťuje suroviny a živiny pro následný vývoj embrya. Autofágie také doplňuje UPS degradací proteinů, které nebyly plně degradovány proteazomem (Tsukamoto a Tatsumi, 2018). Správná degradace maternálních proteinů je zásadní po celou dobu preimplantačního vývoje embryí savců, a to již při maturaci oocytů až po EGA.

## 4. Charakterizace vybraných proteinů

Embryo vzniká splynutím oocyty a spermie, dvou terminálně diferencovaných buněk, které ale musí být schopné později vytvářet všechny buněčné typy. Proces přeměny oocyty v totipotentní zygotu je velmi složitý. Degradace specifických maternálních proteinů patří ke klíčovým událostem umožňující aktivaci embryonálního genomu a úspěšný vývoj embrya. EGA úzce souvisí s remodelací chromatinu. Maternální proteiny, které je nutno degradovat pro správný průběh EGA, tak regulují genovou expresi změnou struktury chromatinu či translokací transkripčních faktorů. Jejich cílená degradace umožňuje remodelaci chromatinu, změnu v genové expresi a přechod kontroly vývoje z maternálních genů na embryonální geny. Jak již ale bylo dříve zmíněno, degradace maternálních proteinů nutných k EGA není příliš prozkoumána. U savců zatím bylo identifikováno jen málo takových proteinů.

Ne všechny maternální proteiny jsou ale degradované před EGA, některé si embryo během preimplantačního vývoje uchovává. Příkladem je proteinový komplex SCMC (subcortical maternal complex), který je v myších embryích nezbytný již pro první dělení embrya. V myších oocytech jsou geny kódující složky tohoto komplexu exprimovány během oogeneze, ale již v průběhu meiotického zrání je mRNA degradována. Nahromaděné proteiny však přetrvávají až do stádia blastocysty (Li *et al.*, 2008).

V následující části této práce se zaměřím na charakterizaci čtyř proteinů – PIASy, CBX5, TAB1 a H1FOO, jejichž degradace hraje zásadní roli v procesu embryonální genomové aktivace u savců. Prostřednictvím zkoumání jejich struktury, funkce, role a degradace v embryonálním vývoji můžeme lépe pochopit, jak tyto proteiny ovlivňují klíčové události v raném vývoji savčích embryí.

### 4.1. PIASy

PIASy neboli protein inhibitor of activated STAT y patří do rodiny PIAS proteinů. U savců byly popsány 4 členy této rodiny proteinů: PIAS1, PIAS3, PIASx (také PIAS2) a PIASy (známý také jako PIAS4). PIAS proteiny jsou vzájemně sekvenčně velmi konzervované, mají podobnou strukturu i funkci. Tyto proteiny byly pojmenovány díky své schopnosti vázat se na transkripční faktory STAT (signal transducer and activator of transcription) (Chung, 1997). STAT faktory jsou důležité pro přenos signálů z buněčného povrchu do jádra buňky, kde ovlivňují regulaci genů. PIAS proteiny se na tyto faktory vážou, blokují tím jejich vazbu na DNA a ovlivňují tak regulaci transkripce genů (shrnutí v Calò *et al.*, 2003). Proteiny PIAS neinteragují pouze se STAT faktory, ale také s řadou dalších významných transkripčních faktorů, jako jsou NF- $\kappa$ B jaderný faktor, protein p53 či LEF1 (lymphoid enhancer binding factor 1) (Kahyo *et al.*, 2001; Sachdev *et al.*, 2001; Liu *et al.*, 2005). V závislosti na tom, o jaký PIAS a cílový protein se jedná, může dojít k aktivaci či represí transkripce.

O další funkční roli PIAS proteinů vypovídá jejich Siz/PIAS RING (SP-RING) doména, která je příbuzná RING finger doméně, nacházející se také u některých E3 ubiquitin ligáz (například u již

zmiňované RNF114). Toto pozorování spolu s jejich častou asociací s proteiny modifikovanými SUMO (small ubiquitin-like modifier) vedlo ke zjištění, že PIAS proteiny fungují jako E3 ligázy v procesu zvaném SUMOylace. Proces SUMOylace je velmi podobný ubiquitylaci, jejíž průběh jsem popsala v dřívější části této práce. SUMO je malý protein, který je strukturně podobný ubiquitinu. Stejně jako ubiquitin je protein SUMO kovalentně konjugován s cílovým substrátem enzymatickou kaskádou zahrnující E1 aktivační enzym, E2 konjugační enzym a E3 ligázu. SUMO vytváří vazbu s lysinovými zbytky cílových proteinů. SUMOylace patří mezi významné posttranslační modifikace a je zásadní pro regulaci mnoha buněčných procesů jako je transkripce, segregace chromozomů, remodelace chromatinu nebo oprava DNA. Dále také ovlivňuje lokalizaci proteinů a mění jejich interakce (shrnuje v Sharrocks, 2006; Gareau a Lima, 2010).

#### 4.1.1. Role PIASy v preimplantačním vývoji

Již dříve byl prokázán vliv PIAS proteinů na embryonální vývoj různých živočichů. U žaby *Xenopus laevis* hrají PIAS důležitou roli v indukci a formování mesodermu během raného vývoje (Burn *et al.*, 2011). U *Drosophila melanogaster* vede delece PIAS k abnormalitám ve struktuře, kondenzaci a segregaci chromozomů a způsobuje embryonální letalitu (Betz *et al.*, 2001; Hari *et al.*, 2001). Umlčení orthologa PIAS proteinu u háďátka *C. elegans* vedlo k defektům ve vývoji hltanu a poškození embryonálního růstu (Holway *et al.*, 2006). Tyto poznatky naznačují, že PIAS regulují klíčové procesy během vývoje živočichů napříč druhy. Proteiny PIAS jsou velmi konzervované mezi živočišnými druhy (PIAS *Xenopus laevis* jsou více než z 70% identické se savčími). To vede k myšlence, že by PIAS proteiny mohly mít velký vliv také v embryogenezi savců (Burn *et al.*, 2011).

Higuchi a spol. identifikovali PIASy jako protein, jehož degradace je nutná pro správný preimplantační vývoj myších embryí. Zjistili, že overexprese proteinu PIASy způsobuje abnormální segregaci chromozomů a poškozuje časnou embryonální transkripci. Všechny tyto defekty jsou s největší pravděpodobností způsobeny narušením SUMOylační dráhy (Higuchi *et al.*, 2019).

Maternální protein PIASy se v myších oocytech hromadí během jejich zrání. Po oplození je postupně degradován ubiquitin-proteazomovým systémem. Je exprimován až do stádia 8 buněk, ale ihned po oplození dochází k významnému poklesu v jeho množství. K obdobnému poklesu ihned po fertilizaci dochází také u kravských a prasečích embryí (Kinterova *et al.*, v přípravě). Nedostatečná degradace PIASy v oplozených myších oocytech vede k zastavení jejich vývoje ve dvoubuněčném stádiu (Higuchi *et al.*, 2019). U myších embryí dochází k EGA právě ve stádiu 2 buněk.

PIASy svojí SUMOylační aktivitou ovlivňuje translokaci methyltransferázy SUV39H1 do jádra. Nadměrná exprese PIASy vede k akumulaci této methyltransferázy v jádře a v důsledku toho dochází ke zvýšené trimethylaci lysinu 9 histonu H3 (H3K9me3) (Higuchi *et al.*, 2019). H3K9me3 je posttranslační modifikace histonů typická pro heterochromatin. Heterochromatin je kondenzovaná forma chromatinu, která je transkripčně neaktivní. H3K9me3 má podstatnou roli v modulaci chromatinu, genové regulaci a určování identity buňky (shrnuje v Nicetto a Zaret, 2019). Zvýšení

H3K9me3 vede k nadměrné kondenzaci chromatinu a abnormální genové expresi u dvoubuněčných embryí. Overexprese PIASy narušuje aktivaci časných embryonálních transkriptů během MZT a znemožňuje EGA. V důsledku toho dochází k zastavení vývoje myšího embrya ve dvoubuněčném stádiu (Higuchi *et al.*, 2019).

