

Univerzita Karlova
Přírodovědecká fakulta

Studijní program: Reprodukční a vývojová biologie



Bc. Kateřina Šimková

Lokalizace maternálních RNA ve vajíčkách a časných embryích

Detection and quantification of maternal RNA localization during early development

Diplomová práce

Vedoucí diplomové práce: Mgr. Radek Šindelka, Ph.D.

Praha, 2022

Prohlášení:

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

V Praze, 20.04.2022

Bc. Kateřina Šimková

Poděkování

Ráda bych poděkovala svému školiteli Radkovi Šindelkovi, Ph.D. za cenné rady a pomoc při psaní této diplomové práce. Velké díky patří MSc. Ravindra Naraine za analýzu RNA-seq dat a dále také mým kolegům Mgr. Danielovi Krausovi a Viktorii Iegorové, PhD. za pomoc s praktickou částí této práce.

Abstrakt

Určení stavby tělního plánu díky asymetrickému rozložení maternálních RNA a proteinů bylo studováno u mnoha živočišných druhů. Během oogeneze si živočichové vytváří zásoby těchto RNA a proteinů, které využívají pro regulaci embryonálního vývoje, a to až do znovuzahájení transkripce z embryonálního genomu. V této diplomové práci jsem se věnovala především identifikaci asymetricky rozmístěných RNA v časných embryích obojživelníka *Ambystoma mexicanum*, které stojí za určením animálně-vegetativní osy. V druhé části mé práce jsem se také pokusila identifikovat asymetricky rozmístěné RNA ve 2 a 4 buněčném embryu, které by mohly stát za určením dalších tělních os – dorzo-ventrální a levo-pravé. Pomocí RT-qPCR tomografie se mi úspěšně podařilo stanovit lokalizační profil vybraných maternálních RNA podél A-V osy a v jednotlivých blastomerách 2 a 4 buněčného embrya. Dále se nám pomocí RNA-seq podařilo získat celkový obraz transkriptomu časných embryí, který nám ukázal, že se během časného vývoje odehrává řada změn. Tyto události jsem rozdělila do tří kategorií: relokizace RNA, syntéza RNA před aktivací embryonální transkripce a degradace RNA v časném vývoji. Zajímavé zjištění bylo odhaleno ve skupině RNA degradovaných během časného vývoje, která obsahuje řadu genů, které mají u *Xenopus laevis* a dalších živočichů nepostradatelnou roli ve vývoji PGC. Dosažené výsledky jsem v této práci porovnála především s příbuzným modelovým organismem *Xenopus laevis* a ukázala jsem, že i zdánlivě podobné organismy vykazují mnoho odlišností v regulaci časného vývoje.

Klíčová slova: RNA lokalizace, *Ambystoma mexicanum*, *Xenopus laevis*, časný embryonální vývoj, animálně-vegetativní osa, dorzo-ventrální osa, levo-pravá osa

Abstract

The asymmetric localization of maternal RNAs and proteins is a crucial mechanism for the body plan development in many animal species. These maternal factors are expressed during the oogenesis and they are used for the regulation of early development. In this diploma thesis, I addressed the role of asymmetrically localized RNAs along animal-vegetal axis in the early development of *Ambystoma mexicanum*. The second part of my thesis is focused on RNA localization in dorso-ventral and left-right axes. I identified the localization patterns of many known RNAs along the animal-vegetal axis using RT-qPCR and I also detected several genes, which can be involved in the dorso-ventral or left-right patterning. Furthermore, we performed transcriptome wide analysis, which revealed changes classified into the following categories: RNAs relocalization, *de novo* synthesis before the onset of MBT and RNAs degradation during early development. Many vegetally localized genes in *Xenopus laevis* with the important role in the development of primordial germ cells have been previously described. Surprisingly, my results show that many of these genes are degraded during the early development of *A. mexicanum*. I believe that this degradation may be due to a different mechanism of PGC development in *A. mexicanum* and *X. laevis*. In this work, I compared the results of two closely related model organisms, and I showed each can regulate the early development in a different way.

Key words: RNA localization, *Ambystoma mexicanum*, *Xenopus laevis*, early development, animal-vegetal axis, dorso-ventral axis, left-right axis

Obsah

| | |
|--|----|
| Obsah..... | 1 |
| Seznam použitých zkratk..... | 3 |
| Úvod..... | 5 |
| Literární přehled..... | 6 |
| 1. Ranný embryonální vývoj..... | 6 |
| 2. Rýhování..... | 6 |
| 3. Aktivace embryonálního genomu (EGA, embryonic genome activation) | 8 |
| 4. Vznik tělních os | 9 |
| 4.1. A-V osa..... | 9 |
| 4.2. D-V osa..... | 10 |
| 4.3. L-P osa | 12 |
| 5. RNA lokalizace..... | 13 |
| 5.1. Obecné mechanismy RNA lokalizace | 13 |
| 5.2. Asymetrická lokalizace RNA u <i>X. laevis</i> | 14 |
| 5.2.1. Časná (METRO) transportní dráha..... | 14 |
| 5.2.2. Pozdní transportní dráha | 15 |
| 5.2.3. Střední transportní dráha..... | 17 |
| 5.2.4. Lokalizace RNA v animálním pólu | 17 |
| 6. Role lokalizované RNA ve vývoji zárodečných buněk..... | 18 |
| 6.1. Vznik zárodečných buněk..... | 18 |
| 6.2. Buněčně autonomní mechanismus | 18 |
| 6.3. Induktivní mechanismus..... | 18 |
| 6.4. Vývoj zárodečných buněk v <i>D. rerio</i> | 19 |
| 7. Determinanty zárodečných buněk | 20 |
| 7.1. <i>buc/velo1</i> | 20 |
| 7.2. <i>nanos1</i> | 21 |
| 7.3. <i>grip2</i> | 21 |
| Cíle diplomové práce | 22 |
| Metody..... | 23 |
| 1. Embrya..... | 23 |
| 2. RT-qPCR tomografie..... | 23 |
| 2.1. Příprava embryí pro identifikaci RNA distribuce podél A-V osy | 23 |

| | | |
|--------|---|----|
| 2.2. | Příprava embryí pro identifikaci RNA profilu pro určení L-P nebo D-V osy | 23 |
| 2.3. | RNA izolace | 24 |
| 2.4. | RT-qPCR..... | 24 |
| 2.4.1. | Reverzní transkripce | 24 |
| 2.4.2. | qPCR | 25 |
| 3. | RNA sekvenování | 25 |
| 3.1. | Příprava knihoven z blastomer 2 a 4 buněčného embrya..... | 25 |
| 3.2. | Příprava knihoven ze vzorků vajíček a embryí připravených podél A-V osy | 26 |
| 3.3. | RNA sekvenování | 26 |
| 4. | Mikroinjikace | 26 |
| 5. | Analýza dat | 26 |
| 5.1. | Analýza lokalizace RNA podél A-V osy | 26 |
| 5.2. | Analýza syntézy a degradace RNA..... | 27 |
| 5.3. | Analýza distribuce RNA v 2 a 4 buněčném embryu..... | 28 |
| 5.4. | Analýza RNA-seq dat | 28 |
| 6. | Roztoky | 28 |
| | Výsledky..... | 29 |
| 1. | Distribuce maternální RNA podél A-V osy | 29 |
| 1.1. | Distribuce celkové RNA | 29 |
| 1.2. | Asymetricky lokalizovaná RNA | 30 |
| 1.3. | Relokalizace RNA v průběhu časného vývoje..... | 30 |
| 1.4. | Syntéza RNA v období před MBT..... | 32 |
| 1.5. | Degradace maternální RNA v časném vývoji..... | 35 |
| 2. | Distribuce maternální RNA v jednotlivých blastomerách | 37 |
| 2.1. | Distribuce RNA ve 2 buněčném embryu | 37 |
| 2.2. | Distribuce RNA ve 4 buněčném embryu | 38 |
| 2.3. | Komplikace při validaci RNA-Seq dat pomocí RT-qPCR | 39 |
| 3. | Sledování osudu buněk značené fluorescenčním dextranem | 39 |
| | Diskuse..... | 41 |
| | Závěr..... | 52 |
| | Použitá literatura..... | 53 |
| | Přílohy..... | 66 |

Seznam použitých zkratk

| | |
|--|---|
| <i>akt2</i> | <i>v-akt murine thymoma viral oncogene homolog 2</i> |
| <i>ankhd1</i> | <i>ankyrin repeat and KH domain containing 1</i> |
| <i>atp4a</i> | <i>ATPase H⁺/K⁺ transporting subunit alpha</i> |
| <i>atp6v0c</i> | <i>ATPase H⁺ transporting V0 subunit C</i> |
| A-V osa | animálně-vegetativní osa |
| <i>buc</i> | <i>bucky ball</i> |
| <i>cdk8</i> | <i>cyclin-dependent kinase 8</i> |
| cDNA | complementary deoxyribonucleic acid (komplementární deoxyribonukleová kyselina) |
| <i>ctnnb1</i> | <i>catenin beta 1</i> |
| <i>dazl</i> | <i>deleted in azoospermia-like</i> |
| <i>ddx4</i> | <i>DEAD-box helicase 4</i> |
| DEGs | differentially expressed genes (rozdílně exprimované geny) |
| <i>dnd1</i> | <i>dead end 1</i> |
| D-V | dorzo-ventrální |
| EDEN-BP | embryo deadenylation element specific RNA-binding protein |
| EGA | embryonic genome activation (aktivace embryonálního genomu) |
| <i>gdf1</i> | <i>growth differentiation factor 1</i> |
| <i>grim-1</i> | <i>gene associated with retinoid-interferon-induced mortality-1</i> |
| <i>grip2</i> | <i>glutamate receptor-interacting protein 2</i> |
| <i>gsk3b</i> | <i>glycogen synthase kinase-3 beta</i> |
| H ⁺ /K ⁺ -ATPáza | hydrogen potassium ATPase |
| H ⁺ -V-ATPáza | vacuolar-type hydrogen ATPase |
| LE | lokalizační element |
| L-P | levo-pravá |
| MAP | mitogen-activated protein kinase |
| MBT | midblastula transition (přechodné stádium střední blastuly) |
| METRO | message transport organizer |
| <i>mok</i> | <i>MAPK/MAK/MRK overlapping kinase</i> |

| | |
|--------------------|--|
| mRNA | messenger RNA (mediátorová RNA) |
| MW | molecular weight (molekulová hmotnost) |
| nt | nucleotide (nukleotid) |
| <i>nynrin-like</i> | <i>NYN Domain And Retroviral Integrase Containing-like</i> |
| <i>otx1</i> | <i>orthodenticle homeobox 1</i> |
| padj | adjusted p-value (upravená p-hodnota) |
| PCA | principal component analysis (analýza hlavních komponent) |
| PGC | primordial germ cells (primordiální zárodečné buňky) |
| <i>plin2</i> | <i>peripilin2</i> |
| qPCR | quantitative polymerase chain reaction (kvantitativní polymerázová řetězová reakce) |
| <i>rbpms2</i> | <i>RNA binding protein with multiple splicing 2</i> |
| RNA | ribonucleic acid (ribonukleová kyselina) |
| RNA-seq | RNA-sequencing (RNA-sekvenování) |
| RNP | ribonucleoprotein particles (ribonukleoproteinové částice) |
| RT | reverse transcription (reverzní transkripce) |
| <i>shq1</i> | protein SHQ1 homolog |
| <i>tgf-β</i> | <i>transforming growth factor beta</i> |
| UTR | untranslated region (nepřekládaná oblast) |
| <i>vegt</i> | <i>vegetal T-box transcription factor</i> |
| <i>velo1</i> | <i>vegetally localized protein 1</i> |
| WISH | whole-mount <i>in situ</i> hybridization (<i>in situ</i> hybridizace celého embrya) |
| Wnt | Wingless/int-1 signalization |
| <i>wnt1</i> | <i>Wnt family member 1</i> |
| <i>wnt11</i> | <i>Wnt family member 11</i> |
| <i>wnt5a</i> | <i>Wnt family member 5A</i> |
| <i>wnt5b</i> | <i>Wnt family member 5B</i> |
| <i>wnt8b</i> | <i>Wnt family member 8B</i> |
| <i>znhit2</i> | <i>zinc finger HIT-type containing 2</i> |

Úvod

Časný embryonální vývoj živočichů je velice komplexní proces, který je již několik desetiletí podrobován detailnímu výzkumu, ale i tak zde pořád panuje mnoho nejasností, zda jsou vývojové mechanismy mezi jednotlivými druhy evolučně konzervované.

U řady živočišných druhů je základem pro stavbu budoucího tělního plánu gradient maternálních molekul podél animálně-vegetativní osy (A-V) vajíčka. Na rozdíl od savců, kde nebyly nalezeny žádné známky takto lokalizovaných molekul v časném vývoji, u obojživelníků a ryb je známo, že vývoj zárodečných vrstev je umožněn díky asymetricky lokalizovaným RNA a proteinům. Jedním z nejvíce probádaných živočichů v tomto ohledu je drápatka vodní (*Xenopus laevis*). Vajíčko *X. laevis* je rozdělené na tmavou animální polovinu, která je zodpovědná za vznik nervových a ektodermálních struktur, a na světlou vegetativní polovinu, ze které vznikají endodermální struktury. V nedávné době provedená transkriptomová analýza vajíček *X. laevis* ukázala, že až 98 % procent všech maternálních mRNA vykazuje lokalizaci podél A-V osy (Sindelka *et al.* 2018).

Po oplození dochází u obojživelníku ke tvorbě druhé tělní osy – dorzo-ventrální (D-V). Zatímco v embryích octomilky obecné (*Drosophila melanogaster*) je známo, že vznik D-V osy je zprostředkován gradientem maternální mRNA *gurken*, u *X. laevis* je většina studií toho názoru, že je vznik D-V osy určen pomocí lokalizace proteinů. Posledním komponentem určujícím stavbu tělního plánu je vznik levo-pravé (L-P) osy. Dlouhou dobu se mělo za to, že vznik asymetrické L-P osy je zahájen až v období gastrulace, ale v nedávných publikacích se podařilo identifikovat asymetricky lokalizované mRNA již ve 2 a 4 buněčném embryu.

V mé práci jsem se zaměřila na charakterizaci maternálních RNA, potenciálně potřebných k určení tří základních tělních os – A-V, D-V a L-P – v časných embryích obojživelníka axolotla mexického (*Ambystoma mexicanum*). *A. mexicanum* je z fylogenetického hlediska poměrně blízko příbuzný *X. laevis* a s tímto druhem také sdílí řadu podobností. Oba druhy jsou ve vývojové biologii využívány ve výzkumech zaměřující se na regeneraci a embryonální vývoj. Samice *A. mexicanum*, tak jako *X. laevis*, klade velké množství velkých (~2 mm) vajíček, které jsou díky vnějšímu oplození dobře přístupná pro další zkoumání. Nakladená vajíčka obou živočichů jsou si velice podobná a tato morfologická podobnost přetrvává i v časných embryonálních stádiích. Z tohoto důvodu jsem se proto v mé práci rozhodla studovat časná embrya *A. mexicanum* a dosažené výsledky porovnat právě s *X. laevis*.

Literární přehled

1. Ranný embryonální vývoj

Jednou z klíčových událostí při vzniku mnohobuněčného organismu je příprava buňky na buněčné dělení, které je velmi často asymetrické. Před samotným dělením musí uvnitř buňky dojít k asymetrickému rozdělení takzvaných determinantů buněčného osudu – proteinů, kódujících a nekódujících ribonukleových kyselin (RNA, ribonucleic acid).

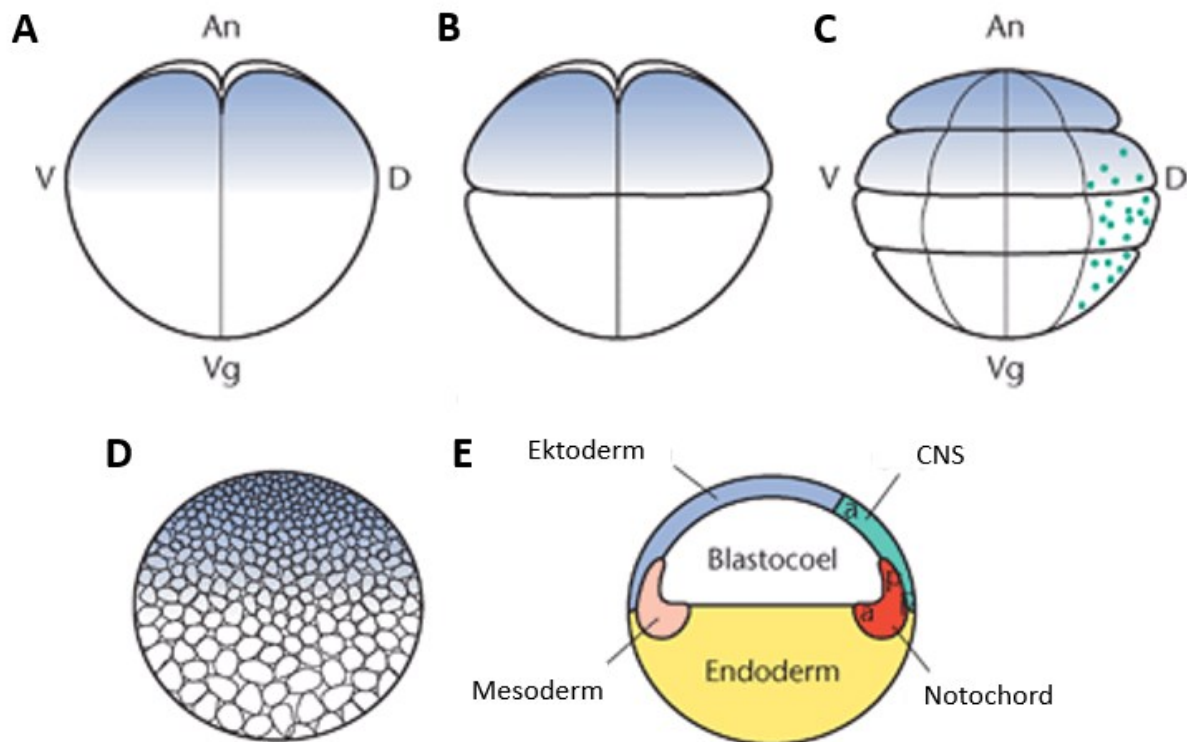
U řady živočichů se asymetrické rozdělení determinantů objevuje již během oogeneze nebo těsně po oplození. Takto lokalizované proteiny a RNA tvoří polaritu vajíček a určují tak osud buněk daného regionu během vývoje. Zatímco savčí oocyty a ranná embrya nejeví žádné známky asymetrické lokalizace (Vinot *et al.* 2005), u obojživelníků z řádu žab (*Anura*) je tento jev velice častý. Nejprozkoumanějším zástupcem tohoto řádu je *X. laevis*, u níž dochází k asymetrické lokalizaci maternálních RNA a proteinů již během oogeneze (Forristall *et al.* 1995, Kloc a Etkin 1995, Sindelka *et al.* 2010, 2018). Asymetricky lokalizovaná RNA byla identifikována i u dalších zástupců toho řádu – u skokana levhartího (*Rana pipiens*) (Nath *et al.* 2005) a bezblanky koki (*Eleutherodactylus coqui*) (Elinson *et al.* 2011).

Dalším řádem patřící pod obojživelníky je řád ocasatí (*Caudata*). Nejčastěji používaným modelovým organismem z řádu *Caudata* je *A. mexicanum*, jenž je hojně využíván ve výzkumech zaměřující se na embryonální vývoj a regeneraci. Bohužel informace o lokalizaci maternálních RNA u zástupců tohoto řádu, ale stále chybí. Proto jsem si pro můj výzkum vybrala právě *A. mexicanum* a zaměřila se na distribuci jeho maternálních RNA ve vajíčkách a časných embryích.

2. Rýhování

Krátce po oplození dochází k rýhování vajíčka. Během prvního dělení embrya *X. laevis* probíhá dělicí rýha od animálního do vegetativního pólu a rozděluje tak embryo na levou a pravou blastomeru. Druhé dělení je kolmé k prvnímu za vzniku 4 buněk, které rozděluje embryo na dorzální a ventrální části a následně dochází ke třetímu dělení kolmému k předešlému dělení za vzniku 8 buněk. V 8 buněčném embryu jsou 4 buňky animální poloviny menší než buňky vegetativní hemisféry z důvodu velkého množství žloutku, který ovlivňuje pozici dělicího vřeténka. Následně dochází k dalším dvěma dělení za vzniku 16 a 32 buněk (obrázek 1A-1D). V následujících děleních embrya vstupují do stádia blastuly a dochází ke ztrátě synchronicity dělení (Gerhart a Kirschner 1994).

Trasování buněk pomocí mikroinjikace dextranu nebo křenové peroxidázy do jednotlivých blastomer časného embrya *X. laevis* umožnila sestavení tzv. mapy buněčného osudu („fate map“). Buňky z animální poloviny embrya dávají vzniknout ektodermálním a neuroektodermálním strukturám, zatímco vegetativní polovina je zodpovědná za vznik endodermu. Mesoderm poté vzniká z ekvatoriálního segmentu vlivem vegetativních indukčních faktorů (obrázek 1E) (Moody 1987a, 1987b, Mills *et al.* 1999). Podrobná mapa osudu jednotlivých blastomer byla sestavená také u obojživelníka žebrovník Waltlův (*Pleurodeles waltl*), zástupce z řádu *Caudata*. Trasování blastomer 32 buněčného embrya ukázalo mnohé podobnosti s mapou *X. laevis*, ale přesto se příspěvek jednotlivých blastomer ke vzniku budoucích tělních orgánů částečně liší. Například endodermální struktury u *P. waltl* vznikají pouze z vegetativních blastomer, zatímco u *X. laevis* mohou částečně přispívat vzniku endodermu i blastomery z více ekvatoriálního segmentu (Delarue *et al.* 1997). Podrobná mapa ukazující osud jednotlivých blastomer *A. mexicanum* chybí, ale z výzkumu z roku 1985 je patrné že animální pól gastruly dává vzniknout epidermis, ale již ne prospektivnímu neurálnímu plátu, zatímco ekvatoriální segment je zodpovědný za vznik mesodermu a endodermu (Cleine a Slack 1985).



Obrázek 1: Rýhování *X. laevis*. A) Dvoubuněčné embryo B) 4 buněčné embryo C) Embryo 32 buněk D) Blastula E) Řez blastulou ukazující příspěvek blastomer k budoucím ektodermálním, entodermálním a mesodermálním strukturám. V- ventrální; D- dorzální; A- animální; Vg-vegetativní; CNS- centrální nervová soustava (převzato a upraveno podle Elinson, 2011).

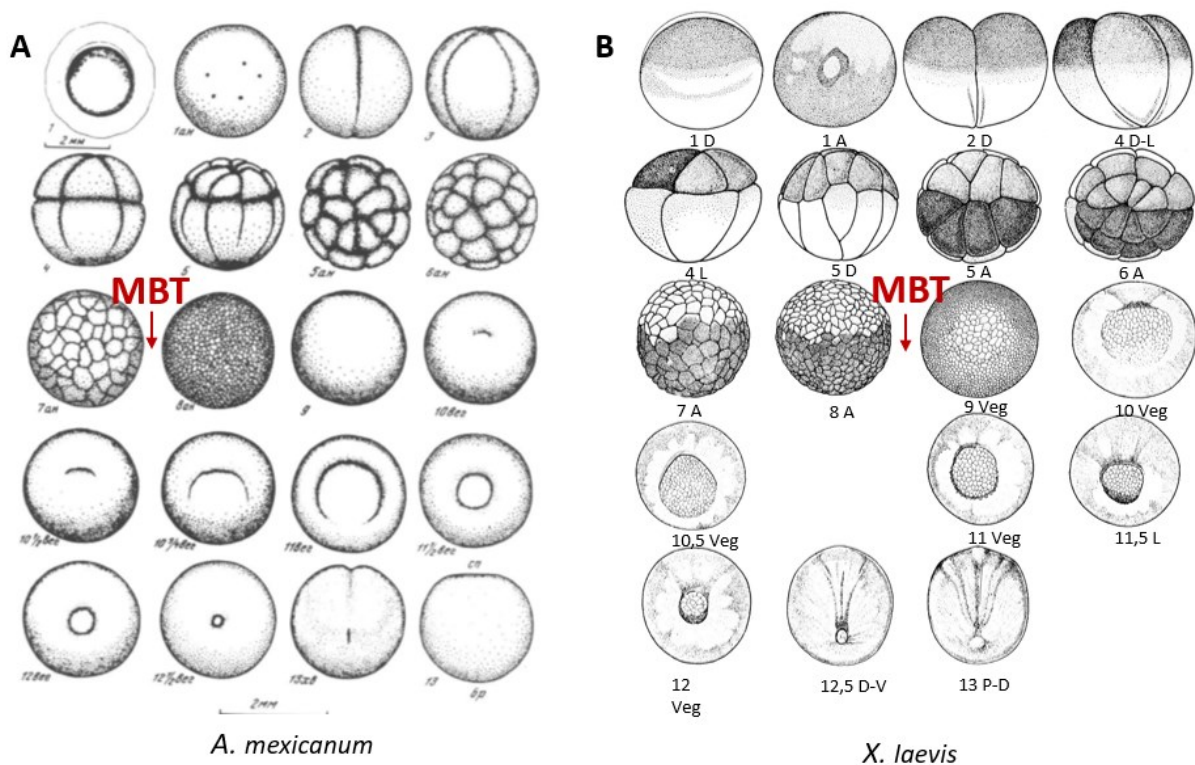
3. Aktivace embryonálního genomu (EGA, embryonic genome activation)

Po oplození nastává u obojživelníků fáze vyznačující se rychlým buněčným dělením, které je umožněno velkou zásobou maternální RNA a proteinů. Po definovaném počtu buněčných dělení dochází k přechodnému období ve stádiu střední blastuly (MBT, midblastula transition). Během MBT dochází ke zpomalení buněčného dělení, ztrátě synchronicity dělení a následně k aktivaci exprese zygotických genů (Bachvarova *et al.* 1966, Hara 1977, Satoh 1977).

I když jsou si embrya *A. mexicanum* a *X. laevis* v časně embryogenezi morfologicky velice podobná (obrázek 2), doba mezi jednotlivými děleními se liší. Zatímco u *X. laevis* trvá buněčné dělení před MBT přibližně 30 min u *A. mexicanum* je to v průměru kolem 90 minut (Schreckenberga a Jacobson 1975, Bordzilovskaya a Dettlaff 1979). Rozdíl v době trvání jednoho dělení může spočívat v odlišné skladbě buněčného cyklu v době před MBT. Zatímco buněčný cyklus se u *X. laevis* skládá pouze z S a M fáze (Graham a Morgan 1966, Desnitskiy 2018) u *A. mexicanum* je zde navíc přítomná i G2 fáze (Signoret a Lefresne 1974 citováno podle Lefresne *et al.* 1998). Po MBT dochází k přidání G1 fáze (u *X. laevis*

i G2 fáze) do buněčného cyklu (Graham a Morgan 1966, Frederick a Andrews 1994, Lefresne *et al.* 1998, Iwao *et al.* 2005).

