

Univerzita Karlova v Praze

Přírodovědecká fakulta

Studijní program: Biologie

Studijní obor: Buněčná a vývojová biologie



Diplomová práce

**Transkripční aktivity genů, charakterizující vývojově kompetentní
cytoplazmu oocytů skotu**

**Transcriptional activity of the genes characterizing developmentally
competent cytoplasm in bovine oocytes**

Bc. Denisa Pešanová

Školitel: Ing. Lucie Němcová, Ph.D.

Praha 2013

Prohlášení:

Prohlašuji, že jsem závěrečnou práci vypracovala samostatně pod vedením Ing. Lucie Němcové, Ph.D. na Ústavu živočišné fyziologie a genetiky AV ČR, v.v.i., a že jsem uvedla všechny použité informační zdroje a literaturu. Tato práce ani její podstatná část nebyla předložena k získání jiného nebo stejného akademického titulu.

V Praze dne 15.8.2013

.....
Bc. Denisa Pešánová

Poděkování

Ráda bych tímto poděkovala školitelce diplomové práce paní Ing. Lucii Němcové, Ph.D. za odborné vedení, za její trpělivost a čas při diskuzích týkajících se problematiky vývojové kompetence, který mi během studia věnovala. Dále bych chtěla poděkovat RNDr. Jiřímu Kaňkovi, DrSc. za finanční zabezpečení práce. Rovněž bych chtěla poděkovat Monice Kopčíkové za odborné školení v oblasti přípravy kultivačních médií a ostatním členům Laboratoře vývojové biologie za cenné rady a příjemné prostředí. V neposlední řadě bych ráda poděkovala rodině za podporu během mého studia.

Diplomová práce byla vypracována za podpory grantové agentury Ministerstva zemědělství NAVZ QI91A018 (Zvýšení efektivity biotechnologických postupů využitelných v reprodukci a šlechtění skotu).

Abstrakt

Antrální folikul poskytuje oocyty specifické prostředí – niku, která během oogeneze podporuje vznik kvalitních oocytů. Vývojová kompetence oocytů skotu je ovlivněna velikostí folikulu, ze kterého pochází. Oocyty izolované ze středních nebo větších antrálních folikulů (≥ 6 mm) mají vyšší vývojovou kompetenci (schopnost vyvinout se do stádia blastocysty). Změny cytoplazmatických faktorů, např. mRNA, odrážejí vývojový potenciál oocyty. S pomocí mikročipu jsme charakterizovali nematurované oocyty izolované ze středních folikulů (MF, 6-10 mm) a malých folikulů (SF, 2-5 mm) za účelem odlišit různě vývojově kompetentní oocyty na základě genové exprese. Celkem u 61 genů byl rozdíl v expresi $\geq 1,4\times$. Pro validaci výsledků získaných z mikročipu bylo pomocí kvantitativní RT-PCR vybráno 15 genů. Před maturací byly potvrzeny signifikantní rozdíly u nezralých oocytů izolovaných z SF a MF u genů *ATP5C1*, *MAP3K13*, *MTRF1L*, *TAF1A* a *UBL5*. U 12 genů byla stanovena hladina mRNA po maturaci u subpopulací oocyty rozdělených na základě atrezie kumulárních buněk a velikosti folikulu. Hladina transkriptu *ATP5F1* se po maturaci neměnila u všech kategorií. V případě *BRD7* zůstalo množství transkriptu na stejné úrovni u oocytů bez atretických kumulárních buněk nezávisle na velikosti folikulu. U *TAF1A* se snížila hladina mRNA u oocytů z MF nezávisle na atrezii kumulárních buněk. Všechny ostatní sledované geny vykazovaly po maturaci snížení transkriptu ve všech sledovaných kategoriích oocytů. Pomocí metody kvantitativní RT-PCR byl stanoven expresní profil během časného embryonálního vývoje u 6 vybraných genů. Hladina *MLF1IP* je nejvyšší v MII a během časného embryonálního vývoje postupně klesá. Dochází k degradaci nebo deadenylaci transkriptu a maternální zásoby transkriptu pravděpodobně postačují pro vývoj embrya do pozdního 8-buněčného stádia. U *ATP5C1*, *ATP5F1*, *GATA3*, *PRPF18*, *MTRF1L* dochází k zahájení transkripce z embryonálního genomu v pozdním 8-buněčném stádiu. Získané výsledky naznačují, že malá změna úrovně exprese RNA u více genů současně je pravděpodobně nutná pro dosažení vývojové kompetence oocyty.

Klíčová slova

bovinní oocyt, maturace, polymerázová řetězová reakce s reverzní transkripcí, velikost antrálního folikulu, vývojová kompetence

Abstract

The antral follicle provides a specialized microenvironment or niche, which is necessary for production of high quality oocyte. The developmental competence of bovine oocyte is influenced by the follicle size. Oocytes originated from medium or larger follicles (≥ 6 mm) have greater developmental competence (ability to develop to the blastocyst stage). The changes in cytoplasmic factors, for example mRNAs, could explain differences in oocyte developmental potential. Using Bovine Oligonucleotide microarrays the differences in gene expression profiles of oocytes at germinal vesicle and MII stages from medium (MF, 6-10 mm) or small (SF, 2-5 mm) follicles were characterized. The aim was to find differences between oocytes diverse developmental competence. The expression fold change between the two experimental groups was in 61 genes. Subsets of 15 differentially expressed genes were validated by quantitative RT-PCR. Before maturation, significant differences were confirmed at the level of *ATP5C1*, *MAP3K13*, *MTRF1L*, *TAF1A* and *UBL5*. Subpopulations of oocytes were classified according to atresia of cumulus cells and follicle size. We determined the level of 12 individual transcripts after maturation. *ATP5F1* remained stable in all experimental groups of oocytes. The level of *BRD7* transcript remained stable in SF oocyte independent of atresia in the cumulus cells. The level of *TAF1A* transcript decreased in MF oocytes independent sign of atresia in the cumulus. Other analyzed genes show substantial drop in the level of individual transcripts in MF and SF oocytes after maturation. Next, we characterized expression profile of 6 selected genes throughout early embryonic development. The relative abundance of *MLF1IP* was the highest in MII and progressively decreased during further early embryonic development. The level of transcript is gradually degraded or deadenylated and we hypothesized that maternal transcript is essential for development to late 8-cell embryo. Expression pattern of *ATP5C1*, *ATP5F1*, *GATA3*, *PRPF18* and *MTRF1L* from embryonic genome was confirmed at late 8-cell stage. Our results suggest that small changes in the RNA transcription profiles of many genes are necessary for production of high quality oocyte.

Keywords

bovine oocyte, maturation, quantitative reverse transcription polymerase chain reaction, size of antral follicle, developmental competence

Obsah

1 Seznam zkratk	7
2 Úvod	10
3 Oogeneze a folikulogeneze	11
4 Kvalita oocyty	13
4.1 Určení kvality oocyty.....	14
4.2 Cytoplazmatická a jaderná maturace	17
4.3 Vliv velikosti folikulu na vývojovou kompetenci	20
4.4 Vliv estrálního cyklu a atrezie kumulárních buněk antrálních folikulů na vývojovou kompetenci.....	21
5 Transkripční aktivita oocyty během maturace a transkripční aktivita embrya během časného vývoje	25
6 Cíle práce	29
7 Metody	30
7.1 Získání oocytů z malých a středně velkých folikulů – aspirace pomocí vakua, totální disekce	30
7.2 Získání oocytů z antrálních folikulů pro embryonální vývoj – vypichování, vystříhávání.....	31
7.3 <i>In vitro</i> kultivace oocytů, příprava spermií pro oplození, oplození, kultivace embryí	32
7.4 Ověření zahájení transkripce pomocí α -amanitinu	34
7.5 Izolace mediátorové RNA/celkové RNA	34
7.6 Navržení primerů	35
7.7 Kvalitativní RT-PCR	37
7.8 Kvantitativní RT-PCR	37
7.9 Elektroforéza.....	38
7.10 Statistická analýza.....	38

7.11 Příprava a analýza mikročipu	38
8 Výsledky.....	39
8.1 Stanovení hladiny mRNA lumikanu (<i>LUM</i>) a staniokalcinu 1 (<i>STC1</i>) pomocí qRT-PCR u nematurovaných/maturovaných oocytů a během embryonálního vývoje.....	39
8.2 Výběr kandidátních genů z mikročipu, který porovnával expresi oocytů ze středně velkých folikulů (MF; 6-10 mm s vysokou meiotickou kompetencí) oproti oocytům z malých folikulů (SF; 2-5 mm s nízkou meiotickou kompetencí)	40
8.2.1 Ověření exprese 15 vybraných genů na základě výsledků mikročipu.....	43
8.2.2 Charakterizace exprese 12 genů vybraných pomocí qRT-PCR během maturace	46
8.2.3 Stanovení exprese <i>ATP5C1</i> , <i>ATP5F1</i> , <i>GATA3</i> , <i>MLF1IP</i> , <i>MTRF1L</i> a <i>PRPF18</i> během časného embryonálního vývoje.....	51
9 Diskuze.....	54
9.1 Stanovení exprese <i>LUM</i> a <i>STC1</i>	54
9.2 Expresní profily genů vybraných na základě mikročipu	56
9.2.1 Skupina A – geny vztahující se k mitochondriím.....	57
9.2.2 Skupina B – transkripční a translační faktory a posttranslační modifikační proteiny	60
9.2.3 Skupina C – geny, které se svými translačními produkty podílejí na řízení buněčného cyklu	63
10 Závěry	66
11 Seznam literatury.....	67
11.1 Elektronické zdroje	82
12 Seznam příloh.....	83

1 Seznam zkratek

3'UTR	<i>3' untranslated region</i> ; 3' nepřekládaná oblast
APC/C	<i>anaphase-promoting complex/cyclosome</i> ; anafázi podporující komplex/cyklozóm
ATP	<i>adenosine triphosphate</i> ; adenosintrifosfát
ATP5C1	<i>ATP synthase mitochondrial F1 complex gamma</i> ; mitochondriální ATP syntáza podjednotka gamma
ATP5F1	<i>ATP synthase mitochondrial Fo complex subunit B1</i> ; mitochondriální ATP syntáza podjednotka B1
BCB test	<i>Brilliant Cresyl Blue test</i> ; test brilantní kresylovou modří
BCB-	negativní výsledek BCB testu
BCB+	pozitivní výsledek BCB testu
BRD7	<i>bromodomain-containing protein 7</i> ; bromodoménu obsahující protein 7
Ca²⁺	<i>calcium cation</i> ; vápenatý kation
cAMP	<i>cyclic adenosine monophosphate</i> ; cyklický adenosinmonofosfát
CAND1	<i>cullin-associated NEDD8-dissociated 1</i> ; s kulinem asociující po nedylaci disociující protein 1
CC	<i>cumulus cells</i> ; kumulární buňky
cDNA	<i>complementary DNA</i> ; komplementární DNA
C-konec	konec proteinu s karboxylovou skupinou
COC	<i>oocyte cumulus complex</i> ; oocyt-kumulární komplex
CPE	<i>cytoplasmic polyadenylation element</i> ; cytoplazmatický polyadenylační element
CPEB1	<i>cytoplasmic polyadenylation element- binding protein 1</i>
dNTPs	<i>deoxynucleotide triphosphates</i> ; deoxyribonukleotidtrifosfáty
DLK	<i>dual leucine zipper bearing kinases</i>
dsRNA	<i>double stranded RNA</i> ; dvouřetězcová ribonukleová kyselina
E3	<i>E3 ubiquitin ligase</i> ; ubikvitin ligáza enzym 3
ECS	estrální bovinní sérum
EGA	<i>embryonic gene activation</i> ; aktivace embryonálního genomu
eIF4E	<i>eukaryotic translation initiation factor 4E</i> ; eukaryotický iniciační faktor 4E
FM	<i>fertilization medium</i> ; fertilizační médium
FSH	<i>follicle stimulating hormone</i> ; folikuly stimulující hormon
FSHR	<i>follicle stimulating hormone receptor</i> ; receptor pro folikuly stimulující hormon
G6PDH	glukóza-6-fosfát dehydrogenáza
GATA3	<i>GATA binding factor-3</i> ; faktor 3 vázající GATA protein
GV (oocyt)	<i>germinal vesicle</i> ; zárodečný váček (nematurovaný oocyt)
GVBD	<i>germinal vesicle breakdown</i> ; rozpad jaderné membrány oocytu (zárodečného váčku)
HEPES	Kyselina N-2 hydroxyetyl piperazin-N-ethan sulfonová
HMG	<i>high mobility group</i> ; proteiny s vysokou pohyblivostí v elektroforetickém poli
hnRNA	<i>heterogeneous nuclear RNA</i> ; heterogenní jaderná ribonukleová kyselina
hpf	<i>hours after fertilization</i> ; hodin po fertilizaci

IVC	<i>in vitro cultivation; in vitro kultivace</i>
IVF	<i>in vitro fertilization; in vitro fertilizace</i>
IVM	<i>in vitro maturation; in vitro maturace</i>
IVP	<i>in vitro production; produkce</i>
JC-1	<i>tetraethyl benzimidazolylcarbocyanine iodide</i> , jodid karbocyaninu
LH	<i>luteinizing hormone; luteinizační hormon</i>
LHR	<i>luteinizing hormone receptor; receptor pro luteinizační hormon</i>
logFC	<i>logarithm fold of change; logaritmus násobku změny</i>
LUM	<i>lumican; lumikan</i>
MAD1	<i>mitotic spindle-assembly checkpoint protein 1; protein účastnící se kontrolního bodu sestavování dělicího vřeténka 1</i>
MAD2	<i>mitotic spindle-assembly checkpoint protein 2; protein účastnící kontrolního bodu sestavování dělicího vřeténka 2</i>
MAP3K13	<i>mitogen-activated protein kinase kinase kinase 13</i>
MDM2	<i>mouse double minute 2 homolog</i>
MF	<i>medium follicle; středně velký folikul</i>
MI	<i>meiotic arrest at prophase 1; oocyt zastavený v profázi 1. meiotického cyklu</i>
MII	<i>meiotic arrest in metaphase II; oocyt zastavený v metafzi 2. meiotického cyklu</i>
MLF1IP	<i>myeloid leukemia factor 1-interacting protein; protein interagující s myeloidním leukemickým faktorem 1</i>
MPF	<i>maturation-promoting factor; faktor podporující zrání oocyty</i>
MPM/PVA	pracovní medium doplněné o polyvinylalkohol
MPS1	<i>monopolar spindle1-like 1</i>
MRLP47	<i>mitochondrial ribosomal protein L47; mitochondriální ribozomální protein L47</i>
mRNA	<i>messenger RNA; mediátorová RNA</i>
mtDNA	<i>mitochondrial DNA; mitochondriální deoxyribonukleová kyselina</i>
MTFRL1	<i>mitochondrial translational release factor 1-like; protein podobný mitochondriálnímu translačnímu uvolňujícímu faktoru 1</i>
NAC	<i>nucleosome-associated complex; nukleozómem asociující komplex</i>
NGDN	<i>Neuroguidin</i>
NSN	<i>not surrounded nucleolus</i>
OBS	oestrální bovinní sérum
PBS	<i>phosphate buffer saline; fosfáty pufovaný fyziologický roztok</i>
poly A konec	konec proteinu obsahující adenosinmonofosfáty
PRPF18	<i>PRP18 pre-mRNA processing factor 18 homolog; homolog pre-mRNA sestřihového faktoru 18</i>
P21	<i>cyclin dependent kinase inhibitor 1; protein 21</i>
qPCR	<i>quantitative polymerase chain reaction; kvantitativní polymerázová řetězová reakce</i>
qRT-PCR	<i>quantitative reverse transcription-polymerase chain reaction; kvantitativní polymerázová řetězová reakce s reverzní transkripcí</i>
rDNA	<i>ribosomal DNA; ribozomální deoxyribonukleová kyselina</i>
rRNA	<i>ribosomal RNA; ribozomální ribonukleová kyselina</i>
RNA	<i>ribonucleic acid; ribonukleová kyselina</i>

RT-PCR	<i>reverse transcription-polymerase chain reaction</i> ; polymerázová řetězová reakce s reverzní transkripcí
SAC	<i>spindle-assembly checkpoint</i> ; kontrolní bod buněčného cyklu rozchodu chromatid
SCF komplex	<i>Skp-Cullin-F-box containing complex</i>
SF	<i>small follicle</i> ; malý folikul
SL1	<i>selectivity factor 1</i> ; transkripční faktor selektivity 1
SN	<i>surrounded nucleolus</i>
SRFS3	<i>serine/arginine rich splicing factor 3</i> ; na serin a arginin bohatý protein účastní se sestřihu
SSH	<i>suppression subtractive hybridization</i> ; supresivní subtraktivní hybridizace
STC1	<i>stanniocalcin 1</i> ; staniokalcin 1
SWI/SNF	<i>switch/sucrose nonfermentable nucleosome remodeling complex</i> ; nukleozóm remodelující komplex
TAF1A	<i>TATA box binding protein (TBP)-associated factor</i> ; faktor asociující s TATA box vazebným proteinem
TBP	<i>TATA binding protein</i> ; TATA vazebný protein
TrisHCl	tris(hydroxymetyl)aminomethan hydrochlorid
TTK	<i>protein tyrosine/serine/threonine kinase</i> ; Tyrozin treonin protein kináza
UBTF	<i>upstream binding transcription factor</i> ; vazebný transkripční faktor RNA polymerázy I
UBL5	<i>ubiquitin-like 5</i> ; ubiquitinu podobný protein 5
VÚVEL	Výzkumný ústav veterinárního lékařství v Brně
WID systém	<i>well-in-drop</i> ; kultivace jednoho oocyty v jedné kapce média

2 Úvod

Výběr kvalitních pohlavních buněk je považován za klíčový faktor pro produkci embryí v podmínkách *in vitro* (IVP, *in vitro production*). Tématem současného výzkumu je snaha o zdokonalení podmínek pro kultivaci oocytů, což by mohlo zvýšit jejich kvalitu. Poznatky jsou uplatňovány v biomedicině i v reprodukci hospodářských zvířat. Vývojová kompetence oocytů je definována jako schopnost maturace, oplození a zajištění embryonálního a fetálního vývoje až do narození životaschopných a zdravých potomků (Sirard *et al.*, 2006). Přestože byly kultivační podmínky během posledního desetiletí zdokonaleny, jen necelých 40 % oocytů skotu se během IVP vyvine do stádia blastocysty (Lonergan a Fair, 2008).

Somatické buňky folikulu a jeho vnitřní prostředí významně ovlivňují schopnost oocyty dokončit zrání a získat vývojovou kompetenci. Velikost antrálních folikulů koreluje s vývojovou kompetencí oocytů (Lequarre *et al.*, 2005).

Během růstu oocyty se mění jeho transkripční aktivita. V průběhu maturace je hladina transkriptů snížena nebo zachována na stejné úrovni. Celkový transkripční profil tak odráží funkční stav cytoplazmy (Kanka *et al.*, 2012). Analýza genové exprese umožňuje sledování změn hladin transkriptů genů spojených s vývojovou kompetencí. Největší zastoupení mají geny, jejichž proteiny regulují transkripci, translaci, posttranlační modifikace nebo jsou nutné pro mitotické a meiotické dělení a metabolismus (Wrenzycki *et al.*, 2005). Mitochondrie hrají klíčovou úlohu během maturace a vývoje oocytů (Wang *et al.*, 2009; Chappel, 2013). Právě relativní množství transkripčních a replikačních faktorů mitochondrií je využíváno k charakterizaci meiotické kompetence oocytů skotu (Opiela *et al.*, 2010; Machatkova *et al.*, 2012).

Moje diplomová práce se na rozdíl od předchozích studií, zabývajících se celkovým transkripčním profilem maturovaných a nematurovaných oocytů, zaměřuje na neprobádanou oblast – kvantifikaci vybraných genů získaných na základě porovnání exprese u nematurovaných oocytů z malých a středních antrálních folikulů. Cílem je nalézt skupinu genů, jejichž transkripční profil vypovídá o kvalitě oocyty. Sledování expresních profilů takových genů napomáhá k vyhodnocení optimalizace maturačních podmínek.

3 Oogeneze a folikulogeneze

Vývoj a utváření oocyty (oogeneze) probíhá v závislosti na vývoji a růstu ovariálních folikulů (folikulogenezi). Tento děj je definován jako postupný vývoj od primordiálních až k antrálním ovariálním folikulům, ze kterých je následně *in vivo* během ovulace uvolněn zralý oocyt. Oba vývojové procesy jsou zahájeny během raného embryonálního vývoje a vedou k tvorbě oocyty schopného po splnutí se samčí pohlavní buňkou vytvořit nového jedince. Folikulogeneze je charakterizována dvěma fázemi. První je preantrální fáze, která zahrnuje tvorbu primárního a sekundárního folikulu. Tato fáze nepodléhá kontrole gonadotropiny (hormony podporujícími vývoj gonád) produkovanými adenohypofýzou. Druhá, antrální fáze, je již řízena gonadotropiny. Klíčové jsou luteinizační hormon (LH, *luteinizing hormone*) a folikuly stimulující hormon (FSH, *follicle-stimulating hormone*). Každý folikul je tvořen několika odlišnými typy somatických buněk, které oocyty poskytují vhodné prostředí a dostatek živin. Oocyt uvnitř folikulu roste a zvětšuje svůj objem, dochází k intenzivní syntéze RNA a nahromadění signálních molekul, růstových faktorů i proteinů. V období pohlavní zralosti oocyt dokončuje svůj vývoj. V pubertě ovariální folikuly rostou, ovulují a degenerují (Fair, 2003).

Samičí pohlavní buňky skotu, podobně jako u ostatních savců, vznikají z primordiálních zárodečných buněk, které kolonizovaly genitální lištu, ztratily schopnost pohybu a diferencovaly na oogonie. Po ukončení periody mitotického dělení vstupují oogonie do meiózy. Redukční jaderné dělení je zastaveno v diktyotenním stádiu profáze prvního meiotického cyklu za vzniku primárního oocyty. Takový oocyt obsahuje kompaktní kulovité jádro neboli „zárodečný váček“ (GV, *germinal vesicle*). Bovinní oocyt s průměrem 30 μm obklopuje 4-8 plochých pregranulózních buněk přiléhajících na bazální laminu. Tento útvar představuje primordiální folikul, který dorůstá až 40 μm (Hyttel *et al.*, 1997). Jádro oocyty obklopuje hladké a drsné endoplazmatické retikulum, v cytoplazmě se nachází několik malých váčků Golgiho aparátu a kulovité mitochondrie (Fair *et al.*, 1997).

Během vývoje se počet granulózních buněk zvyšuje až na 20 a současně dochází ke změně jejich tvaru. Zploštělé granulózní buňky se přeměňují na krychlové. Tato změna charakterizuje stádium primárního folikulu. V preantrální fázi vývoje folikulu oocyt prochází růstovou fází, na konci níž může měřit až 95 μm (Hyttel *et al.*, 1997). Jádro oocyty je transkripčně aktivní, pro detekci transkripce se v prvotních studiích využívalo

metody autoradiografie. Během kultivace je do média přidán ^3H -uridin, který je inkorporován do nově vznikající RNA (Fair *et al.*, 1996). V cytoplazmě se tvoří kortikální granula a kolem oocyty jsou ukládány proteiny utvářející *zona pellucida* (Fair *et al.*, 1997). Následuje přeměna na sekundární folikul. Uvnitř oocyty dochází k dalším strukturním změnám – k protažení tvaru mitochondrií a jejich přemístění blíže k plazmatické membráně oocyty. Hluboko v cytoplazmě se může nacházet několik málo kortikálních granulí (Fair *et al.*, 1997). Charakteristické je utvoření druhé vrstvy granulózniích buněk, které přiléhají těsnými spoji (*adherent junctions*) na oocyt, a utvoření děrných spojů (*gap junctions*) (Fair *et al.*, 1997).

Na počátku antrální fáze exprimují granulóznií buňky receptory pro FSH (FSHR, *follicle stimulating hormone receptor*) a buňky *theca folliculi interna* vytváří receptory pro LH (LHR, *luteinizing hormone receptor*). Je známo, že již ve folikulu s jednou až dvěma vrstvami granulózniích buněk byla detekována pomocí *in situ* hybridizace mediátorové RNA (mRNA) pro FSHR (Xu *et al.*, 1995). Antrální vývoj začíná utvořením dutiny vyplněné folikulární tekutinou (antrální dutina). Během přeměny z primordiálního folikulu na časný antrální se folikul zvětší 350× (Lussier *et al.*, 1987). Navíc v této fázi dochází k diferenciaci a specializaci granulózniích buněk na kumulární buňky (CC, *cumulus cells*) a buňky stěnové granulózy. Folikul zvětšuje svůj objem, jeho velikost je na počátku antrální fáze 0,6 mm (Hyttel *et al.*, 1997) a na konci ovulační fáze dosahuje průměru 15-20 mm.

Po utvoření antrální dutiny se již průměr oocyty tak výrazně nemění. Za plně dorostlý se považuje oocyt o velikosti 120 μm (Fair *et al.*, 1997; Otoi *et al.*, 1997). Mitochondrie jsou rozptýleny v celém objemu cytoplazmy. Váčky Golgiho aparátu vytváří rozsáhlé sítě a větší cisterny (Fair *et al.*, 1997). V antrální fázi folikuly nejprve reagují na zvýšení hladiny FSH nutné pro vytvoření kohorty rostoucích folikulů. Poté zvýšení hladiny LH indukuje expanzi CC a pokračování meiotického cyklu rozpadem jaderné membrány (GVBD, *germinal vesicle breakdown*). Meióza se zastaví ve druhém meiotickém bloku – metafázi II. Oocyt může být v této fázi ovulován a oplozen.

4 Kvalita oocyty

Velké procento oocytů izolovaných z antrálních folikulů maturovaných v *in vitro* podmínkách nemá schopnost pokračovat ve vývoji po oplození. Pro vývoj oocyty je podstatná nika – prostředí folikulu. Kvalita pohlavních buněk *in vitro* a *in vivo* závisí na správném vývoji oocyty i folikulu a jejich vzájemné komunikaci (Gilchrist *et al.*, 2008; Sirard 2011). Z toho vyplývá, že vývojová kompetence narůstá v závislosti na vývoji folikulu i velikosti oocyty (Otoi *et al.*, 1997; Hagemann *et al.*, 1999).

Oocyt dosahuje vývojové kompetence postupně během svého růstu a maturace. Po dosažení pohlavní zralosti jedince získávají oocyty během své růstové fáze schopnost zahájit GVBD, kondenzovat chromatin a pokračovat v meiotickém cyklu (Mermillod *et al.*, 1999; Mermillod *et al.*, 2008). V *in vivo* podmínkách dosahuje oocyt v průběhu maturace vývojové kompetence v dominantním folikulu. Pro IVP jsou oocyty v GV stádiu izolovány z antrálních folikulů a maturovány v *in vitro* podmínkách. Vývojový potenciál *in vivo* maturovaných oocytů je vyšší než *in vitro* (Greve *et al.*, 1987; Leibfried-Rutledge *et al.*, 1987).

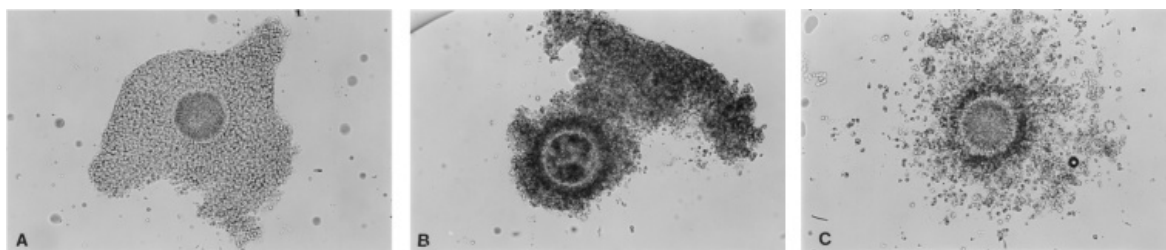
Oocyty získané z ovárií pro IVP jsou heterogenní, na jejich kvalitu působí více faktorů, např. fáze estrálního cyklu, velikost a stav atrézie folikulu. U většiny savců se kvalita oocyty zhoršuje se vzrůstajícím věkem samice. Bylo zjištěno, že bovinní oocyty mladších samic mají vyšší schopnost být oplozeny (62,3 %), zatímco u oocytů samic starších než 120 měsíců byla výrazně snížena schopnost oplození (30,3 %). U oocytů starších samic bylo zaznamenáno o 16 % více defektů při vydělení druhého pólového tělíška. Úspěšnost vývoje embryí do stádia blastocysty se však mezi skupinami nelišila (Yamamoto *et al.*, 2010).

Míra úspěšnosti kultivace do stádia embrya závisí také na způsobu izolace (např. aspirace, vystřihování folikulů, totální disekce), složení kultivačních médií (Hirao, 2011) a kvalitě spermií (DeJarnette *et al.*, 1992; Nadir *et al.*, 1993). Do stádia blastocysty se vyvine necelých 40 % *in vitro* maturovaných bovinních oocytů, avšak byla publikována i úspěšnost 50 % (Lequarre *et al.*, 2005). Nízké procento úspěšnosti získání embryí po fertilizaci je přisuzováno neúplnému cytoplazmatickému zrání (Ferreira *et al.*, 2009).