PIASy hraje klíčovou roli v SUMOylaci topoizomeráz. Topoizomerázy jsou základní enzymy, které mění topologii DNA. Topoizomeráza II umí za spotřeby ATP štěpit obě vlákna dvoušroubovice DNA a je tak nezbytná pro správnou topologii chromozomů k jejich replikaci, transkripci, kondenzaci a segregaci. V rámci studií na myších embryích bylo zjištěno, že inhibice topoizomerázy II má za následek zastavení vývoje embrya ve dvoubuněčném stádiu. Blokace topoizomerázy II má nepříznivý dopad na organizaci chromatinu v jádře a následné procesy buněčného dělení. Embrya, u kterých byla topoizomeráza II inhibována, rovněž vykazovala neporušenou strukturu jaderné lamely, což vedlo k zastavení buněk v interfázi. Funkční topoizomeráza II je klíčovým komponentem jádra, který hraje zásadní roli při replikaci DNA v raných fázích buněčného cyklu (St. Pierre *et al.*, 2002). Overexprese PIASy vede k nadměrné SUMOylaci topoizomerázy II, která blokuje její dekatenační aktivitu (tj. oddělení propletených molekul DNA), a tím způsobuje zástavu vývoje myších embryí (Higuchi *et al.*, 2019).

PIAS proteiny jsou důležité pro řadu buněčných procesů včetně regulace posttranslačních modifikací, transkripce a buněčné signalizace. Tyto proteiny jsou rovněž klíčové během raného embryonálního vývoje napříč druhy. U myších embryí je však degradace maternálně exprimovaného proteinu PIASy nezbytná pro regulaci transkripce časných embryonálních transkriptů (menší vlna EGA). Jeho overexprese vede k nadměrné kondenzaci chromatinu (nárůstem H3K9me3) a narušuje správnou segregaci chromozomů (blokací topoizomerázy II), což vede k zástavě vývoje v 2buněčném stádiu. Vzhledem k tomu, že u skotu a prasat, stejně jako u myší, dochází po fertilizaci k poklesu PIASy, lze předpokládat, že overexprese PIASy má obdobnou funkci také u dalších savčích druhů a že jeho degradace je nutná pro regulaci transkripce časně exprimovaných genů i u bovinních a prasečích embryí.

## 4.2. CBX5

Protein CBX5 (chromobox protein 5) je členem rodiny chromobox proteinů. Chromobox proteiny jsou díky své schopnosti vázat se na heterochromatin důležité epigenetické regulátory a jsou klíčové pro mnoho buněčných procesů jako je diferenciaci či senescence, ale také pro embryonální vývoj a regulaci genové exprese. CBX proteiny hrají u lidí významnou roli v růstu nádorů. Mohou mít jak pronádorovou, tak také protinádorovou aktivitu v závislosti na typu nádoru a buněčném kontextu (Zhu *et al.*, 2021).

Lidský i myší genom kóduje nejméně osm chromobox proteinů. Tyto proteiny mohou být rozděleny do dvou hlavních skupin. První skupinou jsou PcG proteiny (Polycomb-group proteins),

kteří zahrnují CBX2, CBX4, CBX6, CBX7 a CBX8. Druhou skupinou jsou HP1 proteiny (heterochromatin protein 1), kam patří mimo jiné protein CBX5 (Wotton a Merrill, 2007). HP1 proteiny jsou vysoce konzervované napříč druhy. Poprvé byly popsány u octomilky (*Drosophila melanogaster*) (James a Elgin, 1986). U savců existují tři různé izoformy HP1 proteinů: CBX5 (HP1 $\alpha$ ), CBX1 (HP1 $\beta$ ) a CBX3 (HP1 $\gamma$ ) (Singh *et al.*, 1991; Minc *et al.*, 1999).

CBX5 má dvě hlavní funkční domény. Na N-konci obsahuje chromo doménu (CD), pomocí které se váže na H3K9me3 (případně H3K9me2), charakteristické znače konstitutivního heterochromatinu. Na C-konci proteinu se nachází chromoshadow doména (CSD), která je zodpovědná za homodimerizaci a interakci s dalšími nehistonovými proteiny (Machida *et al.*, 2018). Právě tato schopnost dimerizace je zásadní pro kondenzaci heterochromatinu. Díky tomu se mohou proteiny CBX5 spojit a přiblížit tím dva nukleozomy, což vede k vyššímu stupni kondenzace chromatinu a k umlčení genové transkripce. Nedostatečná hladina CBX5 je spojena se špatnou morfologií jádra (Strom *et al.*, 2021). CBX5 hraje klíčovou roli v organizaci heterochromatinu a v epigenetické regulaci genové exprese (shrnutí v Kumar a Kono, 2020).

Schopnost CBX5 rozpoznávat methylovou značku H3K9me3 z něj činí tzv. methylreader. CBX5 není jen čtečkou těchto značek, ale reguluje celou dynamiku methylace H3K9, a tím ovlivňuje organizaci heterochromatinu během vývoje savců. Narušení regulace H3K9me3 je také spojováno s poruchami buněčných procesů, jako je buněčné dělení, senescence nebo autofágie a může vést až ke vzniku rakoviny (Saha a Muntean, 2021). Zvýšená exprese CBX5 má za následek zvýšenou expresi SUV39H1, která vytváří další H3K9me3 značky, na které se CBX5 může vázat. CBX5 a SUV39H1 tak spolupracují na tvorbě a šíření heterochromatinu (Maeda a Tachibana, 2022). Tato interakce umožňující vytvoření a šíření heterochromatinu je také ovlivňována proteinem PIASy, který byl zmíněn v předchozí kapitole. PIASy svojí SUMOylační aktivitou zvyšuje výskyt SUV39H1 v jádře, což vede k nárůstu H3K9me3 a CBX5.

#### **4.2.1. Role CBX5 během preimplantačního vývoje**

Expresce CBX5 během preimplantačního vývoje byla pozorována na myších embryích. V průběhu zrání oocytů je exprese CBX5 vysoká. Po oplodnění však hladina CBX5 rychle klesá a jeho hladina se začne opět zvyšovat až po implantaci embrya (Wongtawan *et al.*, 2011).

CBX5 je degradován ubiquitin-proteazomovým systémem. Jeho ubiquitylaci a degradaci reguluje E3 ligáza RNF114 (Zhou *et al.*, 2021). Degradace CBX5 je zásadní pro řadu molekulárních a buněčných procesů, které jsou kritické pro preimplantační vývoj myších embryí. Overexpresce CBX5 byla spojena se zastavením embryonálního vývoje a inhibicí hlavní vlny EGA, což zdůrazňuje důležitost regulované hladiny CBX5 pro správný preimplantační vývoj. Degradace CBX5 umožňuje transkripci genů klíčových během EGA. Naopak overexpresce CBX5 znemožňuje transkripci těchto genů kvůli jeho vazbě na H3K9me3 a následné kondenzaci chromatinu, který se tak stává transkripčně neaktivní. Správná organizace chromatinu je klíčová pro aktivaci embryonálních transkriptů.

### 4.3. TAB1

TAB1 (TAK1 binding protein) je regulátor důležité kinázy MAP3K7/TAK1. Na C-koncové části proteinu obsahuje specifickou doménu pro aktivaci enzymu TAK1 (transforming growth factor- $\beta$ -activated kinase 1; nazývaný též mitogen activated protein kinase kinase kinase 7, MAP3K7). N-koncová část slouží jako dominantně negativní inhibitor TGF- $\beta$ . TAK1 reguluje transkripční faktor NF- $\kappa$ B (nuclear factor kappa B) (Yang *et al.*, 2017). NF- $\kappa$ B signální dráha je evolučně konzervovaná napříč druhy od *Drosophila melanogaster* po člověka a nachází se téměř ve všech buněčných typech. NF- $\kappa$ B hraje zásadní roli v imunitní a zánětlivé odpovědi, proliferaci buněk a metabolické regulaci. Poškození této dráhy způsobuje autoimunitní onemocnění, chronické záněty, ale také defekty ve vývoji. NF- $\kappa$ B signální dráha je důležitá pro úspěšný embryonální vývoj savců i nižších organismů. Je zásadní například pro vývoj orgánů jako jsou plíce či játra, neurální trubice, končetin, svalů, ale také pro vznik hematopoetických kmenových buněk. Při narušení této dráhy dochází k závažným vývojovým defektům, které často končí embryonální letalitou (shrnutí v Espín-Palazón a Traver, 2016).