Oba obojživelníci se odlišují i v počtu buněčných dělení předcházejících MBT. U *X. laevis* dochází k prodloužení buněčného cyklu po 12 dělení (obrázek 2B) a ve stejné době byla také zjištěna přítomnost nově syntetizované RNA (Bachvarova *et al.* 1966, Satoh 1977). U *A. mexicanum* se doba buněčného cyklu prodlužuje po 11 dělení (Hara 1977) (obrázek 2A). Bohužel žádný výzkum potvrzující přítomnost nově syntetizované RNA v tomto stádiu u *A. mexicanum*, ale proveden nebyl.



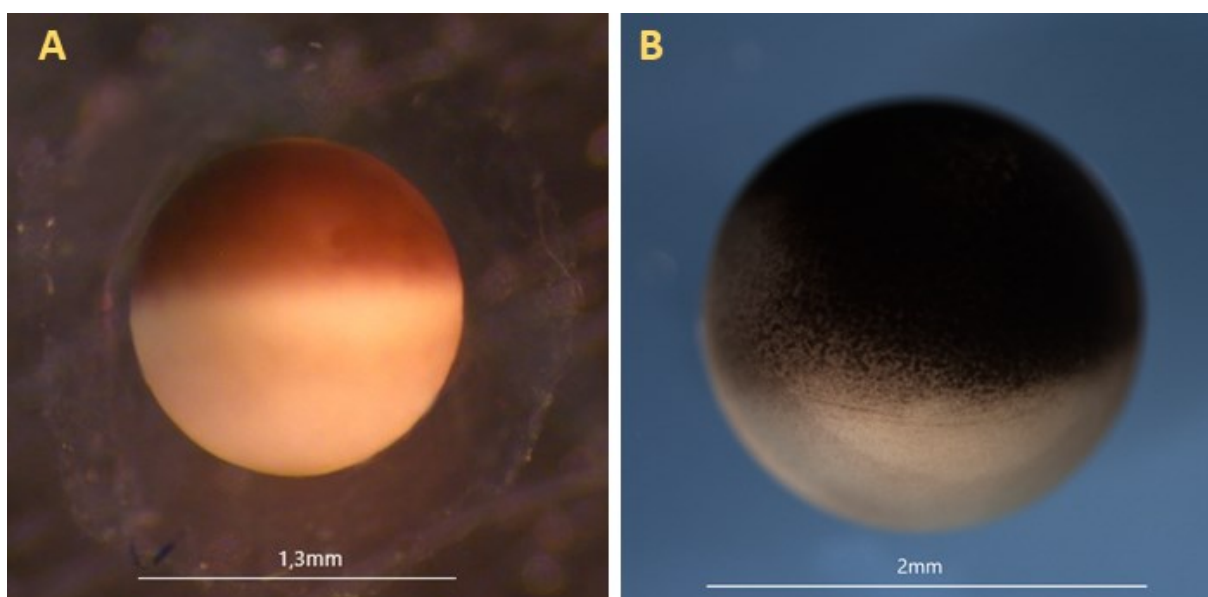
Obrázek 2: Časný embryonální vývoj *A. mexicanum* (A) a *X. laevis* (B). Na obou obrázcích je vyznačené, v jaké fázi dochází k MBT. MBT- midblastula transition, D- dorzální pohled, A- animální p., L- laterální p., V- ventrální p., Veg- vegetativní p. (převzato a upraveno podle Bordzilovskaya a Dettlaff, 1979; Gerhart a Kirschner 1994; *Xenopus laevis* stage series: complete.)

4. Vznik tělních os

4.1. A-V osa

Během oogeneze a časně embryogeneze dochází u obojživelníků ke stanovení A-V, D-V a L-P osy, které jsou nepostradatelné pro správný vývoj embrya. A-V osa je u *X. laevis* dána rozdělením vajíčka na animální a vegetativní pól (obrázek 3), ke kterému dochází již během IV. fáze oogeneze. Animální polovina se vyznačuje přítomností pigmentových granul, které jí udávají tmavě hnědé zbarvení. Pro animální polovinu je typická přítomnost zárodečného

váčku („germinal vesicle“). Vegetativní polovina je světlá a obsahuje velké množství žlutkových proteinů. Žlutkové proteiny se zde nachází ve formě membránově vázaných váčků, tzv. žlutkových plátů, které jsou uvnitř oocyty mezi IV.-VI. fází oocyty asymetricky distribuovány převážně do vegetativní poloviny. Dále se ve vegetativní polovině nachází endoplazmatické retikulum, Golgiho aparát, velké množství mitochondrií a zárodečná plazma. Toto uskupení se formuje v I. fázi oocyty a označuje se jako mitochondriální oblak nebo také jako Balbianiho tělísko (Dumont 1972). Zárodečná plazma obsahuje determinanty (maternální RNA a proteiny), ze kterých později vznikají primordiální zárodečné buňky (PGC) (Buehr a Blackler 1970, Tada *et al.* 2012). Na druhou stranu u *A. mexicanum* se však zdá, že PGC vznikají indukci v mesodermu bez přítomné zárodečné plazmy (Ikenishi a Nieuwkoop 1978, Johnson *et al.* 2003).



Obrázek 3: Vajíčko *X. laevis* (A) a *A. mexicanum* (B) s ukazatelem jejich velikostí.

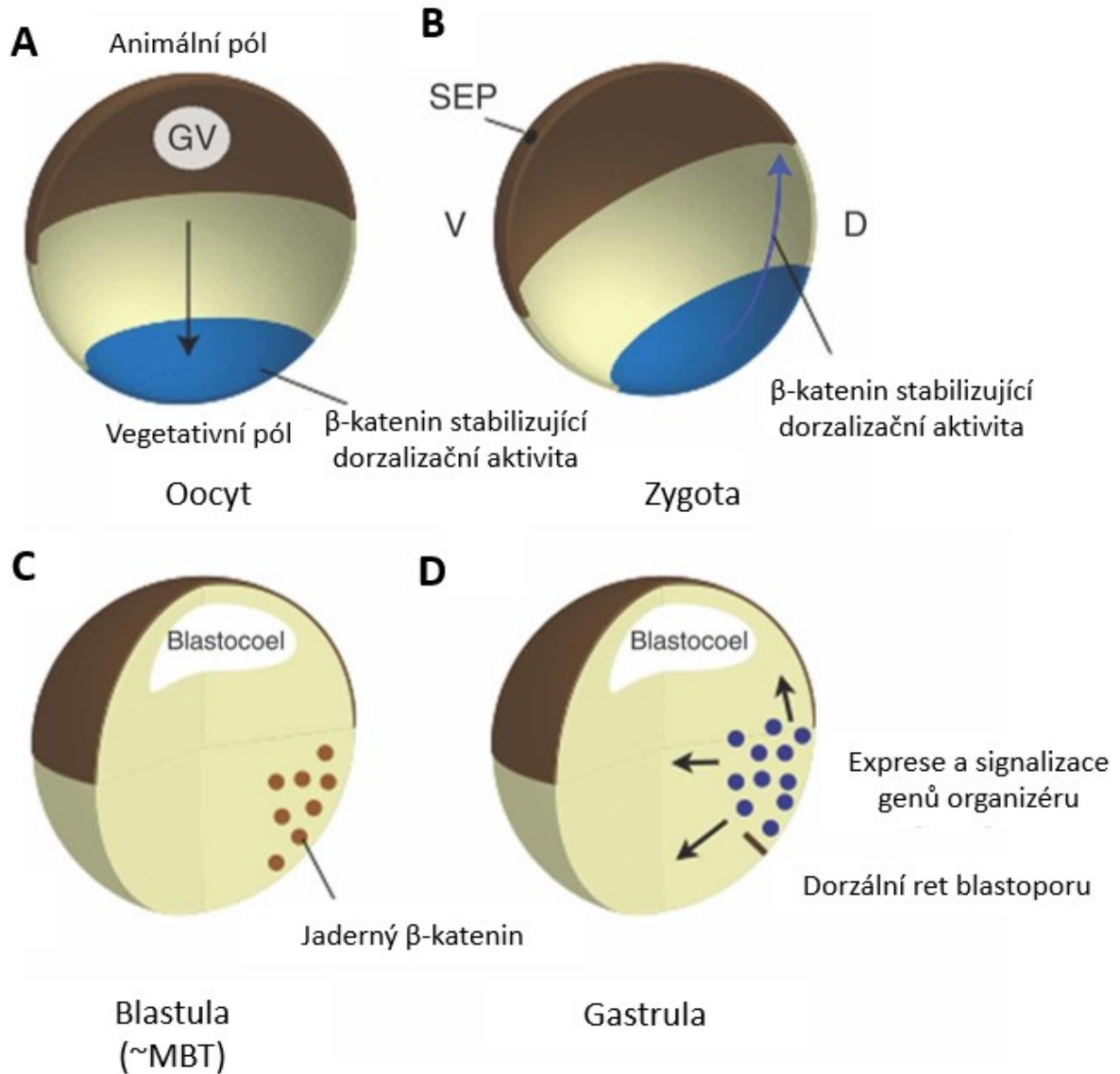
4.2. D-V osa

D-V polarita je u obojživelníků stanovena sérií procesů nastávajících po oplození a spouštějící přestavbu cytoplazmy a přesun dorzálních determinantů.

U *X. laevis* spermie proniká skrz animální stranu vajíčka a tím dojde k přestavění mikrotubulů, které umožní kortikální rotaci. Ke kortikální rotaci dochází asi 45 minut po oplození a trvá do prvního buněčného dělení. Během této doby dochází k polymeraci a depolymeraci mikrotubulů, což umožní pohyb kortexu oproti cytoplazmě asi o 30°. Přesunem kortexu dojde ke vzniku šedého srpku, struktury na budoucí dorzální straně, která je základem pro organizátor a Nieuwkoopovo centrum (Manes *et al.* 1978, Vincent *et al.* 1986, 1987, Elinson a Rowning 1988).

Pro určení dorzální strany jsou důležité maternální determinanty, které jsou během oogeneze transportovány do vegetativního pólu. Mesoderm indukující faktory jako např. *růstový diferenační faktor* (*gdf1*, *growth differentiation factor 1* – dříve *vg1*) a *vegetativní T-box transkripční faktor* (*vegt*, *vegetal T-box transcription factor*) jsou nejprve ukotveny ve vegetativním kortexu, ale po oplození dojde k jejich translaci a mohou tak difundovat do ekvatoriálního segmentu, kde spouští expresi genů rodiny *transformujícího růstového faktoru beta* (*tgf-β*, *transforming growth factor beta*) důležitých pro vznik mesodermu (Melton 1987, Weeks a Melton 1987, Pondel a King 1988, Forristall *et al.* 1995, Lustig *et al.* 1996, Stennard *et al.* 1996, Zhang a King 1996, Wardle a Smith 2006).

Dále se ve vegetativním pólu vyskytují faktory (např. protein Dishevelled) stabilizující protein β -katenin (obrázek 4A), hlavní součást Wingless/int-1 (Wnt) β -katenin signalizační dráhy zodpovědné za dorzalizaci celého embrya (Heasman *et al.* 1994, Miller *et al.* 1999). β -katenin stabilizující faktory se během oogeneze vyskytují ve vegetativním pólu, po oplození jsou vlivem kortikální rotace přesunuty podél mikrotubulů do ekvatoriálního segmentu na budoucí dorzální stranu (obrázek 4B) (Miller *et al.* 1999). Následně dojde ke stabilizaci β -kateninu a jeho vstupu do jader buněk, kde zůstává nahromaděn až do období MBT (obrázek 4C) (Larabell *et al.* 1997, Miller *et al.* 1999). Po MBT β -katenin aktivuje expresi řady zygotických genů, které kooperací s exprimovanými geny *tgf-β* umožňují tvorbu Nieuwkoopova centra, organizátoru a následně i vznik mesodermu (obrázek 4D) (Wardle a Smith 2006).



Obrázek 4: Vznik D-V osy u *X. laevis*. V oocytu jsou β -katenin stabilizující faktory (např. Dishevelled) lokalizované ve vegetativním pólu (A). Po oplození dochází ke kortikální rotaci a přemístění β -katenin stabilizujících faktorů do budoucí dorzální strany embrya (B). V blastule je β -katenin stabilizován a lokalizován v jádrech (C). Vlivem β -kateninu a mesoderm indukujících faktorů dochází k aktivaci exprese řady genů a k dorzalizaci embrya (D). V- ventrální, D-dorzální, GV- zárodečný váček (germinal vesicle), SEP- místo vstupu spermie (sperm entry point) (převzato a upraveno podle Houston, 2012).

4.3. L-P osa

Zatímco mechanismus stojící za určení dvou již zmíněných os se zdá být poměrně dobře prozkoumán otázka, kdy a jakým způsobem dochází k určení L-P osy u obojživelníků zatím zůstává nezodpovězena.

Prvním krokem v určení L-P osy u *X. laevis* se zdá být asymetrická lokalizace iontových pump. Mediátorová RNA (mRNA, messenger RNA) pro vodíko-draselnou pumpu (H^+/K^+ -ATPáza, Hydrogen potassium ATPase) je v oocytu exprimována

rovnoměrně, po oplození ale během následujících dvou dělení dochází k její lokalizaci do blastomer pravé strany (Levin *et al.* 2002). Podobně je během prvních dělení lokalizovaná i vakuolární vodíková pumpa (H^+ -V-ATPáza, vacuolar-type hydrogen ATPase) (Adams *et al.* 2006).

Asymetrický tok H^+ se ukázal být nejčasnějším známým krokem pro určení L-P osy také u dána pruhovaného *Danio rerio* a kura domácího *Gallus gallus*. Zajímavé ale je, že u savců žádný podobný mechanismus odhalen nebyl. Rozdílný tok iontů během časného vývoje tak může být konzervovaným mechanismem pro zahájení asymetrické exprese genů určujících L-P osu pouze u části obratlovců (Levin *et al.* 2002, Adams *et al.* 2006).

Protože se většina doposud objevených genů asymetricky exprimuje až v pozdějších stádiích vývoje, asymetricky lokalizovaná mRNA pro H^+/K^+ -ATPázu v 2 buněčném stádiu se proto považuje za nejranější ukazatel L-P osy u *X. laevis*.

5. RNA lokalizace

5.1. Obecné mechanismy RNA lokalizace

Jedním ze způsobů posttranskripční regulace genové exprese je transport RNA v rámci buněčného jádra, cytoplazmy nebo i v extracelulárním prostoru. Specifická lokalizace je umožněna interakcí *trans* proteinů vázající RNA s *cis*-lokalizačními elementy (LE) transkriptu za vzniku ribonukleoproteinových částic (RNP, ribonucleoprotein particles). *Cis*-lokalizační elementy (známé též jako *zipcode*) jsou specifické sekvence v délce pohybující se od jednotek až do několika tisíc nukleotidů a vyskytují se většinou na 3' nebo 5' nepřekládané oblasti (UTR, untranslated region) transkriptu (shrnutí v Chin a Lécuyer, 2017).

Lokalizace RNA může buňce přinášet mnoho výhod. Příkladem jsou neurony, v nichž jsou molekuly mRNA transportovány až do nejvzdálenějších částí axonů a dendritů, což umožňuje směřovat translaci proteinů jen do vybraných částí buňky. Oproti transportu RNA by byl přesun jednotlivých proteinů, i v několik metrů dlouhých axonech, velice energeticky i časově náročný. RNA je transportována společně s RNA-vázajícími proteiny podél mikrotubulů a aktinových mikrofilament za pomoci molekulových motorů (dyneiny, kinesiny, myosiny) a ukazuje se, že tento mechanismus je společný pro RNA transport ve většině buněk (shrnutí v Gummy *et al.*, 2014).

Další výzkumy ukázaly, že lokalizace RNA hraje důležitou roli v ranném embryonálním vývoji. Specifická lokalizace maternální mRNA a dalších determinantů do určité oblasti cytoplazmy polarizuje buňku a určuje osud buněk při probíhajícím dělení.

Jeden z prvních výzkumů přinesl zjištění, že v oocytech *D. melanogaster* dochází k aktivní lokalizaci maternální mRNA *bicoid* do budoucí anteriorní části embrya, zatímco *nanos* mRNA je lokalizovaná v jeho posteriorní části. Po oplodnění dojde k translaci a vzniklé proteiny vytvoří koncentrační gradient, který je základem pro vznik anterior-posteriorní osy embrya (Frohnhofer a Nüsslein-Volhard 1986, Driever a Nüsslein-Volhard 1988, St Johnston *et al.* 1989, Lehmann a Nüsslein-Volhard 1991).

Asymetricky lokalizovaná maternální mRNA byla také široce studována v oocytech obojživelníka *X. laevis*. Většina maternálních mRNA je zde lokalizovaná buď do animálního nebo vegetativního gradientu v rámci oocyty (Sindelka *et al.* 2018) a toto uspořádání je důležité pro vývoj zárodečných vrstev, specifikaci os a vznik zárodečných buněk. Následující kapitoly se budou zabývat detailním popsáním mechanismů vedoucí k tomuto asymetrickému rozložení molekul.

5.2. Asymetrická lokalizace RNA u *X. laevis*

V oocytech *X. laevis* lze rozlišit 4 kategorie lokalizace RNA – extrémně vegetativní, vegetativní, animální a extrémně animální. Z celkového počtu 15 005 analyzovaných mRNA se jich většina (94,4 %) vyskytuje v animálním pólu. V extrémně animální části oocyty je lokalizované 2,8 % mRNA a ve vegetativní části 1,3 % mRNA. U 1,3 % mRNA nebylo možné určit lokalizační profil. Nejmenší podíl poté tvoří skupina mRNA lokalizovaná v extrémně vegetativní části – 0,2 % (Sindelka *et al.* 2018).

RNA lokalizovaná ve vegetativní hemisféře je na základě LE v 3' UTR transportována časnou nebo pozdní transportní drahou a následně zabudována do vegetativního kortexu. Oproti tomu o mechanismu lokalizace mRNA do animální hemisféry existuje minimum informací (Sindelka *et al.* 2018).

5.2.1. Časná (METRO) transportní dráha

Časnou transportní drahou jsou mRNA transportovány do vegetativního kortexu přes oblast mitochondriálního oblaku nazývanou organizátor přenosu mRNA (METRO, message transport organizer) (obrázek 5). V této oblasti je nahromaděná zárodečná plazma, se kterou se sdružuje mRNA, a poté společně s dalšími komponenty dávají vznik zárodečným buňkám (Kloc a Etkin 1995).

Zástupcem časně transportní dráhy je mRNA *nanos 1* (*nanos1*; dříve *xcat2*). *Nanos1* mRNA je ve stádiu oocyty I lokalizována v oblasti mitochondriálního oblaku (Mosquera *et al.* 1993, Forristall *et al.* 1995). Lokalizace mRNA je umožněna difúzí z jádra do cytoplazmy a následným zachycením v mitochondriálním oblaku (Kloc a Etkin 1995, Zhou a King 1996,

Chang *et al.* 2004). Zachycení v oblaku probíhá bez účasti mikrotubulů a molekulových motorů a je pravděpodobně závislé na specifických vazebných místech (Kloc a Etkin 1995, Chang *et al.* 2004). V případě *nanos1* byl objeven opakující se motiv UGCAC v 3' UTR oblasti, který pravděpodobně společně s dalšími motivy interaguje s RNA vazebnými proteiny a tím umožňuje vazbu v mitochondriálním oblaku (Betley *et al.* 2002, Chang *et al.* 2004).

Na přelomu stádia oocyty II-III dochází k přesunutí mitochondriálního oblaku společně s molekulami mRNA do vegetativní hemisféry a v poslední fázi transportu je mRNA *nanos1* ukotvena v malé oblasti vegetativního kortexu (Mosquera *et al.* 1993, Forristall *et al.* 1995). Podle nejnovějšího modelu se zdá, že k finálnímu přesunu RNA dochází před samotnou fragmentací mitochondriálního oblaku. Mechanismus, kterým dochází k tomuto závěrečnému transportu RNA, ale není více objasněn (Wilk *et al.* 2005).

Ve vegetativním kortexu je mRNA ukotvena i po oplození a v období časného embryonálního vývoje (Mosquera *et al.* 1993, Forristall *et al.* 1995). Schéma umístění mRNA časně transportní dráhy je během časného vývoje konzistentní s rozmístěním zárodečné plazmy, což společně odpovídá roli ve vzniku zárodečné linie (Savage a Danilchik 1993, Forristall *et al.* 1995).

5.2.2. Pozdní transportní dráha

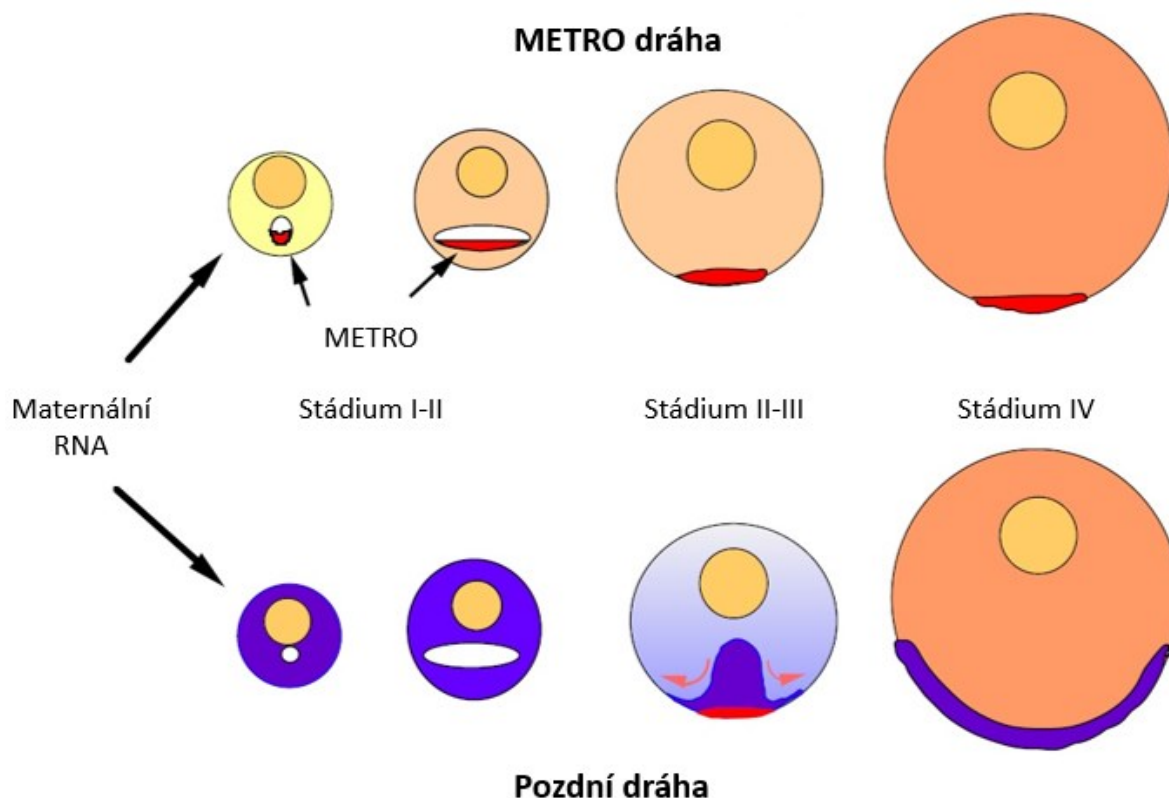
Maternální mRNA transportované pozdní transportní dráhou se vyznačují lokalizací v širší oblasti vegetativního kortexu než mRNA transportované METRO dráhou (obrázek 5). mRNA pozdní dráhy hrají roli především při vývoji zárodečných vrstev.

Mechanismus této transportní dráhy byl nejvíce popsány u mRNA *vegt* (Lustig *et al.* 1996, Stennard *et al.* 1996, Zhang a King 1996) a *gdf1*. Obě molekuly jsou nejprve ve stádiu oocyt I volně rozprostřeny v cytoplazmě, ve stádiu oocyt II se začnou hromadit v oblasti vegetativního pólu, spojují se s endoplazmatickým retikulem a následně jsou na přelomu stádia III a IV přesunuty a ukotveny do vegetativního kortexu (Melton 1987, Forristall *et al.* 1995, Kloc a Etkin 1995, Deshler *et al.* 1997).

Prvotní agregace mRNA v oblasti endoplazmatického retikula probíhá bez účasti mikrotubulů, pro pozdější transport do vegetativního kortexu jsou již mikrotubuly a molekulární motory (kinesin I a kinesin II), které interagují s RNP komplexem, nezbytné (Yisraeli *et al.* 1990, Betley *et al.* 2004, Yoon a Mowry 2004, Messitt *et al.* 2008). K ukotvení mRNA ve vegetativním kortexu dochází interakcí s cytokeratinovými filamenti (Pondel a King 1988, Alarcon a Elinson 2001). Krátce po oplození dojde k rozpadu

cytokeratinu a mRNA jsou uvolněny z kortexu a difúzí rozprostřeny ve vegetativní polovině vajíčka a ranných embryí (Weeks a Melton 1987, Pondel a King 1988, Forristall *et al.* 1995, Zhang a King 1996).

Pro transport do vegetativního pólu je mRNA *gdf1* rozpoznána díky 340 nt (nucleotide) dlouhému lokalizačnímu elementu v 3' UTR oblasti (Mowry a Melton 1992). V rámci lokalizačního elementu bylo nalezeno několik krátkých repetitivních motivů (UUUCUA a UUCAC), které jsou schopné vazby s proteiny za vzniku RNP komplexu (Deshler *et al.* 1997, 1998, Cote *et al.* 1999). Lokalizační element byl identifikován také v 3' UTR oblasti mRNA *vegt* a i zde se nachází klastry UUCAC motivů (Bubunenko *et al.* 2002, Kwon *et al.* 2002). Zdá se ale, že motiv lokalizačních elementů není společný pro všechny mRNA přepravované touto dráhou. Příkladem je mRNA *vegetativně lokalizovaný protein* (*velo1*, *vegetally localized protein*), která sice vykazuje stejný lokalizační vzor jako výše zmíněné mRNA, ale liší se délkou i sekvencí LE (Claußen a Pieler 2004). Zdá se tedy, že mRNA molekuly určené pro transport pozdní dráhou mohou být rozlišené na základě různých motivů v 3' UTR a celkový výčet zjištěných motivů nemusí být stále konečný.



Obrázek 5: Lokalizační dráhy maternální RNA. RNA transportovaná METRO dráhou (nahore) je nejprve zachycena v mitochondriálním oblaku (stádium oocyty I) a následně dochází k její lokalizaci do malé oblasti vegetativního kortexu (stádium oocyty II-III). V pozdní dráze je RNA v oocyty nejprve distribuována rovnoměrně a k zachycení do vegetativního kortexu dochází až později během oogeneze (stádium oocyty IV) (převzato a upraveno podle Kloc a Etkin, 1995).