4.1 Určení kvality oocyty

Pro IVP embryí skotu je nutné využívat pouze kvalitní oocyty, populace oocytů izolovaných z ovárií je však heterogenní, což značně situaci komplikuje. Kvalita oocyty je ovlivněna působením mnoha faktorů mezi, které patří: fáze estrálního cyklu (De Wit *et al.* 2000), prostředí folikulu (Sutton *et al.* 2003), velikost a atrezie folikulu (Pavlok *et al.*, 1992; Lonergan *et al.*, 1994). Již od 19. století se kvalita oocytů posuzovala podle morfologických znaků za pomoci světelného mikroskopu. Mezi hlavní kritéria výběru oocytů skotu patří počet, tvar a struktura kumulárních buněk, barva a množství granul v cytoplazmě, morfologie organel a pravidelný tvar *zona pellucida* (Blondin a Sirard, 1995). Oocyt vyhodnocený jako kvalitní nemusí být vždy vývojově kompetentní. Za kvalitnější jsou standardně považovány bovinní oocyty s kompaktním vícevrstevným kumulem a jasnou, někdy až jemně granulovanou, cytoplazmou, zatímco oocyty bez kumulárních buněk, s poškozeným nebo méně než třívrstevným kumulem a tmavou heterogenní cytoplazmou jsou označovány za méně kvalitní (Blondin a Sirard, 1995), viz Obrázek 1.

Obrázek 1: Oocyty a kumulus



A – kompaktní kumulus; B – méně kompaktní a tmavý kumulus; C – expandovaný kumulus; převzato a upraveno z (De Wit *et al.*, 2000).

Většina biochemických a molekulárních metod hodnocení zahrnuje invazivní postupy, které nejsou kompatibilní s životaschopností oocyty. Biochemické a molekulární metody jsou využívány společně s metodami neinvazivními.

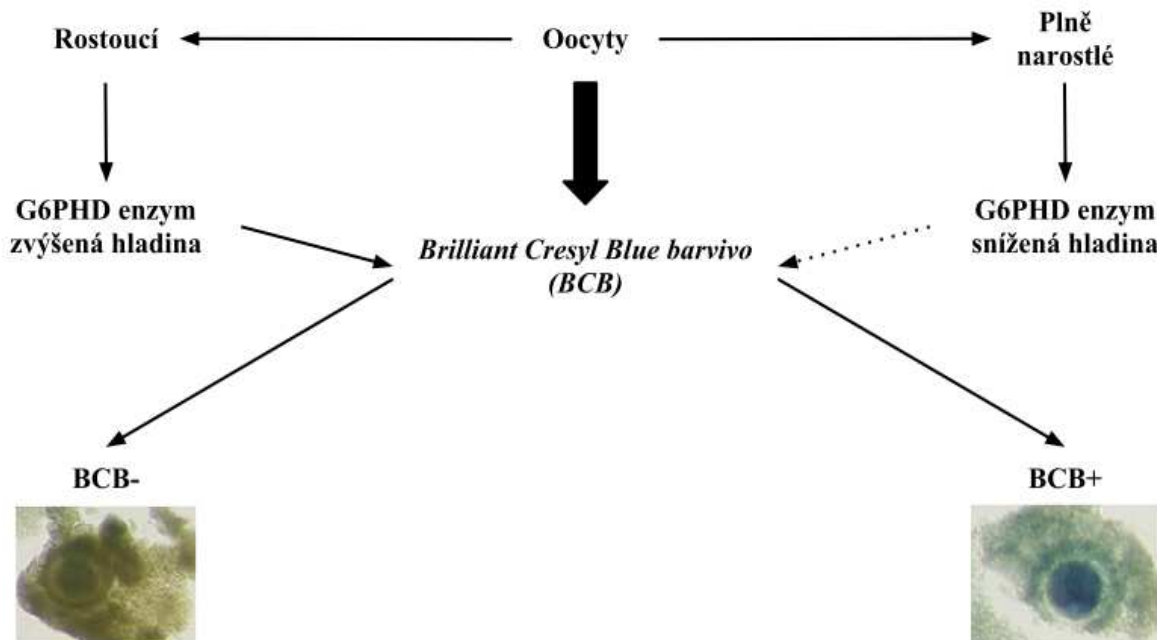
Morfologie a metabolismus mitochondrií odráží vývojovou kompetenci oocyty i kvalitu embryí, protože tyto orgány jsou zdrojem ATP (Stojkovic *et al.*, 2001), které je nutné pro oplození i embryonální vývoj (Van Blerkom, 2009). Pomocí biochemických metod je možné stanovit aktivitu mitochondrií (Machatkova *et al.*, 2012), koncentraci Ca^{2+} (Boni *et al.*, 2002), ATP (Rieger, 1997) a mastných kyselin (Auclair *et al.*, 2013).

Pro výběr kompetentních bovinních oocytů se v základním výzkumu začíná používat *Brilliant Cresyl Blue test* (BCB). Jedná se o vitální barvivo (brilantní kresylovou modř) přidávané do kultivačního média, pomocí něhož se stanovuje aktivita glukóza-6-fosfát dehydrogenázy (G6PDH). Pokud je aktivita enzymu G6PDH nízká, dojde k vytvoření modrého produktu, který obarví cytoplazmu oocyty (viz Obrázek 2). Tyto oocyty označujeme jako BCB+, zatímco BCB- mají vysokou hladinu G6PDH a neobarvenou cytoplazmu. U nematurovaného oocyty (v růstové fázi vývoje) je aktivita G6PDH vyšší, avšak během maturace klesá. Oocyty, které nejsou kvalitní, si uchovávají vyšší hladinu G6PDH a zůstávají bezbarvé. Téměř před 9 lety bylo provedeno porovnání bovinních oocytů selektovaných na základě metody BCB testu a klasické selekce podle morfologických znaků. BCB test umožnil porovnání oocytů jalovic (samic skotu před prvním otelením) a samic po otelení. Oocyty získané z jalovic BCB+ dosahovaly po *in vitro* fertilizaci (IVF) a *in vitro* kultivaci (IVC) stádia blastocysty v 12,3 %, zatímco BCB- v pouhých 1,6 % a 30 % oocytů krav po otelení poskytlo blastocysty (Pujol *et al.*, 2004). Metoda je v primárním výzkumu vhodným doplňkem morfologických/mikroskopických přístupů k selekci oocytů. Alm *et al.* (2005) rozdělili oocyty na BCB+, BCB- a kontrolu a ponechali je zrát. Po oplození se z kontroly bez barviva vyvinulo do stádia blastocysty 34,1 % a v případě oocytů označených BCB+ 19,2 %. V případě oocytů BCB- se vyvinulo do stádia blastocysty 3,9 %.

V současnosti se využívá u myši, králíka, koně, ovce, člověka i skotu pro výběr kvalitních oocytů hodnocení kondenzace chromatinu (Tan *et al.*, 2009). U myši byly poprvé popsány dva stavy chromatinu – SN (*surrounded nucleolus*) a NSN (*not surrounded nucleolus*) (viz Obrázek 3). U SN je chromatin kondenzovaný a utváří kolem jádérka shluky ve tvaru prstence. Při NSN není chromatin kondenzovaný a nevytváří struktury kolem jádérka. Než získají oocyty vývojovou kompetenci, musí nastat změna kondenzace chromatinu z NSN na SN, během které dochází k umlčení transkripce. Předpokládá se, že oocyty, ve kterých transkripce neprobíhá, mají větší vývojovou kompetenci než oocyty nematurované s rozvolněným chromatinem (Lodde *et al.*, 2007; Lodde *et al.*, 2008). Oocyty skotu byly podle struktury chromatinu rozděleny do čtyř skupin (GV0, GV1, GV2, GV3). Předpokládá se, že nejvyšší vývojovou schopností disponují oocyty zařazené do skupin GV2 a GV3. Nejvyšší pokles transkripce byl popsán u skupiny oocytů GV3, které obsahují periferně umístěné jádro, na jaderné

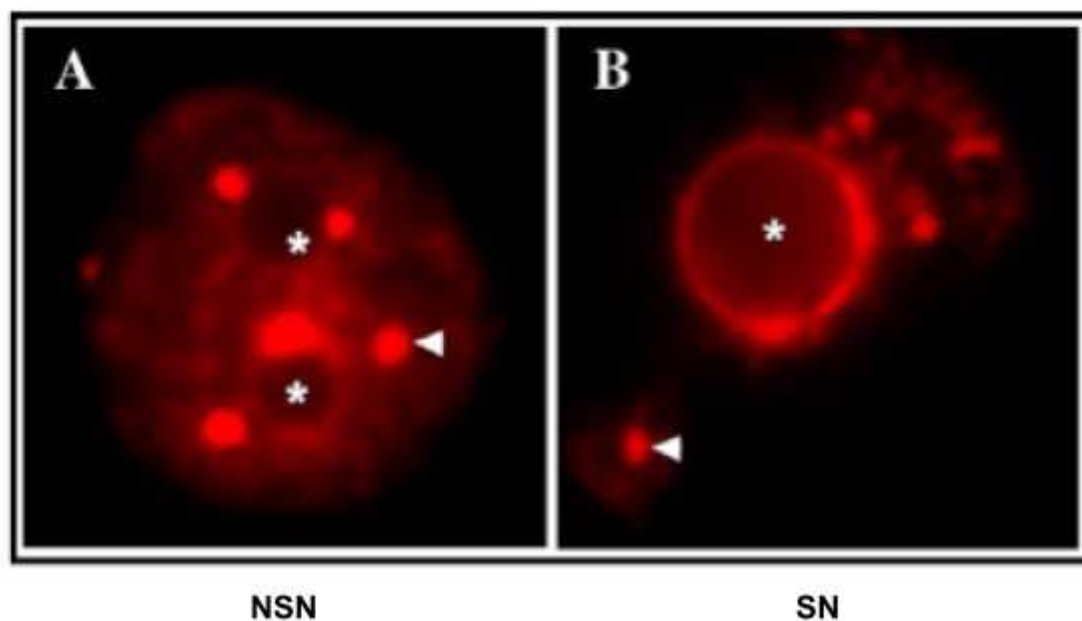
membráně mají mnoho záhybů a jejich chromatin je nahromaděný na jednom místě (Lodde *et al.*, 2008).

Obrázek 2: Schéma Brilliant Cresyl Blue testu



Převzato a upraveno z (Bhojwani *et al.*, 2007).

Obrázek 3: Struktura chromatinu v GV oocyty



A – kondenzovaný chromatin s uspořádáním NSN; B – uspořádání chromatinu SN; * – pozice jadérka; ◄ – oblasti heterochromatinu; DNA je obarvená Hoechst 33248 a zobrazena červeně. Jedná se o oocyty myši. Převzato z (De La Fuente, 2006) a upraveno.

Naprostá většina našich znalostí o vývojové kompetenci je v poslední době získávána pomocí molekulárních metod biologie. Tyto přístupy mnohem přesněji než morfologická kritéria vypovídají na základě genové exprese o schopnosti vývoje – jako nástroj pro studium slouží supresivní subtraktivní hybridizace (SSH, *suppression subtractive hybridization* – slouží ke srovnání dvou vzorků s různě exprimovanými geny), mikročipy a kvantitativní polymerázová řetězová reakce s reverzní transkripcí (qRT-PCR, *quantitative reverse transcription-polymerase chain reaction*) (Dalbiès-Tran a Mermillod, 2003; Memili *et al.*, 2007; Katz-Jaffe *et al.*, 2009). Pro studium funkce genu se využívá RNA interference. Vnesení dsRNA do oocyty pomocí mikroinjikace umožňuje sledování vlivu změn exprese specifických genů na fenotyp (Paradis *et al.*, 2005). Na rozdíl od neinvazivních přístupů jsou invazivní metody lépe kvantifikovatelné, hodnotí objektivní parametry a jejich výhodou je velká senzitivita. Nejsou však využitelné pro IVF.

4.2 Cytoplazmatická a jaderná maturace

Zrání je fáze oogeneze, zahájená v GV stádiu a pokračující až do metafáze druhého meiotického dělení. V průběhu maturace dochází ke strukturním změnám v jádře (tzv. jaderná maturace) i v cytoplazmě (tzv. cytoplazmatická maturace) (Sirard *et al.*, 2006). Takové změny umožňují vytvořit zcela zralý oocyt, který je po ovulaci schopný oplození (Gosden a Lee, 2010).

Jaderné zrání lze sledovat v podobě změn kondenzace chromozómů, které jsou pozorovatelné pomocí světelné mikroskopie po obarvení aceto-orceinem (Sirard *et al.*, 1989). Oocyty maturují obklopeny kumulárními buňkami a vzájemná komunikace umožňuje regulovat maturaci (Sutton *et al.*, 2003).

Zrání oocyty *in vitro* je spontánně zahájeno po vyjmutí oocyty z antrálního folikulu bez jakéhokoliv hormonálního stimulu, zatímco *in vivo* je znovuzahájení meiózy podmíněno uvolněním LH z adenohipofýzy. Předpokládá se, že indukované zpoždění znovuzahájení jaderné maturace v *in vitro* podmínkách umožní, aby oocyty doplnily dosud nenasyntetizovanou RNA, růstové faktory, enzymy, strukturní proteiny a další látky potřebné pro časný embryonální vývoj (Bilodeau-Goeseels, 2012). V základním výzkumu se využívá inhibitorů fosfodiesteráz či analogu cyklického adenosin monofosfátu (cAMP, *cyclic adenosine monophosphate*), jehož vysoká hladina brzdí GVBD. Dále se využívá např. butyrolaktonu nebo roskovitinu, které patří mezi inhibitory MPF (*maturation promoting factor*). MPF je komplex cyklin dependentní kinázy 1 a cyklinu B.

Podílí se na iniciaci GVBD a aktivovaný komplex je nutný pro pokračování meiózy (Sirard, 2001). Vliv inhibitorů dokládají výsledky Thomas *et al.* (2004). Použitím milrinonu (inhibitoru fosfodiesterázy typu 3 v oocytech) se zvýšil vývoj do blastocysty ze 16 % na 54 %. U rolipramu (inhibitoru fosfodiesterázy typu 4 v kumulárních buňkách) došlo ke zvýšení počtu blastocyst ze 17 % na 51 % (Thomas *et al.*, 2004).

Před vznikem antrální dutiny nejsou oocyty meioticky kompetentní (Lonergan *et al.*, 1994). Schopnost znovuzahájit meiózu však ještě nemusí znamenat kompetenci k dosažení metafáze II. Bylo prokázáno, že meiotická kompetence koreluje s velikostí oocyty, což má spojitost s rostoucím průměrem folikulu (Arlotto *et al.*, 1996). Rozměry oocyty i folikulu slouží jako kritéria při výběru oocytů vhodných ke kultivaci. Oocyty, které dorostou v průměru 100 μm (Arlotto *et al.*, 1996), mají schopnost dosáhnout MI stádia, avšak za meioticky kompetentní jsou považovány takové, které měří alespoň 115 μm v průměru (Otoi *et al.*, 1997). Velikosti folikulu se věnuje následující kapitola 4.3.

Během *in vitro* maturace probíhá rychleji rozpad jaderné membrány (de Loos *et al.*, 1992), naopak kumulární expanze je rozsáhlejší během *in vivo* zrání. Oocyty maturované *in vivo* dosahují stádia blastocysty častěji než maturované *in vitro* (Rizos *et al.*, 2002). V *in vivo* podmínkách roste folikul ze 4 mm na 15 mm po dobu 5 dní (Pavlok *et al.*, 1992), zatímco pro IVM jsou běžně izolovány oocyty z folikulů 2-6 mm a průměrná doba jaderné maturace u skotu trvá 24 h (Sirard *et al.*, 1989). U oocytů dochází v *in vitro* podmínkách spontánně k iniciaci GVBD v rozpětí 6,6-8,0 h od zahájení kultivace (Sirard *et al.*, 1989). Oocyt je schopný dokončit MI přibližně v intervalu 10,3-15,4 h. Dále meiotické zrání zahrnuje přechod z MI do MII, vydělení 1. pólového tělíska a dosažení MII.

Dokončení zrání oocyty vyžaduje kromě jaderného zrání i cytoplazmatickou maturaci. Cytoplazmatická maturace je komplexní proces zahrnující ultrastrukturní změny cytoskeletu a redistribuci organel, nahromadění ribozomální RNA (rRNA, *ribosomal RNA*) a mRNA a aktivaci proteinů, které jsou nutné pro získání vývojové kompetence a dokončení embryonálního vývoje (Ferreira *et al.*, 2009). Správný průběh zrání je klíčový pro vývojovou schopnost oocyty.

Během maturace dochází k přemístění kortikálních granul, což jsou malé váčky obsahující strukturní proteiny, enzymy a glykosaminoglykany. V GV stádiu se granula nachází difúzně spíše hluboko v cytoplazmě, zatímco na konci MII fáze jsou přemístěna pod povrch plazmatické membrány oocyty (Hyttel *et al.*, 1986). Tyto změny jsou později během IVF nezbytné pro zablokování polyspermie (Gardner a Evans, 2006). V cytoplazmě

během maturace dochází ke strukturním přestavbám membrán Golgiho aparátu a utváření větších cisteren (Hyttel *et al.*, 1986). Během cytoplazmatické maturace dochází také k přestavbě jednotlivých váčků endoplazmatického retikula, které se účastní zpracování a modifikace proteinů, metabolismu lipidů nebo regulace signalizace pomocí Ca^{2+} (He *et al.*, 1997). Většina nematurovaných oocytů není schopna po oplození zahájit vápníkovou vlnu nutnou pro aktivaci oocytu (Lee *et al.*, 2006).

Mitochondrie jsou důležitou organelou, ve které probíhá velká část metabolismu. Tyto organely produkují ATP, které je zdrojem energie (Stojkovic *et al.*, 2001) nezbytné pro dokončení maturace, oplození a následný vývoj. Mitochondrie slouží jako zásobárna Ca^{2+} , který je důležitou signalizační molekulou během maturace, oplození a při pozdějším vývoji. Tato organela se účastní apoptózy oocytu. Kyslíkové radikály, zvýšená koncentrace Ca^{2+} nebo zvýšená exprese pro-apoptotických proteinů (např. rodina Bcl-2) indukuje uvolnění cytochromu C a aktivaci signální dráhy kaspáz (Thouas *et al.*, 2004). Je dokázáno, že v 18. hodině *in vitro* maturace (IVM) dochází k rozptýlení a přemístění mitochondrií do periferních oblastí cytoplazmy (Hyttel *et al.*, 1986; Machatkova *et al.*, 2012). Během MI se 40 % mitochondrií v myším oocytu lokalizuje do blízkosti dělicího vřeténka a následně migruje společně ke kortexu (Dalton a Carroll, 2013). Reorganizace, struktura mitochondrií a množství ATP v oocytu/embryu jsou parametry, které se využívají pro stanovení kvality oocytu (Machatkova *et al.*, 2012) a pro určení kvality blastocysty (Tarazona *et al.*, 2006).

Význam cytoplazmy a mitochondrií dokládají studie na myši (Perez *et al.*, 2000), praseti (Shourbagy *et al.*, 2006) i skotu, které prokázaly, že přenos cytoplazmy nebo mitochondriální frakce chrání oocyt před apoptózou. Oocyty byly záměrně vystaveny působení ethidium bromidu, který negativně ovlivňuje replikaci mitochondriální DNA a brání pokračování meiózy i přesunu kortikálních granulí. Po čtyřiaadvacetihodinové maturaci bovinních oocytů s přidavkem ethidium bromidu byly poškozené oocyty obohaceny o cytoplazmu nepoškozených zdravých oocytů. Schopnost prvního dělení u poškozených oocytů byla 49,3 %, zatímco u oocytů obohacených o ooplazmu 68,7 %. Přenos části cytoplazmy a mitochondrií vylepšuje viabilitu blastocysty (Chiaratti *et al.*, 2011).

4.3 Vliv velikosti folikulu na vývojovou kompetenci

První studie, které popisovaly vliv velikosti folikulu na vývojovou kompetenci oocyty, byly provedeny poměrně dávno (Lonergan *et al.*, 1994; Blondin a Sirard, 1995; Hagemann *et al.*, 1999). Pro *in vitro* studie jsou vybírány oocyty z izolovaných různě velkých antrálních folikulů nejčastěji o velikosti 2-8 mm (Khurana a Niemann, 2000; Hendriksen *et al.*, 2004; Sagirkaya *et al.*, 2007; Gendelman a Roth, 2012).

Bylo prokázáno, že oocyty z preantrálních folikulů o velikosti menší než 0,9 mm nejsou schopné zahájit GVBD, zatímco oocyty z malých antrálních folikulů větších než 0,9 mm jsou schopné dokončit MI. Oocyt získaný z folikulu o velikosti větší než 2,0 mm je schopný kompletního jaderného zrání (Pavlok *et al.*, 1992).

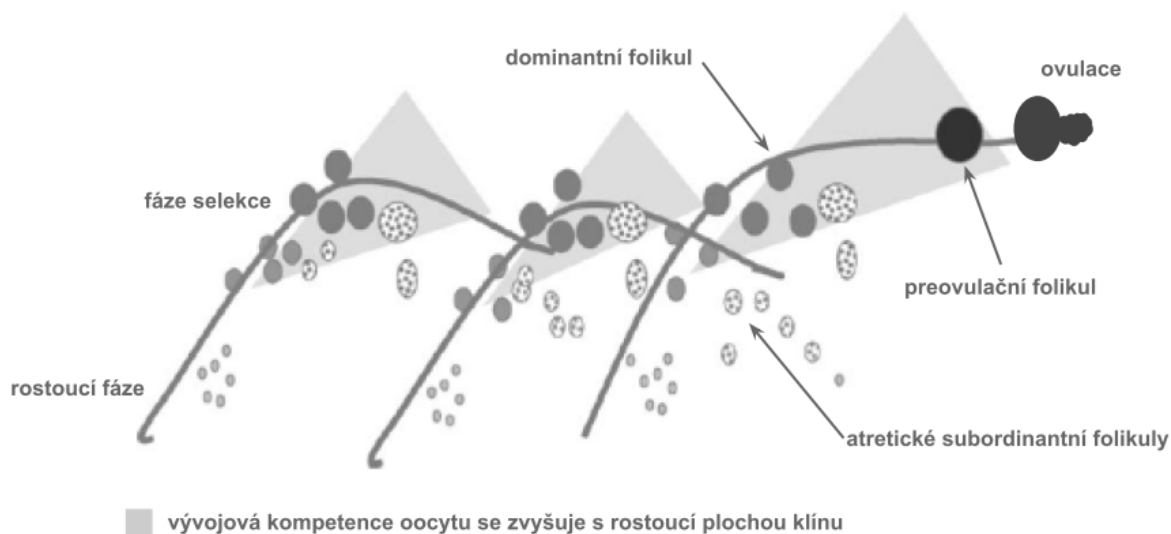
Oocyty izolované z malých antrálních folikulů jsou považované za méně vývojově kompetentní oproti oocytům izolovaným z větších antrálních folikulů, což může být způsobeno vlivem dominantního folikulu během folikulární vlny (Hagemann *et al.*, 1999; Machatkova *et al.*, 2004). Oocyty izolované ze stejně velkého folikulu se mohou např. vlivem estrálního cyklu nebo atrézie lišit schopností vývoje do stádia blastocysty (Lonergan *et al.*, 1994; Blondin a Sirard, 1995). Více o této problematice v kapitole 4.4. Lonergan *et al.* (1994) získali kultivací v *in vitro* podmínkách dvakrát více blastocyst z oocytů izolovaných z folikulů větších než 6 mm oproti oocytům z folikulů 2-6 mm. Blondin a Sirard (1995) se zabývali oocyty izolovanými z folikulů menších než 3 mm, 3-5 mm a větších než 5 mm a zjistili, že oocyty izolované z folikulů menších než 3 mm se vyvíjí nejčastěji do stádia 16-buněčného embrya. Oocyty izolované z folikulů větších než 3 mm se vyvíjí do posledního sledovaného stádia – moruly. Podle Hagemanna *et al.* (1999) se významně neliší vývojová schopnost oocytů izolovaných z folikulů o velikosti 3-5 mm a 6-8 mm. Další studii provedly společně tři výzkumné týmy (Dánský institut zemědělských věd, Katolická univerzita v Lovani, Francouzský národní institut pro zemědělský výzkum). Porovnávaly vývojovou kompetenci oocytů izolovaných z malých antrálních folikulů (2-4 mm) a velkých folikulů (větších než 6 mm). Po vyhodnocení experimentu zjistily, že se do stádia blastocysty vyvinulo 42 %, 50 % a 39 % oocytů izolovaných z velkých folikulů a 14 %, 35 % a 22 % oocytů izolovaných z malých folikulů (Lequarre *et al.*, 2005). Nejednotná klasifikace rozměrů malých, středních a velkých folikulů způsobuje nepřehlednost výsledků jednotlivých laboratoří v problematice vývojové kompetence. I další autoři potvrdili vztah mezi velikostí folikulu a vývojovou kompetencí (Fair *et al.*, 1995; Hendriksen *et al.*, 2000).

4.4 Vliv estrálního cyklu a atrézie kumulárních buněk antrálních folikulů na vývojovou kompetenci

Estrální cyklus skotu je zahájen mezi osmým až dvanáctým měsícem po narození a trvá 18-24 dnů. Skládá se z luteální fáze (období 14-18 dnů, kdy se ze zbylých buněk folikulu po ovulaci oocyty vytvoří *corpus luteum*) a folikulární fáze (období 4-6 dnů, které následuje po zániku žlutého tělíska až do ovulace) (Forde *et al.*, 2011). Podobně jako u lidí, v průběhu bovinního estrálního cyklu dochází k ovulaci jednoho maturovaného oocyty. Během antrální fáze folikulogeneze se uskutečňuje výběr ovulujícího folikulu v sérii dvou nebo tří po sobě jdoucích vln. Jejich počet je pravděpodobně ovlivněn různými faktory, např. složením potravy (Murphy *et al.*, 1991) nebo dobou laktace (Lucy *et al.*, 1992). Zahájení a průběh folikulární vlny je řízeno hormony, které jsou produkovány hypofýzou a vaječníky (Roche, 1996). Každé folikulární vlně předchází nárůst FSH, který stimuluje růst folikulů. Bylo zjištěno, že během první vlny k ovulaci nedochází, ta nastává až během druhé nebo třetí vlny (Savio *et al.*, 1988; Sirois a Fortune, 1988) (viz Obrázek 4). Vlna začíná nábořem 20-24 folikulů (fáze růstu), které svůj růst zastavují až po dosažení velikosti přibližně 4 mm (Ginther *et al.*, 1996). Na granulózních buňkách folikulu se objevují FSHR (Lucy, 2007). Cyklus pokračuje výběrem jednoho dominantního folikulu o velikosti 8-9 mm, který se zvětšuje (fáze selekce/dominance). Během vývoje folikul začíná reagovat na LH pomocí LHR umístěných na tekálních a granulózních buňkách. Granulózní buňky subordinantních folikulů (potlačených v růstu) zanikají (Ginther *et al.*, 1996; Ginther, 2000). Během ovulační vlny v pre-ovulační fázi jeden dominantní folikul pokračuje v růstu přibližně do velikosti 20 mm a následně je, po nárůstu koncentrace LH v krvi a po expanzi kumulárního komplexu, oocyt-kumulární komplex (COC, *oocyte cumulus complex*) po prasknutí folikulu vypuzen z ovária (Ginther *et al.*, 1996). V neovulující vlně je zahájena u všech folikulů, včetně dominantního, apoptóza a jejich degradace.

Na konci 20. století se laboratoře zabývaly vlivem jednotlivých fází estrálního cyklu na vývojovou kompetenci a shodně prokázaly, že bylo získáno nižší procento životaschopných blastocyst z růstové fáze první folikulární vlny estrálního cyklu oproti ostatním fázím cyklu (Salamone *et al.*, 1999; Hagemann *et al.*, 1999; Machatkova *et al.*, 2004). Dominantní fáze snižuje vývojovou kompetenci oocytů izolovaných ze subordinantních folikulů (Hagemann, 1999). Další studie prokázala, že oocyty izolované z folikulů střední velikosti (6-10 mm) během růstové fáze dosahovaly stádia

Obrázek 4: Folikulární vlny během estrálního cyklu skotu



Převzato z (Sirard *et al.*, 2006) a upraveno. Na obrázku jsou tři vlny FSH. Tečkovaná kolečka zobrazují atretické folikuly, plná šedá kolečka znamenají folikuly bez atrézie, sytost výplně se zvyšuje s mírou diferencovanosti folikulů.

blastocysty v 36 %. Naproti tomu oocyty získané ze stejně velkých folikulů po výběru dvou dominantních folikulů dosahovaly 27,6 %. U malých (2-5 mm) subordinantních folikulů se snížil počet blastocyst v dominantní fázi o 13,7 % (Machatkova *et al.*, 2004). Tyto parametry byly zkoumány z hlediska procentuální úspěšnosti prvního dělení po oplození a vývoje do stádia blastocysty (Nemcova *et al.*, 2006). V práci Nemcova *et al.* (2006) analyzovali mRNA konexinu 43. Protein je součástí děrných spojů, které jsou odpovědné za mezibuněčnou komunikaci. U embryí pocházejících z vývojově kompetentních oocytů ve fázi růstu byla zvýšená hladina transkriptu oproti embryím pocházejícím z oocytů s nižší vývojovou kompetencí získaných z folikulů ve fázi dominance. Hladina konexinu 43 mRNA koreluje s intervalem zrání a kvalitou oocytu (Nemcova *et al.*, 2006).