NF- $\kappa$ B se v neaktivní formě vyskytuje v cytoplazmě buňky, kde je asociovaný s inhibitorem I $\kappa$ B. Po fosforylaci a následné degradaci I $\kappa$ B je NF- $\kappa$ B aktivován a translokován do jádra. Zde se váže na promotory cílených genů a následně spustí jejich expresi.

Při studiu vlivu NF- $\kappa$ B transkripčního faktoru na raný embryonální vývoj myších embryí byl pozorován výskyt jeho podjednotky p65 v různých stádiích raného embrya. Podjednotka p65 je přítomna již v MII fázi oocyty, je tedy maternálně exprimována. Její hladina rapidně klesá od stádia 8 buněk po blastocystu. Různá stádia embryí jsou k inhibitorům NF- $\kappa$ B faktoru rozdílně citlivá. Působení inhibitoru na embryo v raném jednobuněčném stádiu způsobilo zástavu vývoje embrya ve dvoubuněčném stavu. Naopak přidání inhibitoru do dvoubuněčného embrya nemělo vliv na jeho vývoj do stádia blastocysty. Zdá se, že pro správný embryonální vývoj je nutná aktivace NF- $\kappa$ B faktoru, a to ve specifické fázi raného jednobuněčného embrya (Nishikimi *et al.*, 1999).

#### 4.3.1. Role TAB1 v preimplantačním vývoji

Studie na myších oocytech ukázala význam degradace TAB1 pro raný embryonální vývoj. TAB1 je degradován ubiquitin-proteazomovým systémem. Konkrétně je hlavním substrátem pro E3 ligázu RNF114, stejně jako CBX5 (viz. předchozí kapitola).

Protein TAB1 vykazuje podobnou expresi jako RNF114. Zatímco v zygotě se nachází v hojném množství, v 2buněčném stádiu je protein ubiquitinylován a jeho exprese výrazně klesá. Ve stádiu 2 buněk tedy dochází v myších embryích k masivní degradaci proteinu TAB1. Pokud k poklesu množství TAB1 proteinu nedojde, dochází k zastavení vývoje myších embryí v 2buněčném stádiu (Yang *et al.*, 2017). K degradaci TAB1 před hlavní vlnou EGA dochází i u skotu a prasat (Kinterova *et al.*, v přípravě).

V MII a zygotě se NF- $\kappa$ B p65 nachází převážně v cytoplazmě, na rozdíl od 2buněčného a 4buněčného stádia, kdy je lokalizován také v jádře. Embrya ošetřená inhibitorem p65 zastavují vývoj v 2buněčném stádiu. Translokace NF- $\kappa$ B p65 do jádra a spuštění NF- $\kappa$ B dráhy je esenciální pro správný průběh MZT. Při overexpresi TAB1 k této translokaci nedochází, a není tak spuštěna exprese genů potřebných pro vývoj myších embryí. Nedojde tak k EGA a vývoj myších embryí je zastaven.

U myši je degradace proteinu TAB1 nezbytná pro aktivaci NF- $\kappa$ B signální dráhy a následné aktivaci embryonálního genomu. Vzhledem k tomu, že je správné fungování NF- $\kappa$ B signální dráhy důležité pro embryonální vývoj živočichů napříč druhy a k předběžným datům o degradaci TAB1 před hlavní vlnou EGA u bovinních a prasečích embryí, lze předpokládat, že degradace TAB1 pro správný průběh EGA bude důležitá i u dalších savců.

#### 4.4. H1FOO

Protein H1FOO je varianta linkerového histonu H1, která je specifická pro rostoucí oocyty a preimplantační embrya. Histony H1 se vážou na linkerovou DNA mezi jednotlivými nukleozomy a regulují prostorové uspořádání nukleozomů do vyšších struktur. Linkerové histony jsou zásadní pro regulaci genové exprese. Ovlivňují nejen kondenzaci chromatinu, ale také přímo interagují s aktivátory a represory genové exprese. Funkce a struktura H1 histonů je významně ovlivňována přítomností posttranslačních modifikací. Oproti core histonům jsou linkerové histony výrazně variabilnější a zároveň méně prozkoumané.

Histony H1 obsahují velmi konzervovanou centrální globulární doménu, zatímco C- a N-konce jsou více variabilní. N-konec obsahuje mnoho potenciálních fosforylačních míst, C-konec je bohatý na kyselé aminokyseliny. N-koncová doména a centrální globulární doména jsou důležité pro asociaci s DNA (shrnuto v Hergeth a Schneider, 2015; Andrés *et al.*, 2020). Pro tuto práci je zajímavé zjištění, že histon H1 přímo interaguje s proteinem CBX5 skrze jeho chromo doménu (Nielsen *et al.*, 2001).

U savců je známo 11 variant histonu H1: 7 somatických, 3 specifické pro spermie a 1 specifický pro oocyty – H1FOO (Happel a Doenecke, 2009). H1FOO ale sdílí jen malou sekvenční podobnost s ostatními typy H1 histonů. Liší se především v sekvenci aminokyselin na C-konci. Právě C-koncové doméně by pravděpodobně mohla být připsána funkční specifičnost (Li *et al.*, 2022).

Savčí varianta H1FOO byla poprvé identifikována u myši v roce 2001 jako homolog oocyt-specifického linkerového histonu ježovky a *Xenopus laevis* (Tanaka *et al.*, 2001). U *Drosophila melanogaster* je tento histon označován jako dBigH1 a je zásadní během MBT a raného embryonálního vývoje. Embrya s nefunkční variantou dBigH1 (loss-of-function mutace) zastavila vývoj v době MBT (Pérez-Montero *et al.*, 2013).

Varianty histonu H1FOO byly dále identifikovány u skotu a prasat, ale také u lidí. Homologie tohoto proteinu mezi druhy je ale relativně malá (bovinní H1FOO a myší H1FOO sdílí pouze 41,1%



homologii) (Tanaka *et al.*, 2003; Sheng *et al.*, 2015; Li *et al.*, 2022). Od toho se také pravděpodobně odvíjí různé role a důležitost v embryonálním vývoji napříč druhy.

#### 4.4.1. Exprese H1FOO během preimplantačního vývoje

Exprese H1FOO začíná v GV oocytech a udržuje se až do jeho nahrazení somatickou variantou v době EGA. U skotu se silně exprimuje v GV oocytech a akumuluje se v cytoplazmě a na chromatinu. V 8 a 16buněčném stádiu dochází k degradaci a poté je už nedetekovatelný. To koreluje s načasováním EGA a nahrazením maternální H1FOO somatickou variantou (McGraw *et al.*, 2006). Podobně je tomu také u myši. Exprese začíná v GV oocytech. V 1buněčném stádiu je hladina H1FOO vysoká, v 2buněčném stádiu dochází k významnému poklesu. K degradaci H1FOO dochází u myši také v době EGA, tj. v 2buněčném stádiu (Sánchez-Sáez *et al.*, 2022).

U skotu byl H1FOO detekován dokonce i v granulóznicích buňkách, u myši to prokázáno nebylo. Souvisí to pravděpodobně s tím, že se bovinní a myši H1FOO značně liší. Exprese H1FOO v granulóznicích buňkách a oogoniích byla nalezena také u prasat. Jeho exprese se navíc s postupujícím vývojem prasečích vaječníků zvyšuje (Sheng *et al.*, 2015).

Proces degradace histonu H1FOO zatím bohužel nebyl podrobně prozkoumán a popsán.