5.2.3. Střední transportní dráha

Mnoho vegetativně lokalizovaných mRNA vykazuje charakteristiky jak pro časnou, tak i pro pozdní transportní dráhu a řadí se proto do samostatné skupiny nazývané jako střední transportní dráha. Příkladem je mRNA *dead-end 1* (*dnd1*), která sice má lokalizační vzor i LE typický pro pozdní transportní dráhu, jedná se ale o transkript specifický pro zárodečnou plazmu (Horvay *et al.* 2006). Dalšími zástupci střední transportní dráhy je mRNA *peripilin 2* (*plin2*; dříve též *fatvg*) (Chan *et al.* 1999), která pravděpodobně využívá k transportu oba typy drah nebo dále také mRNA *proteinu interagujícího s glutamátovým receptorem 2* (*grip2*, *glutamate receptor-interacting protein 2*) transportující se na podobném principu (Claußen *et al.* 2011).

5.2.4. Lokalizace RNA v animálním pólu

V animálním pólu oocyty je lokalizovaná většina přítomné mRNA (kolem 94 %) a lokalizace probíhá pravděpodobně během oogeneze difúzí z jádra bez aktivního transportu (Sindelka *et al.* 2010, 2018). Na druhou stranu, extrémně animální skupina mRNA vykazuje

rostoucí gradient v animálním pólu v oblasti kortexu, což již naznačuje potřebu aktivního transportu, ale protože v 3'UTR oblasti zatím nebyl zjištěn žádný motiv potřebný pro transport, mechanismus lokalizace zatím zůstává neobjasněn (Sindelka *et al.* 2018).

6. Role lokalizované RNA ve vývoji zárodečných buněk

6.1. Vznik zárodečných buněk

Během vývoje obratlovců je pro vznik PGC, prekursorů gamet, kritické oddělení zárodečné linie od somatické. Dosud byly popsány dva mechanismy zajišťující tuto událost – mechanismus buněčně autonomní a induktivní.

6.2. Buněčně autonomní mechanismus

Buněčně autonomní mechanismus byl popsán například u obratlovců *D. rerio* a *X. laevis*. U *X. laevis* je základem pro vznik zárodečné linie zárodečná plazma obsahující nemembránová zárodečná granula s maternálními RNA a proteiny (Mahowald a Hennen 1971, Heasman *et al.* 1984, Kloc a Etkin 1995).

Na začátku oogeneze se zárodečná plazma akumuluje v oblasti mitochondriálního oblaku, následně nastává přesun celého komplexu do vegetativní oblasti, fragmentaci mitochondriálního oblaku, a poté dochází k ukotvení komponentů zárodečné plazmy do kortexu oocyty (METRO dráha) (Heasman *et al.* 1984; Kloc a Etkin 1995). Po oplození je zárodečná plazma během rýhování segregována do vegetativních blastomer pomocí asymetrického dělení, kdy se zárodečná plazma vždy segreguje do jedné dceřiné buňky, budoucí PGC, a tímto procesem postupně dojde postupně k oddělení zárodečné linie od somatické. Přibližně 1,5 dne po oplození dojde v embryu k několika mitotickým dělením PGC v oblasti endodermu a zárodečné buňky poté migrují do genitální rýhy, kde dají vzniknout gametám (Blackler 1958, Whittington a Dixon 1975, Wylie *et al.* 1976).

6.3. Induktivní mechanismus

Induktivní mechanismus diferenciací zárodečných buněk bývá nejvíce spojován se savčími modely, ukazuje se ale, že tento mechanismus je společný i pro zástupce z řádu *Caudata*.

U *A. mexicanum* se ukázalo, že PGC vznikají bez přítomnosti zárodečné plazmy v odpovědi na indukční signály z endodermu. PGC vznikají z totipotentních buněk, které jsou v rané gastrule lokalizované ve ventrální marginální zóně. Prekuzory PGC na konci gastrulace prochází dorzálním rtem blastoporu a usídlují se v budoucím mesodermu, kde dávají vznik gametám (Nieuwkoop 1947, Boterenbrood a Nieuwkoop 1973, Sutasurja a Nieuwkoop 1974, Ikenishi a Nieuwkoop 1978, Johnson *et al.* 2001, 2003). Bylo

prokázáno, že nevratné určení zárodečného osudu buněk probíhá až po specifikaci somatických buněk, a to až v období neurulace (Chatfield *et al.* 2014).

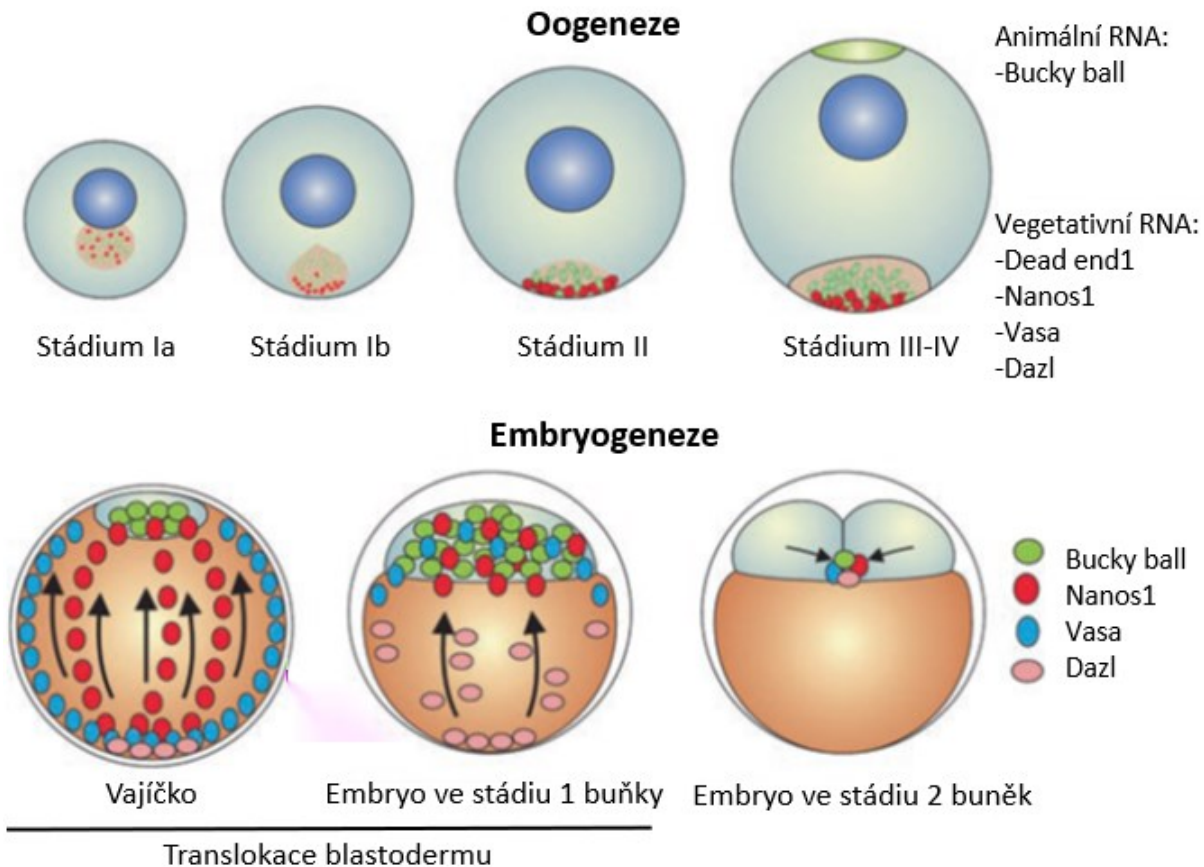
Vzhledem ke společnému mechanismu určení zárodečné linie pomocí induktivní signalizace u myši a ocasatých obojživelníků se zdá, že by induktivní mechanismus mohl být původním pro obratlovce a pocházet od společného předka *Tetrapod* (Johnson *et al.* 2003, Chatfield *et al.* 2014).

6.4. Vývoj zárodečných buněk v *D. rerio*

Vývoj oocyty *D. rerio* se rozděluje na 5 stádií v závislosti na morfologických a fyziologických změnách (Selman *et al.* 1993). Během prvního stádia dochází k formaci Balbianiho tělíska, které hraje významnou roli ve vývoji prekursorů PGC jak u *D. rerio*, tak i u *X. laevis* (Mahowald a Hennen 1971, Heasman *et al.* 1984, Selman *et al.* 1993).

Balbianiho tělísko obsahuje řadu mRNA esenciálních pro tvorbu PGC jako je například *ddx4* (*DEAD-box helicase 4*; známé též jako *vasa*), *nanos1*, *dnd1* a *bucky ball* (*buc*) (Yoon *et al.* 1997, Braat *et al.* 1999, Köprunner *et al.* 2001, Weidinger *et al.* 2003, Bontems *et al.* 2009). Balbianiho tělísko se nejprve nachází v blízkosti zárodečného váčku, následně ale dochází ve stádiu II k jeho přesunu do vegetativního pólu, kde se postupně rozpadne a část jeho mRNA asociuje s kortexem oocyty (Braat *et al.* 1999, Howley a Ho 2000, Kosaka *et al.* 2007). Odlišně je lokalizovaná mRNA *buc*, která se oddělí z Balbianiho tělíska již během stádia II a přemístí se z vegetativního do animálního pólu (obrázek 6) (Bontems *et al.* 2009).

Po oplození se vlivem cytoplazmatické přestavby a zapojení cytoskeletu přesunou do animálního pólu, oblasti budoucího blastodermu, i zbylé mRNA- *dnd1*, *ddx4* a *nanos1* (Howley a Ho 2000, Weidinger *et al.* 2003, Theusch *et al.* 2006). Během prvního dělení vajíčka jsou mRNA lokalizované do blízkosti dělicí rýhy v oblasti embrya sousedící se žloutkem a následně jsou během dalších dělení asymetricky separovány do prekursorů PGC (obrázek 6) (Yoon *et al.* 1997, Braat *et al.* 1999, Köprunner *et al.* 2001, Weidinger *et al.* 2003, Theusch *et al.* 2006).



Obrázek 6: Lokalizace zárodečné plazmy v oogenezi a časně embryogenezi *D. rerio*. Ve stádiu Ia se utváří Balbianiho tělísko, které asociuje s mRNA zárodečné plazmy. Na přelomu stádia Ib a II se Balbianiho tělísko a mRNA přesouvají do vegetativního pólu. V následujících stádiích se Balbianiho tělísko rozpadá a mRNA asociuje s kortexem. *buc* mRNA se ve stádiu III přesouvá do animálního pólu. Po oplození se mRNA zárodečné plazmy z vegetativního kortexu přesouvá do animálního pólu a následně se uskupuje v oblasti dělicí rýhy (převzato a upraveno podle Agüero et al., 2017).

7. Determinanty zárodečných buněk

7.1. *buc/velo1*

V *X. laevis* je mRNA pro *velo1* lokalizovaná pozdní transportní dráhou do vegetativního pólu (Claußen a Pieler 2004). Byly objeveny dvě sestřihové varianty *velo1* – krátká a dlouhá varianta. Delší varianta proteinu se na rozdíl od krátké varianty v previtelogenních oocytech vyskytuje v mitochondriálním oblaku. V pozdních oocytech jsou obě varianty součástí ostrůvků zárodečné plazmy přičemž se ukázalo, že krátká isoforma *velo1* je podstatná pro agregaci těchto ostrůvků (Nijjar a Woodland 2013). Sekvence *velo1* obsahuje homologie pro protein Buc *D. rerio*, kde ovlivňuje A-V lokalizaci mRNA pravděpodobně skrz formaci Balbianiho tělíska (Marlow a Mullins 2008, Bontems et al. 2009). V *D. rerio* je *buc* mRNA ve stádiu oocyt I lokalizovaná taktéž vegetativně, v pozdějších stádiích oocytu ale dochází k její relokaci do animálního pólu. Během prvních dělení je poté protein Buc lokalizován

společně se zárodečnou plazmou ve vegetativní části embrya. Experimentálně indukovaná zvýšená exprese *buc* vedoucí ke zvýšení počtu PGC poté ukazuje na roli proteinu v embryonální organizaci zárodečné plazmy a tím pádem na jeho esenciální roli při vzniku zárodečných buněk. (Bontems *et al.* 2009).

7.2. *nanos1*

RNA-vázající protein obsahující 2 konzervované motivy zinkových prstů („zinc fingers“) potřebné pro vazbu na RNA je kódován genem *nanos1* (Hashimoto *et al.* 2010, Lai *et al.* 2011). Protein Nanos1 je specifický pro tvorbu zárodečných buněk u řady živočišných druhů jako například u *D. rerio* (Köprunner *et al.* 2001) nebo *X. laevis* (Forristall *et al.* 1995, Zhou a King 1996, Lai *et al.* 2011).

Transkripce mRNA *nanos1* *X. laevis* probíhá již během časně oogeneze, translace je ale během oogeneze inhibována a probíhá až po oplození (Mosquera *et al.* 1993, Forristall *et al.* 1995, Zhou a King 1996, Luo *et al.* 2011). Ukazuje se, že protein Nanos1 hraje roli při inhibici translace RNA specifické pro endoderm (např. VegT), a tím umožňuje vznik zárodečných buněk. K inhibici translace ale dochází pouze v období, kdy se zárodečné buňky vyskytují v oblasti endodermu, tedy před začátkem migrace (Lai *et al.* 2011, 2012).

7.3. *grip2*

Gen *grip2* kóduje protein se sedmi PDZ doménami, jehož funkce byla původně objevena při synaptických přenosech nervové soustavy. Protein byl objeven v neuronech, kde asociuje s AMPA glutamátovými receptory a je tak pravděpodobně zodpovědný za jejich lokalizaci (Dong *et al.* 1999). Následně byla ale zjištěna přítomnost mRNA *grip2* v oocytech *X. laevis* a vyvstala tak otázka, zda může mít tento gen roli i v ranném embryonálním vývoji.

Ve stádiu oogeneze I je mRNA lokalizovaná v oocytu *X. laevis* uniformně, tak jako to odpovídá transkriptům lokalizovaným pozdní transportní dráhou, následně ale dochází k její lokalizaci do mitochondriálního oblaku, což odpovídá METRO dráze. Lokalizační vzor této mRNA se tedy řadí ke střední transportní dráze. Dále bylo zjištěno, že mRNA se v pozdějším vývoji přesouvá do PGC, a protože experiment inhibující translaci *grip2* pomocí morfolino oligonukleotidu vedl k problémům lokalizace PGC do genitální rýhy, předpokládá se, že protein Grip2 má pravděpodobně vliv na udržení populace PGC a na migraci PGC do genitální rýhy. Migrace PGC pomocí proteinu Grip2 by mohla probíhat odpovědí na přitažlivé signály z dorzálního mesodermu (Kaneshiro *et al.* 2007, Tarbashevich *et al.* 2007, Kirilenko *et al.* 2008).

Cíle diplomové práce

Hlavním cílem mé diplomové práce je porovnat RNA lokalizaci v časně embryogenezi *A. mexicanum* vůči *X. laevis*. Pomocí kvantitativní PCR reverzní transkripce (RT-qPCR, quantitative reverse transcription PCR) a RNA sekvenační (RNA-seq, RNA-sequencing) tomografie jsem identifikovala řadu genů spadajících do jedné z kategorií lokalizace RNA původně používaných u *X. laevis* (Sindelka *et al.* 2018). K mým dalším cílům se řadí identifikace genů, vykazující změny mezi časnými stádii na RNA úrovni:

- 1) Relokalizované RNA v časném vývoji
- 3) Syntézy RNA před MBT
- 4) Degradace RNA v časném vývoji

V druhé části mé práce jsem se pomocí metod RT-qPCR a RNA-seq zaměřila na identifikaci obsahu RNA v blastomerách 2 a 4 buněčného embrya. Cílem tohoto experimentu bylo srovnat distribuci RNA v jednotlivých blastomerách u embryí *A. mexicanum* s daty *X. laevis*, které již byli získány v naší laboratoři (Sindelka *et al.*, nepublikováno). Nalezené rozdíly ukazují na unikátnost každého modelu, a proto jsem začala pomocí mikroinjikace dextranu do pólů oplozeného vajíčka a jednotlivých blastomer studovat relokizaci v časném vývoji a buněčný osud.

Metody

1. Embrya

Embrya *A. mexicanum* byla poskytnutá z chovu katedry zoologie Přírodovědecké fakulty Univerzity Karlovy ve spolupráci s Vladimírem Soukupem, Ph.D.

Samec a samice *A. mexicanum* byli společně umístěny přes noc v akváriu o teplotě 15°C. To indukovalo samice ke kladení vajíček a jejich oplodnění. Oplodněná vajíčka byly následně sesbírány do Petriho misky se Steinbergovým médiem (viz 6), kde byli s použitím dvou pinzet zbaveny gelového obalu. Embrya jsme inkubovali při teplotě 15 °C do stádia 1, 2, 4, 64 a 1 000 buněk, a poté je přenesli do Tissue-Tek O.C.T. Compound a orientovali animální polovinou směrem vzhůru. Vzorky byly poté uschovány při teplotě -80°C.

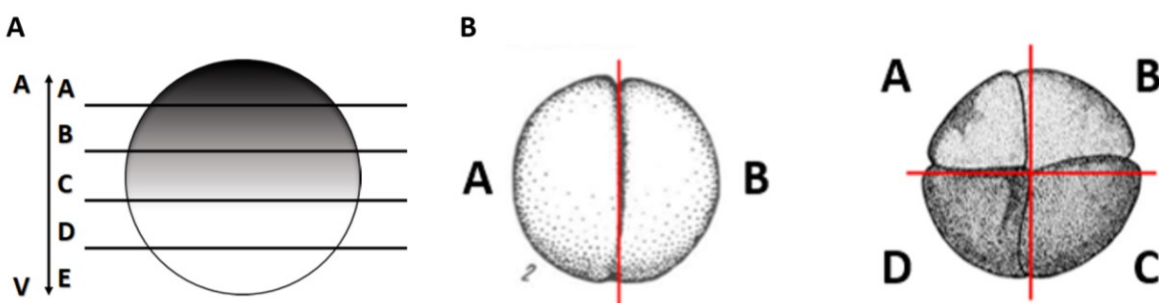
2. RT-qPCR tomografie

2.1. Příprava embryí pro identifikaci RNA distribuce podél A-V osy

5 vzorků ve stádiu vajíčka (1 buňka), 4, 64 a 1 000 buněk bylo nařezáno na 5 segmentů podél A-V osy (obrázek 7A) pomocí kryostatu (Leica CM1950). Teplota kryokomory byla nastavena na 24 °C a teplota nástavce na vzorek na -14°C. Nejprve byly vzorky po dobu 10 min inkubovány v kryokomoře a následně bylo každé embryo rozřezáno na 30 μm široké plátky. Následné plátky byly rovnoměrně rozděleny do 5 zkumavek, přičemž zkumavka č.1 obsahovala animální část, zatímco zkumavka č.5 vegetativní část embrya.

2.2. Příprava embryí pro identifikaci RNA profilu pro určení L-P nebo D-V osy

Pro určení distribuce RNA v jednotlivých blastomerech bylo 6 vzorků ve stádiu 2 a 4 buněk nejprve 10 minut inkubováno při teplotě -14 °C v kryokomoře (pro zamezení namrzávání vzdušné vlhkosti) a následně pomocí velmi jemného skalpelu manuálně rozřezáno na jednotlivé blastomery. Blastomery byly poté rozděleny do zkumavek a číslování vzorků proběhlo podle přiloženého schématu (obrázek 7B).



Obrázek 7. Příprava embryí podél A-V osy (A). Schéma rozdělení blastomer 2 a 4 buněčného embrya (B).

2.3.RNA izolace

RNA byla izolována pomocí TRI Reagent® protokolu. Vzorky byly homogenizované s 300 µl TRI Reagent® (Sigma-Aldrich), po 15 minutách inkubace bylo přidáno 60 µl chloroformu a vzorky byly následně centrifugovány 15 minut při 12 000 g a 4 °C v Eppendorf Centrifuge 5415 R (MarshallScientific). Centrifugací se oddělila horní vodní fáze, která byla přidána k 180 µl isopropanolu. Po 30 min centrifugace (16 100 g, 4 °C) došlo k vysrážení RNA ve formě pelety, která byla pročištěna 500 µl 80% ethanolu. Po odsátí ethanolu a vysušení se sraženina rozpustila v 20 µl Tris-EDTA pufru (Sigma-Aldrich). Následně byl přidán 1 µl GlycoBlue (ThermoFisher) a 20 µl 8M LiCl (Sigma-Aldrich), který umožní dodatečné očištění RNA od inhibitorů přítomných ve žloutku vegetativní hemisféry ranných embryí. Po celonoční inkubaci při -20 °C byla provedena centrifugace vzorků (30 min, 16 100 g, 4 °C) a následně byly vzorky 2x promyty 200 µl 80% ethanolu. Po odsátí a odpaření zbytků ethanolu bylo ke vzorkům přidáno 20 µl 1x Tris-EDTA pufru (Sigma-Aldrich) a vzorky byly 5 min inkubovány při 65 °C až do dokonalého rozpuštění RNA. Změření koncentrace celkové RNA bylo pro RT-qPCR provedeno na NanoDrop-2000 (ThermoFisher), pro přípravu knihoven byla koncentrace a kvalita změřena pomocí 5200 Fragment Analyzer (Agilent).

2.4. RT-qPCR

2.4.1. Reverzní transkripce

30 ng RNA z každého segmentu embryí připraveného podél A-V osy a 50 ng RNA z jednotlivých blastomer bylo přepsáno na komplementární deoxyribonukleovou kyselinu (cDNA, complementary deoxyribonucleic acid) metodou reverzní transkripce. Reakce byla připravena na celkový objem 10 µl a skládala se ze 2 kroků. V prvním kroku byla nejprve RNA naředěná dH₂O bez RNáz a DNáz (ThermoFisher) na objem 5 µl. Dále bylo přidáno 0,5 µl dNTPs (dGTP, dCTP, dATP, dTTP; každý 10mM, ThermoFischer), 0,5 µl oligo-dT a náhodných hexamerů (každý 50 µM, ThermoFisher), 0,5 µl dH₂O bez RNáz a DNáz (ThermoFisher) a 0,5 µl RNA-spike (TATAA biocenter). Přidáním RNA-spike (TATAA biocenter) jsme ověřovali případnou inhibici ve vzorku.

Druhý mix obsahoval 2 µl 5xRT pufru (ThermoFisher), 0,5 µl RnaseOUT (ThermoFisher), 0,5 µl Maxima H minus Transkriptázy (ThermoFisher). Reakce s prvním mixem probíhala v C1000 Thermal Cycler (Bio-Rad) za následujících podmínek – 5 minut při 65 °C a 10 minut při 4 °C. Po tomto kroku byl do reakce přidán druhý mix. Dále reakce probíhala 10 minut při 25 °C, 30 minut při 50 °C, 5 minut při 85 °C a následně byly vzorky

zchlazeny na teplotu 4 °C. Výsledná cDNA byla naředěna na 100 µl Tris-EDTA pufrům (Sigma-Aldrich) a uskladněna při -20 °C.

2.4.2. qPCR

Anotace genů a genové sekvence byly čerpány z online databáze (<https://www.axolotl-omics.org/>) a také z naší RNA-seq analýzy. Primery použité pro kvantitativní polymerázovou řetězovou reakci (qPCR, quantitative polymerase chain reaction) byly navrhnuté s pomocí programu Primer3 (Přílohy, tabulka 1). Pro porovnání nukleotidové sekvence jednotlivých RNA isoformů a zajištění specifity cílového místa primerů byl využit program Geneious verze 2021.2.

Reakční směs o celkovém objemu 7 µl obsahovala 2 µl cDNA, 0,29 µl směsi „forward a reverse“ primerů (směs 1:1, koncentrace 20µM), 3,5 µl 2x TATAA SYBR® GrandMaster® Mix (TATAA Biocenter) a 1,21 µl dH₂O bez RNáz a DNáz (ThermoFisher). Reakce probíhala na přístroji CFX384 Real-Time System (Bio-Rad) za následujících podmínek: denaturace 3 minuty při 95 °C a následně v 45 cyklech: denaturace 15 sekund při 95 °C, nasednutí primerů při 60 °C 20 sekund a elongační fáze při 72 °C 20 sekund. Specifita reakce byla ověřena analýzou křivky tání produktu.

3. RNA sekvenování

3.1. Příprava knihoven z blastomer 2 a 4 buněčného embrya

Ze 150 ng RNA z jednotlivých blastomer 2 a 4 buněčného embrya (z každého stádia 4 replikáty) byla nejprve odstraněna rRNA podle protokolu Ribocop rRNA Depletion Kit V1.3 (Lexogen). Po depleci byly připraveny knihovny podle protokolu NEBNext® Ultra™ II Directional RNA Library Prep Kit for Illumina® (New England Biolabs). Nejprve byla provedena fragmentace RNA po dobu 8 minut. Syntéza prvního řetězce cDNA probíhala 10 minut při 25 °C, 50 minut při 42 °C a 15 minut při 70 °C v C1000 Thermal Cycler (Bio-Rad). Syntéza druhého řetězce cDNA probíhala 60 minut při 16 °C. Dvouřetězcová cDNA byla pročištěna pomocí NEBNext Sample Purification Beads. Poté byla podle protokolu připravená ligační směs, umožňující ligaci adaptorů s cDNA. Směs byla nejprve inkubována 15 minut při 20 °C. Následně byly přidány 3 µl USER enzymu a směs byla inkubována dalších 15 minut při 37 °C. Po dalším pročištění došlo k amplifikaci RNA pomocí PCR reakce (12cyklů) obsahující indexované primery. Iniciační denaturace probíhala 30 sekund při teplotě 98 °C, a poté následovala denaturace 10 sekund při 98 °C. Nasednutí primerů probíhalo při teplotě 65 °C 75 sekund a závěrečná fáze trvala 5 minut při

65 °C. Po pročištění knihoven byla změřena kvalita pomocí 5200 Fragment Analyzer (Agilent). Knihovny byli rovnoměrně smíchány na směs o objemu 150 µl a molaritě 12 nM. Po závěrečném přečištění (odstranění nespotřebovaných adaptorů) byla molární koncentrace směsi stanovena na 31 nM.

3.2. Příprava knihoven ze vzorků vajíček a embryí připravených podél A-V osy
cDNA knihovny byli připraveny ze 3 replikátů z každého stádia (5 segmentů z každého). Postup byl shodný s předcházejícím, jen jsem použila 100ng celkové RNA na vzorek a výsledná koncentrace smíchaných knihoven byla 3,5 nM.

3.3. RNA sekvenování

RNA sekvenování bylo provedeno Servisní laboratoří funkční genomiky a bioinformatiky (Ústav molekulární genetiky AV ČR, v. v. i.) za použití sekvanátoru Illumina NextSeq 500, high-output 150bp.

4. Mikroinjikace

2 nl fluorescein dextranu (1% roztok v H₂O, 10 000 MW) byly injikovány do animálního nebo vegetativního pólu oplodněného vajíčka a do animální části jedné z blastomer embrya ve stádiu 2 buněk (obrázek 12). Embrya inkubována při 15 °C a focena 8 nebo 12 dní po oplození pomocí stereomikroskopu (Nikon SMZ1270). Výsledné obrázky byly zpracovány v programu ImageJ.