Atrézie je běžnou součástí vývoje folikulu během estrálního cyklu. Bylo prokázáno, že až 85 % folikulů nalezených ve vaječníku během jakékoliv fáze estrálního cyklu je atretických (Blondin *et al.*, 1996).

Somatické antrální buňky jsou odstraňovány programovanou buněčnou smrtí. Atrézie folikulu začíná apoptózou buněk stěnové granulózy. Nakonec dochází k narušení kumulárních buněk obklopujících oocyt (Blondin a Sirard, 1995; Zeuner *et al.*, 2003). Je zajímavé, že oocyty izolované z folikulů s mírně narušenou vnější vrstvou CC dosahují

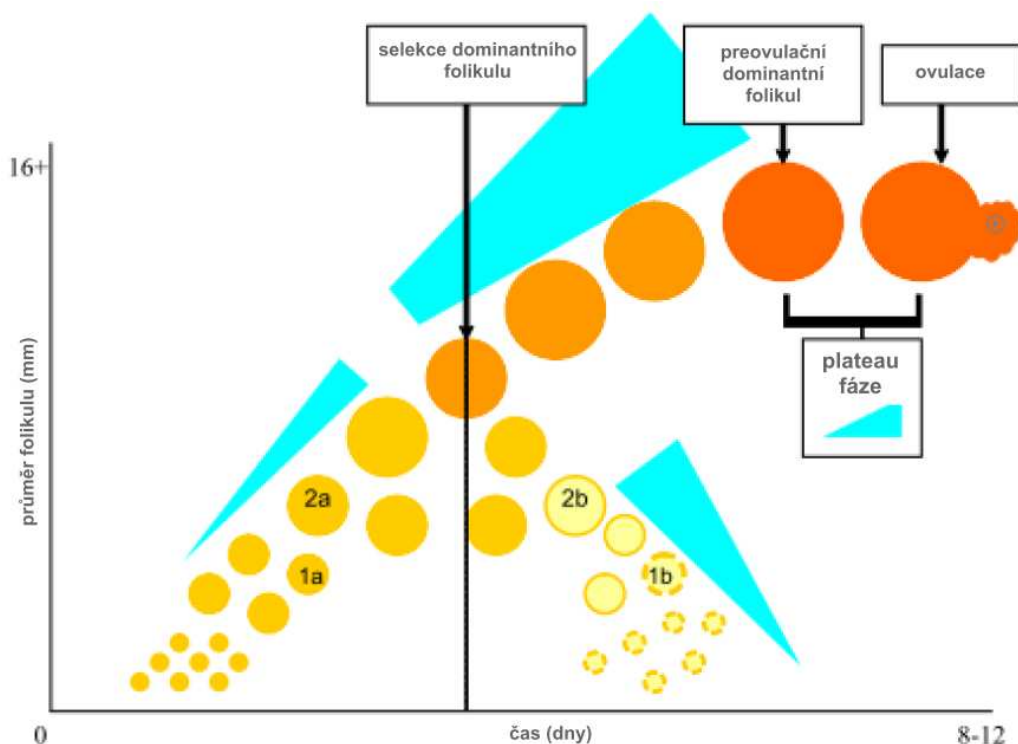
častěji stádia blastocysty v porovnání s oocyty bez známek atrézie CC (Blondin a Sirard, 1995; Boni *et al.*, 2002; Zeuner *et al.*, 2003). Předpokládá se, že vliv mírné atrézie na oocyt kumulární buňky je velmi podobný preovulačním podmínkám, které vylepšují viabilitu oocyty. Během časně fáze atrézie po rozvolnění degradovaných kumulárních buněk dochází jako při expanzi kumulárních buněk během maturace ke ztrátě komunikace s buňkami stěnové granulózy (Blondin a Sirard, 1995).

Ve studii zabývající se apoptózou kumulárních buněk oocytů bylo dokázáno, že procentuální zastoupení apoptotických kumulárních buněk bylo nižší u COC, v nichž oocyt měří v průměru 100-120 μm oproti skupinám s oocyty měřícími méně než 100 μm a více než 120 μm (100 %; 58,62 %; 80,33 %) (Anguita *et al.*, 2007). Doba, která uplynula od nástupu dominance, negativně koreluje s atrézií a kvalitou subordinatních folikulů. V počátečním stádiu dominance mají oocyt ze subordinatních folikulů vyšší vývojový potenciál. Těsně před ovulací dominantního folikulu je schopnost vývoje subordinatních folikulů snížena v důsledku pokročilé atrézie (viz Obrázek 5) (Vassena *et al.*, 2003; Sirard, 2011). Další studie pomocí SSH a qRT-PCR odhalila rozdílně exprimované geny (např. Inhibin A) granulózních buněk dominantního a subordinatního folikulu, které by mohly sloužit jako molekulární markery pro odlišení dominantních a subordinatních folikulů (Sisco *et al.*, 2003).

Stupeň atrézie CC ovlivňuje kvalitu mitochondrií v oocyty. Pro hodnocení kvality se měří mitochondriální membránový potenciál (Romek *et al.*, 2011) nebo aktivita enzymů oxidativní fosforylace (Torner *et al.*, 2004). Mitochondrie jsou barveny např. *MitoTracker Orange* nebo JC-1 (*tetraethyl benzimidazolylcarbocyanine iodide*). Tyto fluorescenční barvy se váží na membrány mitochondrií, na kterých probíhá dýchání (respirace). Následně je pomocí epifluorescenčního mikroskopu změřena intenzita fluorescence obarvených mitochondrií. Jejich distribuce a intenzita fluorescence odráží aktivitu mitochondrií (Torner *et al.*, 2004; Tarazona *et al.*, 2006). U nematurovaných oocytů izolovaných z malých folikulů (2-5 mm) s mírnou atrézií CC je aktivita mitochondrií nižší oproti oocytům izolovaným z malých folikulů s CC bez známek atrézie. Po maturaci se aktivita mitochondrií zvyšuje u oocytů izolovaných z folikulů střední velikosti (6-10 mm) i oocytů z malých folikulů (2-5 mm). Nejvyšší nárůst mitochondriální aktivity po maturaci dosahují oocyt z malých folikulů s mírnou atrézií CC. Během maturace se ATP v oocyty zvyšuje ve všech kategoriích COC. Nejvyšší nárůst ATP byl detekován v oocytech izolovaných z malých i velkých folikulů s mírnou atrézií CC.

Kvalitnější mitochondriální aparát mají maturované oocyty bez atrezie CC izolované z folikulů středně velkých a dále oocyty s mírnou atrezií CC izolované z malých folikulů (Machatkova *et al.*, 2012). U prasete bylo prokázáno spojení mezi zvýšenou mitochondriální aktivitou a lepší vývojovou schopností oocyty, určené na základě metody BCB (Egerszegi *et al.*, 2010). U skotu bylo zjištěno, že embrya, která obsahovala menší množství ATP, se vyvíjela pomaleji do blastocysty a jejich buňky byly menší ve srovnání s embryi, která měla více ATP (Stojkovic *et al.*, 2001). Při studii vlivu apoptotických buněk stěnové granulózy a velikosti folikulu na vývojovou kompetenci bylo dokázáno, že hustota plovoucích apoptotických buněk stěnové granulózy ve folikulární tekutině koreluje s vývojovým potenciálem oocyty (Feng *et al.*, 2007). Pro stanovení vlivu apoptózy granulózních buněk na vývojovou kompetenci autoři použili WID kultivační systém (*well in drop*), ve kterém je oocyt/embryo kultivováno v samostatné kapce média. Tato metoda umožňuje sledovat vývoj jednoho určitého oocyty až po embryo (Feng *et al.*, 2007).

Obrázek 5: Vývojová kompetence a atrezie folikulu



Převzato z (Hennet a Combelles, 2012) a upraveno. Modrá plocha ukazuje vývojovou schopnost oocytů během folikulární vlny. Jakmile je stanoven dominantní folikul, nevybrané folikuly 1b obsahují oocyty s nižší vývojovou kompetencí ve srovnání se stejně velkými folikuly získanými, když dominantní folikul ještě nebyl vybrán 1a. Oocyty izolované z časně atretických folikulů 2b mají větší vývojový potenciál než neatretické 2a.

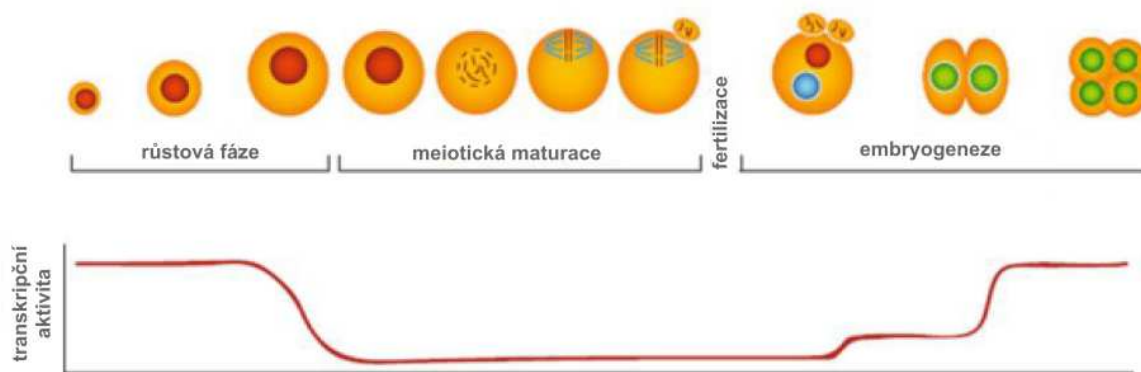
5 Transkripční aktivita oocyty během maturace a transkripční aktivita embrya během časného vývoje

Rostoucí oocyt v časném sekundárním folikulu je transkripčně aktivní, což dokládá syntéza heterogenní jaderné RNA (hnRNA, *heterogeneous nuclear RNA*) a rRNA (Fair *et al.*, 1997; Hyttel *et al.*, 1997). Oocyt během růstové fáze akumuluje hlavně mRNA a proteiny důležité pro dokončení meiózy a oplození i pro časná embryonální dělení. Přepis mRNA a zpracování transkriptu pokračuje, dokud bovinní oocyt nenaroste do průměru 110-120 μm a folikul v tu dobu měří 3 mm (Fair *et al.*, 1995; Hyttel *et al.*, 1997). To znamená, že s nástupem GVBD transkripce se snižuje na hranici detekce. V MII oocyty už není detekovatelná (Tomek *et al.*, 2002) (viz Obrázek 6). Počátek GVBD je doprovázen nejen zvýšenou translací, ale také cytoplazmatickou polyadenylací (Bachvarova, 1992). Mediátorová RNA oocyty je během maturace uchována, translatována nebo degradována. Podobně je tomu po oplození, protože počátek časného embryonálního vývoje je řízen mRNA maternálního původu (Meirelles *et al.*, 2004), tj. veškerou mRNA nasyntetizovanou z mateřského genomu během růstové fáze oocyty. Ochrana před ribonukleázami je zajištěna vazbou proteinu na mRNA, za tvorby ribonukleoproteinových partikulách (Darnbrough a Ford, 1981). U drápatky se uchování mRNA účastní rodina proteinů označovaných jako maskiny (Bouvet a Wolffe, 1994). Tyto proteiny dokáží asociovat se sekvencí na 3' UTR mRNA a brání tak degradaci i případné translaci (Richter, 2007). Translace některých mRNA v cytoplazmě je spojena s jejich polyadenylací. Zvýšení translace mRNA souvisí s prodlužováním 3' polyA konce myších oocytů. Za stabilní je považována mRNA s více než 150 nukleotidy v polyA konci (Bachvarova a De Leon 1980; Paynton a Bachvarova 1994). Inhibice translace je spojena se zkracováním nebo přesunem těchto koncových úprav (Paynton a Bachvarova, 1994). K cílené degradaci mRNA při přechodu z maternálního na embryonální genom jsou využívány krátké nekódující jednořetězcové RNA vážící se na nepřekládané úseky transkriptů. Brání translaci nebo přispívají k deadenylaci, a tím k následné degradaci cílených mRNA. Degradace maternálních RNA vrcholí kolem období aktivace embryonálního genomu (EGA, *embryonic genome activation*). U myši vymizí během vývoje do 2-buněčného stádia až 90 % oocytárních transkriptů (Hamatani *et al.*, 2004).

Pro časný embryonální vývoj po fertilizaci oocyty je klíčová EGA, která je druhově specifická (Kanka *et al.*, 2003). EGA nastává ve dvou stádiích. Podle Memili a First (1998) začíná bovinní embryo svoji vlastní transkripci již v zygotě, v prvním cyklu rýhování.

Výsledky mikročipové analýzy prokázaly, že k minoritní genomové aktivaci (*minor genome activation*) dochází mezi stádii 2-4 buněk (Kues et al., 2008). Transkripce většiny genů je zahájena v pozdním 8-buněčném stádiu (*major genome activation*) (Barnes a First, 1991).

Obrázek 6: Transkripční aktivita během vývoje oocyty a po oplození



Převzato z (Clarke, 2012) a upraveno.

Pro analýzu genové exprese oocyty a v preimplantačním vývoji se používá specifický inhibitor transkripce – α -amanitin. Slouží k potlačení syntézy mRNA, kterou katalyzuje RNA polymeráza II (Kidder *et al.*, 1985). V oocytech ošetřených α -amanitinem po 24 h maturace jednotlivé specifické transkripty vykazují podobný transkripční profil jako tytéž transkripty z nematurovaných oocytů (Mamo *et al.*, 2011). Pokud je α -amanitin přidán do kultivačního média ve 4-buněčném stádiu, dochází k úplnému zastavení vývoje ve stádiu moruly (Liu a Foote 1997).

Expres jednotlivých genů vypovídá o kvalitě oocyty. Dosud není známá kompletní skupina specifických genů, včetně načasování jejich exprese, které jsou potřebné pro získání vývojové kompetence. Naprostá většina našich znalostí ohledně genů, které jsou potřebné v průběhu normálního vývoje oocyty, byla získána v poslední době využitím mikročipů. Přestože je mikročipová technologie dostupná, provedení experimentu, analýza dat a jejich zpracování je poměrně finančně nákladné. V případě analýzy oocyty je nutná příprava směsných vzorků, protože jeden oocyt obsahuje malé množství (přibližně 2,4 ng) celkové RNA (Bilodeau-Goeseels a Schultz 1997). Množství hybridizované RNA na jeden mikročip je obvykle 2,5-10 μ g (Subkhankulova a Livesey, 2006). Mikročipy se používají ke sledování mnoha genů najednou v určitých experimentálních stádiích nebo podmínkách např. porovnání diferencielně exprimovaných

genů mezi MII a GV (Fair *et al.*, 2007), oocytů izolovaných z malých a velkých antrálních folikulů (Lequarre *et al.*, 2005) nebo v oocytech za *in vivo* a *in vitro* podmínek (Katz-Jaffe *et al.*, 2009; Mamo *et al.*, 2011).

Mikročipová analýza slouží také při hledání evolučně konzervovaných genů. Pro historicky první experiment skotu byla použita heterologní hybridizace radioaktivně značené mRNA oocytu a cDNA s lidskými sekvencemi na mikročipu. Bylo identifikováno 300 transkriptů, mezi 70 rozdílně exprimovanými geny byly geny vztahující se svou funkcí k transkripci, regulaci buněčného cyklu nebo apoptóze. Tato studie přispěla k poodhalení problematiky evolučně konzervovaných genů (Dalbiès-Tran a Mermillod, 2003).

Heterologní hybridizace mezi 1 176 lidskými sekvencemi a celkovou RNA izolovanou z bovinních oocytů malých folikulů (menších než 4 mm) a velkých folikulů (větších než 6 mm) byla provedena na nylonové membráně. Žádný z detekovaných 358 transkriptů nebyl při porovnání oocytů z malých a velkých folikulů zvýšen více než 3×. Nevýhodou byl nízký počet úseků DNA komplementárních k detekované sekvenci, proto nemusela být existence některých významných genů odhalena (Lequarre *et al.*, 2005). Postupem času jsou mikročipy čím dál častěji vyráběny na zakázku komerčními firmami (Affymetrix, Agilent, Illumina). Pro podrobnější studium bylo využito mikročipu Affymetrix GeneChip Bovine Genome Array, který obsahoval 23 tisíc sekvencí cDNA. Rozdílně exprimováno bylo 821 genů, z nichž bylo v MII stádiu 2× zvýšeno 209 transkriptů (Fair *et al.*, 2007). U maturovaných oocytů byly sníženy hladiny mRNA pro geny spojené s transkripcí, translací a aktivací mitogenem aktivujících protein kináz. Podobné výsledky byly získány u myších maturovaných oocytů (Cui *et al.*, 2007). U nematurovaných oocytů byly zvýšeny geny týkající se replikace, metabolismu aminokyselin a signalizace (Cui *et al.*, 2007). Další studie transkriptomu, ve které autoři použili stejný typ mikročipu s totožným množstvím cDNA úseků jako Fair *et al.* (2007), porovnávala *in vivo* a *in vitro* podmínky maturace (Katz-Jaffe *et al.*, 2009). Byly identifikovány 4 geny, které jsou součástí Krebsova cyklu, a 14 genů účastnících se oxidativní fosforylace. Úroveň mRNA všech těchto genů byla snížena v *in vitro* podmínkách maturace na rozdíl od *in vivo* podmínek. Z toho vyplývá, že za *in vitro* podmínek je k aktivaci metabolismu potřeba více energie. Komunikace oocytu a CC je podstatná pro kvalitní maturaci oocytu. Regassa *et al.* (2011) identifikovali poprvé transkripty, které jsou obsaženy pouze v CC nebo oocytu ve vývojovém stádiu MII nebo v GV. Navíc porovnávali expresi oocytů zbavených CC s oocyty obklopenými

kumulárními buňkami. Získaná data ukazují, že oocyty zbavené CC více exprimují geny týkající se transkripční a translační kontroly, zatímco v kumulárních buňkách se objevily geny zapojené do metabolismu sacharidů, proteinů a biologické syntézy steroidních hormonů.

Pomocí cDNA mikročipu od firmy Affymetrix, který obsahoval 24 072 úseků DNA, byly porovnány oocyty v MII stádiu, 8-buněčná embrya a 8-buněčná embrya inkubovaná v α -amanitinu. Bylo zjištěno, že geny zahrnuté v metabolismu nebo při metylaci DNA mají vyšší hladinu v MII stádiu, zatímco pro 8-buněčné stádium jsou podle analýzy klíčové geny regulující signalizaci a transkripci (Misirlioglu *et al.*, 2006). Oproti 8-buněčnému stádiu byla v MII oocyty úroveň mRNA zvýšena u 258 genů. Při porovnání MII oproti 8-buněčným embryím inkubovaným v α -amanitinu byla úroveň mRNA zvýšena u 148 genů.

Mamo *et al.* (2011) provedli obsáhlou studii transkriptomu nematurovaných oocytů a *in vitro* maturovaných oocytů. Pro srovnání výše zmíněných kategorií oocytů bylo použito stejného typu mikročipu jako Misirlioglu *et al.* (2006). Anotováno bylo 8 489 transkriptů, rozdílně exprimováno 2 117. Skupina čítající 1 528 genů vykazovala zvýšenou úroveň mRNA v nematurovaných oocytech, z nich 25 bylo ověřeno pomocí qRT-PCR. Naměřená úroveň mRNA odpovídala výsledkům mikročipu u 22 genů. Nematurované oocyty obsahovaly více transkriptu v případě genů regulujících metabolismus a intracelulární transport, podobně jako v publikaci Katz-Jaffe *et al.* (2009), zatímco v maturovaných oocytech byly více exprimovány geny řídící buněčnou signalizaci a zajišťující homeostázi.

6 Cíle práce

Cíle diplomové práce byly stanoveny následovně:

1. Metodou qRT-PCR ověřit zvýšení hladiny mRNA po maturaci u genů – lumikanu (*LUM*) a staniokalcinu 1 (*STC1*), které byly navrženy jako ukazatele kvality maturace podle výsledků publikace Mamo *et al.* (2011).
2. Vybrat kandidátní geny z mikročipu, který porovnával genovou expresi u oocytů ze středně velkých folikulů (6-10 mm s vysokou meiotickou kompetencí) oproti oocytům z malých folikulů (2-5 mm s nízkou meiotickou kompetencí).
 - 2.1. Ověřit exprese vybraných genů na základě výsledků z mikročipu.
 - 2.2. Charakterizovat profily exprese vybraných genů pomocí qRT-PCR během maturace.
 - 2.3. Stanovit profil exprese vybraných genů během časného embryonálního vývoje.

7 Metody

Pokud není uvedeno jinak, chemikálie použité během pokusů pocházejí od společnosti Sigma (Sigma-Aldrich, Praha, ČR). Plastik pro kultivaci oocytů a embryí, zejména čtyřjamkové destičky, pochází od firmy Nunclon (Nunc, Roskilde, Dánsko).

7.1 Získání oocytů z malých a středně velkých folikulů – aspirace pomocí vakua, totální disekce

Ovária skotu byla z jatek do laboratoře dopravena v termosce, každý pár byl speciálně zabalen ve tkanině. Ovária byla rozbalena a položena na předeřátou ploténku (o teplotě 27-30 °C). Selektce ovárií probíhala na základě velikosti, barvy, tvaru a fáze vývoje folikulu. Každý pár ovárií byl vyhodnocen samostatně. Selekcí byla vyloučena cystózní a zvazivovatělá ovária, menší a ojedinělé cysty byly propíchnuty. Vybírány byly malé folikuly o rozměru 2-5 mm. Ovária obsahující větší počet malých folikulů nejsou zvazivovatělá a později byla zpracována pomocí metody totální disekce. Středně velké folikuly byly získány z ovárií, ve kterých se kromě malých folikulů a jednoho či dvou dominantních folikulů nacházel vyšší počet folikulů větších než 10 mm, které neobsahovaly v kortexu hemoragické *corpus luteum*. Ovária se středně velkými folikuly byla zpracována aspirací pomocí vakua, poté se vaječník se zbývajících folikulů rozřezal.

Nejprve byla ovária roztríděna a opláchnuta fyziologickým roztokem (0,90 % NaCl), dále promyta destilovanou vodou a odložena do kádinky s fyziologickým roztokem. Metoda totální disekce kortexu spočívá v úplném rozvrásnění vnější vrstvy ovária pomocí řezacího nástroje. Výhodou oproti aspiraci je vyšší výtěžnost oocytů. Ovária byla umístěna na pracovní Petriho misku (o průměru 10 cm), která obsahovala 5 ml média TCM-199 obohaceného o 50 U/ml penicilinu, 50 µg/ml streptomycinu, 5 % estrálního bovinního séra (ECS; Sevapharma, Praha, ČR) a 20 mM HEPESu. Jejich korová vrstva byla rozřezána, aby byl otevřen co největší počet folikulů. Následně bylo každé ovárium opláchnuto 2 ml fosfátového pufru (PBS), vzniklá suspenze se z misky přelila na připravená sítko, která byla následně promyta fyziologickým roztokem. Dolní uhlíkaté sítko zachytilo oocyt-kumulární komplexy a zbytky granulózních a kumulárních buněk. Oocyty byly ze sítka opláchnuty do Petriho misky (o průměru 10 cm) s médiem TCM-199

obohaceným o 50 U/ml penicilinu, 50 µg/ml streptomycinu, 5 % estrálního bovinního séra a 20 mM HEPESu.

Výběr probíhal pod binolupou při 25 násobném zvětšení. Po odstranění kumulárních buněk byly nematurované oocyty rozděleny po dvaceti v dělených Petriho miskách. Pro izolaci RNA byly vybírány a po pěti přeneseny do mikrozkušavky o objemu 0,2 ml. Přebytké TCM-199 médium bylo odsáto. Oocyty byly zmrazeny a uchovány při teplotě -80 °C.

Oocyty s kumulárními buňkami byly maturovány v TCM-199 médiu obohaceném o 20 mM pyruvátu sodného, 50 U/ml penicilinu, 50 µg/ml streptomycinu, 5 % estrálního bovinního séra a 15 IU/ml gonadotropinů (P.G. 600; Intervet, Boxmeer, Nizozemsko). Selektce maturovaných i nematurovaných oocytů probíhala na základě stavu kumulárních buněk a cytoplazmy. Oocyty měly ukončený růst a obsahovaly vícevrstevný kumulus.

Klasifikace oocytů:

- M1** - oocyty pocházející ze středně velkých folikulů měly čistou homogenní cytoplazmu a kompaktní vícevrstevný kumulus.
- S1** - oocyty pocházející z malých folikulů měly čistou homogenní cytoplazmu a kompaktní vícevrstevný kumulus.
- M3** - oocyty pocházející ze středně velkých folikulů měly mírně granulovanou cytoplazmu, vnější vrstva kumulu byla mírně expandována, přítomny známky atrézie kumulárních buněk.
- S3** - oocyty pocházející z malých folikulů měly mírně granulovanou cytoplazmu, vnější vrstva kumulu byla mírně expandována, přítomny známky atrézie kumulárních buněk.

Výběr oocytů všech kategorií byl proveden ve spolupráci s laboratoří Výzkumného ústavu veterinárního lékařství v Brně (VÚVEL v.v.i), kterou jsem navštívila a s metodou se tam osobně seznámila.

7.2 Získání oocytů z antrálních folikulů pro embryonální vývoj – vypichování, vystříhávání

Ovária skotu byla dopravena do laboratoře v termosce při teplotě 38 °C. Způsob výběru metody izolace byl závislý na množství materiálu. Při počtu více než 50 ks byly oocyty vypichovány z folikulů o velikosti 6-10 mm pomocí jehly. Za pomoci injekční

stříkačky s jehlou 20G byla odsáta folikulární tekutina s COC do zkumavky o objemu 15 ml. Po sedimentaci byly buňky celkem třikrát po sobě promyty modifikovaným izolačním Parkerovým médiem (MPM/PVA; složení viz Příloha 1, MPM/PVA izolační médium) s PBS (v poměru 1:5). Poté byly oocyty přeneseny na Petriho misku, kde byly v pracovním MPM vybírány oocyty vhodné pro IVP.

V případě, že bylo ovárií méně než 50 ks, byly oocyty izolovány metodou vystřihávání. Oproti metodě vypichování lze dosáhnout vyšší výtěžnosti. Nevýhodou je naopak pracnost a s ní spojená časová náročnost metody. Pro izolaci RNA byly vybírány folikuly o rozměru 6-10 mm. Ty byly nejprve obstříhány a poté odloženy do Petriho misky s fyziologickým roztokem. Posléze byly folikuly třikrát po sobě promyty fyziologickým roztokem. Folikuly byly přeneseny po dvaceti kusech do izolačního MPM/PVA. Folikul byl přidržet pinzetou, jehlou byla narušena stěna folikulu a obsah byl vytlačen ven do izolačního MPM/PVA.

Izolace oocytů byla provedena v Petriho misce (o průměru 6 cm) v izolačním MPM/PVA. Oocyty určené pro izolaci RNA byly z izolačního MPM/PVA po pěti vybírány do mikrozkušavky, přebytečné médium bylo odsáto, oocyty zamrazeny a uchovány při -80 °C. Pro produkci blastocyst byly maturovány pouze oocyty izolované z folikulů o velikosti 6-10 mm.

7.3 *In vitro* kultivace oocytů, příprava spermií pro oplození, oplození, kultivace embryí

1. den

Selektované oocyty byly z izolačního MPM/PVA přeneseny ke kultivaci do čtyřjamkové destičky se zracím kultivačním MPM (složení viz Příloha 1, MPM zrací kultivační médium). Maturace probíhala po dobu 24 h v termostatu za podmínek 5 % CO₂ při teplotě 39 °C.