#### 4.4.2. Role H1FOO v preimplantačním vývoji

Role H1FOO (a jeho homologů) byla dříve než u savců popsána u jiných živočichů (*Drosophila melanogaster*, *Xenopus laevis*, ježovka). U těchto živočichů je správná exprese homologů H1FOO důležitá pro preimplantační vývoj a MBT. Také u *Drosophila melanogaster* a *Xenopus laevis* začíná exprese jejich homologů H1FOO již v zárodečných buňkách a k degradaci dochází v době MBT (Pérez-Montero *et al.*, 2013).

Hojně studována byla role H1FOO při maturaci oocytů. V *in vitro* studii na myších oocytech došlo po inhibici H1FOO k výrazně nižší míře maturace oocytů ve srovnání s kontrolní skupinou. Oocytům se nepodařilo vyloučit první pólóvé tělíčko a byly zablokovány v metafázi I (Furuya *et al.*, 2007). *In vitro* studie na bovinních embryích došla k podobným závěrům. H1FOO je nezbytný pro meiotickou maturaci bovinních oocytů a jeho nadprodukce stimuluje tento proces (Yun *et al.*, 2015).

V 1buněčném stádiu myších embryí je struktura chromatinu velmi rozvolněná. To se mění přechodem do 2buněčného stádia, kdy se stává výrazně kondenzovanější. Knockdown H1FOO má za následek kompaktnější chromatin v jednobuněčném stádiu a zároveň dochází k zvýšenému ukládání histonu H3. Naopak overexprese H1FOO vede k méně výraznému poklesu rozvolněnosti mezi 1buněčným a 2buněčným stádiem. H1FOO se podílí na změně struktury chromatinu a ovlivňuje míru ukládání histonu H3 v jádře mezi 1buněčným a 2buněčným stádiem myších embryí (Funaya *et al.*, 2018).

Roli H1FOO v rozvolnění chromatinu ukázala také studie na myších embryonálních kmenových buňkách. H1FOO byl v těchto buňkách soustředěn v oblastech transkripčních počátků genů specifických pro oocyty. Nahromadění H1FOO vedlo k relaxaci chromatinu a k indukci genové exprese. Funkce H1FOO v raném vývoji embryí tak pravděpodobně spočívá v dekonduzaci chromatinu a aktivaci genové exprese (Hayakawa a Tanaka, 2021).

Všechny tyto studie ukazovaly na klíčovou roli H1FOO při maturaci oocytů a raném embryonálním vývoji myší. K jinému výsledku ale dospěli v roce 2022 Sánchez-Sáez a spol., kteří provedli *in vivo* studii na myších deficientních pro H1FOO a prokázali, že přítomnost H1FOO není vyloženě nezbytná pro maturaci oocytů a myši mohou tolerovat absenci tohoto specifického linkerového histonu bez zásadního dopadu na jejich vývoj (Sánchez-Sáez *et al.*, 2022). Tyto výsledky pravděpodobně ukazují na existenci kompenzačního mechanismu, který se umí vyrovnat s nepřítomností H1FOO při *in vivo* vývoji myší.

U skotu se ale zdá přítomnost H1FOO důležitější. Li a spol. (2022) zkoumali u bovinních embryích vliv deplece a overexprese H1FOO na embryonální vývoj. Zjistili, že H1FOO je důležitý nejen v organizaci chromatinu, ale taky v ustanovení buněčných linií. Při depleci H1FOO došlo k navýšení H3K9me3 a H3K27me3 (markery kondenzovaného chromatinu) a naopak ke snížení H4K16ac (marker rozvolněného chromatinu). H1FOO reguluje rozvolnění chromatinu a s tím spojenou genetickou expresi. Dále je H1FOO důležitý při ustanovení vzniku prvních dvou buněčných linií – ICM a TE. K tomuto jevu dochází při přeměně moruly v blastocystu. Deplece H1FOO vede k zastavení vývoje bovinních embryí ve stádiu moruly (Li *et al.*, 2022).

K defektům embryonálního vývoje dochází i při overexpresi H1FOO. Overexprese H1FOO snižuje vývojový potenciál bovinních embryí. Po mikroinjekci bovinního homologu H1FOO se významně snížil podíl embryí vyvíjejících se do 8-16buněčného stádia (Li *et al.*, 2022). K zajímavému výsledku došel experiment sledující vliv overexprese bovinního H1FOO mezi různými živočišnými druhy. Zatímco při overexpresi bovinního H1FOO v myších embryích došlo k významnému poklesu počtu embryí, které byly schopné dosáhnout stádia blastocysty, overexprese myšího H1FOO neměla na vývoj myších embryí žádný efekt. Správná exprese bovinního H1FOO je důležitá pro preimplantační vývoj embryí. Jeho degradace a nahrazení somatickými variantami je nezbytná pro nastartování embryonálního genomu (Li *et al.*, 2022).

Rozdíly ve výsledcích studií mohou být důsledkem rozdílných experimentálních přístupů, včetně rozdílů mezi *in vitro* a *in vivo* modely, nebo mohou reflektovat komplexní a dosud ne zcela pochopené regulační mechanismy, které řídí oogenezi a embryonální vývoj. Tyto nekonzistentní výsledky podtrhují potřebu dalších studií k objasnění skutečné role H1FOO v oogenezi a embryonálním vývoji. Kromě toho by bylo vhodné prozkoumat možné kompenzační mechanismy, které mohou v oocytech a embryích zasahovat v případě absence H1FOO. V neposlední řadě je také potřeba objasnit proces degradace H1FOO.

## 5. Závěr

Aktivace embryonálního genomu představuje jednu z klíčových událostí raného preimplantačního vývoje. V počátečních fázích vývoje je embryo transkripčně neaktivní a jeho vývoj závisí na maternální mRNA a proteinech, které se nahromadily v cytoplazmě oocyty během oogeneze. Proto je pro správný preimplantační vývoj zásadní koordinovaná syntéza a degradace těchto maternálních proteinů. Cílem této práce bylo shrnout dosavadní poznatky o maternálních proteinech, jejichž degradace je nezbytná pro správný průběh EGA u savců – PIASy, CBX5, TAB1 a H1FOO. Během maturace oocytů a raného preimplantačního vývoje jsou tyto proteiny exprimovány z maternálních transkriptů. Pro úspěšný průběh EGA je nezbytné, aby byly tyto proteiny degradovány. H1FOO navíc musí být nahrazen variantou exprimovanou již podle embryonálního genomu. Podobně je nutné nahradit maternální variantu proteinu embryonální variantou například v případě homologů CDC6 a DBF4B u *Xenopus laevis*. Tyto proteiny regulují buněčný cyklus a jejich nahrazení somatickými variantami je důležité pro prodloužení buněčného cyklu během MBT (Tikhmyanova a Coleman, 2003; Silva *et al.*, 2006).

Degradace maternálních proteinů je zatím prozkoumána méně než degradace maternálních mRNA. Avšak z dosavadních poznatků lze říci, že degradace jednotlivých maternálních proteinů je specifitější proces a podstatnou roli také hraje správné načasování. Především substrátová specifita a exprese RNF114 ukazují na to, že degradace maternálních proteinů je spíše individuální proces.

Aby mohlo z terminálně diferencovaného oocyty a spermie vzniknout embryo schopné vytvářet všechny buněčné typy, je nutné restartovat genom. EGA proto velmi úzce souvisí s reorganizací struktury chromatinu. Spuštění genové exprese vyžaduje rozvolnění chromatinu v oblasti genu a také přítomnost příslušných transkripčních faktorů. Maternální proteiny, které je nutné degradovat pro správný průběh EGA, se podílejí právě na regulaci struktury chromatinu a translokaci potřebných faktorů.