5. Analýza dat

5.1. Analýza lokalizace RNA podél A-V osy

Za předpokladu 100% účinnosti qPCR byly hodnoty C_q převedeny na relativní množství podle následujícího vzorce:

$$x_j = \frac{2^{-Cq_j}}{\sum_{j=1}^n 2^{-Cq_j}}$$

x_j označuje část RNA vyskytující se v sekci embrya j . Cq_j poté ukazuje hodnotu C_q v jednotlivých sekcích. n je počet sekcí z jednotlivých embryí. Vzorec znázorňuje množství RNA v určitém segmentu oproti celkovému množství v celém embryu.

Rozdělení RNA do jednotlivých kategorií lokalizace probíhalo podle následujících kritérií:

| Kategorie lokalizace | Kritérium |
|--------------------------|---|
| Extrémně animální RNA | maximum v A; $(A + B) > (D + E)$; $C > D$ nebo E |
| Animální RNA | maximum v B; $D + E < 40\%$ z celkové RNA |
| Vegetativní RNA | $(D + E) > (A + B + C)$; $D > A$ nebo B nebo C |
| Extrémně vegetativní RNA | $E > 50\%$ z celkové RNA; $E > 2 \cdot D$ |
| Ostatní RNA | nesplňuje žádné ze zmíněných kritérií |

Lokalizační profil byl také určen u vybraných RNA získaných RNA-seq analýzou. Podíl RNA na celkové RNA byl vypočítán následujícím způsobem:

$$x_j = \frac{z_j}{\sum_{j=1}^n z_j}$$

x_j označuje část RNA vyskytující se v sekci embrya j . z_j poté ukazuje počet transkriptů v jednotlivých sekcích. n je počet sekcí z jednotlivých embryí. Vzorec znázorňuje množství RNA v určitém segmentu oproti celkovému množství v celém embryu.

RT-qPCR a RNA-seq data byly zpracovány pomocí MS Excel. Podíl jednotlivých RNA z celkového množství RNA v embryu je zobrazen v grafech znázorňující průměr z hodnot ze 3 replikátů. Chybové úsečky ukazují směrodatnou odchylku.

5.2. Analýza syntézy a degradace RNA

Pro analýzu změny množství RNA v embryích podél A-V osy detekovanou metodou qPCR byl použit následující výpočet:

$$x_i = 2^{-\Delta Cq_i} \text{ a } \Delta Cq_i = \frac{Cq_{j1} + Cq_{j2} + \dots + Cq_{j5}}{j} - \frac{Cq_{jv1} + Cq_{jv2} + \dots + Cq_{jv5}}{j}$$

x_i je relativní množství RNA v celém embryu ve stádiu i . ΔCq_i označuje relativní změnu exprese ve stádiu i v porovnání se stádiem 1 buňky. Cq_j je hodnota Cq v sekci j a stádiu i a Cq_{jv} je hodnota Cq v sekci j ve stádiu 1 buňky v .

Výpočet změny množství RNA z dat získaných RNA sekvenováním byl vypočítán následujícím výpočtem:

$$y_i = \frac{w_{j1} + w_{j2} + \dots + w_{j5}}{z_{j1} + z_{j2} + \dots + z_{j5}}$$

y_i je relativní množství mRNA v celém embryu ve stádiu i . w_j označuje počet transkriptů ve stádiu i v sekci j a z_{jv} počet transkriptů embrya ve stádiu 1 buňky v sekci j .

Hodnoty relativního množství získané z analýzy RNA-seq a qPCR byly zpracovány pomocí MS Excel a jsou znázorněny ve sloupcových grafech. Graf vyjadřuje srovnání geometrického průměru hodnot ze 3 replikátů z každého stádia chybová úsečka označuje

směrodatnou odchylku. Statistická signifikance byla vypočítána pomocí Studentova nepárového t-testu (Přílohy, tabulka 2).

5.3. Analýza distribuce RNA v 2 a 4 buněčném embryu

Pro analýzu RT-qPCR dat byl použit MS Excel. Celkem byl analyzován distribuční profil 20 mRNA ve 4 vzorcích z každého stádia. Pro analýzu profilu bylo nejprve nutné rozlišit od sebe jednotlivé blastomery. Blastomery byly charakterizovány podle rostoucího množství mRNA *grip2* (A až D). Následně bylo vypočítané relativní množství v jednotlivých blastomerách stejným způsobem jako podél A-V osy (viz 5.1.). V grafu je vyjádřeno průměrné množství RNA u daného genu v jednotlivých blastomer z 2 a 4 buněčného embrya. Rozdíly mezi jednotlivými replikáty vyjadřuje směrodatná odchylka. Statistická signifikance byla vypočítána pomocí Studentova nepárového t-testu (Přílohy, tabulka 3).

5.4. Analýza RNA-seq dat

RNA-seq analýza byla provedena mým kolegou MSc. R. Narainem. Analýza rozdílně exprimovaných genů (DEGs, differentially expressed genes) podél A-V osy byla provedena pomocí DEseq2 (Love *et al.* 2014). Určení DEGs ve 2 a 4 buněčném embryu probíhalo pomocí NormQ normalizační metody (Naraine *et al.* 2020) na základě RT-qPCR profilů *grip2* a *dnd1*. Kritéria pro výběr genů byla následovná – výskyt více než 20 kopií transkriptu na embryo/blastomeru a upravená p-hodnota (padj, adjusted p-value) menší než 0,01. Pro všechny datasety byla také použita analýza hlavních komponent (PCA, principal component analysis), která zobrazuje 500 nejvíce variabilních genů.

6. Roztoky

1x Steinbergův roztok

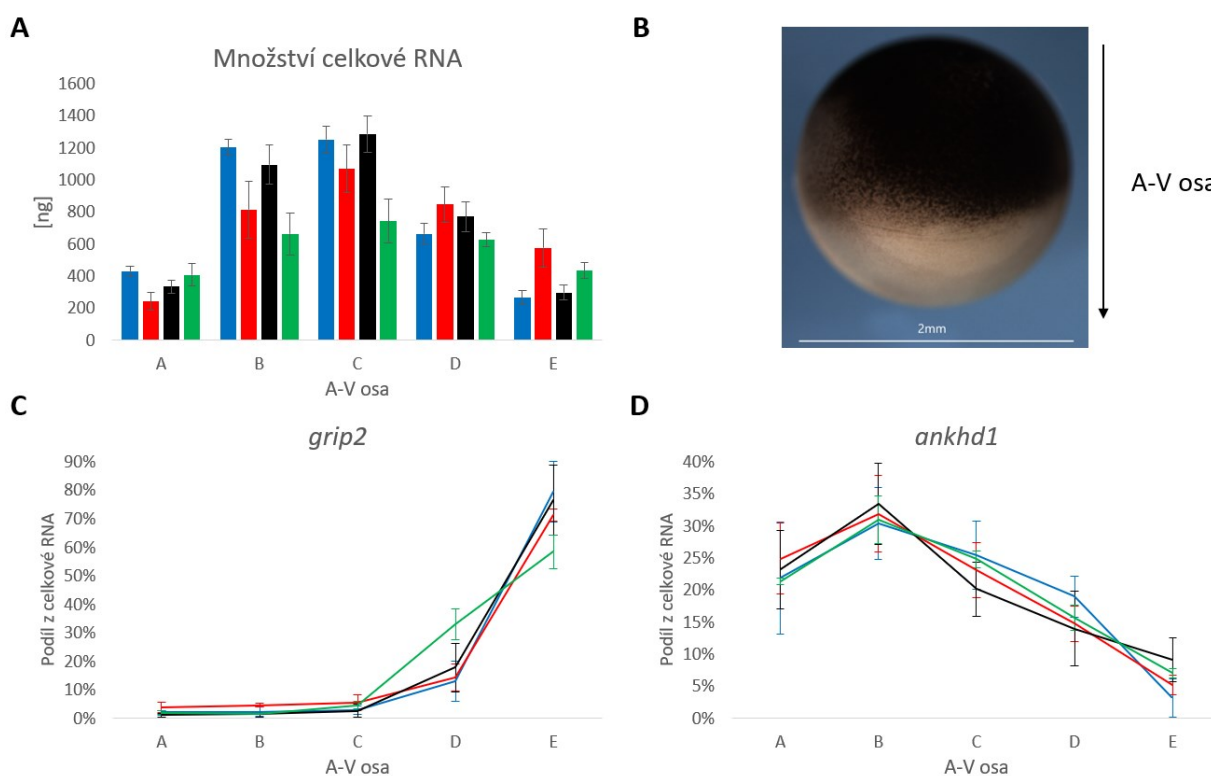
58,2 mM NaCl; 0,9 mM KCl; 0,3 mM Ca(NO₃)₂ x 4H₂O; 0,4 mM MgSO₄ x 7H₂O; 5 mM Trizma base; pH 7.35-7.45

Výsledky

1. Distribuce maternální RNA podél A-V osy

1.1. Distribuce celkové RNA

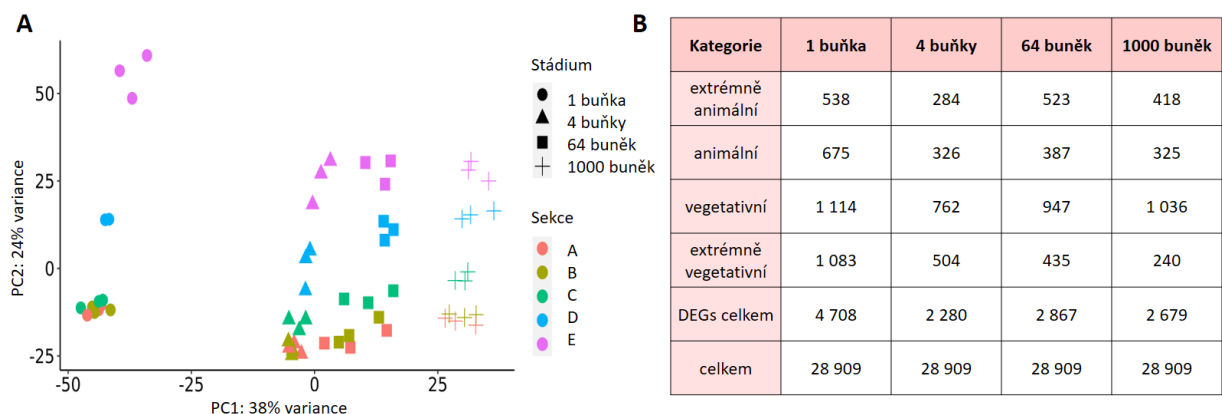
V oocytech *X. laevis* byly stanoveny 4 skupiny lokalizace RNA podél A-V osy pomocí metody RT-qPCR tomografie (Sindelka *et al.* 2018). Za využití této metody jsem v mé práci nejprve identifikovala distribuci celkové RNA podél A-V osy v oplodněných vajíčkách a časných embryích *A. mexicanum* (obrázek 8B). Celkové izolované množství RNA v jednotlivých segmentech se v průběhu vývoje nemění (obrázek 8A). Dále jsem pomocí RT-qPCR stanovila lokalizační profil dvou kontrolních genů a ověřila tak kvalitu a správnou orientaci připravených vzorků. Zatímco mRNA *grip2* je ve všech vzorcích lokalizovaná extrémně vegetativně (obrázek 8C), mRNA genu *obsahující ankyrinovou repetici a KH doménu 1* (*ankhd1*, *ankyrin repeat a KH domain containing 1*) je lokalizovaná animálně (obrázek 8D).



Obrázek 8: Distribuce celkové RNA ve stádiu 1 (modrá), 4 (červená), 64 (černá) a 1000 (zelená) buněk (A) podél A-V osy (B). Kontrolní geny *grip2* (C) a *ankhd1* (D) použité pro ověření kvality embryí. Hodnoty vyjádřeny aritmetickým průměrem ze 3 replikátů. Chybová úsečka vyjadřuje směrodatnou odchylku. A- animální; V- vegetativní.

1.2. Asymetricky lokalizovaná RNA

Po ověření lokalizačních profilů kontrolních genů jsme pokračovali s RNA-seq tomografií, která nám umožnila získat celkový pohled na prostorovou lokalizaci maternálních RNA během časného vývoje. PCA ukazuje, že mezi animální a vegetativní sekci jsou poměrně velké rozdíly pozorovatelné ve všech stádiích a také je zde značná odlišnost mezi jednotlivými stádii (obrázek 9A). Dále se nám podařilo v každém pozorovaném vývojovém stádiu určit 28 909 maternálních RNA. Z celkového počtu genů bylo identifikováno 8-16 % DEGs. Zatímco ve stádiu 1 buňky se nachází 4 708 DEGs v pozdějších stádiích je počet analyzovaných DEGs 2 280 až 2 679. Většinu identifikovaných DEGs jsme byli schopni rozdělit do jedné ze 4 lokalizačních skupin. V extrémně animální sekci jsme detekovali 284 až 538 genů a v animální sekci 326 až 685 genů. Nejvíce genů se nachází ve vegetativní (762 až 1 114 genů) a v extrémně vegetativní kategorii (240 až 1 083 genů) (obrázek 9B). Ze získaných dat je zřetelné, že mezi jednotlivými stádii časného vývoje dochází ke změnám v počtu genů v jednotlivých kategoriích, a právě popisu příčin těchto změn se budu věnovat v další části této práce.



Obrázek 9. PCA ukazující rozdíly podél A-V osy a mezi jednotlivými stádii časného vývoje (A). Počet genů identifikovaných v každé kategorii lokalizace v časném embryonálním vývoji (B).

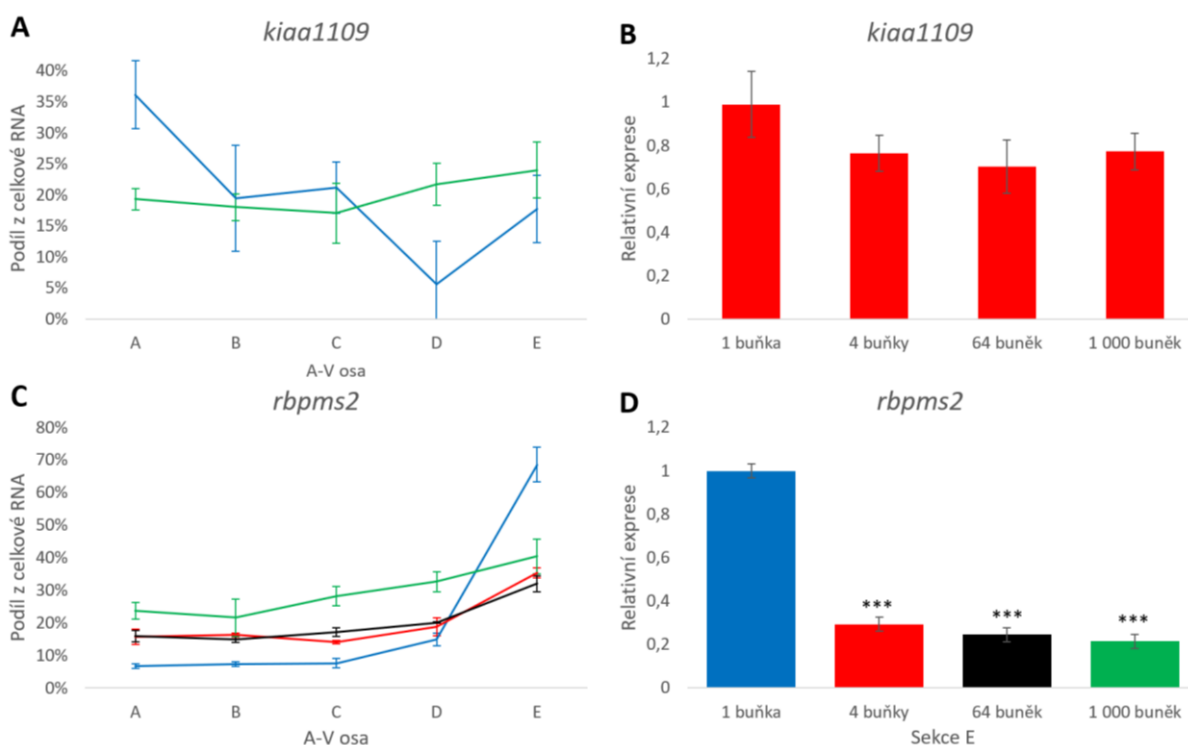
1.3. Relokalizace RNA v průběhu časného vývoje

Ze získaných RNA-seq dat se mi podařilo klasifikovat 3 skupiny genů u nichž, lze pozorovat změny v RNA lokalizačním profilu. Zatímco první skupina genů mění RNA lokalizační profil bez změny celkového množství mRNA v embryu, zbylé dvě skupiny genů mění lokalizační profil v závislosti na ubývajícím nebo klesajícím množství mRNA.

V první skupině jsme identifikovali celkem 3 geny (*kiaa1109*, *slc16a1*, *ccnt2*). Příkladem mRNA měnící lokalizaci je *kiaa1109*, jenž je ve stádiu 1 buňky lokalizovaná

extrémně animálně a ve stádiu 1 000 buněk je poté přítomna v embryu rovnoměrně (obrázek 10A). Změna lokalizace *kiaa1109* je doprovázena stabilním množstvím v průběhu celého časného vývoje (obrázek 10B).

Do skupiny genů s přibývajícím množstvím mRNA spadá celkem 5 genů (např. *hspg2*, *adora2ab*). Všechny tyto geny jsou ve stádiu 1 buňky lokalizované animálně nebo extrémně animálně a v pozdějších stádiích vlivem syntézy nové mRNA dochází ke změně lokalizace. Do poslední skupiny poté spadají geny, které mění lokalizaci vlivem degradace mRNA. V této skupině jsme identifikovali 2 geny (*rac3* a *fam208b*) lokalizované ve stádiu 1 buňky extrémně animálně nebo animálně a s odlišným profilem v pozdějších stádiích. Nejpočetnější podskupinu (31 genů) poté tvoří geny zpočátku lokalizované extrémně vegetativně nebo vegetativně a lokalizované animálně nebo rovnoměrně v pozdějších stádiích. Zástupcem této skupiny je gen nesoucí název *protein vázající RNA s vícenásobným sestřihem* (*rbpms2*, *RNA binding protein with multiple splicing 2* – dříve *hermes*). Ve stádiu 1 buňky je mRNA *rbpms2* lokalizovaná extrémně vegetativně, ale v průběhu vývoje se její rozložení v embryu stává také téměř rovnoměrným (obrázek 10C). Uniformní distribuce *rbpms2* je způsobena degradací maternální mRNA v sekci E, která nastává mezi stádiem 1 buňky a stádiem 4 buněk (obrázek 10D).



Obrázek 10: Geny vykazující změny v RNA profilu. mRNA *kiaal1109* je ve stádiu 1 buňky lokalizována XA (A, modře) zatímco ve stádiu 1 000 buněk (A, zeleně) je lokalizovaná rovnoměrně. mRNA *rbpms2* je lokalizovaná ve stádiu 1 buňky XV (C, modře) zatímco ve stádiu 4 (C, červeně), 64 (C, černě) a 1 000 buněk (C, zeleně) je rozmístěna spíše rovnoměrně. Změna v lokalizaci *kiaal1109* je provázána stabilním množstvím mRNA ve všech stádiích (B). *rbpms2* je způsobena degradací mRNA v XV segmentu E znatelnou již ve stádiu 4 buněk (D). Data jsou vyjádřeny aritmetickým (A a C) nebo geometrickým (B a D) průměrem ze 3 replikátů z každého stádia a chybová úsečka znázorňuje směrodatnou odchylku. Statistická signifikance mezi embryi v pozdějších stádiích a stádiem 1 buňky je spočítána pomocí Studentova nepárového t-testu. b.s. $p > 0.05$, *** $p < 0.001$; XA- extrémně animální; XV- extrémně vegetativní; b.s. - bez signifikance.

1.4. Syntéza RNA v období před MBT

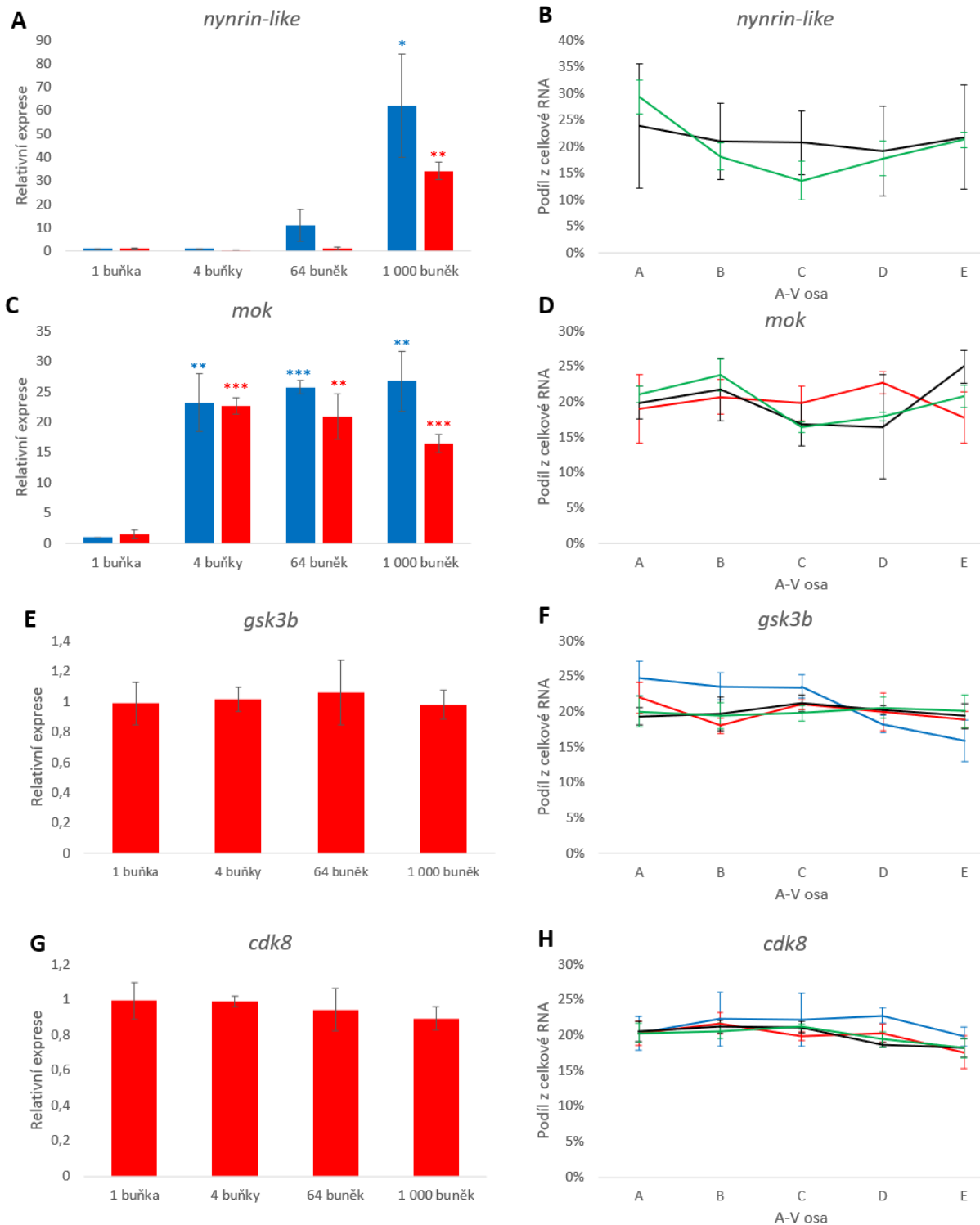
Jako další jsme ze získaných RNA-seq dat identifikovali geny, u nichž jsme pozorovali změny v množství transkriptu mezi jednotlivými stádii časného vývoje.

Celkem jsme identifikovali 4 371 genů, u nichž jsme pozorovali nárůst relativního množství, pravděpodobně způsobený *de novo* syntézou mRNA, a to ve stádiích vývoje předcházejících MBT. *De novo* syntetizované geny byly porovnány mezi jednotlivými stádii a následně rozděleny do dvou kategorií – geny s alespoň dvojnásobnou změnou mezi dvěma stádii a geny s alespoň pětinasobnou změnou. Mezi stádiem 1 a 4 buněk bylo zjištěno 1 666 genů (např. *dctn1*) s přinejmenším dvojnásobnou změnou, z čehož 658 genů (např. *mok*, *plscr2*) dosahovalo více než pětinasobné změny mezi těmito dvěma stádii. Mezi stádiem 4 a 64 buněk byl poté zjištěn více než dvojnásobný přírůstek celkem u 1 003 genů (např. *ilf3*) a z tohoto množství genů jich 652 (např. *ndufb6*) vykazovalo více než pětinasobnou změnu. Mezi stádiem 64 a 1 000 buněk došlo k více

než dvojnásobnému nárůstu množství u 1 702 genů (např. *catspere*), z čehož 1 364 genů (např. *nynrin-like*, *sirt4*) bylo ve stádiu 1 000 buněk syntetizováno v pětinasobném množství oproti stádiu 64 buněk.

Z RNA-seq dat jsem vybrala dva geny vykazující zvýšení množství transkriptu v průběhu časného vývoje a ověřila jejich relativní expresi pomocí RT-qPCR. První je gen podobný proteinu obsahující NYN doménu a retrovirovou integrázu (*nynrin-like*, *NYN Domain A Retroviral Integrase Containing-like*). Při srovnání relativního množství mRNA pro *nynrin-like* získaného metodou RT-qPCR (obrázek 11A, modrý sloupec) ve stádiu 1 buňky s pozdějšími stádii jsem identifikovala slabý nárůst exprese ve stádiu 64 buněk a poté mnohonásobně větší nárůst ve stádiu blastuly. Dalším příkladem je gen pro *MAPK/MAK/MRK překrývající se kinázu* (*mok*, *MAPK/MAK/MRK overlapping kinase*), kde je nárůst relativního množství mRNA ve srovnání se stádiem 1 buňky zřetelný již ve stádiu 4 buněk (obrázek 11C, modrý sloupec). Relativní exprese *nynrin-like* a *mok* získaná metodou RT-qPCR odpovídá analyzovaným RNA-seq (červený sloupec) datům (obrázek 11A, C). Při porovnání lokalizačních profilů v jednotlivých stádiích lze vidět, že k nárůstu exprese *nynrin-like* (obrázek 11B) i *mok* (obrázek 11D) dochází v celém embryu rovnoměrně.

Jak vyplývá ze získaných dat takovéto změny v množství transkriptů jsou v časných embryích spíše ojedinělým jevem. Většina maternální mRNA se v embryích vyskytuje ve stabilním množství. Příkladem jsou mRNA pro *glykogen syntázu kinázu 3b* (*gsk3b*, *glycogen synthase kinase-3 beta*) a pro *cyklin dependentní kinázu 8* (*cdk8*, *cyclin-dependent kinase 8*), jejichž relativní množství je až do stádia časné blastuly srovnatelné s množstvím mRNA přítomné ve stádiu 1 buňky (obrázek 11E, G). Lokalizace mRNA *gsk3B* (obrázek 11F) a *cdk8* (obrázek 11H) je ve všech částech embrya rovnoměrná.