2. den

Po 21 h od izolace oocytů z folikulů byla zahájena příprava spermií pro následné oplození. Předem byla nachystána čtyřjamková destička, do které bylo odměřeno 0,5 ml fertilizačního média (složení viz Příloha 1, FM fertilizační médium). Pejetky se spermatem jsou uchovávány v tekutém dusíku. Zamražené pejetky byly rozmrazeny vhozením do vody o teplotě 37 °C na 10 s. Spermie byly vytlačeny do zkumavky o objemu 0,5 ml. Dále bylo připraveno pět zkumavek naplněných 1,5 ml teplého fertilizačního média

(39 °C, nahřáto v inkubátoru) a pro selekci motilních spermií s neporušenou cytoplazmatickou membránou a intaktním akrozómem byla provedena metoda „swim-up“. Do každé zkumavky s fertilizačním médiem bylo přidáno sperma takovým způsobem, aby se usadilo na dně. Následně byly zkumavky umístěny do termostatu (39 °C), kde byly ponechány přibližně jednu hodinu. Poté byly odsáty vrchní dvě třetiny média, kde se nacházely pouze motilní spermie, a poté byly umístěny do 15 ml zkumavky, ve které se stočily při 1000× g po dobu pěti minut. Pomocí odsávačky byl odebrán supernatant tak, aby zbyl jen pelet s 1 ml média, který byl následně resuspendován. Pro výpočet optimální oplozovací dávky v 0,5 ml zkumavce bylo umístěno 5 µl z roztřepaných pelet (na koncentraci 5×10^5 spermií/1 ml fertilizačního MPM) ke 250 µl filtrované sterilní destilované vody. Byla připravena Bürgerova komůrka. 10 µl suspenze spermií ve vodě bylo přeneseno ze zkumavky tak, aby se dokonale a rovnoměrně překrylo celé počítací pole. Spermie byly počítány pod objektivem se 200× zvětšením, podle níže uvedeného vzorce.

$$4 \times 20 \text{ čtverců} = \text{výsledný počet spermií z komůrky (4 \times 1,25)} = A$$

$$(A/6) \times 100 = B \text{ (počet spermií v tis. v 10 µl)}$$

$$\text{dávka na oplození} = 5 \times 10^6 / B$$

Potřebné množství spermií z 0,5 ml zkumavky (1,5 „oplozovací dávky“) bylo přidáno do předem připravených čtyřjamkových destiček s FM kapacitačním médiem (složení viz Příloha 1, FM kapacitační médium). Pohyb spermií byl zkontrolován pod mikroskopem a čtyřjamkové destičky uloženy do termostatu o teplotě 39 °C na 1,5 hodiny. Posléze byly oocyty s kumulem propláchnuty ve fertilizačním médiu a přidány do čtyřjamkové destičky se spermii. Destička byla uložena zpět do termostatu na 24 h za podmínek 39 °C a atmosféře o složení 5 % CO₂, 5 % O₂ a 90 % N₂, kde proběhlo oplození.

3. den

Zygoty byly mechanicky zbaveny kumulárních buněk. Embrya byla přenesena pomocí pipetky do MEDICULT Embryo Assist média (Origio, Jyllinge, Dánsko) doplněného o 15% OBS pod kapku minerálního oleje a ponechána vyvíjet se. Do destičky bylo umístěno 25 zygot/25 µl média v 39 °C a atmosféře 5 % CO₂, 7 % O₂, 88 % N₂. V pozdní fázi vývoje 16-buněčného stádia bylo médium vyměněno za MEDICULT Blast Assist (Origio, Jyllinge, Dánsko) doplněné o 15% OBS, kultivační podmínky zůstaly

stejně. Embrya byla fixována 32 h po fertilizaci (hpf; jako 2-buněčné stádium), 44 hpf (4-buněčné stádium), 56 hpf (časné 8-buněčné stádium), 92 hpf (pozdní 8-buněčné stádium), 120 hpf (morula) a 156 hpf (blastocysta).

7.4 Ověření zahájení transkripce pomocí α -amanitinu

Pro evaluaci minoritní aktivace transkripce z embryonálního genomu bylo do kultivačního média MEDICULT Embryo Assist přidáno 100 μ g/ml α -amanitinu ve stádiu pozdního 1-buněčného embrya. Embrya byla kultivována až do 4-buněčného stádia (44 hpf), propláchnuta PBS, zamražena po pěti kusech a uchována v mikrozkuhavce o objemu 0,2 ml při teplotě -80 °C. Další skupina embryí pro evaluaci majoritní aktivace transkripce z embryonálního genomu byla kultivována s přidavkem 100 μ g/ml α -amanitinu od 4-buněčného stádia až do pozdního 8-buněčného stádia. Zamražena byla 72 hpf (časné 8-buněčné stádium) a 92 hpf (pozdní 8-buněčné stádium). Kontrolní embrya byla po oplození kultivována v MEDICULT Embryo Assist bez přidavku α -amanitinu a po opláchnutí v PBS zamražena ve stejných intervalech, po pěti kusech a uchována v mikrozkuhavce o objemu 0,2 ml při teplotě -80 °C.

7.5 Izolace mediátorové RNA/celkové RNA

Z oocytů a embryí byla mRNA izolována pomocí Dynabeads mRNA DIRECT MicroKit (Invitrogen, Praha, ČR) podle instrukcí výrobce. Pokud není uvedeno jinak, použité chemikálie jsou součástí tohoto kitu. Izolace pomocí magnetických kuliček využívá přitažlivosti mezi kuličkou a magnetem stojánku. Na kuličkách jsou navázány Oligo(dT). Tato sekvence umožňuje izolovat polyadenylovanou RNA. Výhodou metody je poměrně vysoký výtěžek a možnost izolovat z minimálního množství výchozího materiálu. Nejprve byla provedena lýze přidáním 100 μ l lyzačního pufru do zkumavky se vzorkem oocytů/embryí. Lýze trvala přibližně 30 minut, vzorek byl průběžně kontrolován pod binolupou až do rozpadu oocytů/embryí. Současně proběhla příprava magnetických kuliček. Do 0,5 ml zkumavky bylo ze zásobního roztoku přeneseno 20 μ l kuliček na vzorek. Celkové množství magnetických kuliček bylo dvakrát promyto lyzačním pufrem a rozděleno po 20 μ l do 0,5 ml izolačních zkumavek. Následně byla ze zásobního roztoku lyzačním pufrem naředěna mRNA pro luciferázu (Sigma-Aldrich, Praha, ČR) a přidána v poměru 1 pg na jeden oocyt nebo embryo. Luciferáza slouží jako kontrola výtěžku izolace a současně lze použít jako externí standard. Lyzát byl přidán

do izolační zkumavky již obsahující 20 μ l magnetických kuliček a obsah byl promíchán. Následovala hybridizace RNA a Oligo(dT), vzorky se nechávaly rotovat při pokojové teplotě po dobu 5 minut. Zkumavky se vzorky byly přeneseny na magnet a supernatant byl odebrán. Dalším krokem bylo promývání, na které bylo použito 100 μ l promývacího pufru A a poté třikrát po sobě 100 μ l promývacího pufru B. Dále byly kuličky resuspendovány ve 100 μ l Tris(hydroxymetyl)aminomethan hydrochlorid (TrisHCl), vzorky byly přeneseny na magnet a supernatant byl odebrán. Následovala eluce. Do každé zkumavky byl přidán TrisHCl (4 μ l na oocyt nebo embryo) a zkumavky byly inkubovány 2 minuty při 85 °C. Poté byla zkumavka přenesena na magnet, supernatant odebrán do čisté zkumavky a co nejrychleji umístěn na led. Izolovaná RNA byla uchována při teplotě -80 °C.

Z fibroblastů byla celková RNA izolována pomocí RneasyPlusMini Kit (Qiagen, Hilden, Německo). Fibroblasty byly využity jako pozitivní kontrola během RT-PCR a qRT-PCR. Izolace proběhla podle návodu výrobce. K buňkám lyzovaným v 350 μ l RTL pufru byl přidán 2-merkaptoethanol (1 μ l/100 μ l RTL pufru) a 350 μ l 70% ethanolu. Po důkladném promíchání pipetou bylo 700 μ l přeneseno na speciální Rneasy spin kolonku doplněnou o sběrnou zkumavku a centrifugováno 10000 $\times$ g po dobu 15 s. Zachycený materiál na filtru kolonky byl následně pročištěn 700 μ l RW1 pufru a opětovnou centrifugací (15 s/10 000 g). Poté byla vyměněna sběrná zkumavka a na filtr v kolonce bylo nanášeno 500 μ l roztoku RPE rozředěného 100% ethanolem v poměru 1:4 a opět centrifugováno (15 s/10 000 g). Poté, co byla odstraněna odpadní tekutina, byl krok s přidáním roztoku RPE opakován a následná centrifugace prodloužena na 2 minuty. Dále byla kolonka přenesena na sběrnou zkumavku (1,5 ml) a pomocí RNase-free vody (40 ml) určené speciálně k izolaci RNA byla centrifugací 10000 $\times$ g po dobu 1 minuty převedena buněčná RNA z filtru do sběrné zkumavky. Výsledná koncentrace RNA byla změřena na spektrofotometru NanoDrop ND-1000 (NanoDrop Technologies, Wilmington USA). Izolovaná RNA byla skladována při -80 °C.

7.6 Navržení primerů

V případě genů *ATP5C1*, *ATP5F1*, *BRD7*, *CAND1*, *GATA3(A,B)*, *LUM*, *MAP3K13*, *MTRF1L*, *MRPL47*, *MLF1IP*, *NGDN*, *PRPF18*, *STC1*, *TAF1A*, *TTK*, *UBL5* a *UBTF* bylo navržení vhodných primerů provedeno pomocí softwaru OLIGO6. Primery pro *LUM** a *STC1** byly ověřeny a převzaty z literatury. Sekvence primerů pro dané geny byla ověřena v programu NucleotideBLAST (BLAST) a oligosekvence byly syntetizovány

v komerční firmě (GENERI BIOTECH, Hradec Králové, ČR). Optimální teplota pro nasednutí primerů vybraných genů byla stanovena na základě (gradientové) kvalitativní RT-PCR.

Tabulka 1: Přehled použitých primerů

Gen	Sekvence 5'-3'	Délka produktu	T _m [°C]	GenBank
<i>ATP5C1</i>	F: GATGTGCTGCGGACTACCAG R: GCGGGTGCGATTGAA	152	60	NM_001075136.1
<i>ATP5F1</i>	F: AGAGGTGAAACAGGCGTC R: AGTAACCTCCAAGGCCATAGC	115	60	NM_001075136.1
<i>BRD7</i>	F: CGGTTGAAGTTTTTGACTC R: GACCCAAGAGACAGATCATGT	140	53	NM_001103260.2
<i>CAND1</i>	F: CGGTACTGCAGAGGTTGGAC R: CTCATGGCAGATCGCTTTAGT	124	55	NM_001101173
<i>GATA3(A)</i>	F: CCCGCAGGCGTTACACAGGT R: CCACCGGCTTCGGGTGCAAG	114	60	NM_001076804.1
<i>GATA3(B)</i>	F: CTACTATAAGCTGCACAAT R: TTTGGATTTGCTAGACAT	91	54	NM_001076804.1
<i>LUM*</i>	F: CGAAAGCAGGGTCAAGACAG R: TGATGACCTCCCATACAGTGC	158	60	NM_173934.1
<i>LUM</i>	F: CGAATACCTTGACTTGAG R: GTTGCTAATCTTGTTGTTG	100	60	NM_173934.1
<i>MLF1IP</i>	F: GGCAGCATATTTCTGTCTAA R: AAGCTGGAAGGCTAGATGA	110	55	XM_002698654.1
<i>MRPL47</i>	F: AGTGGCCTATACCTTGGTAC R: GGGCTTGCTTCTCAATTCT	134	49	NM_001076901.1
<i>MTRF1L</i>	F: CGGCTCCACTGGCTCGCTTAG R: AGCAAGGCCGCATCC	99	60	NM_001046378.1
<i>NGDN</i>	F: GGCGAAAACGAGCAAAC R: AGGTATCTTCTTCCGCTTCT	134	53	NM_001046459.1
<i>PRPF18</i>	F: GCCCCTTGGCCCATTTGGTGT R: AGGAAAGTGCTTCTGGCAAATGGTC	137	58	NM_001075323.1
<i>STC1*</i>	F: GTGACACAGATGGGATGTACGAC R: CGAATGGCCAGGAAGACC	142	60	NM_176669.1
<i>STC1</i>	F: CAAGCTGAACGTGTGCAGTG R: CACAGTCCAGTAGGCTTCGG	122	60	NM_176669.1
<i>TAF1A</i>	F: GGCAAAAAGCAATTGGAA R: TTTCTTCTTTAACGCTTGATG	133	48	NM_001045908.1
<i>TTK</i>	F: CTTCTGGCACATCCGTAT R: AGCTTTCAAAATGGAATTAGG	132	49	NM_001205913.1
<i>MAP3K13</i>	F: AACCTATTTCAAGTCTCAG R: CGAATAAGTTCTTCATCTAATC	108	54	NM_001101853
<i>UBTF</i>	F: CAGACCTAATCCAGAATG R: ACTTTGAGATACACCTTC	100	58	XM_002696042
<i>UBL5</i>	F: CGTATTGAAGAAGTGTA R: ATTCTGCTCTATTGGTAAT	105	54	NM_001037710

7.7 Kvalitativní RT-PCR

Kvalitativní RT-PCR sloužila k ověření specifity primerů a čistoty produktu. Pro nastavení optimální teploty nasednutí primerů byl použit QIAGEN One Step RT-PCR Kit (QIAGEN, Hilden, Německo), rozpětí gradientu jsme navrhli ± 5 °C od teploty nasednutí primerů vypočtené programem OLIGO6. Reakční podmínky byly stanoveny následovně – nejprve syntéza komplementární DNA (cDNA) pomocí reverzní transkripce (RT) při 50 °C po dobu 30 minut, predenaturace při 95 °C po dobu 15 minut, na kterou navázala vlastní PCR s opakováním 40 cyklů. V rámci vlastní PCR probíhaly denaturace při 95 °C po dobu 10 s, nasednutí primerů po dobu 15 s a extenze při 72 °C po dobu 15 s. Po ukončení cyklování bylo nastaveno chlazení reakce na 4 °C po dobu 15 minut. Reakce probíhala v termocykleru PTC-200 (MJ Research Inc., Watertown, USA). Reakční směs o celkovém objemu 12,5 μ l obsahovala QIAGEN pufr (1 $\times$), dNTPs mix (400 μ M každý), primer F (400 nM), primer R (400 nM), 5 IU inhibitoru RNáz RNasine (Promega, Madison, USA), QIAGEN One Step RT-PCR Enzyme Mix (0,5 μ l) a templátovou RNA izolovanou z bovinních fibroblastů (2,5 μ l o koncentraci 100 ng/ μ l).

7.8 Kvantitativní RT-PCR

Pro sledování míry exprese jednotlivých genů byla provedena jednokroková qRT-PCR na přístroji Rotor-Gene 3000 (Corbett Research, Mortlake, Austrálie) pomocí QIAGEN One Step RT-PCR Kit (QIAGEN). Reakční podmínky jsou podrobně popsány v kapitole „7.7 Kvalitativní RT-PCR“. Nasednutí primerů proběhlo při teplotách specifických pro jednotlivé geny (viz Tabulka 1).

Vzorky byly připravovány v duplikacích do čirých plastových mikrozkušavek pro RT-PCR. Složení reakční směsi bylo stejné, jako je uvedeno v kapitole 7.7, pouze byl přidán SybrGreen I (0,25 μ l z 1000 $\times$ naředěného zásobního roztoku; Molecular Probes, Eugene, USA). Specifické primery, které byly použity, jsou popsány v Tabulce 1.

Před přidáním mRNA k reakční směsi byly vzorky z oocytů/embryí naředěny H₂O bez nukleáz. Poté bylo do každé reakce přidáno 2,5 μ l mRNA, což je ekvivalent $\frac{1}{4}$ oocyty/embrya na reakci. Pro pozitivní kontrolu bylo využito bovinních fibroblastů, pro negativní kontrolu bylo použito 2,5 μ l dH₂O bez nukleáz. Naměřená data byla vyhodnocena a ověřena pomocí softwaru Internal RotorGene. Nejprve byla provedena analýza křivek tání za účelem ověření specifity konkrétního produktu. Relativní koncentrace vzorků byly vyhodnoceny na základě komparativní analýzy. V případě

charakterizace exprese oocyty bylo množství templátu vztahováno k S1GV, které bylo uvažováno jako 100 %. V případě ostatních genů u embryonální řady je relativní koncentrace vztažena k MII, které bylo bráno jako 100 %. Míra exprese každého vzorku byla normalizována k externímu standardu (luciferáza).

7.9 Elektroforéza

Ověření velikosti produktů po RT-PCR i qRT-PCR proběhlo pomocí agarózové elektroforézy na 1,5% gelu. Elektroforéza proběhla při 100 mV 1% TBE pufru. Jako detekční barvivo při následné vizualizaci produktu bylo použito ethidium bromidu (4 μ l/ 100 μ l gelu). Každý vzorek 10 μ l byl smíchán s 2 μ l LoadingDye (Fermentas, Vilnius, Litva) a následně nanesen do připravených jamek gelu. Vizualizace vzorku proběhlo pod UV zářením na přístroji MultiImage Light Cabinet se softwarem Chemilmager 4000i 3.3b (Alpha Innotech Corp., Leandro, USA).

7.10 Statistická analýza

Bylo zpracováno minimálně osm nezávislých biologických replik a to ve výše uvedených kategoriích oocytů. Byly zpracovány minimálně 4 nezávislé biologické repliky a to ve výše uvedených embryonálních stádiích. Získaná data byla analyzována pomocí programu GraphPad Prism 5 (San Diego, USA), (studentův t-test nebo ANOVA). Rozdíly byly považovány za signifikantní, pokud dosáhly $p \leq 0,05$.

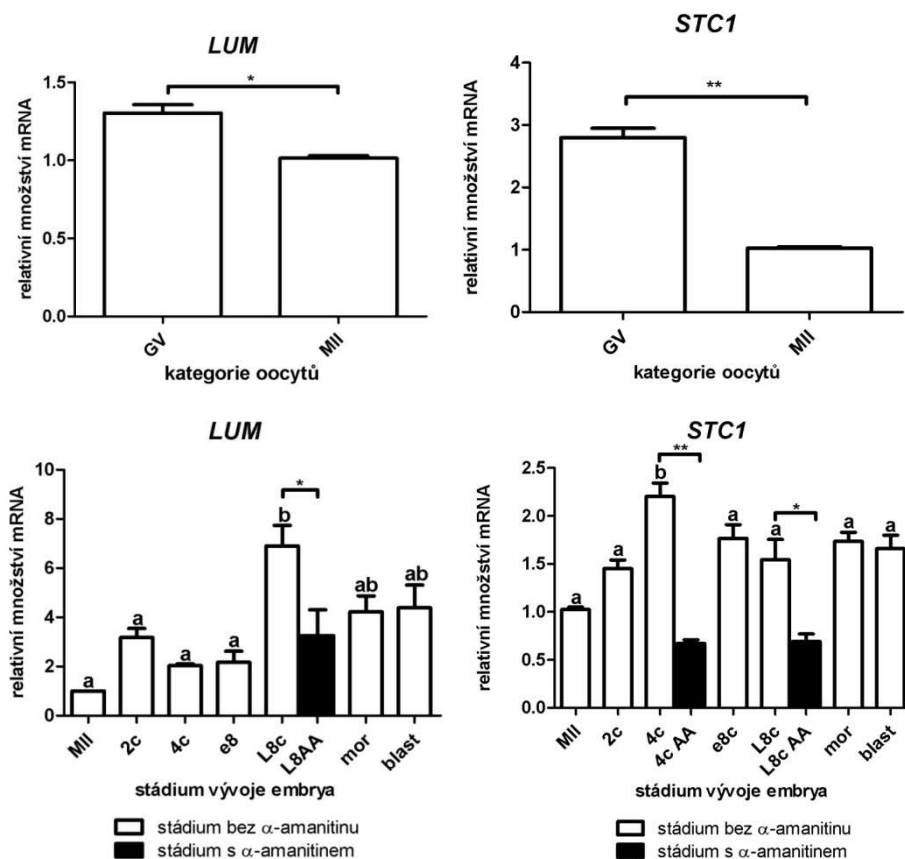
7.11 Příprava a analýza mikročipu

Experiment zahrnoval tři biologická opakování včetně biologického obráceného barvení (dye-swap). Z oocytů byla izolována poly(A) mRNA pomocí DynaBeads. Dále proběhla dvoukroková amplifikace pomocí AminoAllyl I, MessageAmp II a RNA Amplification Kit (Ambion). Sondy byly obarveny 2 μ g AlexaFluor 647 a 555 a RNA. Hybridizace probíhala na sklíčku Bovine Oligonucleotide Microarrays (Missouri Consortium) dle manuálu na přístroji Agilentu 17 hodin při 65 °C. Sklíčka se sondami byla skenována přístrojem Gene TACU T4 Microarray. Analýza obrazu a následná statistická analýza byly provedeny soukromou firmou (CENTRAL EUROPEAN BIOSYSTEM, Praha, ČR) na softwaru Agilent Feature Extraction 10.7.3.1 a statistické vyhodnocení pomocí softwaru R, balíčku LIMMA. Na přípravě mikročipu a vyhodnocení statistické části jsem se nepodílela, jelikož cílem diplomové práce je navázat na výsledky analýzy dat z mikročipu.

8 Výsledky

8.1 Stanovení hladiny mRNA lumikanu (*LUM*) a staniokalcinu 1 (*STC1*) pomocí qRT-PCR u nematurovaných/maturovaných oocytů a během embryonálního vývoje

Expres *LUM* a *STC1* byla zjišťována metodou qRT-PCR. Data byla stanovena komparativní analýzou, relativní množství transkriptu bylo vztaženo k MII stádiu, které je stanoveno jako 1. Množství transkriptu *LUM* naměřené ve stádiu GV bylo signifikantně zvýšené oproti MII. Hladina mRNA oproti MII signifikantně stoupá v pozdním 8-buněčném stádiu, zatímco v morule a blastocystě byla konstantní. V případě kultivace embryí s α -amanitinem došlo v pozdním 8-buněčném stádiu ke snížení *LUM*. Tento pokles signalizuje zahájení transkripce z embryonálního genomu. Naměřená hladina *STC1* v GV stádiu byla signifikantně zvýšená oproti MII. Během embryonálního vývoje došlo ve 4-buněčném stádiu k signifikantnímu zvýšení hladiny transkriptu oproti MII, dále do stádia blastocysty se hladina transkriptu výrazně neměnila.



Relativní kvantifikace mRNA *LUM* a *STC1* během časného embryonálního vývoje. GV – oocyt nematurovaný; MII – oocyt v metafázi II; 2c – 2-buněčné embryo; 4c – 4-buněčné embryo; 4cAA – α -amanitin 4-buněčné embryo; e8c – časně 8-buněčné embryo; L8c – pozdní 8-buněčné embryo; L8cAA – α -amanitin pozdní 8-buněčné embryo; mor – morula; blast – blastocysta. Rozdílné indexy nad grafy (a, b, c...) značí statisticky významné rozdíly u embryonálních stádií ($p < 0,05$). Hvězdičky značí statistické významné rozdíly u kategorie oocytů a embryí ošetřených v α -amanitinu – * = $p < 0,05$; ** = $p < 0,01$; *** = $p < 0,001$. • značí statisticky nesignifikantní rozdíly u embryonálních stádií ošetřených α -amanitinem. Expres byla normalizována k relativní koncentraci externího standardu (luciferáza 1 pg na oocyt/embryo), byly provedeny tři nezávislé qRT-PCR experimenty.

8.2 Výběr kandidátních genů z mikročipu, který porovnával expresi oocytů ze středně velkých folikulů (MF; 6-10 mm s vysokou meiotickou kompetencí) oproti oocytům z malých folikulů (SF; 2-5 mm s nízkou meiotickou kompetencí)

Za pomoci mikročipu Bovine Oligonucleotide Microarray (Missouri Consortium) byl analyzován transkriptom nematurovaných oocytů bez známek atrezie kumulárních buněk získaných z malých (2-5 mm; S1GV) a středně velkých (6-10 mm; M1GV) folikulů. Mikročip obsahoval 16 846 oligosekvencí. Rozdílně bylo exprimováno celkem 3 518 transkriptů. V případě oocytů izolovaných ze středně velkých folikulů oproti malým bylo zvýšeno 2 553 transkriptů a 965 transkriptů sníženo ($p < 0,05$). Výběr byl realizován po konzultaci s Ing. Lucií Němcovou, Ph.D., selekce kandidátních genů byla provedena nejprve na základě logaritmu násobku změny – logFC. Hranice pro výběr genů byla stanovena logFC=0,5, což odpovídá rozdílu v transkripci více než 1,4 $\times$. Nejvyšší zaznamenanou změnou mezi M1 (oocyty bez atretických kumulárních buněk izolované ze středně velkých folikulů) a S1 (oocyty bez atratických kumulárních buněk izolované z malých folikulů) subpopulacemi oocytů byl rozdíl 1,7 $\times$. Nejvyšší detekovanou změnou mezi S1 a M1 byl rozdíl 1,6 $\times$. Rozdílně exprimováno bylo 61 genů. Podle stanovené hranice bylo v oocytech z MF zvýšeno 50 genů (přehledně zobrazeno v Příloze 3), z nichž bylo vybráno pro další testování 8 genů. V oocytech izolovaných z MF bylo podle stanovené hranice 11 genů sníženo (viz Příloha 4) a z těch byly pro experiment vybrány 4. Tato skupina byla doplněna o další 3 geny, jejichž proteiny slouží jako strukturní bílkoviny mitochondrií nebo regulují transkripci mitochondriálních genů a translaci mRNA. Celkem bylo vybráno 15 genů, které jsou přehledně zobrazeny v Tabulce 2.

Tabulka 2: Testované geny vybrané z mikročipu

Název	Zkratka	LogFC
<i>Neuroguidin</i>	<i>NGDN</i>	0,67265
<i>Myeloid Leukemia Factor 1-interacting protein</i>	<i>MLF1IP</i>	0,64317
<i>Mitochondrialribosomal protein L47</i>	<i>MRPL47</i>	0,58118
<i>Bromodomain-containing protein 7</i>	<i>BRD7</i>	0,57491
<i>TATA box binding protein (TBP)-associated factor</i>	<i>TAF1A</i>	0,56873
<i>TTK protein kinase</i>	<i>TTK</i>	0,53385
<i>Cullin-associated NEDD8-dissociated 1</i>	<i>CAND1</i>	0,52949
<i>PRP18 pre-mRNA processing factor 18 homolog</i>	<i>PRPF18</i>	0,50004
<i>ATP synthase, mitochondrial Fo complex, subunit B1</i>	<i>ATP5F1</i>	0,33524
<i>ATP synthase, mitochondrial F1 complex, gamma</i>	<i>ATP5C1</i>	0,36520
<i>Mitochondrial translational release factor 1-like</i>	<i>MTRF1L</i>	0,30794
<i>GATA binding factor-3</i>	<i>GATA3</i>	-0,57993
<i>Mitogen-activated protein kinasekinase kinase 13</i>	<i>MAP3K13</i>	-0,56290
<i>Ubiquitin-like 5</i>	<i>UBL5</i>	-0,55882
<i>Upstream binding transcription factor</i>	<i>UBTF</i>	-0,54609

Na základě společných biologických a molekulárních funkcí byly vybrané geny z mikročipu rozděleny do tří skupin. První skupina obsahuje geny, které ovlivňují transkripci z mitochondriálního genomu a translaci mitochondriálních mRNA nebo tvoří strukturní jednotky komplexů dýchacího řetězce (dále v textu jako „skupina A“): *ATP5C1*, *ATP5F1*, *MRPL47*, *MTRF1L*.

Druhou skupinu tvoří geny kódující proteiny, které se účastní transkripce, translace nebo posttranslačních modifikací (dále v textu jako „skupina B“): *BRD7*, *CAND1*, *GATA3*, *NGDN*, *PRPF18*, *TAF1A*, *UBL5*, *UBTF*.

Do třetí skupiny patří geny, které jsou zapojeny do buněčného cyklu, např. regulují sestavení kinetochor (dále v textu jako „skupina C“): *MAP3K13*, *MLF1IP*, *TTK*.

Diagram 1: Klasifikace genů se zvýšenou expresí podle jejich biologické funkce

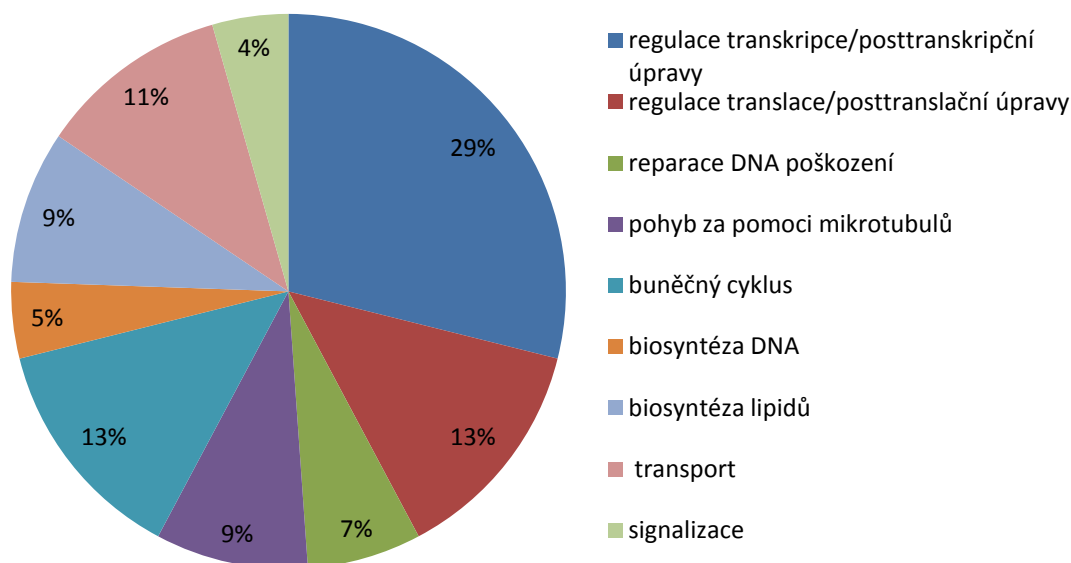


Diagram 1 klasifikuje 47 genů se známou funkcí podle Gene Ontology Consortium Classifications (<http://www.geneontology.org>), doplněných o informace z NCBI public database (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>) a UniProt (<http://www.uniprot.org/>). Na mikročipu se mezi vybranými 50 geny vyskytovaly dva s neznámou funkcí a jeden duplikován, tyto geny v grafu zahrnutý nejsou.