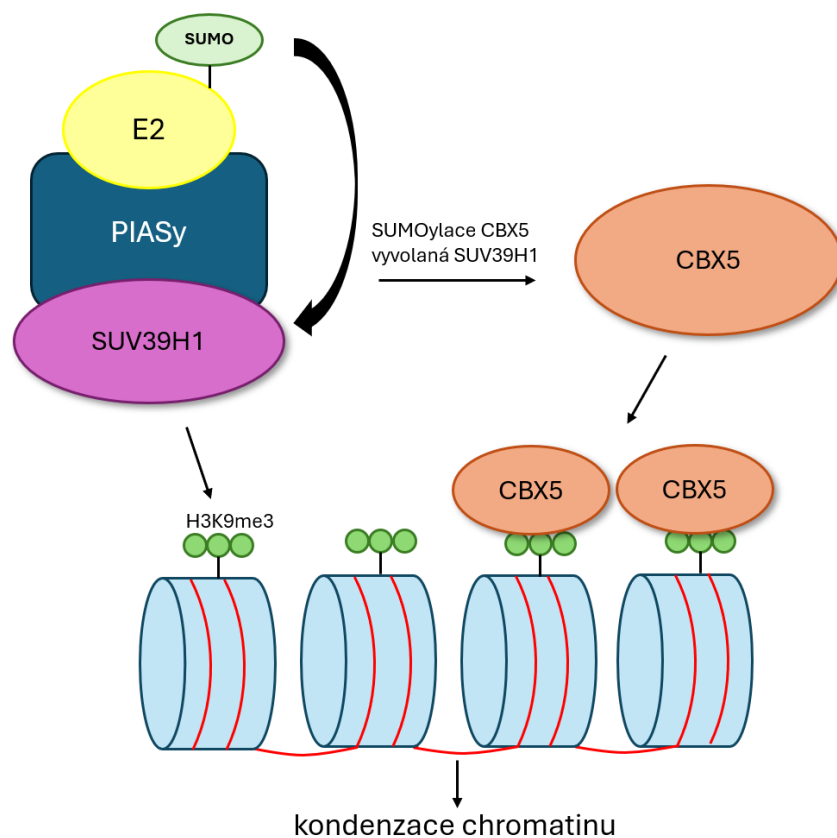
PIASy svojí SUMOylační aktivitou ovlivňuje translokaci methyltransferázy SUV39H1 do jádra. Overexprese PIASy vede k vyššímu výskytu SUV39H1 v jádře, což zvyšuje úroveň H3K9me3, charakteristického znaku kondenzovaného chromatinu. Výskyt H3K9me3 se také zvyšuje působením proteinu CBX5. Ten se nejen váže na H3K9me3 a tím zvyšuje kondenzaci chromatinu, ale také reguluje stabilitu SUV39H1. Jeho zvýšená exprese vede k vyššímu výskytu SUV39H1 v jádře, a to vede k nárůstu H3K9me3. Zároveň overexprese SUV39H1 způsobuje vyšší výskyt CBX5. Oba tyto proteiny se vzájemně ovlivňují, vyšší výskyt CBX5 vede k nárůstu SUV39H1 a naopak. SUV39H1 má roli ve zvyšování SUMOylace CBX5 (Maison *et al.*, 2016) (Obrázek 4).

Samotná overexprese SUV39H1 ale nezabraňuje aktivaci embryonálního genomu u myších embryí a důsledky její overexprese jsou znatelné až po EGA (Burton *et al.*, 2020). Její overexprese má za následek vyšší výskyt H3K9me3 a CBX5 v 8buněčném stádiu myších embryí a významně narušuje vývoj embryí do stádia blastocytu (Zhang *et al.*, 2018). Naopak overexprese proteinů PIASy a CBX5

zabraňuje nastartování embryonálního genomu a jejich degradace je nezbytná pro správný průběh EGA.

Degradace PIASy a CBX5 je důležitá pro rozvolnění chromatinu. Ze stejného důvodu je nutné degradovat i H1FOO. Tento linkerový histon H1FOO musí být degradován a nahrazen somatickou variantou, aby došlo k rozvolnění chromatinu a mohly tak být exprimovány embryonální transkripty u bovinních embryí.

Podobně jako PIASy ovlivňuje translokaci SUV39H1 do jádra, protein TAB1 reguluje translokaci transkripčního faktoru NF- $\kappa$ B do jádra. Při nadměrné expresi TAB1 k této translokaci nedochází, není aktivována NF- $\kappa$ B signální dráha a není spuštěna exprese potřebných genů.



**Obrázek 4: Spolupráce PIASy a CBX5 při regulaci heterochromatinu.** PIASy funguje jako E3 ligáza v procesu SUMOylace. SUMOylace methyltransferázy SUV39H1 zvyšuje její translokaci do jádra a následnou trimethylaci lysinu 9 histonu H3. CBX5 se váže na H3K9me3. CBX5 je methylreader a jeho zvýšená exprese má za následek zvýšenou expresi SUV39H1. Zároveň overexprese SUV39H1 způsobuje vyšší výskyt CBX5. PIASy a CBX5 společně ovlivňují strukturu chromatinu a jejich nadměrná exprese vede ke kondenzaci chromatinu, který se stává transkripčně neaktivní. (vlastní zpracování)

Tyto poznatky jsou výsledky studií převážně na myších modelech. Myš je sice nejvyužívanější savčí model, ale v mnoha aspektech je vývoj myši specifický a nevhodný jako společný model pro savce, případně člověka. Vhodnějšími modely pro studium preimplantačního vývoje a EGA savců jsou skot a prasata. Bohužel zatím neexistuje příliš mnoho studií popisujících konkrétní maternální proteiny, které je u nich nutné degradovat pro správný průběh EGA. Další studie by se tedy měly zaměřit jak na podrobnější zkoumání exprese zmíněných proteinů (PIASy, CBX5, TAB1 a H1FOO) během raného preimplantačního vývoje a vliv jejich overexprese na EGA, tak také na hledání dalších podobných proteinů a zejména společného jmenovatele, který cílí tyto proteiny k degradaci.

Degradace maternálních proteinů je druhově specifická. Tato variabilita je pravděpodobně způsobena rozdíly v sekvencích proteinů mezi druhy. Právě sekvence proteinu je pravděpodobně tím klíčovým prvkem, který určuje, jak důležitá je jeho role a degradace během EGA. Příkladem je zmiňovaný H1FOO, jehož role a degradace během EGA se liší u skotu a myši. Bovinní a myší H1FOO vykazují velmi nízkou homologii, a zatímco myší H1FOO není nezbytné degradovat pro správný vývoj myších embryí, bovinní H1FOO je nutné degradovat pro správný průběh EGA, a to jak u bovinních embryí, tak i v případě, kdy byl bovinní H1FOO mikroinjikován do myších embryí. Zdá se proto, že rozhodující bude právě rozdílná sekvence myšího a bovinního H1FOO.

Vzhledem k tomu, že ne všechny maternální proteiny jsou degradovány a některé z nich si embryo ponechává po delší dobu, bylo by zajímavé zjistit, jaký je vlastně společný znak proteinů, který musejí být degradovány. Konkrétně, zda existuje nějaká specifická sekvence, např. degron - specifická sekvence aminokyselin v proteinu, která funguje jako signál pro jeho rozpoznání a degradaci proteazomem (Lucas a Ciulli, 2017), která tyto proteiny charakterizuje, a jaký mechanismus rozhoduje, jak bude s proteinem zacházeno.

## 6. Seznam použité literatury

\*označuje sekundární zdroje

\*Abe, K., Funaya, S., Tsukioka, D., Kawamura, M., Suzuki, Y., Suzuki, M.G., Schultz, R.M., Aoki, F. (2018). Minor zygotic gene activation is essential for mouse preimplantation development. *Proc Natl Acad Sci USA* 115, 6780-6788.

\*Andrés, M., García-Gomis, D., Ponte, I., Suau, P., Roque, A. (2020). Histone H1 Post-Translational Modifications: Update and Future Perspectives. *IJMS* 21, 5941.

Benesova, V., Kinterova, V., Kanka, J., Toralova, T. (2017). Potential Involvement of SCF-Complex in Zygotic Genome Activation During Early Bovine Embryo. *Methods Mol Biol* 1605, 245–257.

Betz, A., Lampen, N., Martinek, S., Young, M.W., Darnell, J.E. (2001). A Drosophila PIAS homologue negatively regulates stat92E. *Proc Natl Acad Sci USA* 98, 9563–9568.

Burn, B., Brown, S., Chang, C. (2011). Regulation of early Xenopus development by the PIAS genes. *Dev Dyn* 240, 2120–2126.