Obrázek 11: Syntéza mRNA v období před MBT. Srovnání relativního množství mRNA *nynrin-like* (A) a *mok* (C) v pozdějších stádiích vzhledem ke stádiu 1 buňky. Výsledky qPCR (modrý sloupec) jsou porovnány s RNA-seq daty (červený sloupec). Lokalizace *nynrin-like* ve stádiu 64 (B, černě) a 1 000 buněk (B, zeleně) a lokalizace *mok* ve stádiu 4 (D, červeně), 64 (D, černě) a 1000 buněk (D, zeleně). Lokalizace mRNA v ostatních stádiích není zobrazena z důvodu velmi nízké exprese. RNA-seq analýza mRNA *gsk3b* (E) a *cdk8* (G) vykazuje stabilní relativní množství vzhledem ke stádiu 1 buňky v průběhu celého časného vývoje. Lokalizace *gsk3b* (F) a *cdk8* (H) ve stádiu 1 (modře), 4 (červeně), 64 (černě) a 1 000 buněk (zeleně). Hodnoty jsou vyjádřeny

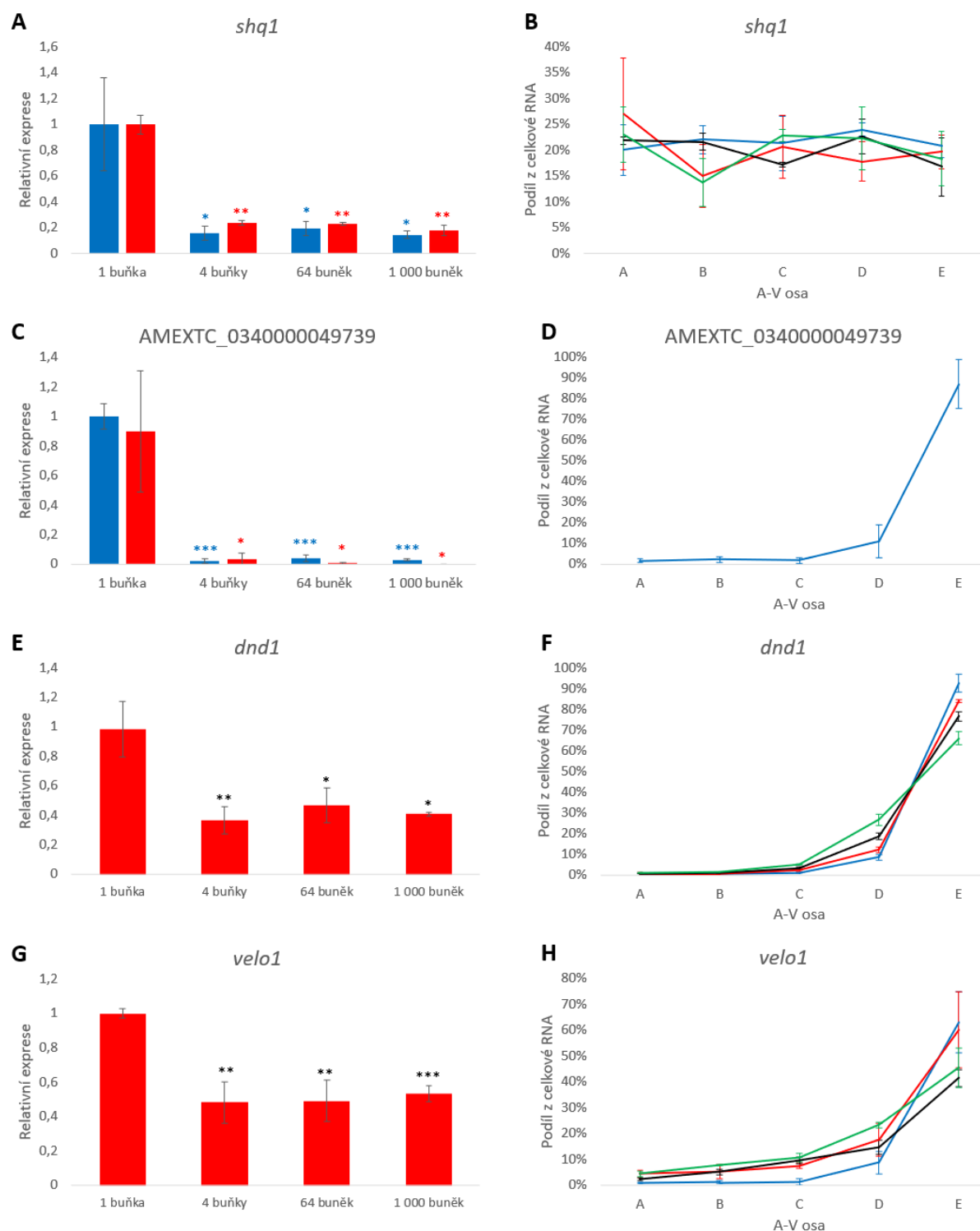
aritmetickým (B, D, F, H) nebo geometrickým průměrem (A, C, E, G) ze 3 replikátů z každého stádia a chybová úsečka znázorňuje směrodatnou odchylku. Statistická signifikance mezi embryi v pozdějších stádiích a stádiem 1 buňky je spočítána pomocí Studentova nepárového t-testu. Metody: RT-qPCR (A, C), RNA-seq (A, B, C, D, E, F, G, H). b.s. $p > 0.05$, * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$; b.s. - bez signifikance.

1.5. Degradace maternální RNA v časném vývoji

Poté, co jsem identifikovala několik genů, kde jsem pozorovala nárůst exprese, jsem se rozhodla zaměřit na geny s opačným trendem – geny, u nichž lze pozorovat klesající množství mRNA mezi jednotlivými stádii časného vývoje. Celkem jsme identifikovali 2 731 genů, z čehož u 2 163 genů (např. *shq*, *metrn*) jsme zaznamenali minimálně dvojnásobný úbytek již mezi stádiem 1 a 4 buněk. Více než pětinasobný úbytek mezi těmito dvěma stádii byl zaznamenán u 1 216 genů (např. *arvcf*, *nbea*). Mezi stádiem 4 a 64 buněk dochází k více než dvojnásobnému úbytku mRNA u 327 genů (např. *rpl36*) a z toho u 109 genů (např. *arid5b*) je úbytek mezi stádii více než pětinasobný. Více než dvojnásobný úbytek v množství mRNA jsme zjistily u 241 genů (např. *hnrnp1*) a více než pětinasobný úbytek u 87 genů (např. *zbtb45*).

U dvou vybraných genů jsem provedla srovnání výsledků obdržených metodou RNA-seq a RT-qPCR. Prvním příkladem je gen kódující *protein SHQ1 homolog (shq1)*. Při srovnání relativní exprese mRNA *shq1* v pozdějších stádiích oproti stádiu 1 buňky jsem identifikovala ubývající množství mRNA ve stádiu 4 buněk, jak při použití metody RT-qPCR (obrázek 12A, modrý sloupec) tak i v případě RNA-seq dat (obrázek 12A, červený sloupec). Razantní úbytek množství RNA ve stádiu 4 buněk jsem pozorovala také u transkriptu označeného jako AMEXTC_0340000049739 s neznámou anotací (obrázek 12C). Zatímco *shq1* je lokalizován ve všech stádiích embrya rovnoměrně (12B) AMEXTC_0340000049739 je lokalizován ve stádiu 1 buňky extrémně vegetativně (12D) a v pozdějších stádiích již není přítomen.

Na základě sekvenačních dat jsem také identifikovala úbytek množství mRNA u dvou extrémně vegetativních genů – *dnd1* (obrázek 12F) a *velo1* (obrázek 12H). U obou genů dochází ve stádiu 4 buněk k degradaci mRNA (obrázek 12E, H), která ale nemá na velký vliv na jejich vegetativní lokalizační profil (obrázek 12F, H).



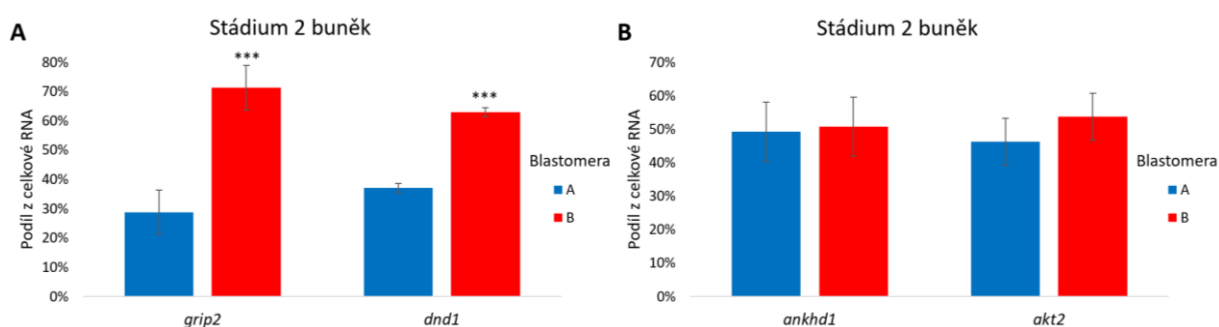
Obrázek 12: Degradace maternální RNA. K degradaci maternální RNA *shq1* (A) a AMEXTC_0340000049739 (C) dochází mezi stádiem 1 a 4 buněk. Relativní exprese získaná metodou RNA-seq (červený sloupec) byla ověřena také pomocí RT-qPCR (modřý sloupec). Lokalizační profil *shq1* (B) se mezi stádiem 1 (modře), 4 (červeně), 64 (černě) a 1 000 buněk (zeleně) nemění. AMEXTC_0340000049739 je ve stádiu 1 buňky (D, modře) lokalizován XV a následně je degradován. RNA-seq data ukazují, že mRNA *dnd1* (F) a *velo1* (H) je lokalizovaná XV jak ve stádiu 1 buňky (modře) tak i ve stádiu 4 (červeně), 64 (černě) a 1 000 buněk (zeleně). K degradaci obou genů dochází mezi stádiem 1 a 4 buněk (E, G). Data jsou vyjádřena aritmetickým (B, D, F, H) nebo geometrickým (A, C, E, H) průměrem ze 3 replikátů z každého stádia a chybová úsečka znázorňuje směrodatnou odchylku. Statistická signifikance mezi embryi v pozdějších stádiích a stádiem 1 buňky

je spočítána pomocí Studentova nepárového t-testu. b.s. $p > 0.05$, * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$; XV- extrémně vegetativní; b.s. - bez signifikance.

2. Distribuce maternální RNA v jednotlivých blastomerách

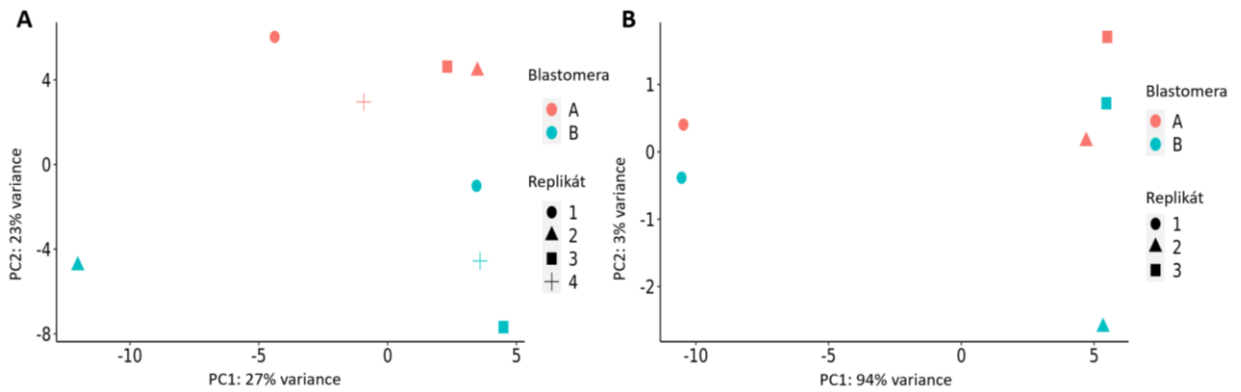
2.1. Distribuce RNA ve 2 buněčném embryu

V druhé části mé práce jsem se věnovala identifikaci nerovnoměrně rozmístěných mRNA v blastomerách 2 a 4 buněčného embrya, které by mohly stát za určením L-P nebo D-V osy. V prvním kroku jsem embrya ve stádiu 2 buněk rozdělila na jednotlivé blastomery a následně jsem identifikovala profil vybraných maternálních RNA. Nejprve jsem ověřila přítomnost několika mRNA, jenž jsem využila jako pozitivní kontrolu při sestavování profilu mRNA podél A-V osy. U genů *ankhd1* a *homolog virového onkogenu myšího thymomu v-akt 2 (akt2, v-akt murine thymoma viral oncogene homolog 2)* jsem identifikovala rovnoměrné rozmístění mezi blastomerami ve všech vzorcích embryí ve stádiu 2 buněk (13B). Dále se mi pomocí metody RT-qPCR podařilo identifikovat 2 geny – *grip2* a *dnd1* – jejichž mRNA je zdatelně nabohacená v jedné z blastomer (obrázek 13A).



Obrázek 13: Distribuce RNA v jednotlivých blastomerách. Ve stádiu 2 buněk je mRNA *grip2* a *dnd1* (A) obohacená v blastomeře B (červeně) více než v blastomeře A (modře). Jako kontrola byly použity rovnoměrně distribuované mRNA *ankhd1* a *akt2* (B). Data získaná metodou RT-qPCR jsou vyjádřena aritmetickým průměrem ze 4 replikátů a chybová úsečka znázorňuje směrodatnou odchylku. Statistická signifikance mezi blastomerami B a A (A, B) je spočítána pomocí Studentova nepárového t-testu. b.s. $p > 0.05$, *** $p < 0.001$; b.s. - bez signifikance.

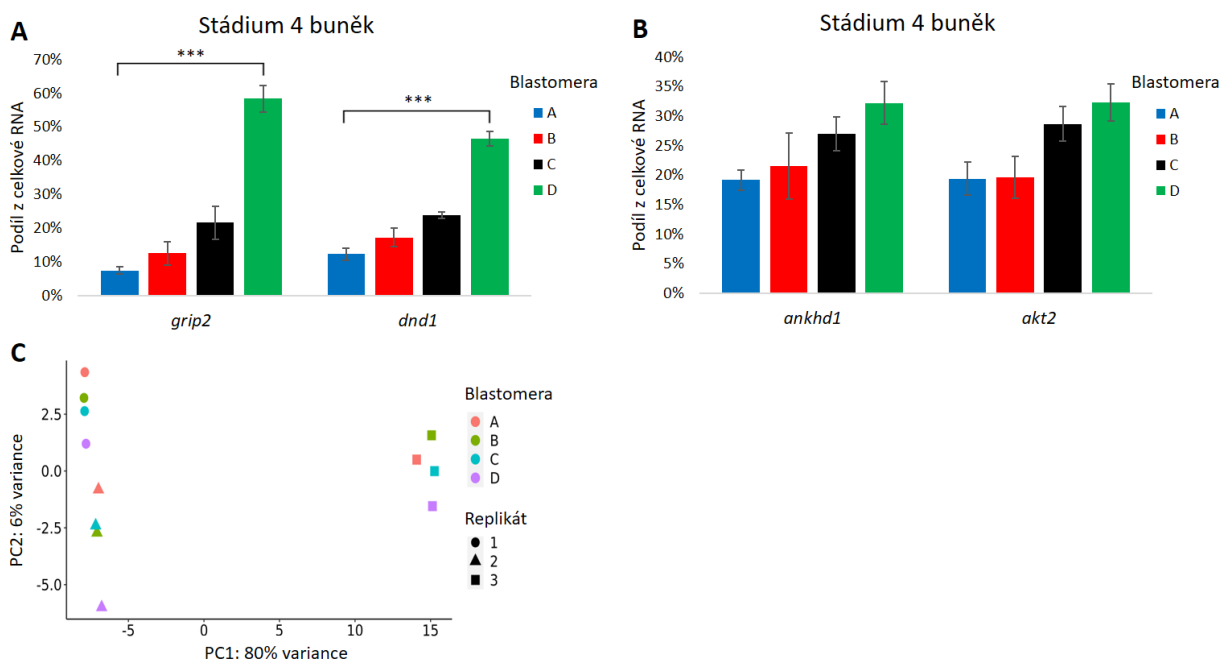
K získání celkového profilu lokalizované RNA jsme vzorky podrobili RNA-seq analýze. Celkem jsme ve 2 buněčném stádiu identifikovali 35 466 genů. Z celkového počtu genů jich je 5,5 % nabohaceno v opačné blastomeře než *grip2* a *dnd1*, ale překvapivě jsme nezjistili žádné geny se stejným lokalizačním profilem jako *grip2* a *dnd1*. Zatímco PCA ukazuje jasné rozdíly mezi oběma blastomerami 2 buněčného embrya *A. mexicanum*, u *X. laevis* jsou si obě blastomery poměrně podobné a více se liší jednotlivá embrya (obrázek 14A, B).



Obrázek 14. Data pro PCA blastomer 2 buněčného embrya *A. mexicanum* (A) byla normalizovaná metodou NormQ. Data pro PCA 2 buněčného embrya *X. laevis* (B) byla normalizována pomocí DEseq2.

2.2. Distribuce RNA ve 4 buněčném embryu

Při analýze vzorků ze stádia 4 buněk jsem identifikovala nesouměrné rozložení mRNA *grip2* a *dnd1* (obrázek 15A), tak jako v případě 2 buněčného embrya. Při srovnání všech blastomer je vidět, že mRNA těchto dvou genů je zřetelně nabohacená v blastomere D. Oproti 2 buněčnému stádiu lze vidět, že ve 4 buněčném stádiu jsou mRNA *ankhd1* a *akt2* lokalizované v jednotlivých blastomerech asymetricky (obrázek 15B). PCA, zobrazující 500 nejvíce variabilních genů, ukazuje, že jsou si jednotlivé blastomery z hlediska DEGs poměrně podobné.

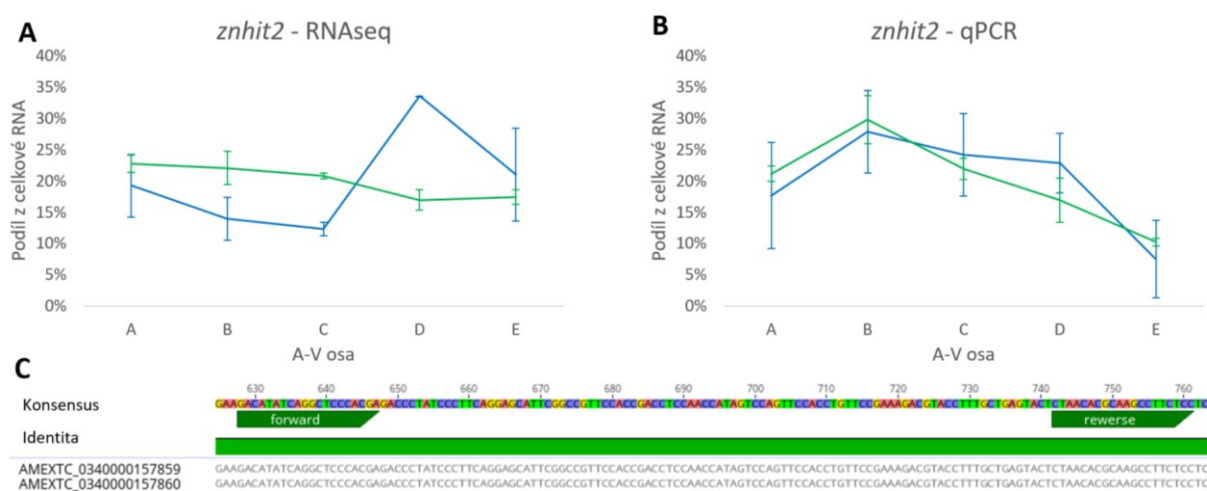


Obrázek 15: Stádium 4 buněk. Ve stádiu 4 buněk jsou mRNA *grip2* a *dnd1* (A) obohaceny v blastomere D. Srovnání blastomer ze stádia 4 buněk s kontrolními geny *ankhd1* a *akt2* (B). PCA blastomer 4 buněčného embrya (C) normalizovaných pomocí NormQ. Data získaná metodou RT-qPCR jsou vyjádřena aritmetickým průměrem ze 4 replikátů a chybová úsečka znázorňuje směrodatnou odchylku. Statistická signifikance mezi blastomery D a A (A) je spočítána pomocí

Studentova nepárového t-testu. Statistická signifikance není z důvodu zjednodušení interpretace uvedena v grafu B (Přílohy, tabulka 3). b.s. $p > 0.05$, *** $p < 0.001$; b.s. - bez signifikance.

2.3. Komplikace při validaci RNA-Seq dat pomocí RT-qPCR

Relativní expresi vybraných rozdílně exprimovaných genů identifikovaných RNA-seq analýzou jsem se rozhodla ověřit také pomocí RT-qPCR. Překvapivě se lokalizační profil získaný analýzou RNA-seq a RT-qPCR dat v několika případech neshodoval. Příkladem je gen kódující *protein obsahující zinkový prst HIT-typu 2 (znhit2, zinc finger HIT-type containing 2)*, který by měl být podle RNA-seq analýzy ve stádiu 1 buňky (obrázek 14A, modře) lokalizován ve vegetativním pólu, zatímco ve stádiu 1000 buněk je jeho distribuce v embryu rovnoměrná (obrázek 16A, zeleně). Při použití metody RT-qPCR je ale lokalizace genu ve stádiu 1 buňky (obrázek 16B, modře) i ve stádiu 1000 buněk (obrázek 16B, zeleně) animální. Na základě genové sekvence jsme vyhledali transkripty s podobnou sekvencí. Ukázalo se, že transkript AMEXTC_0340000157859 kódovaný genem *znhit2*, který byl použit pro RT-qPCR analýzu má 97,9% podobnost v sekvenci s transkriptem AMEXTC_0340000157860, který se ukázal být paralogním genem *znhit2*. Následné vyhledání cílových míst navržených primerů ukázalo, že primery jsou namířeny do oblasti, kde se obě RNA isoformy shodují v nukleotidové sekvenci (obrázek 16C).

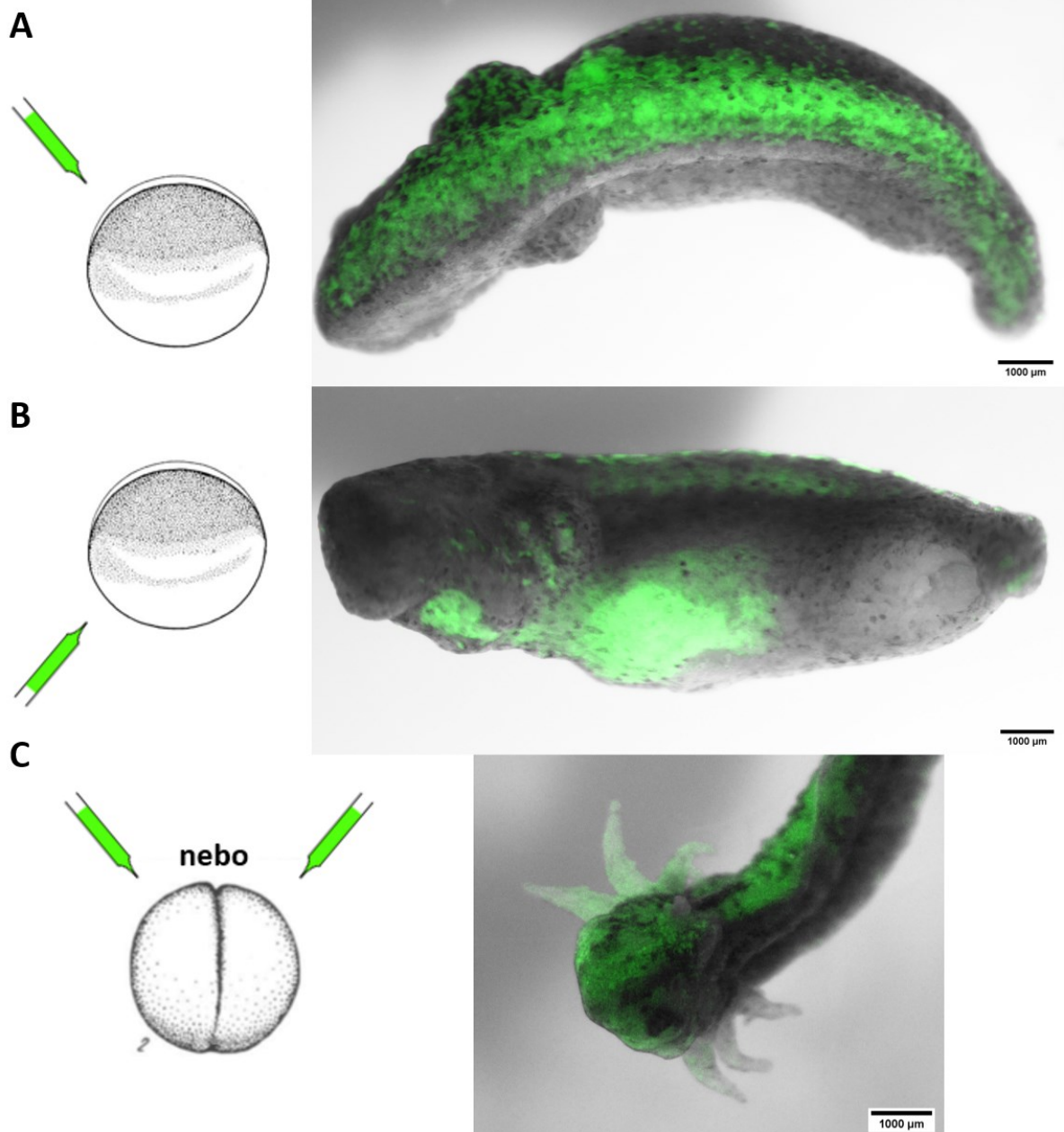


Obrázek 16: Srovnání RNA profilu *znhit2*. Data získaná RNA-seq ukazují, že *znhit2* je ve stádiu 1 buňky (A, modře) lokalizován v animálním pólu a ve stádiu 1000 buněk (A, zeleně) rovnoměrně. RNA profil získaný metodou qPCR odpovídá lokalizaci v animálním pólu pro obě stádia (B). Cílová sekvence navrženého primeru pro *znhit2* (C). Hodnoty vyjádřeny aritmetickým průměrem ze 3 replikátů. Chybová úsečka vyjadřuje směrodatnou odchylku. A - animální; V - vegetativní.

3. Sledování osudu buněk značené fluorescenčním dextranem

Embrya, která jsem ve stádiu vajíčka po oplození injikovala do animálního nebo vegetativního pólu, byla pozorována pod mikroskopem 8 dní po oplodnění. Injikace do animálního pólu způsobila označení buněk, které se během embryogeneze podílejí na vzniku

ektodermálních dorzálních struktur (obrázek 17A). Na druhou stranu, injekce do vegetativního pólu označila buňky podílející se na endodermálních ventrálních struktur (obrázek 17B). Po injekci jedné z blastomer ve dvoubuněčném stádiu, lze vidět, že larva *A. mexicanum* má označenou odpovídající polovinu těla (obrázek 17C). Tento jev indikuje podobnost s *X. laevis* a přestavbou A-V osy do ekto-endodermálních struktur.



Obrázek 17: Sledování osudu buněk. Fluorescenční dextran byl injikován buď do animálního (A), nebo vegetativního pólu (B) oplodněného vajíčka. Dále byl fluorescenční dextran injikován do náhodně vybrané jedné blastomery embrya ve stádiu 2 buněk (C). Embrya byla vyfocena 8 (A, B) a 12 (C) dní po oplození.