Diagram 1: Klasifikace genů se sníženou expresí podle jejich biologické funkce

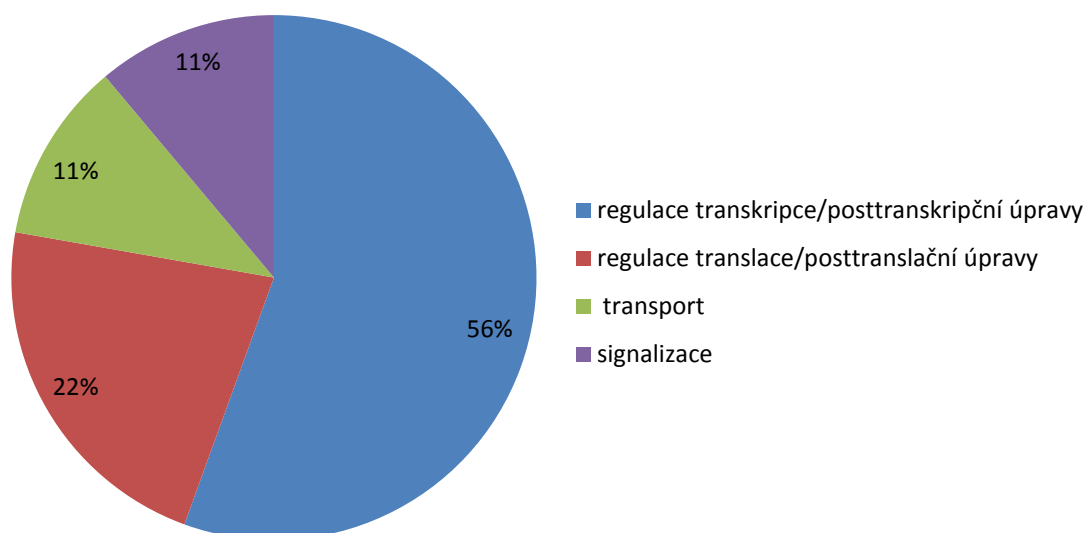
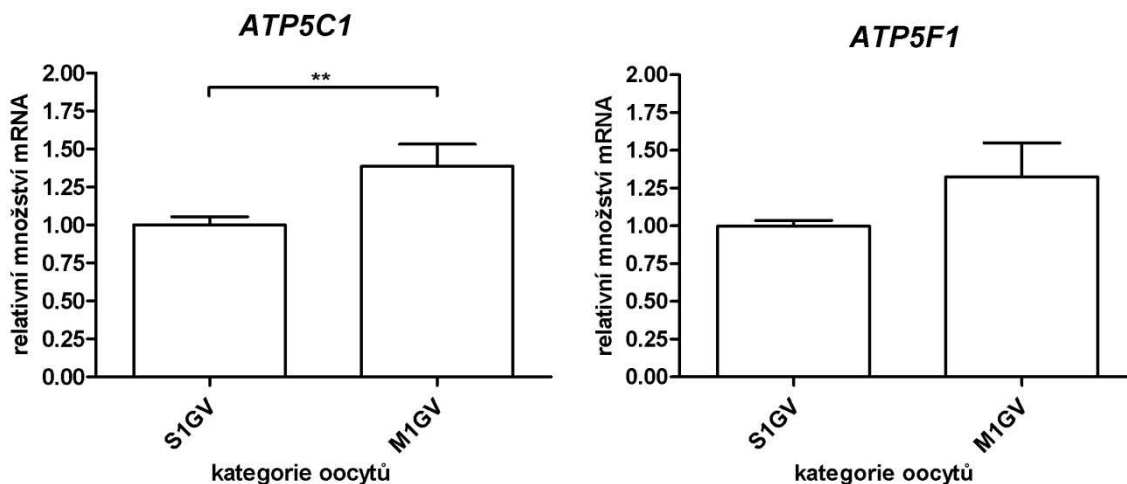


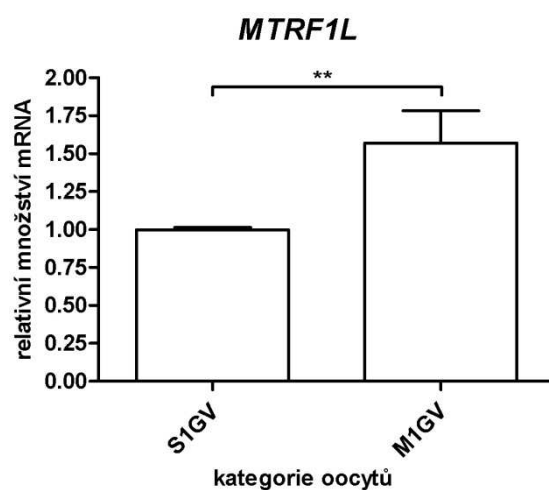
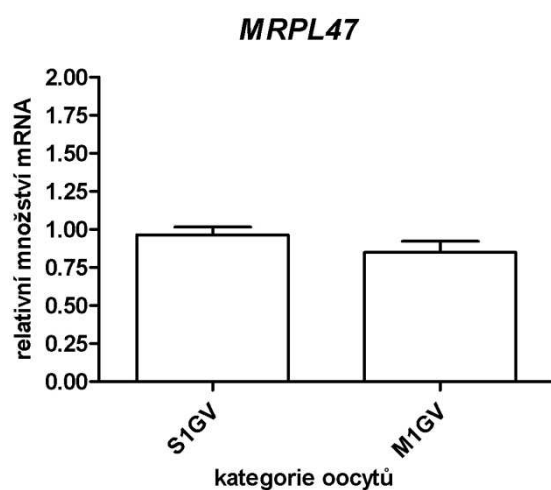
Diagram 2 klasifikuje 10 genů se známou funkcí podle Gene Ontology Consortium Classifications (<http://www.geneontology.org>), doplněných o informace z NCBI public database (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>) a UniProt (<http://www.uniprot.org/>). Na mikročipu byl mezi 11 vybranými geny jeden neznámý transkript, který v grafu zahrnut není.

8.2.1 Ověření exprese 15 vybraných genů na základě výsledků mikročipu

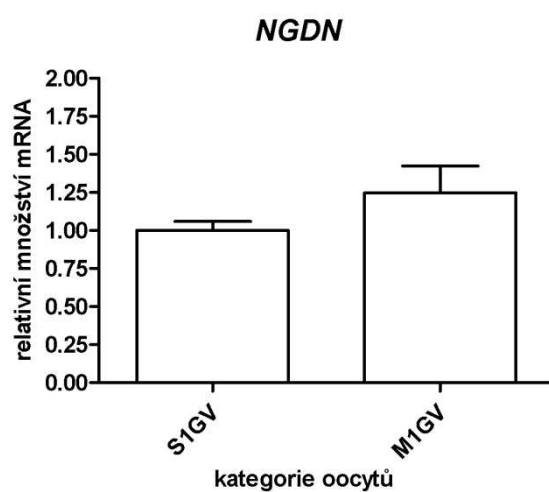
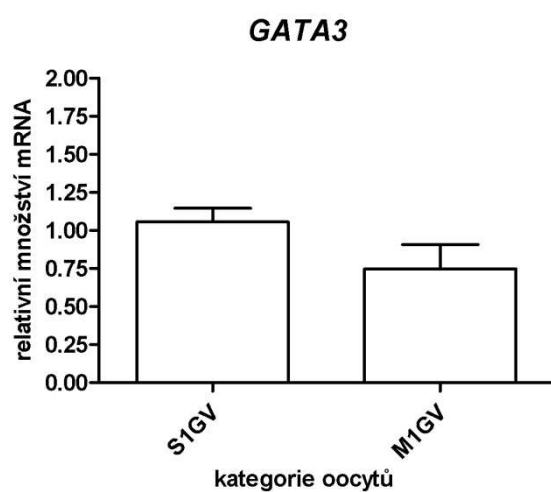
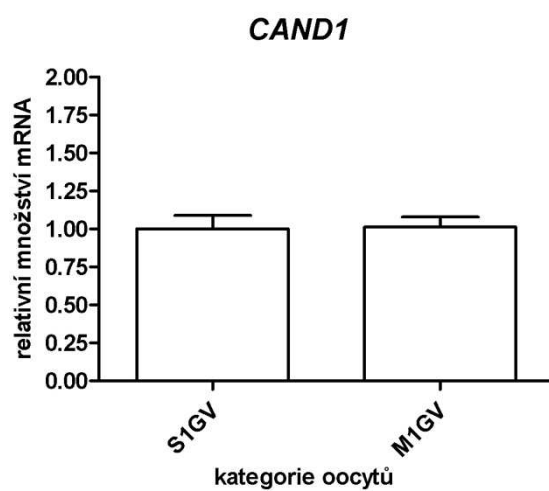
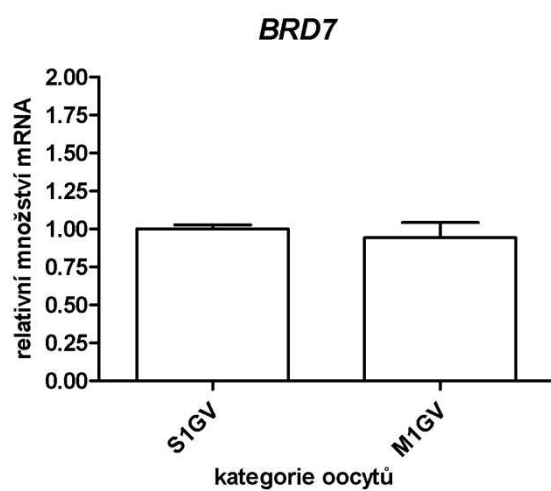
V souladu s výsledky z mikročipu bylo pomocí qRT-PCR naměřeno signifikantní zvýšení hladiny mRNA v kategorii nematurovaných oocytů izolovaných ze středně velkých folikulů (M1GV) oproti oocytům izolovaným z malých folikulů (S1GV) u genů *ATP5C1*, *MTRF1L* a *TAF1A*. U genů *ATP5F1*, *NGDN*, *MLF1IP8*, *PRPF18* a *TTK* byla stanovena vyšší hladina v M1GV. U *BRD7* a *CAND1* se hladina neměnila mezi sledovanými kategoriemi oocytů, což je v nesouladu s výsledkem mikročipu. Snížení hladiny transkriptu odpovídající výsledkům mikročipu bylo naměřeno u *MAP3K13* a *UBL5*. U *MRPL47* byla naměřena nižší hladina transkriptu u M1GV oproti S1GV, naše výsledky nejsou ve shodě s výsledky z mikročipu. U *GATA3* snížení hladiny transkriptu odpovídá výsledkům mikročipu, avšak rozdíl není statisticky významný. *UBTF* mRNA byla zvýšená v M1GV, což se neshoduje s výsledkem mikročipu, naměřený rozdíl nebyl statisticky významný.

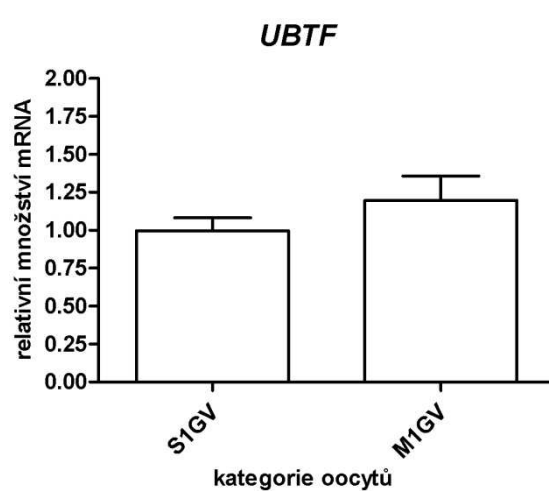
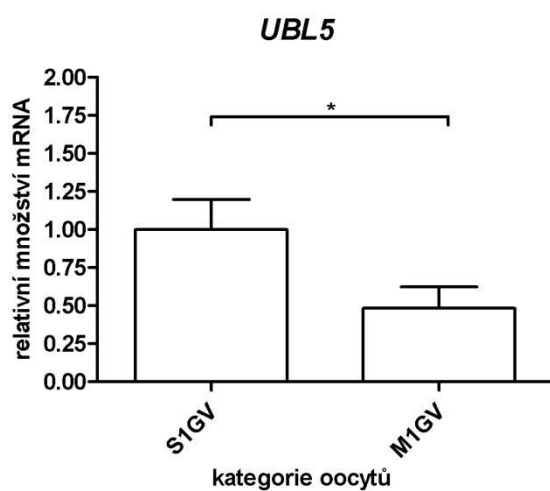
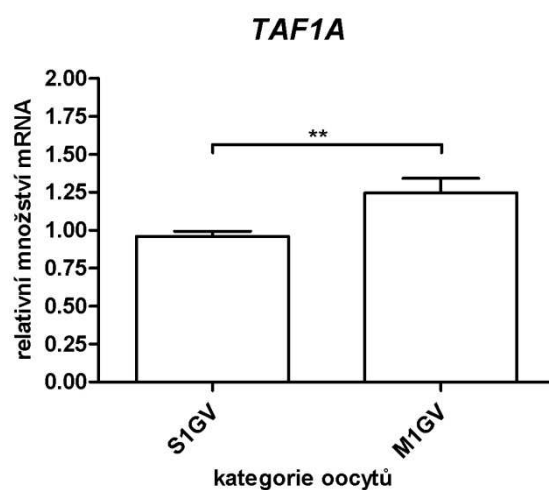
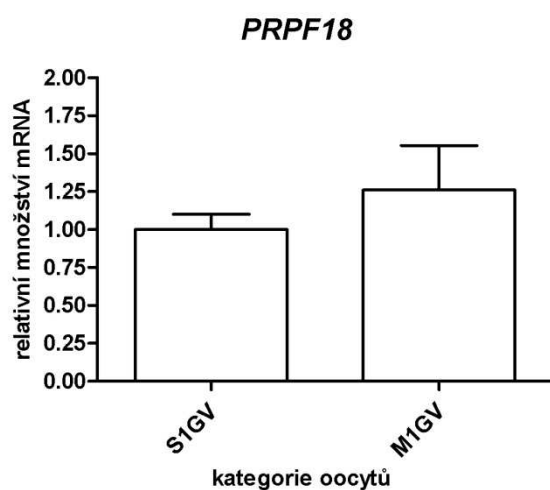
skupina A



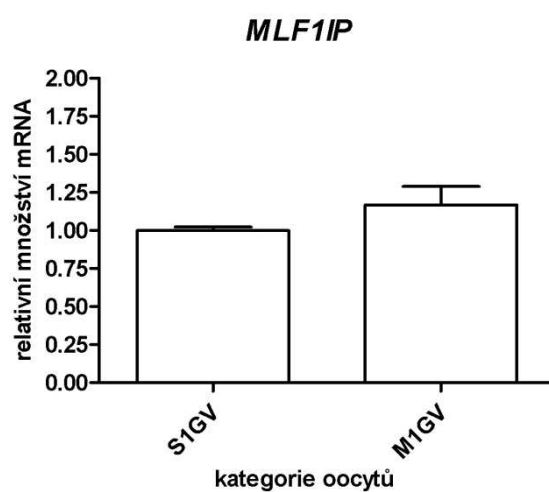
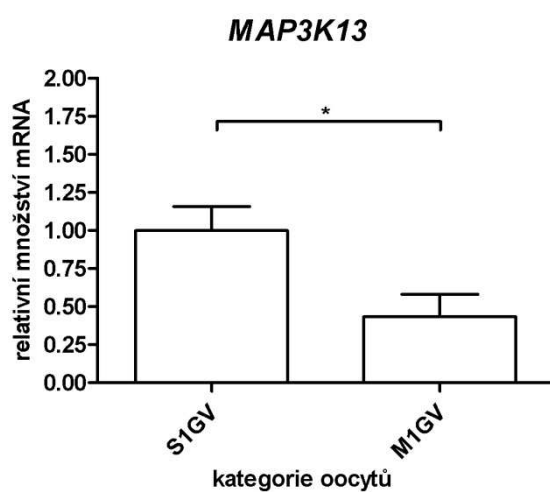


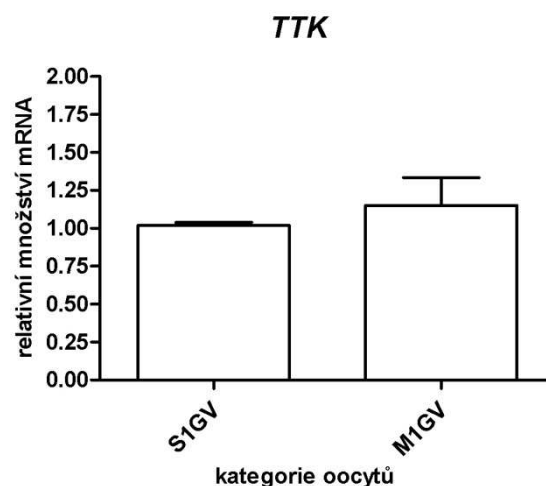
skupina B





skupina C





Expresa mRNA ve stádiu S1GV a M1GV. S1GV – oocyty izolované z malých folikulů s kompaktním kumulem bez známek atrezie a čistou homogenní cytoplazmou; M1GV – oocyty izolované ze středně velkých folikulů s kompaktním kumulem bez známek atrezie a čistou homogenní cytoplazmou. Všechny geny jsou vztaženy k S1GV, které je bráno jako 1. Skupina A – geny, které ovlivňují transkripci mitochondriálního genomu a později translaci mitochondriální mRNA nebo tvoří strukturní jednotky komplexů dýchacího řetězce, skupina B – geny, jejichž proteiny se účastní transkripce, translace nebo posttranslačních modifikací z jaderného genomu, skupina C – geny, které se svými translačními produkty podílí na procesu buněčného cyklu. Hvězdičky značí statistické rozdíly – * = $p < 0,05$; ** = $p < 0,01$; *** = $p < 0,001$.

8.2.2 Charakterizace exprese 12 genů vybraných pomocí qRT-PCR během maturace

Skupina A

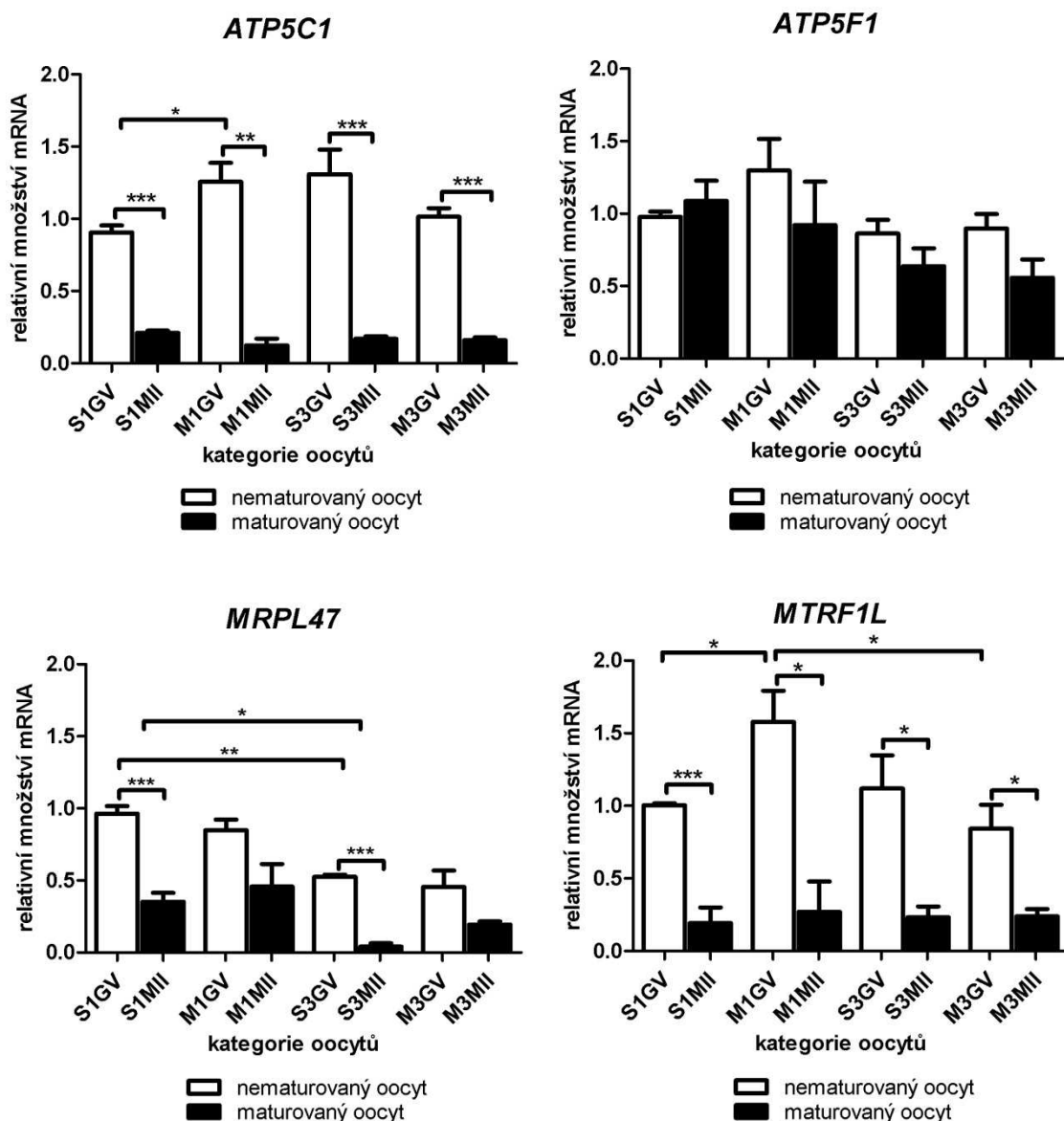
Hladina *ATP5C1* je signifikantně snížena ve všech sledovaných kategoriích oocytů po maturaci. V kategorii S1MII je naměřeno o 77 % méně oproti S1GV. U kategorie M1 po maturaci klesá hladina na 10 %. U kategorie S3 po maturaci klesá hladina na 13 %. U kategorie M3 po maturaci klesla o 84 %. Množství transkriptu mezi S1MII a M1MII se neliší, podobně je tomu při porovnávání S3MII a M3MII.

Bylo zjištěno, že hladina transkriptu *ATP5F1* klesá po maturaci u kategorie oocytů M1, M3 i S3, rozdíl není statisticky významný. Po maturaci v kategorii oocytů S1 množství *ATP5F1* mírně vzrostlo, avšak rozdíl není statisticky významný.

Hladina *MRPL47* po maturaci klesá ve všech kategoriích oocytů. Signifikantní pokles po maturaci byl zaznamenán pouze v kategoriích S1 na 37 % a u S3 klesla hladina o 92 %. Množství transkriptu u kategorie oocytů z malých folikulů bylo signifikantně nižší u S3GV oproti S1GV.

Hladina transkriptu *MTRF1L* po maturaci signifikantně klesá ve všech kategoriích oocytů. U S1 klesá na 19 %. U S3 hladina po maturaci klesá na 20 %. U kategorie M1 po

maturaci klesá hladina transkriptu na 17 %. U M3MII klesá hladina na 28 % oproti M3GV. Množství *MTRF1L* signifikantně nižší u oocytů kategorie M3GV oproti M1GV.



Expres mRNA během maturace u vybraných 4 genů.

GV – oocyty nematurované, S – malý folikul, M – středně velký folikul, 1 – oocyt s kompaktním kumulem bez známek atrezie a čistou homogenní cytoplazmou; 3 – oocyty s mírně granulovanou cytoplazmou, vnější vrstva kumulu byla mírně expandována, přítomny známky atrezie kumulárních buněk. Všechny geny jsou vztaženy k S1GV. Hvězdičky značí statistické rozdíly – * = $p < 0,05$; ** = $p < 0,01$; *** = $p < 0,001$.

Skupina B

Expres *BRD7* po maturaci zůstává konstantní v případě oocytů bez atretických kumulárních buněk izolovaných z SF a oocytů bez atretických kumulárních buněk

izolovaných z MF. Pokles množství transkriptu, nastává u kategorie S3MII oproti S3GV a M3MII oproti M3GV, rozdíl není statisticky významný.

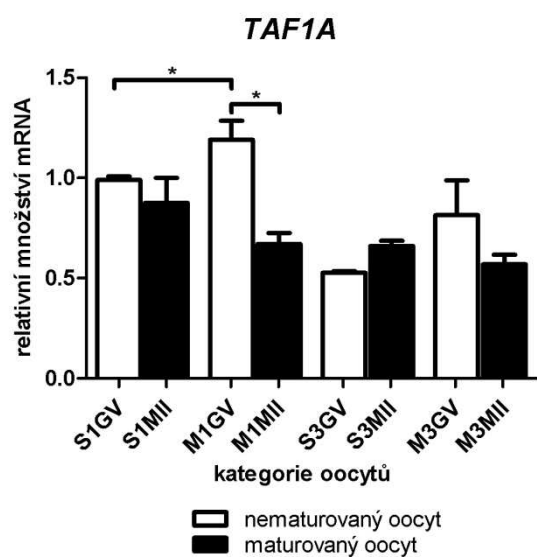
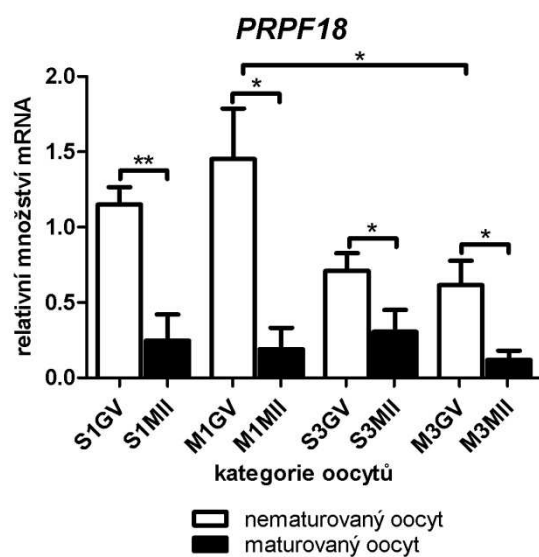
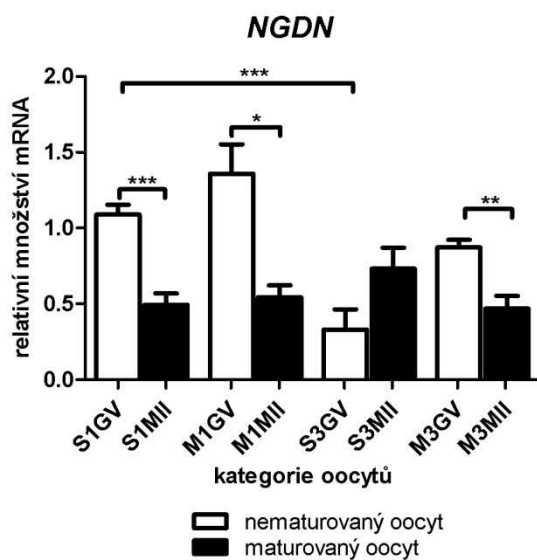
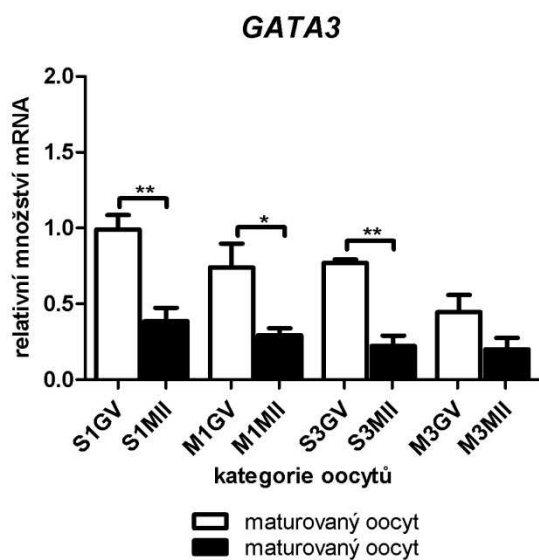
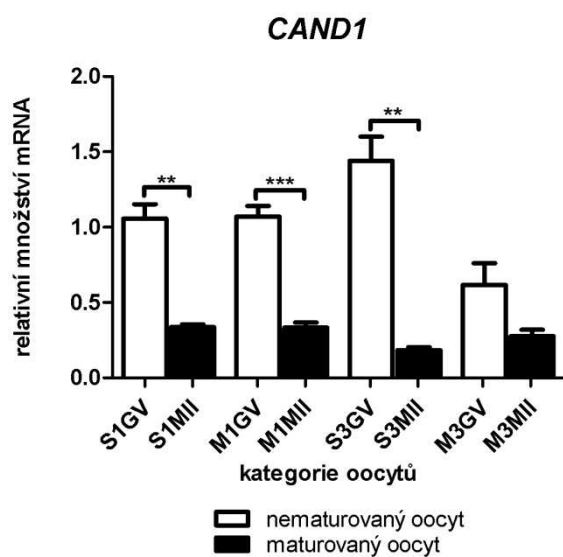
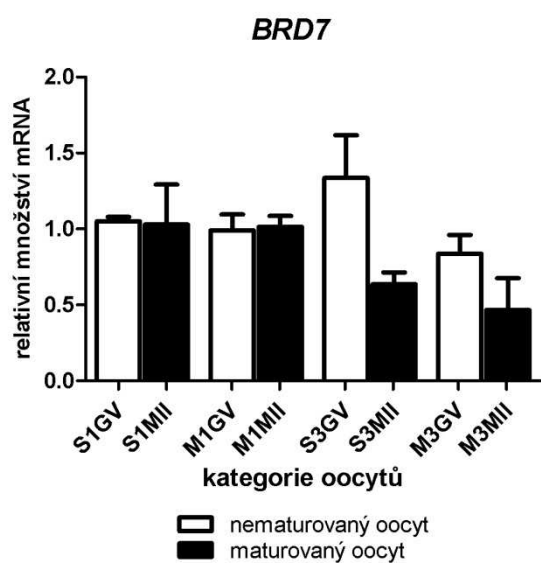
V případě *CAND1* byl zaznamenán pokles exprese po maturaci u všech kategorií, avšak signifikantní snížení bylo zjištěno u S1MII na 32 % oproti S1GV, u M1MII na 31 % oproti M1GV a u S3MII na 13 % oproti S3GV.