Burton, A., Brochard, V., Galan, C., Ruiz-Morales, E.R., Rovira, Q., Rodriguez-Terrones, D., Kruse, K., Le Gras, S., Udayakumar, V.S., Chin, H.G., Eid, A., Liu, X., Wang, C., Gao, S., Pradhan, S., Vaquerizas, J.M., Beaujean, N., Jenuwein, T., Torres-Padilla, M.-E. (2020). Heterochromatin establishment during early mammalian development is regulated by pericentromeric RNA and characterized by non-repressive H3K9me3. *Nat Cell Biol* 22, 767–778.

\*Calò, V., Migliavacca, M., Bazan, V., Macaluso, M., Buscemi, M., Gebbia, N., Russo, A. (2003). STAT proteins: From normal control of cellular events to tumorigenesis. *J Cell Physiol* 197, 157–168.

Chi, D., Zeng, Y., Xu, M., Si, L., Qu, X., Liu, H., Li, J. (2017). LC3-Dependent Autophagy in Pig 2-Cell Cloned Embryos Could Influence the Degradation of Maternal mRNA and the Regulation of Epigenetic Modification. *Cell Reprogram* 19, 354–362.

Chung CD, Liao J, Liu B, Rao X, Jay P, Berta P, Shuai K. (1997). Specific inhibition of Stat3 signal transduction by PIAS3. *Science* 278, 1803-1805.

Degrelle, S.A., Liu, F., Laloe, D., Richard, C., Le Bourhis, D., Rossignol, M.-N., Hue, I. (2024). Understanding bovine embryo elongation: a transcriptomic study of trophoblastic vesicles. *Front Physiol* 15, 1331098.

Ducibella, T., Ukena, T., Karnovsky, M., Anderson, E. (1977). Changes in cell surface and cortical cytoplasmic organization during early embryogenesis in the preimplantation mouse embryo. *J Cell Biol* 74, 153–167.

\*Eckersley-Maslin, M.A., Alda-Catalinas, C., Reik, W. (2018). Dynamics of the epigenetic landscape during the maternal-to-zygotic transition. *Nat Rev Mol Cell Biol* 19, 436–450.

\*Espín-Palazón, R., Traver, D. (2016). The NF-κB family: Key players during embryonic development and HSC emergence. *Exp Hematol* 44, 519–527.

- \*Fan, H.Y., Sun, Q.Y. (2019). Oocyte Meiotic Maturation, in: *The Ovary (Third Edition)*. Elsevier, 181–203, ISBN: 9780128132098.
- Funaya, S., Ooga, M., Suzuki, M.G., Aoki, F. (2018). Linker histone H1 FOO regulates the chromatin structure in mouse zygotes. *FEBS Lett* 592, 2414–2424.
- Furuya, M., Tanaka, M., Teranishi, T., Matsumoto, K., Hosoi, Y., Saeki, K., Ishimoto, H., Minegishi, K., Iritani, A., Yoshimura, Y. (2007). H1FOO is Indispensable for Meiotic Maturation of the Mouse Oocyte *J Reprod Dev* 53, 895–902.
- \*Gareau, J.R., Lima, C.D. (2010). The SUMO pathway: emerging mechanisms that shape specificity, conjugation and recognition. *Nat Rev Mol Cell Biol* 11, 861–871.
- \*Gauster, M., Moser, G., Wernitznig, S., Kupper, N., Huppertz, B. (2022). Early human trophoblast development: from morphology to function. *Cell Mol Life Sci* 79, 345.
- \*Glickman, M.H., Ciechanover, A. (2002). The Ubiquitin-Proteasome Proteolytic Pathway: Destruction for the Sake of Construction. *Physiol Rev* 82, 373–428.
- Graf, A., Krebs, S., Zakhartchenko, V., Schwalb, B., Blum, H., Wolf, E. (2014). Fine mapping of genome activation in bovine embryos by RNA sequencing. *Proc Natl Acad Sci USA* 111, 4139–4144.
- Halstead, M.M., Ma, X., Zhou, C., Schultz, R.M., Ross, P.J. (2020). Chromatin remodeling in bovine embryos indicates species-specific regulation of genome activation. *Nat Commun* 11, 4654.
- Han, J., Kim, Y.-L., Lee, K.-W., Her, N.-G., Ha, T.-K., Yoon, S., Jeong, S.-I., Lee, J.-H., Kang, M.-J., Lee, M.-G., Ryu, B.-K., Baik, J.-H., Chi, S.-G. (2013). ZNF313 is a novel cell cycle activator with an E3 ligase activity inhibiting cellular senescence by destabilizing p21WAF1. *Cell Death Differ* 20, 1055–1067.
- \*Happel, N., Doenecke, D. (2009). Histone H1 and its isoforms: Contribution to chromatin structure and function. *Gene* 431, 1–12.
- Hari, K.L., Cook, K.R., Karpen, G.H. (2001). The *Drosophila* Su(var)2-10 locus regulates chromosome structure and function and encodes a member of the PIAS protein family. *Genes Dev* 15, 1334–1348.
- Hayakawa, K., Tanaka, S. (2021). Oocyte-specific linker histone H1FOO interacts with Esrrb to induce chromatin decondensation at specific gene loci. *Biochem Biophys Res Commun* 561, 165–171.
- \*He, M., Zhang, T., Yang, Y., Wang, C. (2021). Mechanisms of Oocyte Maturation and Related Epigenetic Regulation. *Front Cell Dev Biol* 9, 654028.
- \*Hergeth, S.P., Schneider, R. (2015). The H1 linker histones: multifunctional proteins beyond the nucleosomal core particle. *EMBO Rep* 16, 1439–1453.

Higuchi, C., Yamamoto, M., Shin, S.-W., Miyamoto, K., Matsumoto, K. (2019). Perturbation of maternal PIASy abundance disrupts zygotic genome activation and embryonic development via SUMOylation pathway. *Biol Open* 8, bio.048652.

Holway, A.H., Kim, S.-H., La Volpe, A., Michael, W.M. (2006). Checkpoint silencing during the DNA damage response in *Caenorhabditis elegans* embryos. *J Cell Biol* 172, 999–1008.

Hyttel, P., Fair, T., Callesen, H., Greve, T. (1997). Oocyte growth, capacitation and final maturation in cattle. *Theriogenology* 47, 23–32.

Ibarra-Morales, D., Rauer, M., Quarato, P., Rabbani, L., Zenk, F., Schulte-Sasse, M., Cardamone, F., Gomez-Auli, A., Cecere, G., Iovino, N. (2021). Histone variant H2A.Z regulates zygotic genome activation. *Nat Commun* 12, 7002.

\*Ing. Ota Fuchs, CSc. (2005). The role of ubiquitin-proteasome system in transforming growth factor- $\beta$  signaling and its importance in tumorigenesis. *Klin Onkol* 18, 199-206.

\*Jambhekar, A., Dhall, A., Shi, Y. (2019). Roles and regulation of histone methylation in animal development. *Nat Rev Mol Cell Biol* 20, 625–641.

James, T.C., Elgin, S.C.R. (1986). Identification of a Nonhistone Chromosomal Protein Associated with Heterochromatin in *Drosophila melanogaster* and Its Gene. *Mol Cell Biol*. 6, 3862–3872.

Ji, S., Chen, F., Stein, P., Wang, J., Zhou, Z., Wang, L., Zhao, Q., Lin, Z., Liu, B., Xu, K., Lai, F., Xiong, Z., Hu, X., Kong, T., Kong, F., Huang, B., Wang, Q., Xu, Q., Fan, Q., Liu, L., Williams, C.J., Schultz, R.M., Xie, W. (2023). OBOX regulates mouse zygotic genome activation and early development. *Nature* 620, 1047–1053.

\*Jiang, Y., He, Y., Pan, X., Wang, P., Yuan, X., Ma, B. (2023). Advances in Oocyte Maturation In Vivo and In Vitro in Mammals. *IJMS* 24, 9059.

Jin, Y., Yang, M., Gao, C., Yue, W., Liang, X., Xie, B., Zhu, X., Fan, S., Li, R., Li, M. (2019). Fbxo30 regulates chromosome segregation of oocyte meiosis. *Cell Mol Life Sci* 76, 2217–2229.