Diskuse

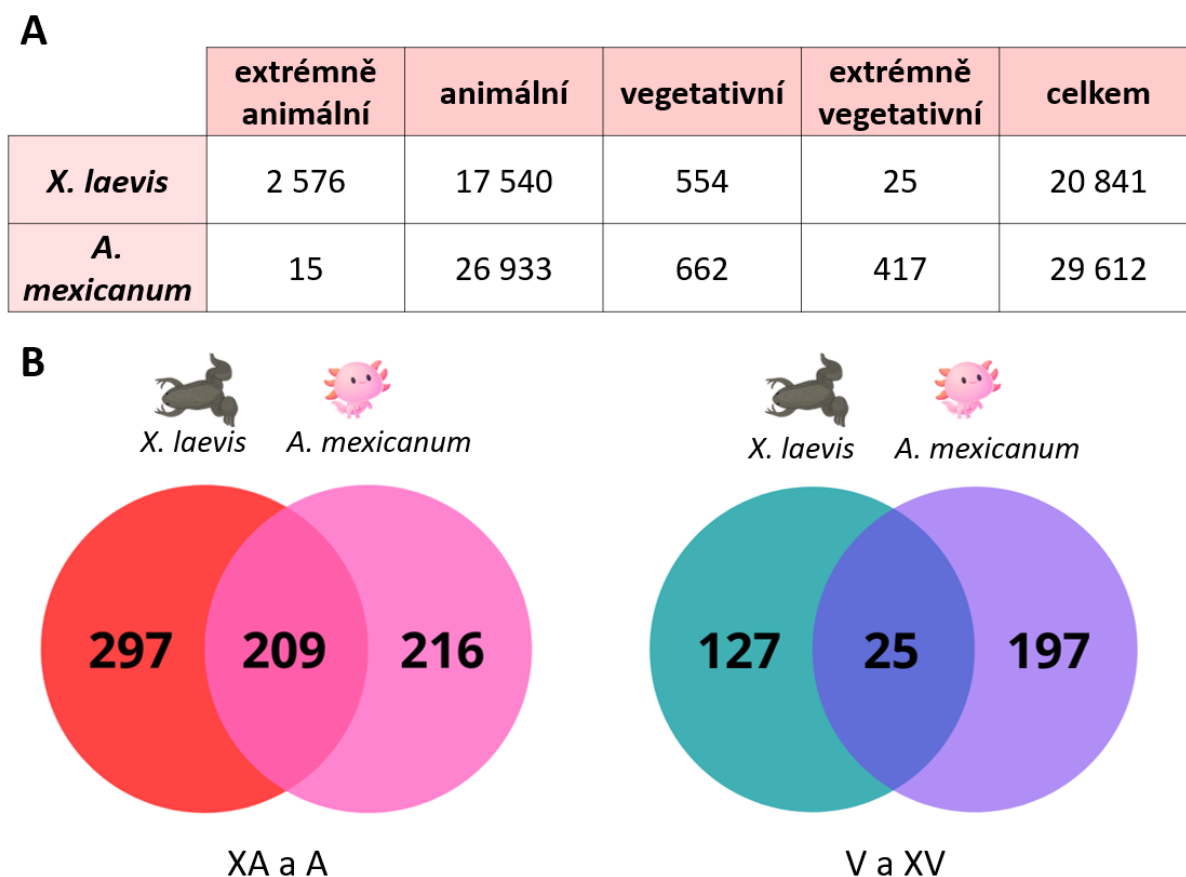
Již dlouho je známo, že RNA lokalizace hraje důležitou roli v asymetrickém buněčném dělení umožňujícím determinaci osudu buněk během časné embryogeneze. Tento fenomén byl popsán u řady druhů včetně *X. laevis*, *R. pipiens*, *D. rerio* a jesetera malého *Acipenser ruthenus* (Nath *et al.* 2005, Junker *et al.* 2014, Pocherniaieva *et al.* 2018, Sindelka *et al.* 2018, Naraine *et al.* 2021). To, jak v posledních letech přibývají organismy, které jsou podrobeny analýze prostorového rozložení RNA molekul v oocytech nebo časných embryích, nám ale ukazuje, že regulace časného vývoje v živočišné říši může být velice rozmanitá. Příkladem je rozdílná lokalizace *vegt*, *wnt11* (*Wnt family member 11*) a *otx1* (*otx1 orthodenticle homeobox 1*), genů důležitých pro časný embryonální vývoj. Zatímco u *X. laevis* se tyto geny nachází ve vegetativním pólu oocyty u *A. ruthenus* je lokalizace animální (Pocherniaieva *et al.* 2018). Také lokalizace mRNA kódující *dazl* (*deleted in azoospermia-like*), jednoho z markerů PGC, není plně konzervovaná mezi všemi živočichy. Zatímco u většiny modelových organismů je lokalizována ve vegetativním pólu oocyty, u *A. mexicanum* je lokalizována animálně (Naraine *et al.* 2021). Tyto příklady nám ukazují, jak je při zkoumání časného vývoje důležité zaměřit se i na jiné než tradiční modelové organismy. Z tohoto důvodu se v mé diplomové práci zabývám RNA lokalizací v časném vývoji *A. mexicanum*, modelového organismu doposud využívanému především pro výzkumy spojené s regenerací. V této části práce budu dosažené výsledky diskutovat při srovnání s dalšími modelovými organismy.

Asymetrická distribuce maternálních RNA ve vajíčcích *X. laevis* a *A. mexicanum*

X. laevis a *A. mexicanum* jsou fylogeneticky velice blízké druhy. Poslední známý společný předek žab a ocasatých obojživelníků byl *Gerobatrachus*, který žil před 260 miliony lety a nejnovější výzkumy ukazují, že v této době také mohlo dojít k oddělení jednotlivých vývojových linií (Anderson *et al.* 2008). Oba druhy obojživelníků se řadí do skupiny *Tetrapod*, fylogenetické skupiny, která se vyvinuli přibližně před 390 miliony let z předchůdců dnešních *Sarcopterygii* (Brinkmann *et al.* 2004, Meyer *et al.* 2021).

Navzdory fylogenetické příbuznosti a morfologické podobnosti časných embryí (viz Literární přehled, obrázek 2) se ukazuje, že základy embryonálního vývoje obou obojživelníků jsou poměrně odlišné. Nedávno publikovaný výzkum zabývající se srovnáním maternálních rozdílně exprimovaných genů podél A-V osy v neoplodněném vajíčku ukázal, že je zde poměrně malý překryv v RNA lokalizačních profilech těchto genů. U *X. laevis* bylo

identifikováno a zařazeno do jedné z lokalizačních skupin celkem 20 841 DEGs, zatímco u *A. mexicanum* to bylo 29 612 genů (obrázek 18A). Následně byly z každé skupiny vybrány nejvíce reprodukovatelné geny ukazující odlišný lokalizační profil mezi druhy (obrázek 18B). Zatímco v animální a extrémně animální sekci sdílí lokalizační profil u obou obojživelníků až 209 genů, ve vegetativní a extrémně vegetativní části je to pouze 25 genů (Naraine *et al.* 2021).



Obrázek 18: Lokalizace maternálních rozdílně exprimovaných genů ve vajíčku *X. laevis* a *A. mexicanum*. Počet DEGs v každé lokalizační skupině (A). Překryv vybraných sdílených genů v animální a vegetativní části vajíčka. Oproti A jsou zde znázorněny pouze ty geny, jejichž mRNA lokalizační profil je dobře definovaný a reprodukovatelný (B). XA- extrémně animální; A- animální; V- vegetativní; XV- extrémně vegetativní (Převzato a upraveno podle Naraine *et al.* 2021).

Na základě přítomnosti rozdílně lokalizovaných maternálních RNA v neoplozeném vajíčku u obou obojživelníků jsem se v mé práci rozhodla studovat lokalizaci maternálních RNA v časných embryích *A. mexicanum*. Bohužel podobný výzkum, který by se věnoval lokalizaci RNA v globálním měřítku také u časných embryí *X. laevis* zatím proveden nebyl. Sice již byl proveden výzkum zabývající se lokalizací několika vybraných mRNA v blastule *X. laevis*, ten ale neodhalil žádné lokalizační změny a došel k závěru, že mRNA je stabilně lokalizovaná v časném vývoji (Sindelka *et al.* 2018). Je ale

možné, že celkový pohled na distribuci RNA v časných embryích bude jiný a další transkriptomové analýzy mohou přinést překvapivé zjištění.

Změny RNA lokalizačních profilů v průběhu časného vývoje

Pomocí RNA-seq tomografie jsme identifikovali celkem 28 909 genů v každém vývojovém stádiu z čehož se ukázalo, že 6 815 genů je rozdílně exprimováno mezi jednotlivými stádii. Toto potvrdila také PCA, která nám ukázala nejen poměrně velké rozdíly mezi jednotlivými stádii, ale i značné odlišnosti mezi animální a vegetativní částí.

Nejprve jsem se zaměřila na geny, jejichž lokalizační profil se mění v průběhu vývoje. Jedním z těchto genů je také *kiaa1109*. Přesná funkce tohoto genu bohužel není známá, některé výzkumy, ale ukazují, že je tento gen nezbytný pro správný vývoj mozku člověka (*Homo sapiens*) (Gueneau *et al.* 2018, Kane *et al.* 2019). V další práci zabývající se funkcí tohoto genu provedli genový „knockdown“ experiment na homologním genu u *D. rerio*, jehož výsledkem byl vznik embryí s abnormálním notochordem a dalšími neurálními defekty (Gueneau *et al.* 2018). Tyto studie ukazují, že je tento gen důležitý pro správný vývoj nervové soustavy, což odpovídá i lokalizaci mRNA *kiaa1109* v extrémně animálním segmentu embrya ve stádiu 1 buňky (viz Výsledky, obrázek 10A), v oblasti, která je považována za výchozí pro vznik ektodermu a neuroektodermu. Proč ale dochází v pozdějších stádiích k relokizaci mRNA a ztrátě asymetrického gradientu není jasné. V dostupné literatuře neexistují žádné zmínky o relokizaci RNA v časném vývoji. Jediný podobný případ se objevuje během oogeneze *D. rerio*, kdy dochází k relokizaci mRNA *buc* a později také *dnd1*, *ddx4* a *nanos1* z vegetativního do animálního pólu (Howley a Ho 2000, Weidinger *et al.* 2003, Theusch *et al.* 2006, Bontems *et al.* 2009). Vzhledem k tomu, že během relokizace *kiaa1109* jsem nepozorovala žádné změny v množství transkriptu mezi jednotlivými stádii, je pravděpodobné, že k relokizaci mRNA dochází aktivním transportem pomocí cytoskeletu stejně jako v případě *D. rerio*.

Na druhou stranu o důvodech relokizace mRNA *rbpms2* se dá diskutovat s větším přesvědčením. *Rbpm2* kóduje RNA-vazebný protein a poprvé byl identifikován ve vyvíjejícím se srdci embrya *X. laevis* (Gerber *et al.* 1999) V nezralých oocytech *X. laevis* je mRNA společně s proteinem *Rbpm2* lokalizovaná ve vegetativním kortexu a v mitochondriálním oblaku. Množství proteinu *Rbpm2* po oplození vajíčka klesá a panuje přesvědčení, že je tento pokles důležitý pro správné rýhování vegetativních blastomer a to pravděpodobně skrz interakci proteinu s některými RNA (Zearfoss *et al.* 2004). S těmito poznatky korespondují mnou získané výsledky z časných embryí *A. mexicanum*. Jak jsem

již ukázala mRNA *rbpms2* je v oplodněném vajíčku *A. mexicanum* lokalizovaná taktéž vegetativně, ale v pozdějších stádiích je její lokalizaci v embryu rovnoměrná (viz Výsledky, obrázek 10C). Pokud ale budeme sledovat i množství mRNA v jednotlivých stádiích zjistíme, že oproti oplodněnému vajíčku je množství mRNA ve stádiu 4 buněk několikanásobně menší (viz Výsledky, obrázek 10D). Z tohoto důvodu se v tomto případě pravděpodobně nejedná o následek aktivní relokalizace, ale spíše o degradaci mRNA. Jak již bylo zmíněno výše, po oplození se u *X. laevis* stává protein Rbpms2 nepotřebným (Zearfoss *et al.* 2004) a tudíž společně s degradací proteinu pravděpodobně dochází i k degradaci mRNA.

Vegetativní lokalizace proteinu Rbpms2 byla také identifikována v oocytech *D. rerio* (Kosaka *et al.* 2007). V oocytech *D. rerio* hraje protein Rbpms2 důležitou roli při agregaci a udržení celistvosti Balbianiho tělíska, a to interakcí proteinu Rbpms2 s proteinem Buc a mRNA *buc* (Heim *et al.* 2014, Kaufman *et al.* 2018). Protože dosavadní výzkumy prováděné na *A. mexicanum* zpochybňují přítomnost zárodečné plazmy nebo Balbianiho tělíska (Ikenishi a Nieuwkoop 1978, Johnson *et al.* 2001) není zřejmé, zda zde protein Rbpms2 také interaguje s *buc* a zda-li je tato interakce, vzhledem k absenci Balbianiho tělíska, vůbec potřebná (o této problematice viz dále).

De novo syntéza RNA před MBT

U každého živočicha je důležitým okamžikem ve vývoji událost EGA. Obecně u savců, kvůli malé míře žloutku v oocytech, k této události dochází mnohem dříve než u živočichů s bohatým obsahem žloutku, např. u obojživelníků a ryb. Dlouhou dobu panovalo přesvědčení, že k aktivaci zygotické exprese dochází v určitém vývojovém stádiu specifickém pro daný druh, v posledních letech ale přibývá důkazů, že EGA může probíhat v malé míře probíhat již o několik stádií dříve.

U *X. laevis* je známo, že k MBT dochází po 12. buněčném dělení (Bachvarova *et al.* 1966, Satoh 1977), v malé míře byla ale detekována syntéza RNA již během 6. buněčného dělení (Kimelman *et al.* 1987, Nakakura *et al.* 1987). Dále také několik cyklů před samotnou MBT byla detekována exprese genů *nodal5* (též známý jako *xnr5*) a *nodal 6* (též známý jako *xnr6*), kteří jsou nezbytní pro aktivaci Nodal signální dráhy (Yang *et al.* 2002). Bylo zjištěno, že je časná exprese těchto genů esenciální pro indukci mesendodermy a správný vývoj zárodečných vrstev (Skirkanich *et al.* 2011).

Expresí zygotických genů před EGA byla také detekována během 6. buněčného dělení embrya *D. rerio* (Mathavan *et al.* 2005) nebo v S-fázi během 1. buněčného dělení

u *M. musculus* (Bouniol *et al.* 1995, Aoki *et al.* 1997). V posledním zmíněném případě bylo navíc zjištěno, že exprese genů v období před EGA je důležitá pro preimplantační vývoj embryí a pro samotné zahájení EGA (Abe *et al.* 2018).

Ohledně určení přesného zahájení MBT u *A. mexicanum* se zdroje rozcházejí. MBT určují podle okamžiku, kdy dochází ke ztrátě synchronicity buněčného dělení mezi 10. a 11. dělením (Hara 1977), nebo také podle zavedení G1 fáze do buněčného cyklu během 9. buněčného dělení (Lefresne *et al.* 1998). Nejnovější výzkum, který provedl RNA-seq analýzu celého transkriptomu časných embryí, ale dospěl k závěru, že k MBT dochází u *A. mexicanum* tak jako u *X. laevis* po 12. buněčném dělení (Jiang *et al.* 2017).

U *A. mexicanum* se mi podařilo identifikovat celkem 4 371 genů, které jsou exprimovány ve stádiích před MBT. Jedním z těchto genů je *nynrin-like*, jenž je exprimován v malé míře již v 64 buněčném embryu. Bohužel, o tomto genu existuje velice málo informací. Homologní savčí gen *nynrin* pravděpodobně vznikl následkem integrace retrovirové sekvence a předpokládá se, že jeho retrovirová RNázová doména hraje roli v endoribonukleové aktivitě a podílí se na retrovirové rezistenci skrz regulaci ubikvitinace virových proteinů (Anantharaman a Aravind 2006, Marco a Marín 2009). Vzhledem k podobnosti s genem *nynrin-like* vyskytující se u *A. mexicanum* se dá předpokládat, že zde hraje podobnou roli.

Dalším příkladem je gen *mok*, jenž patří do Mitogenem aktivované proteinkinázové (MAP, Mitogen-activated protein kinase) superrodiny. I když jeho přesná funkce není známá, je pravděpodobné, že vzhledem k jeho velké podobnosti s dalšími členy MAP superrodiny a proteinkinázové funkci hraje roli v regulaci exprese genů a mitózy (Miyata *et al.* 1999). Vzhledem k tomu, že u *A. mexicanum* jsem pozorovala *de novo* syntézu tohoto genu již ve stádiu 4 buněk (viz Výsledky, obrázek 11C) je možné, že je *mok* potřebný pro regulaci rýhování embrya nebo pro regulaci exprese genů potřebných k EGA.

Z mých výsledků vyplývá, že u *A. mexicanum* dochází k hlavní EGA až v pozdějších stádiích, než jsem sledovala, pravděpodobně tedy po 12. buněčném dělení, jak je uvedeno v Jiang *et al.*, 2017. Mé výsledky také ukazují, že ve stádiích předcházejících MBT dochází v malé míře k zygotické transkripci některých genů. Vzhledem k dostupné literatuře, která se zabývala expresí genů před EGA u různých organismů (Kimelman *et al.* 1987, Nakakura *et al.* 1987, Bouniol *et al.* 1995, Aoki *et al.* 1997, Mathavan *et al.* 2005, Skirkanich *et al.* 2011), lze říci, že i u *A. mexicanum* jsou geny, jejichž zygotická exprese je zahájena před EGA, pravděpodobně důležité pro zahájení hlavní EGA a pro regulaci buněčného cyklu a buněčného dělení.

Degradace maternálních RNA

EGA není provázena pouze vysokou mírou transkripce zygotických genů, ale také degradací maternálních mRNA a proteinů. Deadenylace a následná degradace maternální mRNA může u *X. laevis* probíhat, buď pomocí maternálních proteinů, příkladem je RNA vazebný protein rozeznávající deadenylační prvek embrya (EDEN-BP, embryo deadenylation element specific RNA-binding protein) (Paillard *et al.* 1998) a také Vazebný protein rozeznávající AU bohaté *cis*-elementy (ARE-BP, AU-rich *cis*-elements binding protein) (Voeltz a Steitz 1998), nebo pomocí zygoticky kódovaných mikroRNA, které jsou schopné zprostředkovat deadenylaci maternální RNA a zahájit tak její degradaci v období po MBT (Lund *et al.* 2009, Koebernick *et al.* 2010).

U *A. mexicanum* byla v předchozích pracích identifikována degradace mRNA *wnt1*, *wnt5a* a *wnt5b*. Zatímco u mRNA *wnt1* a *wnt5a* byla zaznamenána degradace na počátku gastrulace, u mRNA *wnt5b* došlo k degradaci již ve stádiu neoplozeného vajíčka. Oblast, která určuje stabilitu nebo degradaci, byla identifikována v 3'UTR a taktéž se ukázalo, že RNA stabilita je ovlivněna působením cytoplazmatických a jaderných faktorů (Caulet *et al.* 2010).

Ve své práci jsem identifikovala celkem 7 317 maternálních genů, které jsou degradovány, a to ještě před MBT. Příkladem jsou *shq1*, *dnd1*, *velo1*, *rbmps2* (viz výše) a neznámý transkript AMEXTC_0340000049739 a u těchto genů dochází k degradaci maternální RNA mezi stádiem 1 a 4 buněk. Transkript s označením AMEXTC_0340000049739 má zajímavý lokalizační profil, ale neznámou funkci i původ. Nepodařilo se nám zjistit žádné existující homology ani na základě nukleotidové sekvence ani proteinové analýzy. Může se tedy jednat o unikátní gen pro *A. mexicanum*. Savčí homolog genu *shq1*, u savců známý jako *gen asociovaný s mortalitou indukovanou retinoidy a interferony (grim-1, gene associated with retinoid-interferon-induced mortality-1)*, hraje u savců roli v potlačení maturace ribosomální RNA a buněčného růstu a dále také indukuje apoptózu (Hofmann *et al.* 2010, Nallar *et al.* 2011). Pokud hraje gen stejnou roli i u *A. mexicanum* je možné, že je degradace genu, který se podílí na potlačení buněčného růstu, v časných stádiích důležitá pro rýhování embrya. Potvrzení této hypotézy si ale bude žádat další výzkum.

Důvodů, proč dochází k degradaci maternální mRNA může být mnoho. Protože většina z identifikovaných genů (79 %) je degradována mezi stádiem 1 a 4 buněk, je pravděpodobné, že se jedná o geny, které hráli roli během oogeneze a během oplození

vajíčka a již nejsou potřebné pro další vývoj. Degradace maternální RNA je také pravděpodobně důležitá pro regulaci vývoje (např. *rbmps2*) a pro zahájení MBT.

Vznik PGC u *A. mexicanum*

Někteří z genů, u kterých jsem zaznamenala degradaci v časných embryích, jsou známy pro svou úlohu při vývoji PGC. Konkrétně se jedná o *rbmps2*, *dnd1* a *velo1*. Rozhodla jsem se proto diskutovat, jakou roli mohou hrát tyto geny a s nimi spojená degradace mRNA ve vývoji zárodečné linie u *A. mexicanum*.

Veškeré markery PGC, které jsem identifikovala v této práci jsou lokalizované ve vegetativním pólu embrya, tak jako u *X. laevis*. Zatímco u *X. laevis* je lokalizace PGC markerů zprostředkována pomocí mitochondriálního oblaku (Kloc a Etkin 1995), přičemž některé mRNA mají přímý podíl na jeho sestavení (Nijjar a Woodland 2013), u *A. mexicanum* se mitochondriální oblak vůbec nevyskytuje (Ikenishi a Nieuwkoop 1978, Johnson *et al.* 2001). Není tedy jasné, jakým mechanismem mohou být mRNA přemístěny do vegetativního pólu a ani není známo jakou roli mohou hrát v časném vývoji embrya.

Představu o funkci PGC markerů u *A. mexicanum* přinesl nedávný výzkum zabývající se zkoumáním genu *velo1*. V tomto výzkumu zjistili, že zatímco u *X. laevis* a *D. rerio* hraje *buc/velo1* zásadní roli při agregaci zárodečné plazmy, u řady savců a u *A. mexicanum* obsahuje sekvence *buc/velo1* prematurační stop kodon. Při porovnání sekvence *velo1* *X. laevis* a *A. mexicanum* byla objevena jednonukleotidová delece navozující předčasný konec translace. Role *velo1* tedy u *A. mexicanum* zůstává nejasná, autoři studie se domnívají, že protein hrál funkci ve formaci zárodečné plazmy u předků obojživelníků. Vzhledem k nepřítomnosti zárodečné plazmy u *A. mexicanum* je tedy pravděpodobné, že gen zde ztratil svojí původní funkci (Škugor *et al.* 2016). Pokud opravdu *velo1* nemá žádnou funkci ve vzniku PGC je pravděpodobné, že degradace jeho mRNA nastává z důvodu zbavení se nepotřebného a pravděpodobně nefunkčního produktu.

Nejnovější výzkumy ukazují, že u *A. mexicanum* dochází k indukci PGC z totipotentních buněk na začátku gastrulace. První buněčně specifická exprese jednoho z markerů PGC *dazl* je ve stádiu 45 a to v oblasti vyvíjejících se gonád (Johnson *et al.* 2001). PGC specifické mRNA tedy mohou být degradovány po oplození, protože zde kvůli nepřítomnosti zárodečné plazmy nejsou potřeba a následně jsou znova exprimovány až v pozdějších stádiích vlivem jiných indukčních faktorů. Indukční mechanismus tvorby PGC se také nachází u řady savců, otázkou tedy je zda došlo v evoluci k vytvoření stejného mechanismu víckrát u různých druhů a určení PGC skrz zárodečnou plazmu je původním

mechanismem pocházejícím od společného předka obojživelníků (Škugor *et al.* 2016), nebo zda naopak je indukční mechanismus tím původním a určení PGC pomocí zárodečné plazmy u *X. laevis* a *D. rerio* se vytvořilo jako následek konvergentní evoluce (Johnson *et al.* 2003).

Asymetrická distribuce RNA ve 2 a 4 buněčném embryu

Tvorba embryonálního tělního plánu je založena na vzniku tří os: A-V, D-V a L-P. Na výše zmiňovaných příkladech jsem ukázala, že jak u *X. laevis* tak i u *A. mexicanum* je pro správné určení A-V osy nezbytné asymetrické rozložení mRNA v animální a vegetativní polovině embrya. V druhé části mé práce jsem se rozhodla porovnat mRNA obsah jednotlivých blastomer 2 a 4 buněčného embrya za účelem identifikace mRNA kódující proteiny D-V a L-P osy a dále dosažené výsledky porovnat s daty získanými z *X. laevis*.

Nejprve jsem s použitím RT-qPCR metody porovnávala v jednotlivých blastomerách rozložení některých známých mRNA kódující determinanty D-V osy: *gsk3b*, *axin1*, *katenu beta 1* (*ctnnb1*, *catenin beta 1*), *wnt5a* a *wnt8b*. Mezi jednotlivými blastomerami embrya jsem nepozorovala žádné rozdíly v expresi těchto genů. Rozložení vybraných faktorů D-V osy bylo již dříve zkoumáno také u časných embryí *X. laevis*, ale i zde byly mRNA rozloženy v blastomerách rovnoměrně (Flachsova *et al.* 2013). Zdá se tedy, že tyto důležité faktory D-V osy jsou u obou obojživelníků regulované spíše na úrovni proteinů než mRNA.

Dále jsem se také pokusila identifikovat mRNA, o nichž je známo, že jsou asymetricky rozloženy v blastomerách 2 a 4 buněčného embrya *X. laevis* a jsou považovány za první krok v určení L-P osy (Levin *et al.* 2002, Adams *et al.* 2006). Bohužel se mi nepodařilo detekovat přítomnost ani mRNA *atp6v0c* (C podjednotky vodíkové pumpy V0, *ATPase H⁺ transporting V0 subunit C*) ani mRNA *atp4a* (alfa podjednotky vodíko-draselné pumpy, *ATPase H⁺/K⁺ transporting subunit alpha*) v žádné z blastomer embryí. Překvapivě jsem, ale zpozorovala nabohacení mRNA *grip2* a *dnd1* v jedné z blastomer 2 a i 4 buněčných embryí. Proto jsme se rozhodli provést RNA-sekvenování, abychom získali celkový profil všech asymetricky exprimovaných mRNA.