Hladina transkriptu *GATA3* se po maturaci snižovala u všech kategorií oocytů. Signifikantní snížení po maturaci bylo zaznamenáno pouze u kategorie oocytů S1 na 39 %. U kategorie oocytů M1 klesá hladina transkriptu po maturaci na 40 % a u kategorie oocytů S3 kleslo množství transkriptu na 29 %.

Množství transkriptu *NGDN* z nematurovaných oocytů bez atretických kumulárních buněk izolovaných z SF je signifikantně vyšší než v případě oocytů stejné velikostní kategorie, které vykazují známky atrezie kumulárních buněk. Během maturace dochází ke statisticky významnému zvýšení hladiny transkriptu u S3MII o 120 % oproti S3GV. Po maturaci hladina transkriptu u kategorie oocytů S1 klesá o 61 %. U M3MII se snižuje množství transkriptu na 53 % oproti M3GV. U M1MII se snižuje na 40 % oproti M1GV.

V případě *PRPF18* dochází po maturaci k signifikantnímu poklesu exprese ve všech kategoriích. V S1MII se snižuje na 22 % oproti S1GV, v M1MII klesá na 13 % oproti M1GV, v S3MII se snižuje na 43 % oproti S3GV a v M3MII klesá na 19 % oproti M3GV. Bylo naměřeno signifikantní snížení hladiny transkriptu v kategorii M3GV oproti M1GV.

Hladina transkriptu *TAF1A* po maturaci signifikantně klesá u kategorie oocytů M1 na 56 %. Snížení hladiny transkriptu po maturaci u kategorií oocytů S1 i M3 nebylo statisticky významné. V kategorii S3MII byla zaznamenána nižší hladina transkriptu oproti S3GV, avšak rozdíl nebyl signifikantní.



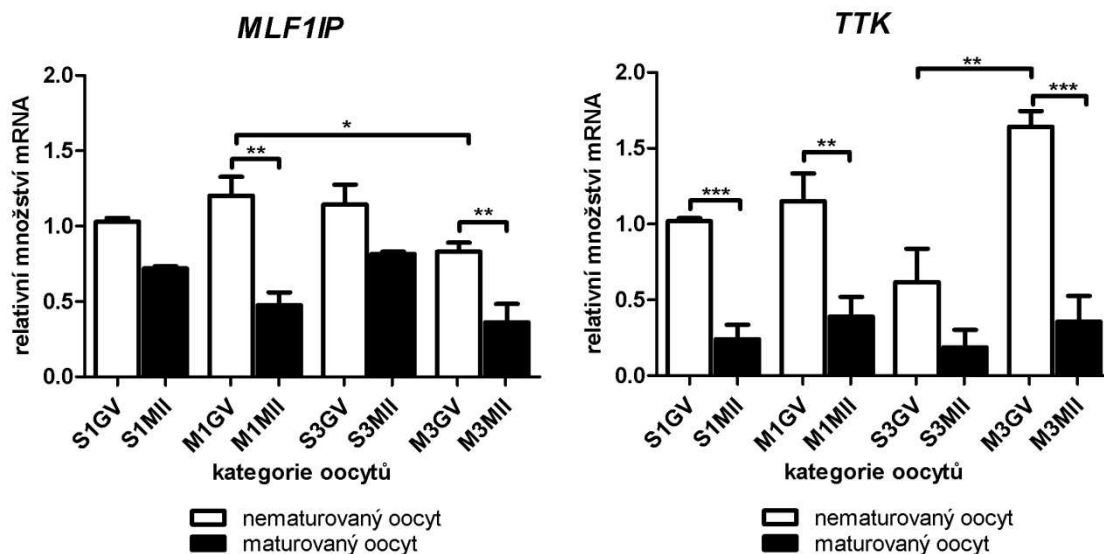
Expres mRNA během maturace u vybraných 6 genů.

GV – oocyty nematurované, S – malý folikul, M – středně velký folikul, 1 – oocyt s kompaktním kumulem bez známek atrezie a čistou homogenní cytoplazmou; 3 – oocyty s mírně granulovanou cytoplazmou, vnější vrstva kumulu byla mírně expandována, přítomny známky atrezie kumulárních buněk. Všechny geny jsou vztaženy k S1GV. Hvězdičky značí statistické rozdíly – * = $p < 0,05$; ** = $p < 0,01$; *** = $p < 0,001$.

Skupina C

Množství transkriptu *MLF1IP* po maturaci klesá ve všech kategoriích oocytů. U M1MII byl naměřen signifikantní pokles hladiny na 39 % oproti M1GV. U M3MII klesla hladina o 60 % oproti M3GV. Byl zaznamenán statisticky významný rozdíl u kategorie oocytů M3GV hladina transkriptu signifikantně snížena oproti M1GV.

Hladina *TTK* mRNA signifikantně po maturaci klesá ve všech kategoriích oocytů, kromě S3, rozdíl není statisticky významný. Množství mRNA je vyšší u M1GV oproti M3GV. Po maturaci množství mRNA u kategorie S1 kleslo na 20 %. U M1MII hladina klesá na 38 % oproti M1GV. U kategorie M3 hladina transkriptu po maturaci klesla o 78 %.



Expres mRNA během maturace u vybraných 2 genů.

GV – oocyty nematurované, S – oocyt pocházející z malých folikulů, M – oocyt pocházející ze středně velkých folikulů, 1 – oocyt s kompaktním kumulem bez známek atrezie a čistou homogenní cytoplazmou; 3 – oocyty s mírně granulovanou cytoplazmou, vnější vrstva kumulu byla mírně expandována, přítomny známky atrezie kumulárních buněk; Všechny geny jsou vztaženy k S1GV. Hvězdičky značí statistické rozdíly – * = $p < 0,05$; ** = $p < 0,01$; *** = $p < 0,001$.

8.2.3 Stanovení exprese *ATP5C1*, *ATP5F1*, *GATA3*, *MLF1IP*, *MTRF1L* a *PRPF18* během časného embryonálního vývoje

U všech genů byl stanoven expresní profil během časného embryonálního vývoje a ověřeno zahájení transkripce z embryonálního genomu pomocí α -amanitinu, který specificky blokuje RNA polymerázu II.

Hladina transkriptu *ATP5C1* stoupá ve 4-buněčném stádiu oproti MII a 2-buněčnému stádiu. Další nárůst hladiny jsme detekovali v pozdním 8-buněčném. Tento nárůst pokračuje až do stádia blastocysty. Nárůst hladiny v pozdním 8-buněčném stádiu je senzitivní k α -amanitinu, což dokazuje aktivaci embryonálního genomu.

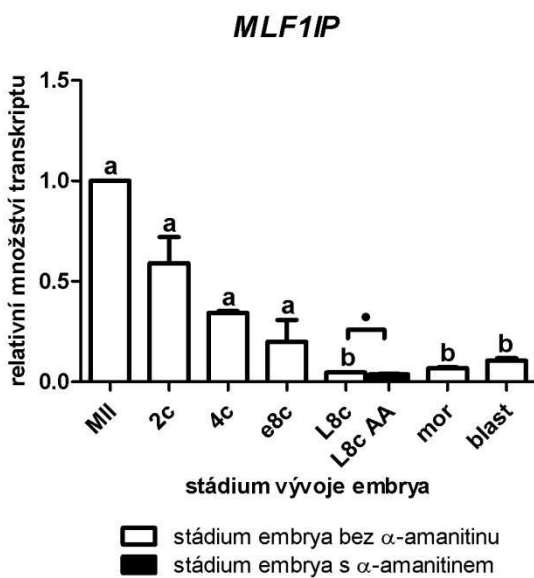
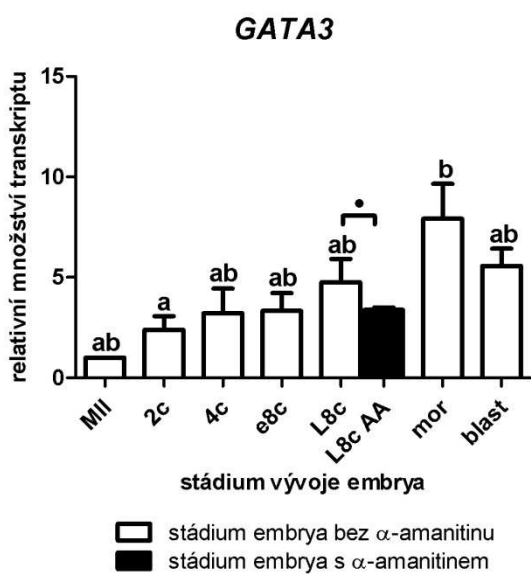
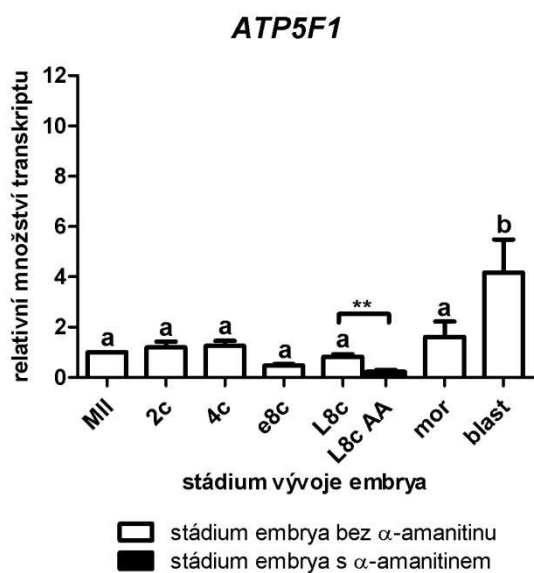
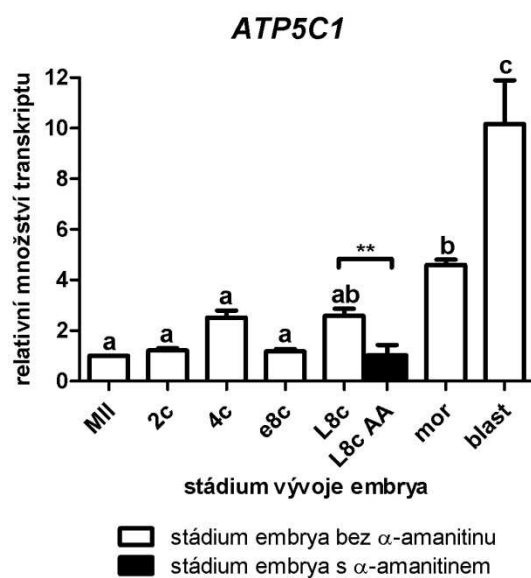
Hladina *ATP5F1* je až do 4-buněčného stádia konstantní, v časném 8-buněčném stádiu dochází k mírnému poklesu. Signifikantní nárůst lze pozorovat ve stádiu blastocysty. Po kultivaci s přidavkem α -amanitinu došlo v pozdním 8-buněčném stádiu ke snížení transkriptu, tento pokles signalizuje *de novo* zahájení transkripce z embryonálního genomu.

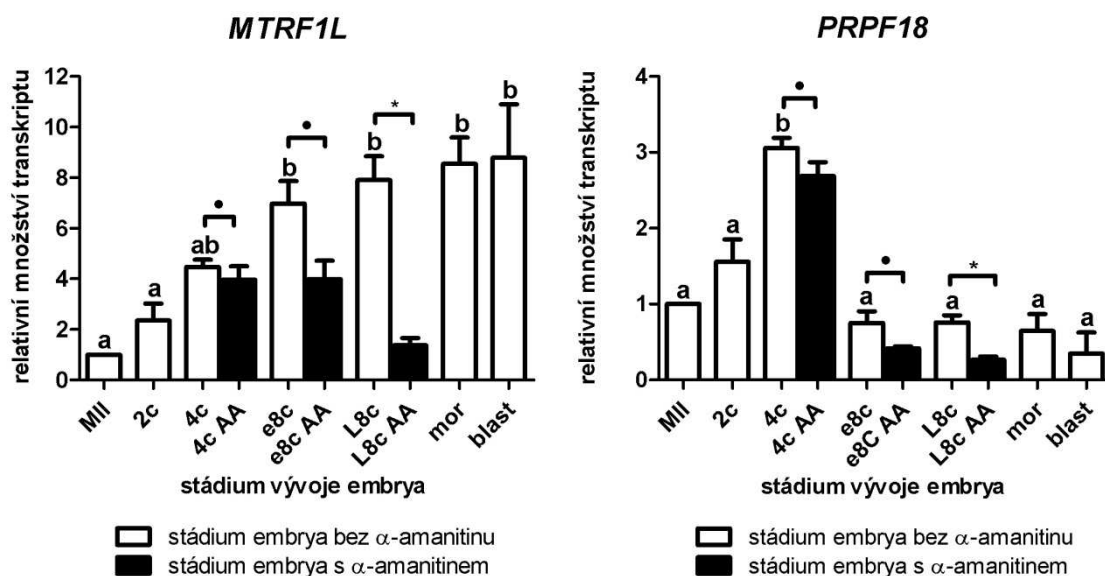
Hladina mRNA *GATA3* postupně stoupá, nejvyšší je ve stádiu moruly. Po přidání α -amanitinu do média nedošlo v pozdním 8-buněčném stádiu k signifikantnímu snížení hladiny mRNA, to znamená, že transkripce z embryonálního genomu nebyla zahájena.

Množství transkriptu *MLF1IP* od stádia MII klesá až do pozdního 8-buněčného stádia. Ve stádiu moruly a blastocysty je množství transkriptu konstantní. Po ověření zahájení transkripce přidavkem α -amanitinu do kultivačního média, nedošlo v pozdním 8-buněčném stádiu k signifikantnímu poklesu transkriptu. To znamená, že v pozdním 8-buněčném stádiu nebyla zahájena transkripce z embryonálního genomu. Maternální zásoby transkriptu postačují pro vývoj embrya do pozdního 8-buněčného stádia.

Hladina *MTRF1L* od stádia MII až po časné 8-buněčné stádium stoupá, mírný nárůst pokračuje až do blastocysty. Po přidání α -amanitinu do média došlo k signifikantnímu poklesu v pozdním 8-buněčném stádiu, což signalizuje zahájení transkripce z embryonálního genomu.

U *PRPF18* dochází k nárůstu exprese ve 4-buněčném stádiu, zatímco v 8-buněčném stádiu je hladina nižší. Úbytek transkriptu pokračuje až do stádia blastocysty. Zahájení transkripce z embryonálního genomu ve 4-buněčném stádiu nebylo pomocí α -amanitinu potvrzeno, zatímco aktivace embryonálního genomu byla prokázána senzitivitou k α -amanitinu v pozdním 8-buněčném stádiu.





Relativní kvantifikace mRNA *ATP5C1*, *ATP5F1*, *GATA3*, *MLF1IP*, *MTRF1L* a *PRPF18* během časného embryonálního vývoje. MII – oocyt v metafázi II; 2c – 2-buněčné embryo; 4c – 4-buněčné embryo; 4c AA – 4-buněčné embryo α -amanitin; e8c – časně 8-buněčné embryo; e8c AA – časně 8-buněčné embryo α -amanitin; L8c – pozdní 8-buněčné embryo; L8c AA – pozdní 8-buněčné embryo α -amanitin; mor – morula; blast – blastocysta. Hladiny mRNA všech genů jsou vztaženy k MII, které je považováno za 1. Rozdílné indexy nad grafy a, b značí statisticky významné rozdíly u embryonálních stádií ($p < 0,05$). Hvězdičky značí statisticky významné rozdíly u embryí kultivovaných s α -amanitinem – * = $p < 0,05$; ** = $p < 0,01$; *** = $p < 0,001$. • značí statisticky nesignifikantní rozdíly u embryonálních stádií kultivovaných s α -amanitinem.

9 Diskuze

9.1 Stanovení exprese *LUM* a *STC1*

Navázali jsme na výsledky práce Mamo *et al.* (2011), ve které autoři navrhli za ukazatele kvality maturace dva transkripty – lumikan (*LUM*) a staniokalcin 1 (*STC1*). U obou byl popsán signifikantní nárůst hladiny transkriptu po maturaci v případě *in vivo* i *in vitro* podmínek. Zvýšení hladin obou transkriptů bylo potvrzeno kultivací s α -amanitinem (Mamo *et al.*, 2011). Nárůst exprese *LUM* a *STC1* během maturace je vyjimečný, u většiny genů hladina mRNA během maturace klesá (Memili *et al.*, 1998; Fair *et al.*, 2007). Otázka regulace transkripce během maturace je však v současnosti sporným tématem. *LUM* a *STC1* byly vybrány pro moji diplomovou práci právě proto, že se jejich transkripční profil odlišoval od ostatních známých potenciálních ukazatelů kvality oocyty. Funkce obou proteinů jsou navíc dobře popsány u myši. Oba nebyly dosud detekovány v oocytech skotu. Prvním dílčím cílem mé diplomové práce bylo ověřit nárůst hladiny transkriptů ve stádiu MII.

STC1 je řazen do rodiny glykoproteinů a jeho exprese byla detekována v mnoha tkáních obratlovců, počínaje rybami a savci konče (Roch a Sherwood, 2011). Jednou z hlavních rolí *STC1* je zajištění homeostázy Ca^{2+} a fosfátu v krevním séru, což bylo prokázáno u lososa (Wagner *et al.*, 1998). U savců *STC1* brání vzniku reaktivních forem kyslíku a tím chrání buňku při zánětlivých procesech (Sheikh-Hamad, 2010). U skotu byl protein nalezen v mateřském mléku a usuzuje se, že sehrává důležitou roli během laktace (Tremblay *et al.*, 2009). U myši byla kromě ledvin a prostaty prokázána vysoká exprese mRNA ve vaječnících (Paciga *et al.*, 2004), konkrétně v tekálních intersticiálních buňkách folikulu (Varghese *et al.*, 1998). Nadměrná exprese *STC1* v myším ováriu je spojována s ovariálním karcinomem (Liu *et al.*, 2010) a zvýšená hladina mRNA je spojena i s dalšími typy rakovinového bujení (Koide a Sasaki, 2006). Knockout však nemá vliv na časný embryonální vývoj ani reprodukci a dospělí jedinci dorůstají normální velikosti (Chang *et al.*, 2005). Během fetálního vývoje staniokalcin pravděpodobně hraje roli při vývoji urogenitálního systému a tvorbě kostí a svalů (Jiang *et al.*, 2000).

Lumikan patří mezi glykoproteiny obsahující keratansulfát. Je zastoupen v pojivových tkáních, nejčastěji v rohovce. Zajišťuje organizaci a integritu extracelulární matrix a reguluje utváření vláken kolagenu (Kao *et al.*, 2006). Nejvyšší exprese mRNA

byla u dospělého jedince detekována v srdci a rohovce (Ying *et al.*, 1997). Nadměrná exprese bývá spojována s mnoha typy rakoviny (např. tlustého střeva, pankreatu, prsu a prostaty) (Coulson-Thomas *et al.*, 2013). Protein byl ve velkém množství nalezen ve stromatu rohovky (Carlson *et al.*, 2005; Funderburgh *et al.*, 1995). Jedinci, u kterých byl proveden knockout genu, dorůstají normální velikosti a jsou fertilní. V dospělosti se fenotyp projevuje abnormálním uspořádáním vláken kolagenu v dermis. Dochází k vytváření silnějších a deformovaných vláken kolagenu. Nepřítomnost proteinu se ve výsledku projevuje snížením pevnosti pokožky (Chakravarti, 2002) a jasnosti rohovky, jejíž zakalení je dáno zvýšenou hustotou fibroblastů (Kao a Liu, 2002; Song *et al.*, 2003).

V této práci byla pomocí qRT-PCR stanovena hladina *LUM* mRNA mírně vyšší v GV oproti MII, u *STC1* byla hladina transkriptu v GV dvakrát vyšší než v MII, což je v rozporu s prací Mamo *et al.* (2011). V práci Mamo *et al.* (2011) byla zaznamenána hladina transkriptu *LUM* za *in vitro* podmínek přibližně 38× vyšší v MII a v případě *in vivo* podmínek bylo stanoveno zvýšení hladiny až 120× v MII. *STC1* byl zvýšen v *in vitro* podmínkách u maturovaných oocytů 3× a 13× v *in vivo* podmínkách. Pro kvantifikaci transkriptů jsme převzali sekvence primerů z publikace Mamo *et al.* (2011). V našich podmínkách nebyly jejich primery vhodné pro kvantifikaci, proto musely být navrženy nové primery, pomocí kterých byly naměřeny prezentované výsledky. Výsledky naznačují, že *LUM* ani *STC1* nemohou sloužit jako ukazatele vývojové kompetence. Rozpor ve výsledcích by mohly způsobovat rozdílné maturační podmínky obou experimentů. Naše zrací média neobsahovala složku epidermálního růstového faktoru. Je známo, že tento růstový faktor přispívá k dosažení meiotické maturace a vylepšuje expanzi kumulu (Harper a Brackett, 1993; Kobayashi *et al.*, 1994; Lorenzo *et al.*, 1994). Vliv epidermálního růstového faktoru na cytoplazmatickou maturaci nebyl studován. *STC1* a *LUM* nejsou vhodnými ukazateli kvality oocyty.

Jako první jsme u skotu zjistili expresní profil u obou genů pomocí qRT-PCR během časného embryonálního vývoje. Expres *LUM* a *STC1* byla doposud stanovena pomocí mikročipů u myši, skotu a člověka (Zeng *et al.*, 2004; Xie *et al.*, 2010). Prokázali jsme signifikantně vyšší hladinu *LUM* v pozdním 8-buněčném stádiu oproti MII i časnému 8-buněčnému stádiu. Toto zvýšení bylo inhibováno při kultivaci s α -amanitinem, čímž jsme potvrdili, že probíhá *de novo* transkripce *LUM*. Expresní profil byl v souladu s daty z mikročipu v případě skotu i člověka (Xie *et al.*, 2010). Mikročipová analýza

transkriptomu u myši během embryonálního vývoje prokázala zvýšení v 1-buněčném stádiu (Zeng *et al.*, 2004).

Následně jsme stanovili pomocí qRT-PCR hladinu *STC1*. Během embryonálního vývoje došlo ve 4-buněčném stádiu k signifikantnímu zvýšení hladiny oproti MII i 2-buněčnému stádiu, do stádia blastocysty se hladina transkriptu výrazně neměnila. Zjistili jsme, že je zvýšení hladiny *STC1* ve 4-buněčném stádiu senzitivní k α -amanitinu. *STC1* patří do skupiny genů, u kterých dochází k *de novo* transkripci během minoritní aktivace embryonálního genomu. Produkty takových genů jsou pravděpodobně potřebné pro časnou fázi vývoje (Kanka *et al.*, 2003). Námi naměřená data pomocí qRT-PCR byla v rozporu s výsledky Xie *et al.* (2010). Autoři u skotu zaznamenali nejvyšší úroveň v oocyty (Xie *et al.*, 2010). U člověka byl zaznamenán nárůst hladiny v 8-buněčném stádiu (Xie *et al.*, 2010). Rovněž u myši byla hladina během celého vývoje do moruly konstantní a zvyšovala se až ve stádiu blastocysty (Zeng *et al.*, 2004).

9.2 Expresní profily genů vybraných na základě mikročipu

Práce vychází z výsledků získaných pomocí mikročipu Bovine Oligonucleotide Microarrays (Missouri Consortium), na kterém byla porovnávána exprese genů u oocytů izolovaných z MF (6-10 mm) s vyšší meiotickou kompetencí oproti oocytům izolovaným z SF (2-5 mm) s nižší meiotickou kompetencí. Izolovaná polyadenylovaná mRNA z oocytů výše zmíněných kategorií byla porovnávána na mikročipu poprvé. Značná část dosavadních poznatků týkajících se vývojové kompetence oocytů byla získána porovnáním hladin transkriptů nematurovaných a maturovaných oocytů (Fair *et al.*, 2007; Su *et al.*, 2007) nebo hledáním rozdílů mezi *in vitro* a *in vivo* maturovanými oocyty (Katz-Jaffe *et al.*, 2009; Mamo *et al.*, 2011).

V roce 2005 byl poprvé připraven mezidruhový mikročip, pomocí něhož bylo porovnáno 1 176 lidských genů s celkovou RNA izolovanou z oocytů skotu z folikulů menších než 4 mm a větších než 6 mm (Lequarre *et al.*, 2005). Autoři hledali evolučně konzervované geny, nevěnovali se klastrovací analýze detekovaných transkriptů. Na rozdíl od mé diplomové práce vybrali Lequarre *et al.* (2005) jiné hranice pro stanovení velikostních kategorií antrálních folikulů. Autoři vybrali kategorii folikulů menší než 4 mm, která obsahuje i meioticky nekompetentní oocyty, díky volbě více rozdílných kategorií mohou být naše výsledky odlišné. Naše nejvýraznější rozdíly exprese byly 1,7×, zatímco vědecká skupina Lequarre *et al.* (2005) naměřila rozdíl až 3×.

Další studie, která se zabývala identifikací genů rozdílně exprimovaných v závislosti na velikosti folikulu a na vývojové kompetenci oocyty, byla provedena metodou subtraktivní hybridizace. Autoři použili také odlišnou hranici pro stanovení velikosti folikulů: folikuly menší než 2 mm a větší než 5 mm (Donnison a Pfeffer, 2004). U vývojově kompetentních oocytů bylo prokázáno trojnásobné zvýšení exprese, což se shoduje s experimentem skupiny Lequarre *et al.* (2005). Autoři si oproti našim velikostním kategoriím folikulů volí více rozdílné kategorie. Oocyty izolované z folikulů menších než 2 mm nejsou meioticky kompetentní, což může být důvodem, proč se naše výsledky liší. Prezentované výsledky, stejně jako výsledky předchozích vědeckých skupin (Donnison a Pfeffer, 2004; Lequarre *et al.*, 2005), ukazují, že neexistují velké kvantitativní rozdíly mezi jednotlivými kategoriemi plně dorostlých oocytů izolovaných z folikulů nad 2 mm. Zdá se, že je vývojová kompetence oocyty dána nepatrnými změnami exprese mnoha genů současně.

U vybraných genů 15 (*ATP5C1*, *ATP5F1*, *BRD7*, *CAND1*, *GATA3*, *MAP3K13*, *MLF1IP*, *MRPL47*, *MTRF1L*, *NGDN*, *PRPF18*, *TAF1A*, *TTK*, *UBL5*, *UBTF* – viz Tabulka 2) jsme ověřovali rozdíly v expresi pomocí qRT-PCR. Analýza pomocí mikročipu je považována za méně přesnou oproti qRT-PCR. Může docházet k chybám během přípravy materiálu i odchylkám při samotném zpracování a normalizaci dat. Naopak qRT-PCR je více senzitivní (Huggett *et al.*, 2005), umožňuje kvantifikaci genové exprese jednoho oocyty nebo embrya. Výsledek mikročipu byl potvrzen u pěti genů – *ATP5C1*, *MAP3K13*, *MTRF1L*, *TAF1A* a *UBL5*. U 12 genů byl u skotu poprvé stanoven expresní profil během maturace pomocí qRT-PCR. Rozdělili jsme je podle biologické funkce na tři skupiny. Skupina A obsahovala geny, které ovlivňují transkripci z mitochondriálního genomu a translaci mitochondriálních mRNA nebo tvoří strukturní jednotky komplexů dýchacího řetězce. Skupina B zahrnuje geny kódované jaderným genomem, jejichž produkty se účastní transkripce, translace nebo posttranslačních modifikací. Do skupiny C patří geny kódované jaderným genomem, které se svými translačními produkty zapojují do regulace buněčného cyklu, např. sestavení kinetochor.