Joseph, S.R., Pálffy, M., Hilbert, L., Kumar, M., Karschau, J., Zaburdaev, V., Shevchenko, A., Vastenhouw, N.L. (2017). Competition between histone and transcription factor binding regulates the onset of transcription in zebrafish embryos. *eLife* 6, e23326

\*Jukam, D., Shariati, S.A.M., Skotheim, J.M. (2017). Zygotic Genome Activation in Vertebrates. *Develop Cell* 42, 316–332.

Kahyo, T., Nishida, T., Yasuda, H. (2001). Involvement of PIAS1 in the Sumoylation of Tumor Suppressor p53. *Mol Cell* 8, 713–718.

Kinterova V., Kanka J., Petruskova V., Toralova T. (2019) Inhibition of Skp1-Cullin-F-box complexes during bovine oocyte maturation and preimplantation development leads to delayed development of embryos. *Biol Reprod* 100, 896–906.



- \*Kinterová, V., Kaňka, J., Bartková, A., Toralová, T. (2022). SCF Ligases and Their Functions in Oogenesis and Embryogenesis—Summary of the Most Important Findings throughout the Animal Kingdom. *Cells* 11, 234.
- \*Kumar, A., Kono, H. (2020). Heterochromatin protein 1 (HP1): interactions with itself and chromatin components. *Biophys Rev* 12, 387–400.
- Li, L., Baibakov, B., Dean, J. (2008). A Subcortical Maternal Complex Essential for Preimplantation Mouse Embryogenesis. *Develop Cell* 15, 416–425.
- Li, S., Shi, Y., Dang, Y., Hu, B., Xiao, L., Zhao, P., Wang, S., Zhang, K. (2022). Linker histone H1FOO is required for bovine preimplantation development by regulating lineage specification and chromatin structure. *Biol of Reprod* 107, 1425–1438.
- Liu B., Yang R., Wong K.A., Getman C., Stein N., Teitell M.A., Cheng G., Wu H., Shuai K. (2005). Negative regulation of NF-kappaB signaling by PIAS1. *Mol Cell Biol* 25, 1113-1123.
- Lucas, X., Ciulli, A. (2017). Recognition of substrate degrons by E3 ubiquitin ligases and modulation by small-molecule mimicry strategies. *Curr Opin Struct Biol* 44, 101–110.
- \*Ma, M., Zhang, L., Liu, Z., Teng, Y., Li, M., Peng, X., An, L. (2024). Effect of blastocyst development on hatching and embryo implantation. *Theriogenology* 214, 66–72.
- Machida, S., Takizawa, Y., Ishimaru, M., Sugita, Y., Sekine, S., Nakayama, J., Wolf, M., Kurumizaka, H. (2018). Structural Basis of Heterochromatin Formation by Human HP1. *Mol Cell* 69, 385-397
- Maeda, R., Tachibana, M. (2022). HP1 maintains protein stability of H3K9 methyltransferases and demethylases. *EMBO Rep* 23, e53581.
- Maison C., Bailly D., Quivy J.P., Almouzni G. (2016). The methyltransferase Suv39h1 links the SUMO pathway to HP1 $\alpha$  marking at pericentric heterochromatin. *Nat Commun.* 7, 12224.
- McGraw, S., Vigneault, C., Tremblay, K., Sirard, M.-A. (2006). Characterization of linker histone H1FOO during bovine in vitro embryo development. *Mol Reprod Dev* 73, 692–699.
- Memili, E., Dominko, T., First, N.L. (1998). Onset of transcription in bovine oocytes and preimplantation embryos. *Mol Reprod Dev* 51, 36–41.
- Minc, E., Allory, Y., Worman, H.J., Courvalin, J.-C., Buendia, B. (1999). Localization and phosphorylation of HP1 proteins during the cell cycle in mammalian cells. *Chromosoma* 108, 220-234.
- \*Mizushima, N. (2007). Autophagy: process and function. *Genes Dev* 21, 2861–2873.
- Molè, M.A., Weberling, A., Zernicka-Goetz, M. (2020). Comparative analysis of human and mouse development: From zygote to pre-gastrulation, in: Current Topics in Developmental Biology. *Elsevier* 136, 113–138.

- \*Nicetto, D., Zaret, K.S. (2019). Role of H3K9me3 heterochromatin in cell identity establishment and maintenance. *Curr Opin Genet Develop* 55, 1–10.
- Nielsen A.L., Oulad-Abdelghani M., Ortiz J.A., Remboutsika E., Chambon P., Losson R. (2001). Heterochromatin formation in mammalian cells: interaction between histones and HP1 proteins. *Mol Cell* 7, 729-39.
- Nishikimi, A., Mukai, J., Yamada, M. (1999). Nuclear Translocation of Nuclear Factor Kappa B in Early 1-Cell Mouse Embryos. *Biol Reprod* 60, 1536–1541.
- Paria, B.C., Huet-Hudson, Y.M., Dey, S.K. (1993). Blastocyst's state of activity determines the “window” of implantation in the receptive mouse uterus. *Proc Natl Acad Sci USA* 90, 10159–10162.
- Park, J., Cho, J., Song, E.J. (2020). Ubiquitin–proteasome system (UPS) as a target for anticancer treatment. *Arch Pharm Res* 43, 1144–1161.
- Pérez-Montero, S., Carbonell, A., Morán, T., Vaquero, A., Azorín, F. (2013). The Embryonic Linker Histone H1 Variant of Drosophila, dBigh1, Regulates Zygotic Genome Activation. *Developmental Cell* 26, 578–590.
- \*Posfai, E., Rovic, I., Jurisicova, A. (2019). The mammalian embryo's first agenda: making trophectoderm. *Int J Dev Biol* 63, 157–170.
- Rodriguez, M.S., Egaña, I., Lopitz-Otsoa, F., Aillet, F., Lopez-Mato, M.P., Dorronsoro, A., Lobato-Gil, S., Sutherland, J.D., Barrio, R., Trigueros, C., Lang, V. (2014). The RING ubiquitin E3 RNF114 interacts with A20 and modulates NF- $\kappa$ B activity and T-cell activation. *Cell Death Dis* 5, e1399.
- Sachdev, S., Bruhn, L., Sieber, H., Pichler, A., Melchior, F., Grosschedl, R. (2001). PIASy, a nuclear matrix-associated SUMO E3 ligase, represses LEF1 activity by sequestration into nuclear bodies. *Genes Dev* 15, 3088–3103.
- \*Saha, N., Muntean, A.G. (2021). Insight into the multi-faceted role of the SUV family of H3K9 methyltransferases in carcinogenesis and cancer progression. *Biochim Biophys Acta Rev Cancer* 1875, 188498.
- Sánchez-Sáez, F., Sainz-Urruela, R., Felipe-Medina, N., Condezo, Y.B., Sánchez-Martín, M., Llano, E., Pendás, A.M. (2022). The Oocyte-Specific Linker Histone H1FOO Is Not Essential for Mouse Oogenesis and Fertility. *Cells* 11, 3706.
- \*Schulz, K.N., Harrison, M.M. (2019). Mechanisms regulating zygotic genome activation. *Nat Rev Genet* 20, 221–234.
- \*Sharrocks, A.D. (2006). PIAS proteins and transcriptional regulation—more than just SUMO E3 ligases? *Genes Dev.* 20, 754–758.
- Sheng, J., Yang, Y., Liu, W., Ji, H., Lei, A., Qing, S. (2015). Location of oocyte-specific linker histone in pig ovaries at different developmental stages postpartum. *Theriogenology* 83, 1203–1212.