Celkem jsme identifikovali 35 466 genů v 2 i 4 buněčném embryu a naším dalším cílem bylo identifikovat geny, jež budou přítomné v jedné z blastomer oproti ostatním blastomerám alespoň dvojnásobně. mooTranskriptomovou analýzu nám ale ztížila skutečnost, že označení blastomer bylo čistě náhodné, protože během přípravy vzorků bylo nemožné od sebe jednotlivé blastomery odlišit (např. barvou, velikostí). Z tohoto důvodu nebylo možné při analýze k sobě správně přiřadit replikáty jednotlivých blastomer, a proto jsme označili blastomery podle množství *grip2* a *dnd1* (více v Metodách). Veškerá data byla

také normalizovaná s použitím těchto dvou genů. Za použití daných kritérií (dvojnásobný rozdíl v blastomerách) se nám v 2 buněčném embryu podařilo identifikovat kolem 5,5 % genů (např. *cnot3*, *abi2*), které jsou nabohacené v opačné blastomeře než *grip2*. Bohužel jsme nezjistili žádné další geny, který by měly stejný profil jako *grip2* a *dnd1*.

V případě 4 buněčného embrya je situace ještě o něco složitější. Pomocí RT-qPCR metody jsem pozorovala nerovnoměrnou distribuci nejen mRNA *grip2* a *dnd1*, ale také mRNA *ankhd1* a *akt2*. To naznačuje, že během dalších buněčných dělení dochází k asymetrickému rozdělení i těch mRNA, které byli ve 2 buněčném stádiu lokalizované rovnoměrně. Lokalizační profil zkoumaných genů se nám podařil ověřit také pomocí RNA-seq analýzy. Bohužel transkriptomová analýza neodhalila žádné další geny se stejným lokalizačním profilem jako mají *grip2* a *dnd1* ve 4 buněčném embryu. Taktéž PCA ukazující 500 nejvíce variabilních genů, nezobrazuje žádné zřejmé rozdíly mezi blastomerami (viz Výsledky, 15 C), což ale nevyklučuje přítomnost jednotlivých asymetricky lokalizovaných mRNA.

PCA provedená na embryích ve stádiu 2 buněk *X. laevis* v naší laboratoři již dříve (viz Výsledky, obrázek 13D) ukazuje, že je mezi blastomerami nízká rozdílnost a většina mRNA je lokalizovaná v blastomerách rovnoměrně. Na druhou stranu PCA (viz Výsledky, obrázek 13C) ukazuje, že u *A. mexicanum* jsou od sebe blastomery poměrně dost odlišné. Porovnání PCA obou obojživelníků naznačuje, že v 2 buněčném embryu *A. mexicanum*, na rozdíl od *X. laevis*, dochází k asymetrické distribuci některých mRNA. Ale vzhledem k tomu, že v dostupné literatuře nejsou dostupné žádné informace o roli mnou identifikovaných genů ve vývoji L-P ani D-V osy, a že získané výsledky ze 4 buněčného embrya jsou poměrně nejednoznačné, bude pro pochopení této problematiky nutné provést další výzkum včetně upravení transkriptomové analýzy 4 buněčného embrya.

Mapování osudu buněk u *A. mexicanum*

Mikroinjikace dextranu, nebo jiné fluorescenční látky, nám umožňuje sledovat embryonální původ tkání a orgánů u dospělého jedince. Tato technika umožňuje sestavení map buněčného osudu, které nám ukážou, jakým způsobem se budou buňky embrya podílet na vzniku tkání během embryogeneze. Sestavení těchto map u různých druhů živočichů je poté užitečné pro mezidruhové srovnávání embryonálního vývoje.

V této práci jsem nejprve injikovala dextran do animální poloviny oplodněného vajíčka *A. mexicanum*, což mělo za následek vyznačení hřbetních struktur embrya v pozdějších stádiích. K nejvýraznějšímu zobrazení došlo v malé oblasti odpovídající

nervové trubice, která má původ v ektodermu. Na druhou stranu injikace do vegetativního pólu se objevila ve ventrální oblasti embrya, konkrétně oblast střeva, které vzniká z endodermu. Získané výsledky naznačují, že materiál v animální nebo vegetativní oblasti vajíčka hraje roli v utváření zárodečných listů podobně jako u *X. laevis*.

Dále jsem také provedla injikaci dextransu do jedné z blastomer embrya ve stádiu 2 buněk. V larválním stádiu je poté vidět, že došlo ke zvýraznění odpovídající poloviny embrya. Tento jev ukazuje, že již ve stádiu 2 buněk jsou jednotlivé buňky od sebe oddělené a není umožněno přesouvání obsahu mezi nimi. Izolovanost jednotlivých blastomer, poté odpovídá mé teorii, že se od sebe jednotlivé buňky liší již v časných stádiích vývoje, což by mohlo mít za následek určení L-P nebo D-V osy. Zda je ale určení těchto dvou os u *A. mexicanum* způsobeno na úrovni mRNA nebo proteinů, si ale žádá další výzkum.

Mapování osudu buněk pomocí fluorescenčního dextransu ukazuje, že u *A. mexicanum* je mapa pro vznik tělního plánu podobná jako u *X. laevis* (Moody 1987a, 1987b), ale mnou získané výsledky transkriptomové analýzy ukazují, že cesty ke vzniku tělního plánu mohou být velice odlišné. Injikace dextransu do oplodněného vajíčka sice ukazuje, že lokalizace mRNA hraje důležitou roli při vývoji tělního plánu, abychom ale určili, jakým způsobem se na vývoji podílejí konkrétní mRNA je potřeba zvolit jiný přístup. Jednou z možností je např. metoda *in situ* hybridizace celého embrya (WISH, whole-mount *in situ* hybridization), která je schopná vizualizovat přítomné mRNA. Použití této metody u *A. mexicanum* je ale ztíženo kvůli přítomnosti řady vysoce podobných transkriptů, takže by bylo potřeba využít velice citlivý přístup, který by od sebe jednotlivé varianty odlišil. Přítomnost různých variant transkriptů mi při vypracování této práce přinesla řadu překážek, a proto se v poslední části této práce věnuji právě této problematice

Komplikace při validaci RNA-Seq dat pomocí RT-qPCR

Ve své práci jsem se potýkala s řadou problémů, jedním z těchto problémů je chybějící anotace u některých genů; řada genů je poté odvozená podle homologního sekvenčního srovnávání, ale jejich genový název a sekvence je pouze předpoklad. Genové anotace jsem čerpala z: <https://www.axolotl-omics.org/> a z naší RNA-seq analýzy.

Dalším problémem je vysoká podobnost různých neanotovaných RNA variant jednotlivých genů, která stěžuje jejich rozlišení na úrovni validačních přístupů jako je RT-qPCR nebo *in situ* hybridizace. V řadě případů je podobnost sekvencí tak vysoká, že není možné navrhnout primery/sondy tak, aby mířili pouze na vybraný transkript. Abych se vyhnula interferenci primerů s nežádoucími sekvencemi pro účely ověřování RNA-seq dat

pomocí RT-qPCR, tak jsem vybrala pouze takové geny, u kterých se nevyskytují žádné varianty transkriptů s vysokou podobností, nebo geny, u nichž je lokalizační profil stejný u všech variant transkriptů.

Původ těchto zmnožených sekvencí u *A. mexicanum* není zřejmý. Na rozdíl od jiných živočichů, jako např. *X. laevis*, kde je známo, že během evoluce došlo k celogenomové duplikaci (Session *et al.* 2016), u *A. mexicanum* žádný důkaz genomové duplikace není. Podle některých zdrojů to ale nevylučuje možnost, že mohlo dojít k relativně vysokému počtu jednotlivých genových duplikací, které by způsobily vznik paralogních genů. Postupná duplikace genů by mohla být jednou z příčin značné velikosti genomu (~32 Gb) a přítomnosti vysokého počtu genů (Smith *et al.* 2009). Na druhou stranu, při srovnání sekvencí několika transkriptů, jsem zpozorovala změny v sekvencích především v sekvencích intronů, což by spíše napovídalo přítomnosti RNA isoform, vzniklých alternativním sestřihem. Dalším faktorem může být také špatná referenční sekvence a nedokonalá anotace jednotlivých genů.

Závěr

V této diplomové práci jsem se zabývala studiem souvislostí časného embryonálního vývoje *A. mexicanum* a lokalizace maternálních RNA. V první části práce jsem se zaměřila na prostorové rozmístění asymetricky lokalizovaných RNA určujících A-V osu. Úspěšně se mi podařilo rozdělit téměř všechny maternální mRNA do 4 lokalizačních profilů – extrémně animální, animální, vegetativní a extrémně vegetativní.

Dále se mi podařilo odhalit, že během časného vývoje dochází k celé řadě změn na úrovni RNA. První skupina obsahuje *de novo* syntetizované mRNA v období před MBT, což ukazuje, že zde dochází k postupné aktivaci zygotické transkripce. Další skupina obsahuje geny, jejichž mRNA je po oplodnění degradovaná. Zajímavé je, že jsem zpozorovala degradaci mRNA také u řady genů, které jsou považované za nezbytné pro vývoj PGC u mnoha organismů. Dále se mi podařilo identifikovat několik genů, jenž vykazují relokizaci během časného vývoje. Vzhledem k nízkému počtu identifikovaných genů, je ale pro potvrzení těchto výsledků vhodné ověření pomocí WISH nebo jedné z pokročilých metod, které umožňují zobrazení jednotlivých molekul RNA v živých buňkách.

V druhé části práce jsem se zaměřila na identifikaci RNA, které by mohly být zodpovědné za určení D-V a L-P osy. Pomocí RT-qPCR a RNA-seq se nám podařilo určit řadu genů, nesouměrně rozdělených mezi blastomery 2 buněčného embrya. Další analýza transkriptomu a porovnání lokalizace mRNA ve 2 a 4 buněčném embryu by nám mohlo říci více o vlivu těchto mRNA na určení L-P nebo D-V osy. V poslední části mé práce jsem s využitím injekce fluorescenčního dextranu nastínila osud částí časného embrya v budoucím vývoji a také jsem ukázala, že se od sebe blastomery 2 buněčného embrya liší z hlediska jejich obsahu, což pravděpodobně může mít za následek určení L-P osy.

Na závěr je nutné říci, že i když fylogenetické analýzy ukazují, že je *A. mexicanum* více příbuzný s *X. laevis*, mnou získané výsledky ukazují, že v některých ohledech sdílí větší podobnost s jinými živočichy. Chybějící zárodečná plazma v oocytech ukazuje, že mechanismy podílející se na vzniku zárodečné linie sdílí ocaseť obojživelníci spíše se savci a mechanismy relokizace mRNA odkazují na určitou podobnost s rybami (např. *D. rerio*). Oba příklady mohou odkazovat na procesy původní pro jejich společného předka. Dosažené výsledky naznačují nutnost mezidruhového srovnávání (s užitím několika morfologicky a fylogeneticky vzdálených druhů) pro lepší pochopení aspektů regulace embryonálního vývoje i z evolučního hlediska.

Použitá literatura

Abe, K., Funaya, S., Tsukioka, D., Kawamura, M., Suzuki, Y., Suzuki, M., Schultz, R., a Aoki, F., 2018. Minor zygotic gene activation is essential for mouse preimplantation development. *PNAS*, 115 (29), E6780–E6788.

Adams, D.S., Robinson, K.R., Fukumoto, T., Yuan, S., Albertson, R.C., Yelick, P., Kuo, L., McSweeney, M., a Levin, M., 2006. Early, H⁺-V-ATPase-dependent proton flux is necessary for consistent left-right patterning of non-mammalian vertebrates. *Dev.*, 133 (9), 1657–1671.

Aguero, T., Kassmer, S., Alberio, R., Johnson, A., and King, M., 2017. Mechanisms of Vertebrate Germ Cell Determination. In: F. Pelegri, M. Danilchik, a A. Sutherland, eds. *Vertebrate Development: Maternal to Zygotic Control*. Cham: Springer International Publishing, 383–440.

Alarcon, V.B. a Elinson, R.P., 2001. RNA anchoring in the vegetal cortex of the *Xenopus* oocyte. *J. Cell Sci.*, 114 (9), 1731–1741.

Anantharaman, V. a Aravind, L., 2006. The NYN Domains: Novel Predicted RNAses with a PIN Domain-Like Fold. *RNA Biol.*, 3 (1), 18–27.

Anderson, J., Reisz, R.R., Scott, D., Fröbisch, N.B., a Sumida, S.S., 2008. A stem batrachian from the Early Permian of Texas and the origin of frogs and salamanders. *Nature*, 453 (7194), 515–518.

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

Bachvarova, R., Davidson, E.H., Allfrey, V.G., a Mirsky, A.E., 1966. Activation of RNA synthesis associated with gastrulation. *PNAS*, 55 (2), 358–365.

Betley, J.N., Frith, M.C., Graber, J.H., Choo, S., a Deshler, J.O., 2002. A Ubiquitous and Conserved Signal for RNA Localization in Chordates. *Curr. Biol.*, 12 (20), 1756–1761.

Betley, J.N., Heinrich, B., Vernos, I., Sardet, C., Prodon, F., a Deshler, J.O., 2004. Kinesin II mediates Vg1 mRNA transport in *Xenopus* oocytes. *Curr. Biol.*, 14 (3), 219–224.

Blackler, A.W., 1958. Contribution to the Study of Germ-cells in the Anura. *Dev.*, 6 (3), 491–503.

Bontems, F., Stein, A., Marlow, F., Lyautey, J., Gupta, T., Mullins, M.C., a Dosch, R., 2009. Bucky ball organizes germ plasm assembly in zebrafish. *Curr. Biol.*, 19 (5), 414–422.

Bordzilovskaya, N.P. a Dettlaff, T.A., 1979. Table of stages of the normal development of axolotl embryos. 1-6.

Boterenbrood, E.C. a Nieuwkoop, P.D., 1973. The formation of the mesoderm in urodelean amphibians. *W. Roux' Archiv f. Entwicklungsmechanik*, 173 (4), 319–332.

Bouniol, C., Nguyen, E., a Debey, P., 1995. Endogenous transcription occurs at the 1-cell stage in the mouse embryo. *Exp. Cell Res.*, 218 (1), 57–62.

Braat, A.K., Zandbergen, T., Van De Water, S., Goos, H.J., a Zivkovic, D., 1999. Characterization of zebrafish primordial germ cells: Morphology and early distribution of vasa RNA. *Dev. Dyn.*, 216 (2), 153–167.

Brinkmann, H., Venkatesh, B., Brenner, S., a Meyer, A., 2004. Nuclear protein-coding genes support lungfish and not the coelacanth as the closest living relatives of land vertebrates. *PNAS*, 101 (14), 4900–4905.

Bubunenko, M., Kress, T.L., Vempati, U.D., Mowry, K.L., a King, M.L., 2002. A consensus RNA signal that directs germ layer determinants to the vegetal cortex of *Xenopus* Oocytes. *Dev. Biol.*, 248 (1), 82–92.

Buehr, M.L. and Blackler, A.W., 1970. Sterility a partial sterility in the South African clawed toad following the pricking of the egg. *Dev.*, 23 (2), 375–384.

Calet, S., Pelczar, H., a Andéol, Y., 2010. Multiple sequences and factors are involved in stability/degradation of Awnt-1, Awnt-5A and Awnt-5B mRNAs during axolotl development. *Dev. Growth Differ.*, 52 (2), 209–222.

Chan, A.P., Kloc, M., a Etkin, L.D., 1999. fatvg encodes a new localized RNA that uses a 25-nucleotide element (FVLE1) to localize to the vegetal cortex of *Xenopus* oocytes. *Development*, 126 (22), 4943–4953.

Chang, P., Torres, J., Lewis, R.A., Mowry, K.L., Houliston, E., a King, M.L., 2004. Localization of RNAs to the Mitochondrial Cloud in *Xenopus* Oocytes through Entrapment and Association with Endoplasmic Reticulum. *Molecular Biology of the Cell*, 15 (10), 4669–4681.

Chatfield, J., O'Reilly, M.-A., Bachvarova, R.F., Ferjentsik, Z., Redwood, C., Walmsley, M., Patient, R., Loose, M., a Johnson, A.D., 2014. Stochastic specification of primordial germ cells from mesoderm precursors in axolotl embryos. *Development (Cambridge, England)*, 141 (12), 2429–2440.

Chin, A. a Lécuyer, E., 2017. RNA localization: Making its way to the center stage. *Biochimica Et Biophysica Acta. General Subjects*, 1861 (11 Pt B), 2956–2970.

Claußen, M. a Pieler, T., 2004. Xvelo1 uses a novel 75-nucleotide signal sequence that drives vegetal localization along the late pathway in *Xenopus* oocytes. *Dev. Biol.*, 266 (2), 270–284.

Claußen, M., Tarbashevich, K., a Pieler, T., 2011. Functional dissection of the RNA signal sequence responsible for vegetal localization of XGrip2.1 mRNA in *Xenopus* oocytes. *RNA Biol.*, 8 (5), 873–882.

Cleine, J.H. a Slack, J.M., 1985. Normal fates and states of specification of different regions in the axolotl gastrula. *J. embryol. exp. morphol.*, 86, 247–269.

Cote, C.A., Gautreau, D., Denegre, J.M., Kress, T.L., Terry, N.A., a Mowry, K.L., 1999. A *Xenopus* Protein Related to hnRNP I Has a Role in Cytoplasmic RNA Localization. *Mol. Cell*, 4 (3), 431–437.

Delarue, M., Sáez, F.J., Johnson, K.E., a Boucaut, J.C., 1997. Fates of the blastomeres of the 32-cell stage *Pleurodeles waltl* embryo. *Dev. Dyn.*, 210 (3), 236–248.

Deshler, J.O., Highett, M.I., Abramson, T., a Schnapp, B.J., 1998. A highly conserved RNA-binding protein for cytoplasmic mRNA localization in vertebrates. *Curr. Biol.*, 8 (9), 489–496.

Deshler, J.O., Highett, M.I., a Schnapp, B.J., 1997. Localization of *Xenopus* Vg1 mRNA by Vera protein and the endoplasmic reticulum. *Science (New York, N.Y.)*, 276 (5315), 1128–1131.

Desnitskiy, A., 2018. Cell cycles during early steps of amphibian embryogenesis: A review. *Biosystems*, 173, 100–103.

Dong, H., Zhang, P., Song, I., Petralia, R.S., Liao, D., a Huganir, R.L., 1999. Characterization of the Glutamate Receptor-Interacting Proteins GRIP1 and GRIP2. *J. Neurosci.*, 19 (16), 6930–6941.

Driever, W. a Nüsslein-Volhard, C., 1988. A gradient of bicoid protein in *Drosophila* embryos. *Cell*, 54 (1), 83–93.

Dumont, J., 1972. Oogenesis in *Xenopus laevis* (Daudin). I. Stages of oocyte development in laboratory maintained animals. *J. Morphol.*, 136 (2), 153–179.

Elinson, R.P., 2011. Cleavage and Gastrulation in *Xenopus laevis* Embryos. In: eLS. Chichester: John Wiley & Sons, Ltd.

Elinson, R.P. a Rowning, B., 1988. A transient array of parallel microtubules in frog eggs: Potential tracks for a cytoplasmic rotation that specifies the dorso-ventral axis. *Dev. Biol.*, 128 (1), 185–197.

Elinson, R.P., Sabo, M.C., Fisher, C., Yamaguchi, T., Oriti, H., and Nath, K., 2011. Germ plasm in *Eleutherodactylus coqui*, a direct developing frog with large eggs. *EvoDevo*, 2 (1), 20.

Flachsova, M., Sindelka, R., and Kubista, M., 2013. Single blastomere expression profiling of *Xenopus laevis* embryos of 8 to 32-cells reveals developmental asymmetry. *Sci. Rep.*, 3 (1), 2278.

Forristall, C., Pondel, M., Chen, L., and King, M.L., 1995. Patterns of localization and cytoskeletal association of two vegetally localized RNAs, *Vg1* and *Xcat-2*. *Dev.*, 121 (1), 201–208.

Frederick, D.L. and Andrews, M.T., 1994. Cell cycle remodeling requires cell-cell interactions in developing *Xenopus* embryos. *J. Exp. Zool.*, 270 (4), 410–416.

Frohnhofer, H.G. and Nüsslein-Volhard, C., 1986. Organization of anterior pattern in the *Drosophila* embryo by the maternal gene *bicoid*. *Nature*, 324 (6093), 120–125.

Gerber, W.V., Yatskievych, T.A., Antin, P.B., Correia, K.M., Conlon, R.A., and Krieg, P.A., 1999. The RNA-binding protein gene, *hermes*, is expressed at high levels in the developing heart. *Mech. Dev.*, 80 (1), 77–86.

Gerhart, J. and Kirschner, M., eds., 1994. *Normal Table of Xenopus Laevis (Daudin): A Systematical and Chronological Survey of the Development from the Fertilized Egg Till the End of Metamorphosis*. P.D. Nieuwkoop, J. Faber, (Eds.). New York: Garland Science.

Graham, C.F. and Morgan, R.W., 1966. Changes in the cell cycle during early amphibian development. *Dev. Biol.*, 14 (3), 439–460.

Gueneau, L., Fish, R.J., Shamseldin, H.E., Voisin, N., Tran Mau-Them, F., Preiksaitiene, E., Monroe, G.R., Lai, A., Putoux, A., Allias, F., Ambusaidi, Q., Ambrozaityte, L., Cimbalistienė, L., Delafontaine, J., Guex, N., Hashem, M., Kurdi, W., Jamuar, S.S., Ying, L.J., Bonnard, C., Pippucci, T., Pradervand, S., Roechert, B., van Hasselt, P.M., Wiederkehr, M., Wright, C.F., Xenarios, I., van Haaften, G., Shaw-Smith, C., Schindewolf, E.M., Neerman-Arbez, M., Sanlaville, D., Lesca, G., Guibaud, L., Reversade, B., Chelly, J., Kučinskas, V., Alkuraya, F.S., and Reymond, A., 2018. KIAA1109 Variants Are Associated with a Severe Disorder of Brain Development and Arthrogyrosis. *Am. J. Hum. Genet.*, 102 (1), 116–132.

Gumy, L.F., Katrukha, E.A., Kapitein, L.C., and Hoogenraad, C.C., 2014. New insights into mRNA trafficking in axons. *Dev. Neurobiol.*, 74 (3), 233–244.

Hara, K., 1977. The cleavage pattern of the axolotl egg studied by cinematography and cell counting. *Roux's archives of developmental biology*, 181 (1), 73–87.

Hashimoto, H., Hara, K., Hishiki, A., Kawaguchi, S., Shichijo, N., Nakamura, K., Unzai, S., Tamaru, Y., Shimizu, T., a Sato, M., 2010. Crystal structure of zinc-finger domain of Nanos and its functional implications. *EMBO Reports*, 11 (11), 848–853.

Heasman, J., Crawford, A., Goldstone, K., Garner-Hamrick, P., Gumbiner, B., McCrea, P., Kintner, C., Noro, C.Y., a Wylie, C., 1994. Overexpression of cadherins and underexpression of β -catenin inhibit dorsal mesoderm induction in early *Xenopus* embryos. *Cell*, 79 (5), 791–803.

Heasman, J., Quarmby, J., a Wylie, C.C., 1984. The mitochondrial cloud of *Xenopus* oocytes: The source of germinal granule material. *Dev. Biol.*, 105 (2), 458–469.

Heim, A.E., Hartung, O., Rothhämel, S., Ferreira, E., Jenny, A., a Marlow, F.L., 2014. Oocyte polarity requires a Bucky ball-dependent feedback amplification loop. *Dev.*, 141 (4), 842–854.

Hofmann, E.R., Nallar, S.C., Lin, L., D’Cunha, J., Lindner, D.J., Weihua, X., a Kalvakolanu, D.V., 2010. Identification and characterization of GRIM-1, a cell-death-associated gene product. *J. Cell Sci.*, 123 (16), 2781–2791. (Článek byl stažen)

Horvay, K., Claußen, M., Katzer, M., Landgrebe, J., a Pieler, T., 2006. *Xenopus* Dead end mRNA is a localized maternal determinant that serves a conserved function in germ cell development. *Dev. Biol.*, 291 (1), 1–11.

Houston, D.W., 2012. Cortical rotation and messenger RNA localization in *Xenopus* axis formation. *WIREs Dev. Biol.*, 1 (3), 371–388.

Howley, C. a Ho, R.K., 2000. mRNA localization patterns in zebrafish oocytes. *Mech. Dev.*, 92 (2), 305–309.

Ikenishi, K. a Nieuwkoop, P.D., 1978. Location and ultrastructure of primordial germ cells (PGCs) in *Ambystoma mexicanum*. *Dev. Growth Differ.*, 20 (1), 1–9.

Iwao, Y., Uchida, Y., Ueno, S., Yoshizaki, N., a Masui, Y., 2005. Midblastula transition (MBT) of the cell cycles in the yolk and pigment granule-free translucent blastomeres obtained from centrifuged *Xenopus* embryos. *Dev. Growth Differ.*, 47 (5), 283–294.

Jiang, P., Nelson, J.D., Leng, N., Collins, M., Swanson, S., Dewey, C.N., Thomson, J.A., a Stewart, R., 2017. Analysis of embryonic development in the unsequenced axolotl: waves of transcriptomic upheaval and stability. *Dev. Biol.*, 426 (2), 143–154.

Johnson, A.D., Bachvarova, R.F., Drum, M., a Masi, T., 2001. Expression of Axolotl DAZL RNA, a Marker of Germ Plasm: Widespread Maternal RNA and Onset of Expression in Germ Cells Approaching the Gonad. *Dev. Biol.*, 234 (2), 402–415.

Johnson, A.D., Crother, B., White, M.E., Patient, R., Bachvarova, R.F., Drum, M., a Masi, T., 2003. Regulative germ cell specification in axolotl embryos: a primitive trait conserved in the mammalian lineage. *Philos. Trans. R. Soc. Lond., B, Biol. Sci.*, 358 (1436), 1371–1379.

Junker, J.P., Noël, E.S., Guryev, V., Peterson, K.A., Shah, G., Huisken, J., McMahon, A.P., Berezikov, E., Bakkers, J., a van Oudenaarden, A., 2014. Genome-wide RNA Tomography in the Zebrafish Embryo. *Cell*, 159 (3), 662–675.

Kane, M.S., Diamonstein, C.J., Hauser, N., Deeken, J.F., Niederhuber, J.E., a Vilboux, T., 2019. Endosomal trafficking defects in patient cells with KIAA1109 biallelic variants. *Genes Dis.*, 6 (1), 56–67.

Kaneshiro, K., Miyauchi, M., Tanigawa, Y., Ikenishi, K., a Komiya, T., 2007. The mRNA coding for *Xenopus* glutamate receptor interacting protein 2 (XGRIP2) is maternally transcribed, transported through the late pathway and localized to the germ plasm. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 355 (4), 902–906.

Kaufman, O.H., Lee, K., Martin, M., Rothhämel, S., a Marlow, F.L., 2018. *rbpms2* functions in Balbiani body architecture and ovary fate. *PLoS Genet.*, 14 (7), e1007489.

Kimelman, D., Kirschner, M., a Scherson, T., 1987. The events of the midblastula transition in *Xenopus* are regulated by changes in the cell cycle. *Cell*, 48 (3), 399–407.

Kirilenko, P., Weierud, F.K., Zorn, A.M., a Woodland, H.R., 2008. The efficiency of *Xenopus* primordial germ cell migration depends on the germplasm mRNA encoding the PDZ domain protein Grip2. *Differentiation*, 76 (4), 392–403.