9.2.1 Skupina A – geny vztahující se k mitochondriím

Do této kategorie patří čtveřice genů – *ATP5C1*, *ATP5F1*, *MTRF1L* a *MRPL47*. Mitochondrie jsou důležité pro vývojovou kompetenci oocyty a sehrávají důležitou roli v buněčném metabolismu, např. cyklu trikarboxylových kyselin a dýchacím řetězcem

(Van Blerkom, 2009). Tyto organely jsou potřebné pro produkci ATP během vývoje oocyty i embrya (Stojkovic *et al.*, 2001). ATP je vytvářen ATP syntázou (komplex V dýchacího řetězce). Tento komplex je lokalizován na vnitřní membráně mitochondrií. Proteiny ATP5C1 i ATP5F1 tvoří subjednotky V. komplexu dýchacího řetězce. Pro tuto práci byly oba zmíněné geny vybrány, protože aktivita mitochondrií a množství ATP slouží jako ukazatelé kvality embrya i oocyty (Wang *et al.*, 2009; Chappel, 2013). Někteří autoři předpokládají spojení mezi množstvím kopií mtDNA a schopností vývoje oocyty (Reynier *et al.*, 2001; May-Panloup *et al.*, 2005). V průběhu cytoplazmatické maturace dochází k redistribuci mitochondrií, jejichž lokalizace indikuje vývojovou kompetenci oocyty. Ve spolupráci s kolektivem z VÚVEL v.v.i. jsme za vývojově schopnější označili bovinní oocyty v MII, které měly vysokou aktivitu mitochondrií nahloučených rovnoměrně v cytoplazmě (Machatkova *et al.*, 2012). Zjistili jsme, že hladina *ATP5C1* mRNA byla vyšší v oocytech izolovaných z MF v porovnání s oocyty izolovanými z SF. Se vzrůstající velikostí folikulu se zvyšuje počet podjednotek ATP syntázy. U skotu Machatkova *et al.*, (2012) popsali, že je mitochondriální aktivita nízká v případě nematurovaných oocytů se známkami atrezie kumulárních buněk izolovaných z MF i SF. Po maturaci se množství ATP u všech kategorií zvyšuje (Machatkova *et al.*, 2012). Na základě mikročipové analýzy u myši bylo množství *Atp5c1* a *Atp5f1* mRNA v MII nižší oproti GV (Su *et al.*, 2007), zatímco naše výsledky ukazují, že hladina bovinní *ATP5C1* mRNA během maturace signifikantně klesá a exprese *ATP5F1* zůstává stejná. Tento výsledek si vysvětlujeme tím, že pravděpodobně nedochází k deadenylaci ani degradaci *ATP5F1* mRNA. Zahájení transkripce z embryonálního genomu v pozdním 8-buněčném stádiu bylo potvrzeno pomocí α -amanitinu u *ATP5C1* i *ATP5F1*. Dále jsme pomocí qRT-PCR ukázali, že množství transkriptu bylo u obou genů zvýšeno v blastocystě. Tento výsledek se shoduje s výsledkem mikročipu u myši (Zeng *et al.*, 2004), člověka i skotu (Xie *et al.*, 2010). U skotu se zvyšuje počet mitochondrií v blastocystě, což může souviset s nárůstem podjednotek V. komplexu dýchacího řetězce. Nárůst transkriptů a pravděpodobně proteinů lze vysvětlit vyššími energetickými nároky, které jsou spojeny se vzrůstajícím počtem buněk a diferenciací na trofoblast a embryoblast. Zachování obou transkriptů v blastocystě nasvědčuje jejich využití v pozdějším vývoji embrya. Produkty transkriptů obou genů u bovinních oocytů nebyly pomocí imunofluorescence ani western blotu testovány.

Mitochondriální ribozomální protein L47 je kódován jaderným genomem. Účastní se translace mitochondriálních transkriptů. Protein tvoří součást 39S podjednotky mitochondriálních ribozómů (Matthews *et al.*, 1982; Koc *et al.*, 2001). Analýza pomocí mikročipu prokázala v případě myšího oocyty snížení množství transkriptu po maturaci (Su *et al.*, 2007). U bovinních oocytů jsme po maturaci našli snížené množství transkriptu *MRPL47* u všech sledovaných kategorií. Délka uchování ribozomálních mRNA se liší v závislosti na kondenzaci chromatinu jádra. V oocytech označených jako SN bylo v případě 27 ribozomálních proteinů naměřeno vyšší množství oproti oocytům NSN. Nedostatek ribozomálních proteinů v NSN oocytech může způsobit předčasné ukončení vývoje ve 2-buněčném stádiu (Monti *et al.*, 2013). Dále jsme zjistili, že množství *MRPL47* získaného z oocytů izolovaných z SF signifikantně klesá v případě oocytů s atretickými kumulárními buňkami oproti oocytům stejné velikosti bez atretických kumulárních buněk. *MRPL47* může sloužit jako ukazatel vývojově kompetentnějších oocytů izolovaných z malých folikulů.

Dalším vybraným transkriptem v této kategorii byl *MTRF1L*, jehož protein rozeznává terminační kodóny mitochondriálních mRNA a účastní se ukončení translace (Nozaki *et al.*, 2008). Je kódován jaderným genomem. Vědci ze společnosti Wellcome Trust Sanger Institute ve své studii vytvořili mutantní formy embryonálních kmenových buněk. Hemizygotní myši s mutací *Mtrf1l*^{tm1a(KOMP)wtst1/?} hynou na počátku embryonálního vývoje (The Jackson laboratory: Mouse Genome Informatics, [online] dostupné z <http://www.informatics.jax.org/javawi2/servlet/WIFetch?page=alleleDetail&key=571550>), což potvrzuje význam *MTRF1L* pro vývoj embrya. Zjistili jsme, že množství transkriptu bylo signifikantně zvýšeno u nematurovaných oocytů izolovaných z MF oproti oocytům získaným z SF. Vývojově kompetentnější oocyty z MF obsahují větší množství transkriptu, protože nesprávné ukončení translace mitochondriálních proteinů by mohlo vést k defektům v oxidativní fosforylaci a produkci kyslíkových radikálů, a tím k zastavení vývoje. Pomocí qRT-PCR jsme u bovinních embryí naměřili zvýšení hladiny *MTRF1L* v 8-buněčném stádiu, dále se hladina udržovala konstantní až do blastocysty. Tentýž expresní profil zaznamenaly analýzy na mikročipech u myši (Zeng *et al.*, 2004) i člověka (Xie *et al.*, 2010). Na rozdíl od nás Xie *et al.* (2010) na embryích skotu detekovali transkript o jedno dělení později (v 16-buněčném stádiu). Pomocí α -amanitinu jsme zjistili, že stejně jako u ostatních zkoumaných genů byla u *MTRF1L* majoritní vlna transkripce zahájena v pozdním 8-buněčném stádiu.

9.2.2 Skupina B – transkripční a translační faktory a posttranslační modifikační proteiny

Homologní protein PRPF18 se u člověka účastní sestřihu pre-mRNA, konkrétně se váže na U4/U6 v jadérových ribonukleoproteinových částicích a účastní se odštěpení lariátové struktury 5' exonu (Horowitz a Krainer, 1997). Ukázali jsme, že množství transkriptu *PRPF18* u nematurovaných bovinních oocytů izolovaných z MF se signifikantně liší mezi kategoriemi s neatretickými a atretickými kumulárními buňkami. Ve všech sledovaných kategoriích oocytů se hladina transkriptu po maturaci snížila. Memili a First (1998) prokázali, že ve většině případů je během zrání oocyty maternální mRNA degradována. Naopak na základě mikročipu bylo u myších oocytů prokázáno, že množství transkriptu zůstává konstantní i po maturaci (Su *et al.*, 2007). *PRPF18* jako jediný z šesti vybraných genů ve svém transkripčním profilu během časného embryonálního vývoje vykazoval zvýšení ve 4-buněčném stádiu, což by vypovídalo o zahájení transkripce během minoritní vlny aktivace embryonálního genomu. Podobné zvýšení ve 4-buněčném stádiu bylo zaznamenáno v předcházející studii naší laboratoře také u sestřihového faktoru *SRFS3* (*serine/arginine-rich splicing factor*) (Kanka *et al.*, 2003). Na rozdíl od *SRFS3* nebyla u *PRPF18* zahájena *de novo* transkripce z embryonálního genomu. Zdá se, že dochází pouze k polyadenylaci maternálního transkriptu, který je nutný pro časný vývoj embrya. Zahájení *de novo* transkripce během majoritní aktivace embryonálního genomu proběhlo v pozdním 8-buněčném stádiu. Naše naměřená data se shodují s výsledkem mikročipu u člověka i skotu (Xie *et al.*, 2010). Na mikročipu byla hladina transkriptu u myši nejnížší ve 2-buněčném a 4-buněčném stádiu a oproti našim výsledkům se zvýšila v morule a v blastocystě zůstala hladina zvýšená (Zeng *et al.*, 2004).

Neurogudin (EIF4E *binding protein*) reguluje translaci mnoha mRNA nesoucích ve své sekvenci cytoplazmatický polyadenylační element (CPE, *cytoplasmic polyadenylation element*). Podobně jako maskiny zabraňuje degradaci transkriptů, které mohou být překládány až v pozdějším stádiu vývoje oocyty nebo embrya (Jung *et al.*, 2006). NGDN váže eIF4E a CPEB1. Tato vazba negativně ovlivňuje translaci některých mRNA s CPE (Jung *et al.*, 2006). Protein se vyskytuje ve vaječníku, varlatech a mozku (Jung *et al.*, 2006). Expres mRNA byla zjištěna u drápatky na animálním pólu 4-buněčného embrya, dále pak v gastrule v mozku, míše, dorzálních rozích ganglií (Jung *et al.*, 2006). U myši byla mRNA detekována ve stádiu gastruly také v mozku.

Vyblokování funkce proteinu u drápatky pomocí komplementární specifické sekvence nukleotidů obsahující morfolinový kruh se projevilo nedokonalým uzavřením neurální trubice u 36 % injikovaných embryí (Jung *et al.*, 2006). Na mikročipu byl zaznamenán pokles po maturaci u myších oocytů (Su *et al.*, 2007), podobně jsme pomocí qRT-PCR zaznamenali pokles i v případě bovinních oocytů. Ukázali jsme, že v nematurovaných oocytech izolovaných z malých folikulů s kumulárními buňkami bez atrézie je vyšší hladina transkriptu než v oocytech, které vykazují známky atrézie kumulárních buněk.

BRD7 kóduje protein, který se účastní reorganizace chromatinu. Váže se svou bromodoménou na acetylované H3 histon (Peng *et al.*, 2006) a umožňuje vazbu dalších remodelačních proteinů. *BRD7* je součástí *Polo Bromo associated BRG1 asociated factor* který patří mezi proteiny lidského SWI/SNF (*switch/sucrose non fermenting*) nukleozom-remodelujícího komplexu (Kaesler *et al.*, 2008). SWI/SNF komplex dokáže pohybovat nukleozómy, a tím zpřístupnit DNA aktivátorům nebo represorům transkripce (Martens a Winston, 2003). *BRD7* je lokalizován do jádra. U linie buněk nasofaryngeálního karcinomu se účastní regulace buněčného cyklu (Zhou *et al.*, 2004). Vazbou na protein p53 zvyšuje transkripci jeho cílových genů (např. P21, MDM2) a tím se podílí na zastavení buněčného cyklu (Drost *et al.*, 2010). Hemizygotní jedinci s mutantní alelou *Brd7^{tm2a(EUCOMM)Wtsi/?}* hynou před odstavením (*The Jackson laboratory: Mouse Genome Informatics*, [online] dostupné z <http://www.informatics.jax.org/javawi2/servlet/WIFetch?page=alleleDetail&key=624227>). Data z mikročipu u myši ukazují, že je množství *Brd7* mRNA zvýšeno v 1-buněčném stádiu (Zeng *et al.*, 2004). Další studie ukazuje zvýšení tohoto transkriptu po maturaci oocyty (Su *et al.*, 2007). My jsme naopak zjistili, že hladina *BRD7* klesá po maturaci ve všech čtyřech kategoriích bovinních oocytů. Tento protein by mohl hrát roli při remodelaci chromatinu během EGA.

Degradace některých transkriptů je důležitá pro zrání a dosažení vývojové kompetence oocyty (Su *et al.*, 2007). U *MAP3K13* a *UBL5* jsme našli signifikantně snížené hladiny mRNA v nematurovaných oocytech z MF oproti SF. *MAP3K13* je součástí velké proteinové rodiny DLK (*dual leucine zipper bearing kinases*) serin/treoninových kináz (Gallo a Johnson, 2002). Celá rodina proteinů je důležitá pro myši embryonální vývoj a utvoření nervové soustavy (Hirai *et al.*, 2005). *UBL5* patří do proteinové rodiny ubiquitinu příbuzných proteinů (jejich funkcí je převážně degradace

proteinů). Transkript se vyskytuje téměř ve všech tkáních, nejvíce je produkován v tkáních bohatých na mitochondrie, např. svaly, játra, ledviny a srdce (Friedman *et al.*, 2001).

GATA3 je transkripční faktor regulující diferenciaci T-lymfocytů (Zheng a Flavell, 1997) a erytrocytů (Ko a Engel, 1993). Kromě hematopoetických buněk se exprimuje také v centrálním i periferním nervovém systému, ledvinách a nadledvinkách, brzlíku a mírně i v dalších tkáních, např. srdci a kůži (George *et al.*, 1994; Lakshmanan *et al.*, 1999). Pomocí *in situ* hybridizace byla GATA3 mRNA detekována během embryonálního vývoje (George *et al.*, 1994). U myši byla nejvyšší hladina *Gata3* mRNA detekována 8,5 dne po oplození v placentě (George *et al.*, 1994). Nulová mutace *Gata3* je letální pro stádium pozdního embryonálního vývoje, myší embrya hynou 11. až 12. den po oplození (Pandolfi *et al.*, 1995). Z toho vyplývá, že je GATA3 důležitý pro embryogenezi. Mutantní fenotyp se projevuje poruchami míchy, dochází k defektům při prodlužování Wolfova kanálu, narušení endotelu kapilár vede k masivnímu vnitřnímu krvácení a zastavení růstu. U *Gata3*^{-/-} myši byly zaznamenány defekty během vývoje vnitřního ucha (Karis *et al.*, 2001). Naše data získaná pomocí qRT-PCR ukazují, že GATA3 klesá po maturaci ve všech stanovených kategoriích oocytů, zatímco data získaná z mikročipové analýzy myších oocytů po maturaci ukazují zvýšení transkripce v MII stádiu (Su *et al.*, 2007). Zjistili jsme, že hladina GATA3 během embryonálního vývoje mírně stoupá do stádium blastocysty. U skotu nebyl tento transkript pomocí mikročipové analýzy zkoumán. U člověka se během časného embryonálního vývoje zvyšuje exprese GATA3 (Xie *et al.*, 2010), což odpovídá našim výsledkům. Pomocí mikročipu byla také u myši zjištěna nejvyšší exprese v blastocystě (Zeng *et al.*, 2004).

CAND1 negativně reguluje vazbu kulinu k proteinům, které jsou součástí SCF (*Skp1-cullin-F box*) komplexu. SCF proteiny v komplexu s E3 enzymem jsou řazeny do rodiny kulin RING E3 ubiquitin ligáz, které hrají roli při degradaci proteinů zapojených do buněčného cyklu, transkripce i buněčné signalizace (Zheng *et al.*, 2002). Pomocí northern blotu bylo u myši zjištěno, že se *Cand1* exprimuje v kosterních svalech, v srdci a játrech (Yogosawa *et al.*, 1999). U *C. elegans* je exprimován v zárodečné P-linii, ve střevech a v buňkách hypodermis. Mutantní *Cand1* způsobuje abnormální tvar vulvy a defekty při vývoji ocasní části. Necelých 20 % potomků homozygotních hád'átek zastavuje svůj vývoj mezi stádiem embrya a L2 larválním stádiem. (Bosu *et al.*, 2010). Analýza mikročipu prokázala u oocytů myši nižší množství *CAND1* transkriptu v MII než v GV (Su *et al.*, 2007). Naše výsledky získané pomocí qRT-PCR rovněž

naznačují, že hladina transkriptu po maturaci klesá ve všech kategoriích oocytů. V naší laboratoři byl již dříve detekován a identifikován transkript kulinu 1 během časného vývoje skotu (Kepkova *et al.*, 2011). Vazba kulinu 1 s CAND1 je významná pro funkci SCF komplexu ubiquitin ligáz. Expresní profil *CAND1* bude součástí další studie mých kolegů.

TAF1A je transkripční faktor. Může regulovat transkripci RNA polymerázou I i II. Je jedním ze tří TATA vazebných proteinů, které společně s TBP tvoří transkripční faktor selektivity 1 (SL1, *selectivity factor 1*) (Di Pietro *et al.*, 2000), který je součástí pre-iniciačního komplexu pro RNA polymerázu I. Nicméně vyvázání TBP na *TAF1A* brání iniciaci transkripce RNA polymerázou II (Comai *et al.*, 1994). Zjistili jsme, že hladina transkriptu *TAF1A* signifikantně klesá po maturaci ve všech kategoriích bovinních oocytů. Rovněž dříve publikované výsledky získané u myši pomocí mikročipu ukazují, že se hladina *Taf1a* po maturaci snižuje (Su *et al.*, 2007).

UBTF je aktivátor transkripce pro RNA polymerázu I (Panov *et al.*, 2006). Tento jaderný protein obsahuje HMG box (*high mobility group*). HMG rodina proteinů je exprimována během embryonálního vývoje, zapojuje se do regulace genové exprese, rekombinace a reparace DNA (Bianchi a Agresti, 2005). Hladina transkriptů *UBTF* a *TAF1A* je nesignifikantně zvýšená u nematurovaných oocytů z MF v porovnání s oocyty ze SF.

9.2.3 Skupina C – geny, které se svými translačními produkty podílejí na řízení buněčného cyklu

MLF1IP je součástí komplexu asociujícího s nukleozómem (NAC, *nucleosome-associated complex*), který zajišťuje průchod mitózou a segregaci chromatid (Minoshima *et al.*, 2005). Protein obsahuje jaderný lokalizační signál. Svým C-koncem může vázat proteiny, které se nacházejí v jádře. Minoshima *et al.* (2005) ho ve svém článku popsal jako centromerický protein U. MLF1IP protein má zásadní roli při lokalizaci polo kinázy 1 na kinetochory během mitózy. Polo kináza 1 se účastní regulace buněčného cyklu v G2/M kontrolním bodě, taktéž reguluje maturaci a separaci centrozómů. Funkce MLF1IP byla studována na buněčných liniích. Při úplném vyblokování proteinu buňky procházejí pomaleji mitózou (Minoshima *et al.*, 2005). Současná studie zjistila, že knockout tohoto genu u myši je letální, jedinci umírají ve stádiu gastruly. Poloviční exprese MLF1IP postačuje k tomu, aby jedinci byli životaschopní a fertilní bez narušení

lymfoidní linie buněk a funkce imunitního systému (Wang *et al.*, 2013). Pomocí western blotu byl protein potvrzen ve vaječníku u dospělých myši (Hanissian *et al.*, 2004). Poměrně vysoká exprese byla potvrzena v rostoucím folikulu a *corpus luteum* (Wang *et al.*, 2013). Exprese *MLF1IP* mRNA během embryonálního vývoje byla zjištěna 11.-12. den po oplození ve vyvíjejícím se mozku a srdci. Třináct a půl dne po oplození byla exprese zjištěna v játrech (Hanissian *et al.*, 2004). U myši byly nalezeny dvě varianty transkriptu o velikosti 4,8 kb a 2,4 kb. Analýza pomocí northern blotu prokázala, že se více přepisuje během embryonálního vývoje transkript o velikost 2,4 kb (Hanissian *et al.*, 2004). Na mezidruhovém mikročipu, který obsahoval transkripty myši, drápatky a skotu, byl identifikován *MLF1IP* jako gen důležitý pro vývoj bovinního oocyty (Vallée *et al.*, 2005). Naše výsledky ukazují snížení transkriptu po maturaci ve všech čtyřech sledovaných kategoriích. Naopak na mikročipu, který porovnával nematurované a maturované myši oocyty, se transkript po maturaci zvyšoval (Su *et al.*, 2007). Navíc jsme zjistili, že oocyty izolované z MF s atretickými kumulárními buňkami mají signifikantně méně *MLF1IP* transkriptu než oocyty bez známek atrezie. Oocyty s nekvalitními kumulárními buňkami pravděpodobně nepotřebují zásobu tohoto transkriptu, protože v nich v brzké době bude zahájena apoptóza. Zjistili jsme, že hladina transkriptu je nejvyšší v 1-buněčném a 2-buněčném embryu, v 8-buněčném stádiu se snižuje, nejnižší je potom v morule a ve stádiu blastocysty se začíná mírně zvedat. Zdá se, že množství maternálního transkriptu postačuje pro vývoj embrya nejméně do pozdního 8-buněčného stádia. Naše výsledky získané pomocí qRT-PCR odpovídají datům z mikročipové analýzy lidského i myšího embrya (Zeng *et al.*, 2004; Xie *et al.*, 2010).

TTK neboli MPS1 (*monopolar spindle1-like 1*) je serin/treoninová kináza (Liu a Winey 2012), jejíž sekvence je konzervovaná u kvasinek, ryb i savců (Mills *et al.*, 1992). Lidský homolog TTK byl detekován na centrozomech a kinetochorech během buněčného cyklu (Liu *et al.*, 2003), důležitý je pro průchod kontrolním bodem SAC (*spindle assembly checkpoint*) (Stucke *et al.*, 2002) a zajišťuje správné napojení dělicího vřeténka ke chromozómům. Homologní protein u drápatky fosforyluje centromerický protein E (kinesinový molekulární motor), který se během mitózy přemístí na kinetochory chromozómů metafázní destičky, což je nutné pro navázání MAD1 (*mitotic spindle-assembly checkpoint protein 1*) a MAD2 (*mitotic spindle-assembly checkpoint protein 2*) na kinetochor. MAD1 a MAD2 tak zabraňují předčasnému navázání dělicího vřeténka a rozchodu chromatid (Abrieu *et al.*, 2001). U myši bylo zjištěno,

že výskyt *Mps1* v oblasti kinetochorů je důležitý pro správné načasování prometafáze (Hached *et al.*, 2011). Tyto výsledky byly získány na mutantní formě *Ttk* s deletovanou kinetochor vazebnou doménou. Kondicionální knockout se v myším oocyty projevuje předčasným vydělením pólového tělíska. Samice po kondicionálním knockoutu mají výrazně sníženou fertilitu (Hached *et al.*, 2011), což potvrzuje význam tohoto genu pro zrání oocyty. Nejvyšší hladina *Ttk* mRNA je detekována ve varlatech a brzlíku (Mills *et al.*, 1992). Naše data z qRT-PCR ukazují pokles bovinního transkriptu po maturaci, což odpovídá výsledkům mikročipu, který porovnával nematurované a maturované oocyty myši (Su *et al.*, 2007).

10 Závěry

1. Pomocí qRT-PCR byly detekovány transkripty *LUM* a *STC1*. V našich podmínkách se nepodařilo ani s nově navrženými primery prokázat zvýšení exprese obou genů v MII stádiu oproti GV. Výsledky naznačují, že *LUM* ani *STC1* nemohou sloužit jako ukazatele vývojové kompetence.
2. Na základě výsledků analýzy mikročipu Bovine Oligonucleotide Microarray (Missouri Consortium) bylo vybráno 15 genů a nalezené rozdíly v expresi byly ověřeny pomocí qRT-PCR. Zvýšená hladina byla signifikantně potvrzena u nematurovaných oocytů s vyšší meiotickou kompetencí oproti oocytům s nižší meiotickou kompetencí u *ATP5C1*, *MTRF1L* a *TAF1A*. Snížená hladina mRNA u oocytů s vyšší meiotickou kompetencí oproti oocytům s nižší meiotickou kompetencí byla prokázána u *MAP3K13* a *UBL5*.
3. Získané výsledky prokázaly, že hladiny *ATP5C1*, *CAND1*, *GATA3*, *MLF1IP*, *MRPL47*, *MTRF1L*, *PRPF18* a *TTK* se snížily po maturaci ve všech čtyřech kategoriích oocytů nezávisle na velikosti a atrézii kumulárních buněk, avšak signifikantní pokles byl zaznamenán pouze u genů *ATP5C1*, *MTRF1L* a *PRPF18*. U *TAF1A* a *NGDN* nedošlo ke snížení transkriptu po maturaci u oocytů z malých folikulů s atretickými kumulárními buňkami. U *ATP5F1* se hladina transkriptu po maturaci neměnila. U *BRD7* zůstala hladina mRNA po maturaci stejná u oocytů bez atrézie kumulárních buněk získaných z obou velikostních kategorií.

MLF1IP, *PRPF18*, *MTRF1L* by mohly sloužit k odlišení oocytů ze středních folikulů s neatretickými a atretickými kumulárními buňkami.

U obdobných kategorií oocytů izolovaných z malých folikulů by mohly k stejnému rozlišení sloužit *MRPL47*, *NGDN*.

Během embryonálního vývoje byly stanoveny expresní profily u *ATP5C1*, *ATP5F1*, *GATA3*, *MLF1IP*, *MTRF1L* a *PRPF18*. U těchto transkriptů bylo pomocí α -amanitinu ověřeno zahájení transkripce z embryonálního genomu. Aktivace transkripce z embryonálního genomu v pozdním 8-buněčném stádiu byla potvrzena v případě *ATP5C1*, *ATP5F1*, *MTRF1L* a *PRPF18*. Nová syntéza transkriptu z embryonálního genomu nebyla prokázána v 8-buněčném stádiu v případě *MLF1IP* a *GATA3*. U *MLF1IP* transkript klesá od stádia MII oocyty až do blastocysty. Maternální zásoby transkriptu postačují pro vývoj nejméně do pozdního 8-buněčného stádia.

11 Seznam literatury

- Abrieu, A., Magnaghi-Jaulin, L., Kahana, J. A., Peter, M., Castro, A., Vigneron, S., Lorca, T., Cleveland, D. W. and Labbé, J.-C. (2001). Mps1 is a kinetochore-associated kinase essential for the vertebrate mitotic checkpoint. *Cell* 106, 83–93.
- Alm, H., Torner, H., Löhrke, B., Viergutz, T., Ghoneim, I. M. and Kanitz, W. (2005). Bovine blastocyst development rate in vitro is influenced by selection of oocytes by brilliant cresyl blue staining before IVM as indicator for glucose-6-phosphate dehydrogenase activity. *Theriogenology* 63, 2194–2205.
- Anguita, B., Vandaele, L., Mateusen, B., Maes, D. and Van Soom, A. (2007). Developmental competence of bovine oocytes is not related to apoptosis incidence in oocytes, cumulus cells and blastocysts. *Theriogenology* 67, 537–549.
- Arlotto, T., Schwartz, J. L., First, N. L. and Leibfried-Rutledge, M. L. (1996). Aspects of follicle and oocyte stage that affect in vitro maturation and development of bovine oocytes. *Theriogenology* 45, 943–956.
- Auclair, S., Uzbekov, R., Elis, S., Sanchez, L., Kireev, I., Lardic, L., Dalbies-Tran, R. and Uzbekova, S. (2013). Absence of cumulus cells during in vitro maturation affects lipid metabolism in bovine oocytes. *Am. J. Physiol. Endocrinol. Metab.* 304, E599–613.
- Bachvarova, R. F. (1992). A maternal tail of poly(A): the long and the short of it. *Cell* 69, 895–897.
- Bachvarova, R. and De Leon, V. (1980). Polyadenylated RNA of mouse ova and loss of maternal RNA in early development. *Dev. Biol.* 74, 1–8.
- Barnes, F. L. and First, N. L. (1991). Embryonic transcription in in vitro cultured bovine embryos. *Mol. Reprod. Dev.* 29, 117–123.
- Bhojwani, S., Alm, H., Torner, H., Kanitz, W. and Poehland, R. (2007). Selection of developmentally competent oocytes through brilliant cresyl blue stain enhances blastocyst development rate after bovine nuclear transfer. *Theriogenology* 67, 341–345.
- Bianchi, M. E. and Agresti, A. (2005). HMG proteins: dynamic players in gene regulation and differentiation. *Current Opinion in Genetics & Development* 15, 496–506.
- Bilodeau-Goeseels, S. (2012). Bovine Oocyte Meiotic Inhibition Before In Vitro Maturation and Its Value to In Vitro Embryo Production: Does it Improve Developmental Competence? *Reproduction in Domestic Animals* 47, 687–693.
- Bilodeau-Goeseels, S. and Schultz, G. A. (1997). Changes in the relative abundance of various housekeeping gene transcripts in in vitro-produced early bovine embryos. *Molecular Reproduction and Development* 47, 413–420.