- Shirayoshi, Y., Okada, T.S., Takeichi, M. (1983). The calcium-dependent cell-cell adhesion system regulates inner cell mass formation and cell surface polarization in early mouse development. *Cell* 35, 631–638.
- Silva, T., Bradley, R.H., Gao, Y., Coue, M. (2006). Xenopus CDC7/DRF1 Complex Is Required for the Initiation of DNA Replication. *J Biol Chem* 281, 11569–11576.
- Singh, P.B., Miller, J.R., Pearce, J., Kothary, R., Burton, R.D., Paro, R., James, T.C., J.Gaunt, S. (1991). A sequence motif found in a Drosophila heterochromatin protein is conserved in animals and plants. *Nucl Acids Res* 19, 789–794.
- Skowyra, D., Craig, K.L., Tyers, M., Elledge, S.J., Harper, J.W. (1997). F-Box Proteins Are Receptors that Recruit Phosphorylated Substrates to the SCF Ubiquitin-Ligase Complex. *Cell* 91, 209–219.
- Song, B.S., Yoon, S.B., Kim, J.S., Sim, B.W., Kim, Y.H., Cha, J.J., Choi, S.A., Min, H.K., Lee, Y., Huh, J.W., Lee, S.R., Kim, S.H., Koo, D.B., Choo, Y.K., Kim, H.M., Kim, S.U., Chang, K.T. (2012). Induction of Autophagy Promotes Preattachment Development of Bovine Embryos by Reducing Endoplasmic Reticulum Stress. *Biol Reprod* 87, 1-11.
- \*Sotomayor-Lugo, F., Iglesias-Barrameda, N., Castillo-Aleman, Y., Casado-Hernandez, I., Villegas-Valverde, C., Bencomo-Hernandez, A., Ventura-Carmenate, Y., Rivero-Jimenez, R. (2024). The Dynamics of Histone Modifications during Mammalian Zygotic Genome Activation. *IJMS* 25, 1459.
- St. Pierre, J., Wright, D.J., Rowe, T.C., Wright, S.J. (2002). DNA topoisomerase II is essential for preimplantation mouse development. *Mol Reprod Dev* 61, 347–357.
- Strom, A.R., Biggs, R.J., Banigan, E.J., Wang, X., Chiu, K., Herman, C., Collado, J., Yue, F., Ritland Politz, J.C., Tait, L.J., Scalzo, D., Telling, A., Groudine, M., Brangwynne, C.P., Marko, J.F., Stephens, A.D. (2021). HP1 $\alpha$  is a chromatin crosslinker that controls nuclear and mitotic chromosome mechanics. *eLife* 10, e63972.
- \*Tadros, W., Lipshitz, H.D. (2009). The maternal-to-zygotic transition: a play in two acts. *Development* 136, 3033–3042.
- Tanaka, M., Hennebold, J.D., Macfarlane, J., Adashi, E.Y. (2001). A mammalian oocyte-specific linker histone gene H1oo : homology with the genes for the oocyte-specific cleavage stage histone ( cs-H1 ) of sea urchin and the B4/H1M histone of the frog. *Development* 128, 655–664.
- Tanaka, Y., Kato, S., Tanaka, M., Kuji, N., Yoshimura, Y. (2003). Structure and expression of the human oocyte-specific histone H1 gene elucidated by direct RT-nested PCR of a single oocyte. *Biochem Biophys Res Commun* 304, 351–357.
- Tian, Q., He, J.-P., Zhu, C., Zhu, Q.Y., Li, Y.G., Liu, J.L. (2022). Revisiting the Transcriptome Landscape of Pig Embryo Implantation Site at Single-Cell Resolution. *Front Cell Dev Biol* 10, 796358.
- Tikhmyanova, N., Coleman, T.R. (2003). Isoform switching of Cdc6 contributes to developmental cell cycle remodeling. *Develop Biol* 260, 362–375.

\*Toralova, T., Kinterova, V., Chmelikova, E., Kanka, J. (2020). The neglected part of early embryonic development: maternal protein degradation. *Cell Mol Life Sci* 77, 3177-3194.

Tsukamoto, S., Kuma, A., Murakami, M., Kishi, C., Yamamoto, A., Mizushima, N. (2008). Autophagy Is Essential for Preimplantation Development of Mouse Embryos. *Science* 321, 117–120.

\*Tsukamoto, S., Tatsumi, T. (2018). Degradation of maternal factors during preimplantation embryonic development. *J Reprod Dev* 64, 217–222.

Wen, D., Banaszynski, L.A., Liu, Y., Geng, F., Noh, K.-M., Xiang, J., Elemento, O., Rosenwaks, Z., Allis, C.D., Rafii, S. (2014). Histone variant H3.3 is an essential maternal factor for oocyte reprogramming. *Proc Natl Acad Sci USA* 111, 7325–7330.

Wilcox, A.J., (1999). Time of Implantation of the Conceptus and Loss of Pregnancy. *N Engl J Med* 340, 1796-1799.

Wong, K.A., Kim, R., Christofk, H., Gao, J., Lawson, G., Wu, H. (2004). Protein Inhibitor of Activated STAT Y (PIASy) and a Splice Variant Lacking Exon 6 Enhance Sumoylation but Are Not Essential for Embryogenesis and Adult Life. *Mol Cell Biol* 24, 5577–5586.

Wongtawan, T., Taylor, J.E., Lawson, K.A., Wilmut, I., Pennings, S. (2011). Histone H4K20me3 and HP1 $\alpha$  are late heterochromatin markers in development, but present in undifferentiated embryonic stem cells. *J Cell Sci* 24, 1878–1890.

\*Wotton, D., Merrill, J.C. (2007). Pc2 and SUMOylation. *Biochem Soc Trans* 35, 1401–1404.

\*Xu, C. (2005). Endoplasmic reticulum stress: cell life and death decisions. *J Clin Invest* 115, 2656-2664.

Yang, Y., Zhou, C., Wang, Ying, Liu, W., Liu, C., Wang, L., Liu, Y., Shang, Y., Li, M., Zhou, S., Wang, Yuanting, Zeng, W., Zhou, J., Huo, R., Li, W. (2017). The E3 ubiquitin ligase RNF 114 and TAB 1 degradation are required for maternal-to-zygotic transition. *EMBO Rep* 18, 205–216.

Yun, Y., An, P., Ning, J., Zhao, G.-M., Yang, W.L., Lei, A.M. (2015). H1FOO is essential for in vitro meiotic maturation of bovine oocytes. *Zygote* 23, 416–425.

Zhai, Y., Yu, H., An, X., Zhang, Z., Zhang, M., Zhang, S., Li, Q., Li, Z. (2022). Profiling the transcriptomic signatures and identifying the patterns of zygotic genome activation – a comparative analysis between early porcine embryos and their counterparts in other three mammalian species. *BMC Genomics* 23, 772.

Zhang, P., Ni, X., Guo, Y., Guo, X., Wang, Y., Zhou, Z., Huo, R., Sha, J. (2009). Proteomic-based identification of maternal proteins in mature mouse oocytes. *BMC Genomics* 10, 348.

Zhang, Y., Zhao, L., Zhang, J., Le, R., Ji, S., Chen, C., Gao, Y., Li, D., Gao, S., Fan, H. (2018). DCAF 13 promotes pluripotency by negatively regulating SUV 39H1 stability during early embryonic development. *EMBO J* 37, e98981.

Zhao, B.-W., Sun, S.M., Xu, K., Li, Y.Y., Lei, W.L., Li, L., Liu, S.L., Ouyang, Y.C., Sun, Q.Y., Wang, Z.B. (2021). FBXO34 Regulates the G2/M Transition and Anaphase Entry in Meiotic Oocytes. *Front Cell Dev Biol* 9, 647103.

\*Zheng, N., Shabek, N. (2017). Ubiquitin Ligases: Structure, Function, and Regulation. *Annu Rev Biochem* 86, 129–157.

Zhou, S., Guo, Y., Sun, H., Liu, L., Yao, L., Liu, C., He, Y., Cao, S., Zhou, C., Li, M., Cao, Y., Wang, C., Lu, Q., Li, W., Guo, X., Huo, R. (2021). Maternal RNF114-mediated target substrate degradation regulates zygotic genome activation in mouse embryos. *Development* 148, 199426.

Zhu, Y., Pu, Z., Li, Z., Lin, Y., Li, N., Peng, F. (2021). Comprehensive Analysis of the Expression and Prognosis Value of Chromobox Family Members in Clear Cell Renal Cell Carcinoma. *Front Oncol* 11, 700528.