Kloc, M. a Etkin, L.D., 1995. Two distinct pathways for the localization of RNAs at the vegetal cortex in *Xenopus* oocytes. *Dev.*, 121 (2), 287–297.

Koebernick, K., Loeber, J., Arthur, P.K., Tarbashevich, K., a Pieler, T., 2010. Elr-type proteins protect *Xenopus* Dead end mRNA from miR-18-mediated clearance in the soma. *PNAS*, 107 (37), 16148–16153.

Köprunner, M., Thisse, C., Thisse, B., a Raz, E., 2001. A zebrafish *nanos*-related gene is essential for the development of primordial germ cells. *Genes Dev.*, 15 (21), 2877–2885.

Kosaka, K., Kawakami, K., Sakamoto, H., a Inoue, K., 2007. Spatiotemporal localization of germ plasm RNAs during zebrafish oogenesis. *Mech. Dev.*, 124 (4), 279–289.

Kwon, S., Abramson, T., Munro, T.P., John, C.M., Köhrmann, M., a Schnapp, B.J., 2002. UUCAC- and Vera-Dependent Localization of VegT RNA in *Xenopus* Oocytes. *Curr. Biol.*, 12 (7), 558–564.

Lai, F., Singh, A., a King, M.L., 2012. *Xenopus* Nanos1 is required to prevent endoderm gene expression and apoptosis in primordial germ cells. *Dev.*, 139 (8), 1476–1486.

Lai, F., Zhou, Y., Luo, X., Fox, J., a King, M.L., 2011. Nanos1 functions as a translational repressor in the *Xenopus* germline. *Mech. Dev.*, 128 (1–2), 153–163.

Larabell, C.A., Torres, M., Rowning, B.A., Yost, C., Miller, J.R., Wu, M., Kimelman, D., a Moon, R.T., 1997. Establishment of the Dorso-ventral Axis in *Xenopus* Embryos Is Presaged by Early Asymmetries in β -Catenin That Are Modulated by the Wnt Signaling Pathway. *J. Cell Biol.*, 136 (5), 1123–1136.

Lefresne, J., Andéol, Y., a Signoret, J., 1998. Evidence for introduction of a variable G1 phase at the midblastula transition during early development in axolotl. *Dev. Growth Differ.*, 40 (5), 497–508.

Lehmann, R. a Nüsslein-Volhard, C., 1991. The maternal gene *nanos* has a central role in posterior pattern formation of the *Drosophila* embryo. *Dev.*, 112 (3), 679–691.

Levin, M., Thorlin, T., Robinson, K.R., Nogi, T., a Mercola, M., 2002. Asymmetries in H⁺/K⁺-ATPase and Cell Membrane Potentials Comprise a Very Early Step in Left-Right Patterning. *Cell*, 111 (1), 77–89.

Love, M.I., Huber, W., a Anders, S., 2014. Moderated estimation of fold change and dispersion for RNA-seq data with DESeq2. *Genome Biol.*, 15 (12), 550.

Lund, E., Liu, M., Hartley, R.S., Sheets, M.D., a Dahlberg, J.E., 2009. Deadenylation of maternal mRNAs mediated by miR-427 in *Xenopus laevis* embryos. *RNA*, 15 (12), 2351–2363.

Luo, X., Nerlick, S., An, W., a King, M.L., 2011. *Xenopus* germline *nanos1* is translationally repressed by a novel structure-based mechanism. *Dev.*, 138 (3), 589–598.

Lustig, K.D., Kroll, K.L., Sun, E.E., a Kirschner, M.W., 1996. Expression cloning of a *Xenopus* T-related gene (*Xombi*) involved in mesodermal patterning and blastopore lip formation. *Dev.*, 122 (12), 4001–4012.

Mahowald, A.P. a Hennen, S., 1971. Ultrastructure of the ‘germ plasm’ in eggs and embryos of *Rana pipiens*. *Dev. Biol.*, 24 (1), 37–53.

Manes, M.E., Elinson, R.P., a Barbieri, F.D., 1978. Formation of the amphibian grey crescent: Effects of colchicine and cytochalasin B. *Wilhelm Roux’s archives of developmental biology*, 185 (1), 99–104.

Marco, A. a Marín, I., 2009. CGIN1: A Retroviral Contribution to Mammalian Genomes. *Mol. Biol. Evol.*, 26 (10), 2167–2170.

Marlow, F.L. a Mullins, M.C., 2008. Bucky ball functions in Balbiani body assembly and animal-vegetal polarity in the oocyte and follicle cell layer in zebrafish. *Dev. Biol.*, 321 (1), 40–50.

Mathavan, S., Lee, S.G.P., Mak, A., Miller, L.D., Murthy, K.R.K., Govindarajan, K.R., Tong, Y., Wu, Y.L., Lam, S.H., Yang, H., Ruan, Y., Korzh, V., Gong, Z., Liu, E.T., a Lufkin, T., 2005. Transcriptome Analysis of Zebrafish Embryogenesis Using Microarrays. *PLoS Genet.*, 1 (2), e29.

Melton, D.A., 1987. Translocation of a localized maternal mRNA to the vegetal pole of *Xenopus* oocytes. *Nature*, 328 (6125), 80–82.

Messitt, T.J., Gagnon, J.A., Kreiling, J.A., Pratt, C.A., Yoon, Y.J., a Mowry, K.L., 2008. Multiple Kinesin Motors Coordinate Cytoplasmic RNA Transport on a Subpopulation of Microtubules in *Xenopus* Oocytes. *Dev. Cell*, 15 (3), 426–436.

Meyer, A., Schloissnig, S., Franchini, P., Du, K., Woltering, J.M., Irisarri, I., Wong, W.Y., Nowoshilow, S., Kneitz, S., Kawaguchi, A., Fabrizius, A., Xiong, P., Dechaud, C., Spaink, H.P., Volff, J.-N., Simakov, O., Burmester, T., Tanaka, E.M., a Schartl, M., 2021. Giant lungfish genome elucidates the conquest of land by vertebrates. *Nature*, 590 (7845), 284–289.

Miller, J.R., Rowning, B.A., Larabell, C.A., Yang-Snyder, J.A., Bates, R.L., a Moon, R.T., 1999. Establishment of the Dorsal–Ventral Axis in *Xenopus* Embryos Coincides with the Dorsal Enrichment of Dishevelled That Is Dependent on Cortical Rotation. *J. Cell Biol.*, 146 (2), 427–438.

Mills, K.R., Kruep, D., a Saha, M.S., 1999. Elucidating the Origins of the Vascular System: A Fate Map of the Vascular Endothelial and Red Blood Cell Lineages in *Xenopus laevis*. *Dev. Biol.*, 209 (2), 352–368.

Miyata, Y., Akashi, M., a Nishida, E., 1999. Molecular cloning and characterization of a novel member of the MAP kinase superfamily. *Genes Cells*, 4 (5), 299–309.

Moody, S.A., 1987a. Fates of the blastomeres of the 16-cell stage *Xenopus* embryo. *Dev. Biol.*, 119 (2), 560–578.

Moody, S.A., 1987b. Fates of the blastomeres of the 32-cell-stage *Xenopus* embryo. *Dev. Biol.*, 122 (2), 300–319.

Mosquera, L., Forristall, C., Zhou, Y., a King, M.L., 1993. A mRNA localized to the vegetal cortex of *Xenopus* oocytes encodes a protein with a nanos-like zinc finger domain. *Dev.*, 117 (1), 377–386.

Mowry, K.L. a Melton, D.A., 1992. Vegetal messenger RNA localization directed by a 340-nt RNA sequence element in *Xenopus* oocytes. *Science*, 255 (5047), 991–994.

Nakakura, N., Miura, T., Yamana, K., Ito, A., a Shiokawa, K., 1987. Synthesis of heterogeneous mRNA-like RNA and low-molecular-weight RNA before the midblastula transition in embryos of *Xenopus laevis*. *Dev. Biol.*, 123 (2), 421–429.

Nallar, S.C., Lin, L., Srivastava, V., Gade, P., Hofmann, E.R., Ahmed, H., Reddy, S.P., a Kalvakolanu, D.V., 2011. GRIM-1, a Novel Growth Suppressor, Inhibits rRNA Maturation by Suppressing Small Nucleolar RNAs. *PLoS ONE*, 6 (9), e24082.

Naraine, R., Abaffy, P., Sidova, M., Tomankova, S., Pocherniaieva, K., Smolik, O., Kubista, M., Psenicka, M., a Sindelka, R., 2020. NormQ: RNASeq normalization based on RT-qPCR derived size factors. *Comput. Struct. Biotechnol. J.*, 18, 1173–1181.

Naraine, R., Iegorova, V., Abaffy, P., Franěk, R., Soukup, V., Psenicka, M., a Sindelka, R., 2021. Evolutionary conservation of maternal RNA localization in fishes and amphibians revealed by TOMO-Seq, DOI: 10.1101/2021.08.01.454628. **

Nath, K., Boorech, J.L., Beckham, Y.M., Burns, M.M., a Elinson, R.P., 2005. Status of RNAs, localized in *Xenopus laevis* oocytes, in the frogs *Rana pipiens* and *Eleutherodactylus coqui*. *Journal of Experimental Zoology Part B: Molecular and Developmental Evolution*, 304B (1), 28–39.

Nieuwkoop, P.D., 1947. Experimental Investigations On the Origin and Determination of the Germ Cells, and On the Development of the Lateral Plates and Germ Ridges in Urodeles. *Archives Néerlandaises de Zoologie*, 8 (1), 1–205.

Nijjar, S. a Woodland, H.R., 2013. Protein interactions in *Xenopus* germ plasm RNP particles. *PloS One*, 8 (11), e80077.

Paillard, L., Omilli, F., Legagneux, V., Bassez, T., Maniey, D., a Osborne, H.B., 1998. EDEN and EDEN-BP, a cis element and an associated factor that mediate sequence-specific mRNA deadenylation in *Xenopus* embryos. *EMBO J.*, 17 (1), 278–287.

Pocherniaieva, K., Sidova, M., Havelka, M., Saito, T., Psenicka, M., Sindelka, R., a Kaspar, V., 2018. Comparison of oocyte mRNA localization patterns in sterlet *Acipenser ruthenus* and African clawed frog *Xenopus laevis*. *J. Exp. Zool.*, 330 (3), 181–187.

Pondel, M.D. a King, M.L., 1988. Localized maternal mRNA related to transforming growth factor beta mRNA is concentrated in a cytokeratin-enriched fraction from *Xenopus* oocytes. *PNAS*, 85 (20), 7612–7616.

Satoh, N., 1977. ‘Metachronous’ Cleavage and Initiation of Gastrulation in Amphibian Embryos. *Dev. Growth Differ.*, 19 (2), 111–117.

Savage, R.M. a Danilchik, M.V., 1993. Dynamics of Germ Plasm Localization and Its Inhibition by Ultraviolet Irradiation in Early Cleavage *Xenopus* Embryos. *Dev. Biol.*, 157 (2), 371–382.

Schreckenber, G.M. a Jacobson, A.G., 1975. Normal stages of development of the axolotl. *Ambystoma mexicanum*. *Developmental Biology*, 42 (2), 391–400.

Selman, K., Wallace, R.A., Sarka, A., a Qi, X., 1993. Stages of oocyte development in the zebrafish, *Brachydanio rerio*. *J. Morphol.*, 218 (2), 203–224.

Session, A.M., Uno, Y., Kwon, T., Chapman, J.A., Toyoda, A., Takahashi, S., Fukui, A., Hikosaka, A., Suzuki, A., Kondo, M., van Heeringen, S.J., Quigley, I., Heinz, S., Ogino, H., Ochi, H., Hellsten, U., Lyons, J.B., Simakov, O., Putnam, N., Stites, J., Kuroki, Y., Tanaka, T., Michiue, T., Watanabe, M., Bogdanovic, O., Lister, R., Georgiou, G., Paranjpe, S.S., van Kruijsbergen, I., Shu, S., Carlson, J., Kinoshita, T., Ohta, Y., Mawaribuchi, S., Jenkins, J., Grimwood, J., Schmutz, J., Mitros, T., Mozaffari, S., Suzuki, Y., Haramoto, Y., Yamamoto, T.S., Takagi, C., Heald, R., Miller, K., Haudenschild, C., Kitzman, J., Nakayama, T., Izutsu, Y., Robert, J., Fortriede, J., Burns, K., Lotay, V., Karimi, K., Yasuoka, Y., Dichmann, D.S., Flajnik, M.F., Houston, D.W., Shendure, J., DuPasquier, L., Vize, P.D., Zorn, A.M., Ito, M., Marcotte, E., Wallingford, J.B., Ito, Y., Asashima, M., Ueno, N., Matsuda, Y., Veenstra, G.J.C., Fujiyama, A., Harland, R.M., Taira, M., a Rokhsar, D.S., 2016. Genome evolution in the allotetraploid frog *Xenopus laevis*. *Nature*, 538 (7625), 336–343.

Signoret, J. a Lefresne, J., 1974. Determination, by tritiated thymidine incorporation, of the stages of cellular cycle in the axolotl germ in synchronous period of segmentation. *C. r. hebd. séances Acad. sci., Ser. D, Sci. nat.*, 279 (14), 1189–1191. *

Sindelka, R., Sidova, M., Svec, D., a Kubista, M., 2010. Spatial expression profiles in the *Xenopus laevis* oocytes measured with qPCR tomography. *Methods*, 51 (1), 87–91.

Sindelka, R., Abaffy, P., Qu, Y., Tomankova, S., Sidova, M., Naraine, R., Kolar, M., Peuchen, E., Sun, L., Dovichi, N., a Kubista, M., 2018. Asymmetric distribution of biomolecules of maternal origin in the *Xenopus laevis* egg and their impact on the developmental plan. *Sci. Rep.*, 8.

Skirkanich, J., Luxardi, G., Yang, J., Kodjabachian, L., a Klein, P.S., 2011. An essential role for transcription before the MBT in *Xenopus laevis*. *Dev. Biol.*, 357 (2), 478–491.

Škugor, A., Tveiten, H., Johnsen, H., a Andersen, Ø., 2016. Multiplicity of *Buc* copies in Atlantic salmon contrasts with loss of the germ cell determinant in primates, rodents and axolotl. *BMC Evol. Biol.*, 16, 232.

Smith, J.J., Putta, S., Zhu, W., Pao, G.M., Verma, I.M., Hunter, T., Bryant, S.V., Gardiner, D.M., Harkins, T.T., a Voss, S.R., 2009. Genic regions of a large salamander genome contain long introns and novel genes. *BMC Genomics*, 10 (1), 1–11.

St Johnston, D., Driever, W., Berleth, T., Richstein, S., a Nüsslein-Volhard, C., 1989. Multiple steps in the localization of bicoid RNA to the anterior pole of the *Drosophila* oocyte. *Dev.*, 107 Suppl, 13–19.

Stennard, F., Carnac, G., a Gurdon, J.B., 1996. The *Xenopus* T-box gene, Antipodean, encodes a vegetally localised maternal mRNA and can trigger mesoderm formation. *Dev.*, 122 (12), 4179–4188.

Sutasurja, L.A. a Nieuwkoop, P.D., 1974. The induction of the primordial germ cells in the urodeles. *Wilhelm Roux' Archiv Fur Entwicklungsmechanik Der Organismen*, 175 (3), 199–220.

Tada, H., Mochii, M., Orii, H., a Watanabe, K., 2012. Ectopic formation of primordial germ cells by transplantation of the germ plasm: Direct evidence for germ cell determinant in *Xenopus*. *Dev. Biol.*, 371 (1), 86–93.

Tarbashevich, K., Koebernick, K., a Pieler, T., 2007. XGRIP2.1 is encoded by a vegetally localizing, maternal mRNA and functions in germ cell development and anteroposterior PGC positioning in *Xenopus laevis*. *Dev. Biol.*, 311 (2), 554–565.

Theusch, E.V., Brown, K.J., a Pelegri, F., 2006. Separate pathways of RNA recruitment lead to the compartmentalization of the zebrafish germ plasm. *Dev. Biol.*, 292 (1), 129–141.

Vincent, J.-P., Oster, G.F., a Gerhart, J.C., 1986. Kinematics of gray crescent formation in *Xenopus* eggs: The displacement of subcortical cytoplasm relative to the egg surface. *Dev. Biol.*, 113 (2), 484–500.

Vincent, J.-P., Scharf, S.R., a Gerhart, J.C., 1987. Subcortical rotation in *Xenopus* eggs: A preliminary study of its mechanochemical basis. *Cell motil.*, 8 (2), 143–154.

Vinot, S., Le, T., Ohno, S., Pawson, T., Maro, B., a Louvet-Vallée, S., 2005. Asymmetric distribution of PAR proteins in the mouse embryo begins at the 8-cell stage during compaction. *Developmental Biology*, 282 (2), 307–319.

Voeltz, G.K. a Steitz, J.A., 1998. AUUUA sequences direct mRNA deadenylation uncoupled from decay during *Xenopus* early development. *Mol. Cell. Biol.*, 18 (12), 7537–7545.

Wardle, F.C. a Smith, J.C., 2006. Transcriptional regulation of mesendoderm formation in *Xenopus*. *Semin. Cell Dev. Biol.*, 17 (1), 99–109.

Weeks, D.L. a Melton, D.A., 1987. A maternal mRNA localized to the vegetal hemisphere in *xenopus* eggs codes for a growth factor related to TGF- β . *Cell*, 51 (5), 861–867.

Weidinger, G., Stebler, J., Slanchev, K., Dumstrei, K., Wise, C., Lovell-Badge, R., Thisse, C., Thisse, B., a Raz, E., 2003. dead end, a Novel Vertebrate Germ Plasm Component, Is Required for Zebrafish Primordial Germ Cell Migration and Survival. *Curr. Biol.*, 13 (16), 1429–1434.

Whittington, P.McD. a Dixon, K.E., 1975. Quantitative studies of germ plasm and germ during early embryogenesis of *Xenopus laevis*. *Dev.*, 33 (1), 57–74.

Wilk, K., Bilinski, S., Dougherty, M.T., a Kloc, M., 2005. Delivery of germinal granules and localized RNAs via the messenger transport organizer pathway to the vegetal cortex of *Xenopus* oocytes occurs through directional expansion of the mitochondrial cloud. *Int. J. Dev. Biol.*, 49 (1), 17–21.

Wylie, C.C., Bancroft, M., a Heasman, J., 1976. The formation of the gonadal ridge in *Xenopus laevis*: II. A scanning electron microscope study. *Dev.*, 35 (1), 139–148.

Xenopus laevis stage series: complete. Xenbase: The *Xenopus* Model Organism Knowledgebase. Version 5.4.2. Dostupné z <https://www.xenbase.org/anatomy/alldev.do> [online]

Yang, J., Tan, C., Darken, R.S., Wilson, P.A., a Klein, P.S., 2002. β -Catenin/Tcf-regulated transcription prior to the midblastula transition. *Dev.*, 129 (24), 5743–5752.

Yisraeli, J.K., Sokol, S., a Melton, D.A., 1990. A two-step model for the localization of maternal mRNA in *Xenopus* oocytes: involvement of microtubules and microfilaments in the translocation and anchoring of Vg1 mRNA. *Dev.*, 108 (2), 289–298.

Yoon, C., Kawakami, K., a Hopkins, N., 1997. Zebrafish vasa homologue RNA is localized to the cleavage planes of 2- and 4-cell-stage embryos and is expressed in the primordial germ cells. *Dev.*, 124 (16), 3157–3165.

Yoon, Y.J. a Mowry, K.L., 2004. Xenopus Staufen is a component of a ribonucleoprotein complex containing Vg1 RNA and kinesin. *Dev.*, 131 (13), 3035–3045.

Zearfoss, N.R., Chan, A.P., Wu, C.F., Kloc, M., a Etkin, L.D., 2004. Hermes is a localized factor regulating cleavage of vegetal blastomeres in *Xenopus laevis*. *Dev. Biol.*, 267 (1), 60–71.

Zhang, J. a King, M.L., 1996. Xenopus VegT RNA is localized to the vegetal cortex during oogenesis and encodes a novel T-box transcription factor involved in mesodermal patterning. *Dev.*, 122 (12), 4119–4129.

Zhou, Y. a King, M.L., 1996. Localization of Xcat-2 RNA, a putative germ plasm component, to the mitochondrial cloud in *Xenopus* stage I oocytes. *Dev.*, 122 (9), 2947–2953.

* Originální citace převzatá ze sekundárního zdroje

** Článek ještě není zveřejněn a je dostupný pouze online ve formě předtisku.

Přílohy

Tabulka 1: Přehled použitých primerů pro RT-qPCR

| transkript | gen | primer | sekvence | délka produktu |
|----------------------|--------------------|---------|------------------------|----------------|
| AMEXTC_0340000035404 | <i>grip2</i> | forward | TTTTCCAGCCGGCAAATGG | 96 |
| | | reverse | TTGGCCACAGGTTTCCAAGT | |
| AMEXTC_0340000001428 | <i>ankhd1</i> | forward | CTGGTGGAAACCAGCGATTCT | 129 |
| | | reverse | AGGCAAATCGTCTGTCAGCA | |
| AMEXTC_0340000022045 | <i>nynrin-like</i> | forward | AGGGGTGTCTTGTGTGTGCA | 64 |
| | | reverse | TTTTGTAAGGCGCCCGGTG | |
| AMEXTC_0340000242324 | <i>mok</i> | forward | GCACACCAGGAATGTTACCCC | 81 |
| | | reverse | ATCCGAGCTATGCCAGACCC | |
| AMEXTC_0340000175069 | <i>shq1</i> | forward | AACATTTGAGGGGCTTGGT | 107 |
| | | reverse | CTCTTCAGGCTCAGTTGGGG | |
| AMEXTC_0340000049739 | bez anotace | forward | TCTTGCTACCACCCACCCTC | 139 |
| | | reverse | AGCCATCACCACCAGCATTG | |
| AMEXTC_0340000227198 | <i>dnd1</i> | forward | TGCCCATGAAGATCCAGGTT | 107 |
| | | reverse | GGAATTCAACCATGCAGCCA | |
| AMEXTC_0340000241818 | <i>akt2</i> | forward | GGCAGTGCTGTTTCTTGACA | 92 |
| | | reverse | TGGA CTGCACACCTACAAT | |
| AMEXTC_0340000157859 | <i>znhit2</i> | forward | GACATATCAGGCTCCCACGA | 134 |
| | | reverse | GGAGAAGGCTTGCGTGTTAG | |
| AMEXTC_0340000250002 | <i>gsk3b</i> | forward | TCGGGACATCAAACCACAGA | 97 |
| | | reverse | CTCTCCACGGACTAACTGCT | |
| AMEXTC_0340000162248 | <i>axin1</i> | forward | GTTTGACCAGGCACAGACAG | 109 |
| | | reverse | GCTTTCACCACCAGTCCTTG | |
| AMEXTC_0340000085917 | <i>ctnnb1</i> | forward | GGTGGACCTCAAGCACTAGT | 127 |
| | | reverse | CAGCTTCAACAATGGCAGGT | |
| AMEXTC_0340000067098 | <i>wnt5a</i> | forward | TCCTTTGCCAATCACTCGCT | 76 |
| | | reverse | TGGGGTCCCAGCAATGAATC | |
| AMEXTC_0340000012052 | <i>wnt8b</i> | forward | GATCTATCGAGTCAGCCCTCC | 72 |
| | | reverse | TGTTTTTCATGGCTGTGCGAG | |
| AMEXTC_0340000267508 | <i>atp6v0c</i> | forward | ACCCAACACAATGTGGGCTC | 124 |
| | | reverse | TGCAATCCCAGTCCCCTCT | |
| NT_010000820929.1 | <i>atp4a</i> | forward | CGGGCGGATTCTACTTAAAACC | 129 |
| | | reverse | TGTCTACGCACTCCCAGTTT | |

Tabulka 2: Přehled p-hodnot mezi jednotlivými stádii u vzorků připravených podél A-V osy

| transkript | gen | metoda | p-hodnota | | |
|----------------------|--------------------|---------|------------|------------|-----------|
| | | | 1K/1 buňka | 64/1 buňka | 4/1 buňka |
| AMEXTC_0340000021373 | <i>kiaa1109</i> | RNA-seq | 0,08229 | 0,09240 | 0,11364 |
| AMEXTC_0340000038222 | <i>rbpms2</i> | RNA-seq | 0,00041 | 0,00041 | 0,00110 |
| AMEXTC_0340000022045 | <i>nynrin-like</i> | RT-qPCR | 0,02682 | 0,06986 | x |
| AMEXTC_0340000022045 | <i>nynrin-like</i> | RNA-seq | 0,00302 | 0,34499 | 0,00447 |
| AMEXTC_0340000242324 | <i>mok</i> | RT-qPCR | 0,00866 | 0,00053 | 0,01065 |
| AMEXTC_0340000242324 | <i>mok</i> | RNA-seq | 0,00050 | 0,00687 | 0,00002 |
| AMEXTC_0340000007889 | <i>gsk3b</i> | RNA-seq | 0,45982 | 0,33069 | 0,42782 |
| AMEXTC_0340000142707 | <i>cdk8</i> | RNA-seq | 0,16066 | 0,34306 | 0,45975 |
| AMEXTC_0340000175069 | <i>shq1</i> | RT-qPCR | 0,00146 | 0,00166 | 0,00172 |
| AMEXTC_0340000175069 | <i>shq1</i> | RNA-seq | 0,00014 | 0,00011 | 0,00012 |
| AMEXTC_0340000049739 | bez anotace | RT-qPCR | 0,00004 | 0,00005 | 0,00004 |
| AMEXTC_0340000049739 | bez anotace | RNA-seq | 0,03737 | 0,03768 | 0,03872 |
| AMEXTC_0340000227198 | <i>dnd1</i> | RNA-seq | 0,02325 | 0,01456 | 0,00689 |
| AMEXTC_0340000183471 | <i>velo1</i> | RNA-seq | 0,00012 | 0,00234 | 0,00215 |

Tabulka 3: Přehled p-hodnot mezi jednotlivými blastomery 2 a 4 buněčného embrya

| transkript | gen | stádium | p-hodnota | | | | | |
|----------------------|---------------|---------|-----------|-------|-------|-------|-------|-------|
| | | | D/A | D/B | D/C | C/B | C/A | B/A |
| AMEXTC_0340000035404 | <i>grip2</i> | 2 buňky | / | / | / | / | / | 2E-04 |
| | | 4 buňky | 4E-05 | 3E-06 | 4E-05 | 2E-02 | 7E-03 | 4E-02 |
| AMEXTC_0340000227198 | <i>dnd1</i> | 2 buňky | / | / | / | / | / | 5E-07 |
| | | 4 buňky | 3E-07 | 5E-06 | 2E-05 | 9E-03 | 1E-04 | 2E-02 |
| AMEXTC_0340000001428 | <i>ankhd1</i> | 2 buňky | / | / | / | / | / | 5E-07 |
| | | 4 buňky | 2E-03 | 2E-02 | 5E-02 | 1E-01 | 5E-03 | 3E-01 |
| AMEXTC_0340000241818 | <i>akt2</i> | 2 buňky | / | / | / | / | / | 1E-01 |
| | | 4 buňky | 9E-04 | 2E-03 | 1E-01 | 8E-03 | 4E-03 | 5E-01 |