- Blondin, P. and Sirard, M. A. (1995). Oocyte and follicular morphology as determining characteristics for developmental competence in bovine oocytes. *Mol. Reprod. Dev.* 41, 54–62.
- Blondin, P., Dufour, M. and Sirard, M. A. (1996). Analysis of atresia in bovine follicles using different methods: flow cytometry, enzyme-linked immunosorbent assay, and classic histology. *Biol. Reprod.* 54, 631–637.
- Boni, R., Cuomo, A. and Tosti, E. (2002). Developmental potential in bovine oocytes is related to cumulus-oocyte complex grade, calcium current activity, and calcium stores. *Biol. Reprod.* 66, 836–842.
- Bosu, D. R., Feng, H., Min, K., Kim, Y., Wallenfang, M. R. and Kipreos, E. T. (2010). C. elegans CAND-1 regulates cullin neddylation, cell proliferation and morphogenesis in specific tissues. *Dev Biol* 346, 113–126.
- Bouvet, P. and Wolffe, A. P. (1994). A role for transcription and FRGY2 in masking maternal mRNA within *Xenopus* oocytes. *Cell* 77, 931–941.
- Carlson, E. C., Liu, C.-Y., Chikama, T., Hayashi, Y., Kao, C. W.-C., Birk, D. E., Funderburgh, J. L., Jester, J. V. and Kao, W. W.-Y. (2005). Keratocan, a Cornea-specific Keratan Sulfate Proteoglycan, Is Regulated by Lumican. *J. Biol. Chem.* 280, 25541–25547.
- Clarke, H. J. (2012). Post-transcriptional control of gene expression during mouse oogenesis. *Results Probl Cell Differ* 55, 1–21.
- Comai, L., Zomerdijs, J. C., Beckmann, H., Zhou, S., Admon, A. and Tjian, R. (1994). Reconstitution of transcription factor SL1: exclusive binding of TBP by SL1 or TFIID subunits. *Science* 266, 1966–1972.
- Coulson-Thomas, V. J., Coulson-Thomas, Y. M., Gesteira, T. F., Andrade de Paula, C. A., Carneiro, C. R. W., Ortiz, V., Toma, L., Kao, W. W.-Y. and Nader, H. B. (2013). Lumican expression, localization and antitumor activity in prostate cancer. *Experimental Cell Research* 319, 967–981.
- Cui, X.-S., Li, X.-Y., Yin, X.-J., Kong, I. K., Kang, J.-J. and Kim, N.-H. (2007). Maternal gene transcription in mouse oocytes: genes implicated in oocyte maturation and fertilization. *J. Reprod. Dev.* 53, 405–418.
- Dalbiès-Tran, R. and Mermillod, P. (2003). Use of Heterologous Complementary DNA Array Screening to Analyze Bovine Oocyte Transcriptome and Its Evolution During In Vitro Maturation. *Biol Reprod* 68, 252–261.
- Dalton, C. M. and Carroll, J. (2013). Biased inheritance of mitochondria during asymmetric cell division in the mouse oocyte. *J. Cell. Sci.* 126, 2955–2964.
- Darnbrough, C. H. and Ford, P. J. (1981). Identification in *Xenopus laevis* of a Class of Oocyte-Specific Proteins Bound to Messenger RNA. *European Journal of Biochemistry* 113, 415–424.

- De La Fuente, R. (2006). Chromatin modifications in the germinal vesicle (GV) of mammalian oocytes. *Dev. Biol.* 292, 1–12.
- De Loos, F., van Maurik, P., van Beneden, T. and Kruip, T. A. (1992). Structural aspects of bovine oocyte maturation in vitro. *Mol. Reprod. Dev.* 31, 208–214.
- De Wit, A. A. de, Wurth, Y. A. and Kruip, T. A. (2000). Effect of ovarian phase and follicle quality on morphology and developmental capacity of the bovine cumulus-oocyte complex. *J ANIM SCI* 78, 1277–1283.
- DeJarnette, J. M., Saacke, R. G., Bame, J. and Vogler, C. J. (1992). Accessory sperm: their importance to fertility and embryo quality, and attempts to alter their numbers in artificially inseminated cattle. *J. Anim. Sci.* 70, 484–491.
- Di Pietro, C., Rapisarda, A., Amico, V., Bonaiuto, C., Viola, A., Scalia, M., Motta, S., Amato, A., Engel, H., Messina, A., et al. (2000). Genomic localization of the human genes TAF1A, TAF1B and TAF1C, encoding TAF(I)48, TAF(I)63 and TAF(I)110 subunits of class I general transcription initiation factor SL1. *Cytogenet. Cell Genet.* 89, 133–136.
- Donnison, M. and Pfeffer, P. L. (2004). Isolation of Genes Associated with Developmentally Competent Bovine Oocytes and Quantitation of Their Levels During Development. *Biol Reprod* 71, 1813–1821.
- Drost, J., Mantovani, F., Tocco, F., Elkon, R., Comel, A., Holstege, H., Kerkhoven, R., Jonkers, J., Voorhoeve, P. M., Agami, R., et al. (2010). BRD7 is a candidate tumour suppressor gene required for p53 function. *Nat. Cell Biol.* 12, 380–389.
- Egerszegi, I., Alm, H., Rátky, J., Heleil, B., Brüssow, K.-P. and Torner, H. (2010). Meiotic progression, mitochondrial features and fertilisation characteristics of porcine oocytes with different G6PDH activities. *Reprod. Fertil. Dev.* 22, 830–838.
- Fair, T. (2003). Follicular oocyte growth and acquisition of developmental competence. *Animal Reproduction Science* 78, 203–216.
- Fair, T., Hyttel, P. and Greve, T. (1995). Bovine oocyte diameter in relation to maturational competence and transcriptional activity. *Mol. Reprod. Dev.* 42, 437–442.
- Fair, T., Hyttel, P., Greve, T. and Boland, M. (1996). Nucleus structure and transcriptional activity in relation to oocyte diameter in cattle. *Molecular Reproduction and Development* 43, 503–512.
- Fair, T., Hulshof, S. C. J., Hyttel, P., Greve, T. and Boland, M. (1997). Oocyte ultrastructure in bovine primordial to early tertiary follicles. *Anat Embryol* 195, 327–336.
- Fair, T., Carter, F., Park, S., Evans, A. C. O. and Lonergan, P. (2007). Global gene expression analysis during bovine oocyte in vitro maturation. *Theriogenology* 68, Supplement 1, S91–S97.

- Feng, W.-G., Sui, H.-S., Han, Z.-B., Chang, Z.-L., Zhou, P., Liu, D.-J., Bao, S. and Tan, J.-H. (2007). Effects of follicular atresia and size on the developmental competence of bovine oocytes: a study using the well-in-drop culture system. *Theriogenology* 67, 1339–1350.
- Ferreira, E. M., Vireque, A. A., Adona, P. R., Meirelles, F. V., Ferriani, R. A. and Navarro, P. A. A. S. (2009). Cytoplasmic maturation of bovine oocytes: Structural and biochemical modifications and acquisition of developmental competence. *Theriogenology* 71, 836–848.
- Forde, N., Beltman, M. E., Lonergan, P., Diskin, M., Roche, J. F. and Crowe, M. A. (2011). Oestrous cycles in *Bos taurus* cattle. *Animal Reproduction Science* 124, 163–169.
- Friedman, J. S., Koop, B. F., Raymond, V. and Walter, M. A. (2001). Isolation of a ubiquitin-like (UBL5) gene from a screen identifying highly expressed and conserved iris genes. *Genomics* 71, 252–255.
- Funderburgh, J. L., Funderburgh, M. L., Hevelone, N. D., Stech, M. E., Justice, M. J., Liu, C. Y., Kao, W. W. and Conrad, G. W. (1995). Sequence, molecular properties, and chromosomal mapping of mouse lumican. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* 36, 2296–2303.
- Gallo, K. A. and Johnson, G. L. (2002). Mixed-lineage kinase control of JNK and p38 MAPK pathways. *Nature Reviews Molecular Cell Biology* 3, 663–672.
- Gardner, A. J. and Evans, J. P. (2006). Mammalian membrane block to polyspermy: new insights into how mammalian eggs prevent fertilisation by multiple sperm. *Reprod. Fertil. Dev.* 18, 53–61.
- Gendelman, M. and Roth, Z. (2012). In vivo vs. in vitro models for studying the effects of elevated temperature on the GV-stage oocyte, subsequent developmental competence and gene expression. *Animal Reproduction Science* 134, 125–134.
- George, K. M., Leonard, M. W., Roth, M. E., Lieu, K. H., Kioussis, D., Grosveld, F. and Engel, J. D. (1994). Embryonic expression and cloning of the murine GATA-3 gene. *Development* 120, 2673–2686.
- Gilchrist, R. B., Lane, M. and Thompson, J. G. (2008). Oocyte-secreted factors: regulators of cumulus cell function and oocyte quality. *Hum. Reprod. Update* 14, 159–177.
- Ginther, O. J. (2000). Selection of the dominant follicle in cattle and horses. *Anim. Reprod. Sci.* 60-61, 61–79.
- Ginther, O. J., Wiltbank, M. C., Fricke, P. M., Gibbons, J. R. and Kot, K. (1996). Selection of the dominant follicle in cattle. *Biology of Reproduction* 55, 1187–1194.
- Gosden, R. and Lee, B. (2010). Portrait of an oocyte: our obscure origin. *J Clin Invest* 120, 973–983.

- Greve, T., Xu, K. P., Callesen, H. and Hyttel, P. (1987). In vivo development of in vitro fertilized bovine oocytes matured in vivo versus in vitro. *J In Vitro Fert Embryo Transf* 4, 281–285.
- Hagemann, L. J. (1999). Influence of the dominant follicle on oocytes from subordinate follicles. *Theriogenology* 51, 449–459.
- Hagemann, L. J., Beaumont, S. E., Berg, M., Donnison, M. J., Ledgard, A., Peterson, A. J., Schurmann, A. and Tervit, H. R. (1999). Development during single IVP of bovine oocytes from dissected follicles: interactive effects of estrous cycle stage, follicle size and atresia. *Mol. Reprod. Dev.* 53, 451–458.
- Hached, K., Xie, S. Z., Buffin, E., Cladière, D., Rachez, C., Sacras, M., Sorger, P. K. and Wassmann, K. (2011). Mps1 at kinetochores is essential for female mouse meiosis I. *Development* 138, 2261–2271.
- Hamatani, T., Carter, M. G., Sharov, A. A. and Ko, M. S. H. (2004). Dynamics of global gene expression changes during mouse preimplantation development. *Dev. Cell* 6, 117–131.
- Hanissian, S. H., Akbar, U., Teng, B., Janjetovic, Z., Hoffmann, A., Hitzler, J. K., Iscove, N., Hamre, K., Du, X., Tong, Y., et al. (2004). cDNA cloning and characterization of a novel gene encoding the MLF1-interacting protein MLF1IP. *Oncogene* 23, 3700–3707.
- Harper, K. M. and Brackett, B. G. (1993). Bovine blastocyst development after in vitro maturation in a defined medium with epidermal growth factor and low concentrations of gonadotropins. *Biol. Reprod.* 48, 409–416.
- He, C. L., Damiani, P., Parys, J. B. and Fissore, R. A. (1997). Calcium, calcium release receptors, and meiotic resumption in bovine oocytes. *Biol. Reprod.* 57, 1245–1255.
- Hendriksen, P. J., Vos, P. L., Steenweg, W. N., Bevers, M. M. and Dieleman, S. J. (2000). Bovine follicular development and its effect on the in vitro competence of oocytes. *Theriogenology* 53, 11–20.
- Hendriksen, P. J. ., Steenweg, W. N. ., Harkema, J. ., Merton, J. ., Bevers, M. ., Vos, P. L. A. . and Dieleman, S. . (2004). Effect of different stages of the follicular wave on in vitro developmental competence of bovine oocytes. *Theriogenology* 61, 909–920.
- Hennet, M. l. and Combelles, C. M. H. (2012). The antral follicle: a microenvironment for oocyte differentiation. *The International Journal of Developmental Biology* 56, 819–831.
- Hirai, S., Kawaguchi, A., Suenaga, J., Ono, M., Cui, D. F. and Ohno, S. (2005). Expression of MUK/DLK/ZPK, an activator of the JNK pathway, in the nervous systems of the developing mouse embryo. *Gene Expr. Patterns* 5, 517–523.
- Hirao, Y. (2011). Conditions affecting growth and developmental competence of mammalian oocytes in vitro. *Animal Science Journal* 82, 187–197.

- Horowitz, D. S. and Krainer, A. R. (1997). A human protein required for the second step of pre-mRNA splicing is functionally related to a yeast splicing factor. *Genes Dev.* 11, 139–151.
- Huggett, J., Dheda, K., Bustin, S. and Zumla, A. (2005). Real-time RT-PCR normalisation; strategies and considerations. *Genes Immun.* 6, 279–284.
- Hyttel, P., Xu, K. P., Smith, S. and Greve, T. (1986). Ultrastructure of in-vitro oocyte maturation in cattle. *J Reprod Fertil* 78, 615–625.
- Hyttel, P., Fair, T., Callesen, H. and Greve, T. (1997). Oocyte growth, capacitation and final maturation in cattle. *Theriogenology* 47, 23–32.
- Chakravarti, S. (2002). Functions of lumican and fibromodulin: lessons from knockout mice. *Glycoconj. J.* 19, 287–293.
- Chang, A. C.-M., Cha, J., Koentgen, F. and Reddel, R. R. (2005). The Murine Stanniocalcin 1 Gene Is Not Essential for Growth and Development. *Mol. Cell. Biol.* 25, 10604–10610.
- Chappel, S. (2013). The Role of Mitochondria from Mature Oocyte to Viable Blastocyst. *Obstetrics and Gynecology International* 2013,.
- Chiaratti, M. R., Ferreira, C. R., Perecin, F., Méo, S. C., Sangalli, J. R., Mesquita, L. G., de Carvalho Balieiro, J. C., Smith, L. C., Garcia, J. M. and Meirelles, F. V. (2011). Ooplast-mediated developmental rescue of bovine oocytes exposed to ethidium bromide. *Reproductive BioMedicine Online* 22, 172–183.
- Jiang, W. Q., Chang, A. C., Satoh, M., Furuichi, Y., Tam, P. P. and Reddel, R. R. (2000). The distribution of stanniocalcin 1 protein in fetal mouse tissues suggests a role in bone and muscle development. *J Endocrinol* 165, 457–466.
- Jung, M.-Y., Lorenz, L. and Richter, J. D. (2006). Translational control by neuroguidin, a eukaryotic initiation factor 4E and CPEB binding protein. *Mol. Cell. Biol.* 26, 4277–4287.
- Kaesler, M. D., Aslanian, A., Dong, M.-Q., Yates, J. R., 3rd and Emerson, B. M. (2008). BRD7, a novel PBAF-specific SWI/SNF subunit, is required for target gene activation and repression in embryonic stem cells. *J. Biol. Chem.* 283, 32254–32263.
- Kanka, J., Bryova, A., Duranthon, V., Oudin, J. F., Peynot, N. and Renard, J. P. (2003). Identification of differentially expressed mRNAs in bovine preimplantation embryos. *Zygote* 11, 43–52.
- Kanka, J., Nemcova, L., Toralova, T., Vodickova-Kepkova, K., Vodicka, P., Jeseta, M. and Machatkova, M. (2012). Association of the transcription profile of bovine oocytes and embryos with developmental potential. *Anim. Reprod. Sci.* 134, 29–35.
- Kao, W. W.-Y. and Liu, C.-Y. (2002). Roles of lumican and keratocan on corneal transparency. *Glycoconj. J.* 19, 275–285.

- Kao, W. W.-Y., Funderburgh, J. L., Xia, Y., Liu, C.-Y. and Conrad, G. W. (2006). Focus on molecules: lumican. *Exp. Eye Res.* 82, 3–4.
- Karis, A., Pata, I., van Doorninck, J. H., Grosveld, F., de Zeeuw, C. I., de Caprona, D. and Fritzsche, B. (2001). Transcription factor GATA-3 alters pathway selection of olivocochlear neurons and affects morphogenesis of the ear. *The Journal of Comparative Neurology* 429, 615–630.
- Katz-Jaffe, M. G., McCallie, B. R., Preis, K. A., Filipovits, J. and Gardner, D. K. (2009). Transcriptome analysis of in vivo and in vitro matured bovine MII oocytes. *Theriogenology* 71, 939–946.
- Kepkova, K. V., Vodicka, P., Toralova, T., Lopatarova, M., Cech, S., Dolezel, R., Havlicek, V., Besenfelder, U., Kuzmany, A., Sirard, M.-A., et al. (2011). Transcriptomic analysis of in vivo and in vitro produced bovine embryos revealed a developmental change in cullin 1 expression during maternal-to-embryonic transition. *Theriogenology* 75, 1582–1595.
- Khurana, N. K. and Niemann, H. (2000). Effects of oocyte quality, oxygen tension, embryo density, cumulus cells and energy substrates on cleavage and morula/blastocyst formation of bovine embryos. *Theriogenology* 54, 741–756.
- Kidder, G. M., Green, A. F. and McLachlin, J. R. (1985). On the use of alpha-amanitin as a transcriptional blocking agent in mouse embryos: a cautionary note. *J. Exp. Zool.* 233, 155–159.
- Ko, L. J. and Engel, J. D. (1993). DNA-binding specificities of the GATA transcription factor family. *Mol. Cell. Biol.* 13, 4011–4022.
- Kobayashi, K., Yamashita, S. and Hoshi, H. (1994). Influence of epidermal growth factor and transforming growth factor-alpha on in vitro maturation of cumulus cell-enclosed bovine oocytes in a defined medium. *J. Reprod. Fertil.* 100, 439–446.
- Koc, E. C., Burkhart, W., Blackburn, K., Moyer, M. B., Schlatzer, D. M., Moseley, A. and Spremulli, L. L. (2001). The Large Subunit of the Mammalian Mitochondrial Ribosome ANALYSIS OF THE COMPLEMENT OF RIBOSOMAL PROTEINS PRESENT. *J. Biol. Chem.* 276, 43958–43969.
- Koide, Y. and Sasaki, T. (2006). [Stanniocalcin-1 (STC-1) as a molecular marker for human cancer]. *Rinsho Byori* 54, 213–220.
- Kues, W. A., Sudheer, S., Herrmann, D., Carnwath, J. W., Havlicek, V., Besenfelder, U., Lehrach, H., Adjaye, J. and Niemann, H. (2008). Genome-wide expression profiling reveals distinct clusters of transcriptional regulation during bovine preimplantation development in vivo. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 105, 19768–19773.
- Lakshmanan, G., Lieuw, K. H., Lim, K. C., Gu, Y., Grosveld, F., Engel, J. D. and Karis, A. (1999). Localization of distant urogenital system-, central nervous system-, and endocardium-specific transcriptional regulatory elements in the GATA-3 locus. *Mol. Cell. Biol.* 19, 1558–1568.

- Lee, B., Yoon, S.-Y. and Fissore, R. A. (2006). Regulation of fertilization-initiated $[Ca^{2+}]_i$ oscillations in mammalian eggs: A multi-pronged approach. *Seminars in Cell & Developmental Biology* 17, 274–284.
- Leibfried-Rutledge, M. L., Critser, E. S., Eyestone, W. H., Northey, D. L. and First, N. L. (1987). Development potential of bovine oocytes matured in vitro or in vivo. *Biology of Reproduction* 36, 376–383.
- Lequarre, A.-S., Vigneron, C., Ribaucour, F., Holm, P., Donnay, I., Dalbiès-Tran, R., Callesen, H. and Mermillod, P. (2005). Influence of antral follicle size on oocyte characteristics and embryo development in the bovine. *Theriogenology* 63, 841–859.
- Liu, Z. and Foote, R. H. (1997). Effects of amino acids and α -amanitin on bovine embryo development in a simple protein-free medium. *Molecular Reproduction and Development* 46, 278–285.
- Liu, X. and Winey, M. (2012). The MPS1 family of protein kinases. *Annu. Rev. Biochem.* 81, 561–585.
- Liu, S.-T., Chan, G. K. T., Hittle, J. C., Fujii, G., Lees, E. and Yen, T. J. (2003). Human MPS1 kinase is required for mitotic arrest induced by the loss of CENP-E from kinetochores. *Molecular Biology of the Cell* 14, 1638–1651.
- Liu, G., Yang, G., Chang, B., Mercado-Urbe, I., Huang, M., Zheng, J., Bast, R. C., Lin, S.-H. and Liu, J. (2010). Stanniocalcin 1 and Ovarian Tumorigenesis. *J Natl Cancer Inst* 102, 812–827.
- Lodde, V., Modina, S., Galbusera, C., Franciosi, F. and Luciano, A. M. (2007). Large-scale chromatin remodeling in germinal vesicle bovine oocytes: interplay with gap junction functionality and developmental competence. *Mol. Reprod. Dev.* 74, 740–749.
- Lodde, V., Modina, S., Maddox-Hyttel, P., Franciosi, F., Lauria, A. and Luciano, A. M. (2008). Oocyte morphology and transcriptional silencing in relation to chromatin remodeling during the final phases of bovine oocyte growth. *Mol. Reprod. Dev.* 75, 915–924.
- Lonergan, P. and Fair, T. (2008). In vitro-produced bovine embryos—Dealing with the warts. *Theriogenology* 69, 17–22.
- Lonergan, P., Monaghan, P., Rzos, D., Boland, M. P. and Gordon, I. (1994). Effect of follicle size on bovine oocyte quality and developmental competence following maturation, fertilization, and culture in vitro. *Mol. Reprod. Dev.* 37, 48–53.
- Lorenzo, P. L., Illera, M. J., Illera, J. C. and Illera, M. (1994). Enhancement of cumulus expansion and nuclear maturation during bovine oocyte maturation in vitro by the addition of epidermal growth factor and insulin-like growth factor I. *J. Reprod. Fertil.* 101, 697–701.
- Lucy, M. C. (2007). The bovine dominant ovarian follicle. *J. Anim. Sci.*

- Lucy, M. C., Savio, J. D., Badinga, L., De La Sota, R. L. and Thatcher, W. W. (1992). Factors that affect ovarian follicular dynamics in cattle. *J. Anim. Sci.* 70, 3615–3626.
- Lussier, J. G., Matton, P. and Dufour, J. J. (1987). Growth rates of follicles in the ovary of the cow. *J. Reprod. Fertil.* 81, 301–307.
- Machatkova, M., Krausova, K., Jokesova, E. and Tomanek, M. (2004). Developmental competence of bovine oocytes: effects of follicle size and the phase of follicular wave on in vitro embryo production. *Theriogenology* 61, 329–335.
- Machatkova, M., Jeseta, M., Hulinska, P., Knitlova, D., Nemcova, L. and Kanka, J. (2012). Characteristics of Bovine Oocytes with Different Meiotic Competence in Terms of Their Mitochondrial Status and Expression of Nuclear-Encoded Factors. *Reprod. Domest. Anim.* 47, 806–814.
- Mamo, S., Carter, F., Lonergan, P., Leal, C. L., Al Naib, A., McGettigan, P., Mehta, J. P., Evans, A. C. and Fair, T. (2011). Sequential analysis of global gene expression profiles in immature and in vitro matured bovine oocytes: potential molecular markers of oocyte maturation. *BMC Genomics* 12, 151.
- Martens, J. A. and Winston, F. (2003). Recent advances in understanding chromatin remodeling by Swi/Snf complexes. *Current Opinion in Genetics & Development* 13, 136–142.
- Matthews, D. E., Hessler, R. A., Denslow, N. D., Edwards, J. S. and O'Brien, T. W. (1982). Protein composition of the bovine mitochondrial ribosome. *J. Biol. Chem.* 257, 8788–8794.
- May-Panloup, P., Chrétien, M. F., Jacques, C., Vasseur, C., Malthiery, Y. and Reynier, P. (2005). Low oocyte mitochondrial DNA content in ovarian insufficiency. *Hum. Reprod.* 20, 593–597.
- Meirelles, F. ., Caetano, A. ., Watanabe, Y. ., Ripamonte, P., Carambula, S. ., Merighe, G. . and Garcia, S. . (2004). Genome activation and developmental block in bovine embryos. *Animal Reproduction Science* 82–83, 13–20.
- Memili, E. and First, N. L. (1998). Developmental changes in RNA polymerase II in bovine oocytes, early embryos, and effect of alpha-amanitin on embryo development. *Mol. Reprod. Dev.* 51, 381–389.
- Memili, E., Dominko, T. and First, N. L. (1998). Onset of transcription in bovine oocytes and preimplantation embryos. *Molecular Reproduction and Development* 51, 36–41.
- Memili, E., Peddinti, D., Shack, L. A., Nanduri, B., McCarthy, F., Sagirkaya, H. and Burgess, S. C. (2007). Bovine germinal vesicle oocyte and cumulus cell proteomics. *Reproduction* 133, 1107–1120.

- Mermillod, P., Oussaid, B. and Cognié, Y. (1999). Aspects of follicular and oocyte maturation that affect the developmental potential of embryos. *J. Reprod. Fertil. Suppl.* 54, 449–460.
- Mermillod, P., Dalbiès-Tran, R., Uzbekova, S., Thélie, A., Traverso, J., Perreau, C., Papillier, P. and Monget, P. (2008). Factors Affecting Oocyte Quality: Who is Driving the Follicle? *Reproduction in Domestic Animals* 43, 393–400.
- Mills, G. B., Schmandt, R., McGill, M., Amendola, A., Hill, M., Jacobs, K., May, C., Rodricks, A. M., Campbell, S. and Hogg, D. (1992). Expression of TTK, a novel human protein kinase, is associated with cell proliferation. *J. Biol. Chem.* 267, 16000–16006.
- Minoshima, Y., Hori, T., Okada, M., Kimura, H., Haraguchi, T., Hiraoka, Y., Bao, Y.-C., Kawashima, T., Kitamura, T. and Fukagawa, T. (2005). The Constitutive Centromere Component CENP-50 Is Required for Recovery from Spindle Damage. *Mol. Cell. Biol.* 25, 10315–10328.
- Misirlioglu, M., Page, G. P., Sagirkaya, H., Kaya, A., Parrish, J. J., First, N. L. and Memili, E. (2006). Dynamics of global transcriptome in bovine matured oocytes and preimplantation embryos. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 103, 18905–18910.
- Monti, M., Zanoni, M., Calligaro, A., Ko, M. S. H., Mauri, P. and Redi, C. A. (2013). Developmental arrest and mouse antral not-surrounded nucleolus oocytes. *Biol. Reprod.* 88, 2.
- Murphy, M. G., Enright, W. J., Crowe, M. A., McConnell, K., Spicer, L. J., Boland, M. P. and Roche, J. F. (1991). Effect of dietary intake on pattern of growth of dominant follicles during the oestrous cycle in beef heifers. *J Reprod Fertil* 92, 333–338.
- Nadir, S., Saacke, R. G., Bame, J., Mullins, J. and Degelos, S. (1993). Effect of freezing semen and dosage of sperm on number of accessory sperm, fertility, and embryo quality in artificially inseminated cattle. *J. Anim. Sci.* 71, 199–204.
- Nemcova, L., Machatkova, M., Hanzalova, K., Horakova, J. and Kanka, J. (2006). Gene expression in bovine embryos derived from oocytes with different developmental competence collected at the defined follicular developmental stage. *Theriogenology* 65, 1254–1264.
- Nozaki, Y., Matsunaga, N., Ishizawa, T., Ueda, T. and Takeuchi, N. (2008). HMRF1L is a human mitochondrial translation release factor involved in the decoding of the termination codons UAA and UAG. *Genes Cells* 13, 429–438.
- Opiela, J., Lipiński, D., Słomski, R. and Katska-Ksiazkiewicz, L. (2010). Transcript expression of mitochondria related genes is correlated with bovine oocyte selection by BCB test. *Anim. Reprod. Sci.* 118, 188–193.
- Otoi, T., Yamamoto, K., Koyama, N., Tachikawa, S. and Suzuki, T. (1997). Bovine oocyte diameter in relation to developmental competence. *Theriogenology* 48, 769–774.

- Paciga, M., DiMattia, G. E. and Wagner, G. F. (2004). Regulation of luteal cell big stanniocalcin production and secretion. *Endocrinology* 145, 4204–4212.
- Pandolfi, P. P., Roth, M. E., Karis, A., Leonard, M. W., Dzierzak, E., Grosveld, F. G., Engel, J. D. and Lindenbaum, M. H. (1995). Targeted disruption of the GATA3 gene causes severe abnormalities in the nervous system and in fetal liver haematopoiesis. *Nature Genetics* 11, 40–44.
- Panov, K. I., Friedrich, J. K., Russell, J. and Zomerdijs, J. C. B. M. (2006). UBF activates RNA polymerase I transcription by stimulating promoter escape. *EMBO J.* 25, 3310–3322.
- Paradis, F., Vigneault, C., Robert, C. and Sirard, M.-A. (2005). RNA interference as a tool to study gene function in bovine oocytes. *Molecular Reproduction and Development* 70, 111–121.
- Pavlok, A., Lucas-Hahn, A. and Niemann, H. (1992). Fertilization and developmental competence of bovine oocytes derived from different categories of antral follicles. *Mol. Reprod. Dev.* 31, 63–67.
- Paynton, B. V. and Bachvarova, R. (1994). Polyadenylation and deadenylation of maternal mRNAs during oocyte growth and maturation in the mouse. *Mol. Reprod. Dev.* 37, 172–180.
- Peng, C., Zhou, J., Liu, H. Y., Zhou, M., Wang, L. L., Zhang, Q. H., Yang, Y. X., Xiong, W., Shen, S. R., Li, X. L., et al. (2006). The transcriptional regulation role of BRD7 by binding to acetylated histone through bromodomain. *J. Cell. Biochem.* 97, 882–892.
- Perez, G. I., Trbovich, A. M., Gosden, R. G. and Tilly, J. L. (2000). Reproductive biology: Mitochondria and the death of oocytes. *Nature* 403, 500–501.
- Pujol, M., López-Béjar, M. and Paramio, M. T. (2004). Developmental competence of heifer oocytes selected using the brilliant cresyl blue (BCB) test. *Theriogenology* 61, 735–744.
- Regassa, A., Rings, F., Hoelker, M., Cinar, U., Tholen, E., Looft, C., Schellander, K. and Tesfaye, D. (2011). Transcriptome dynamics and molecular cross-talk between bovine oocyte and its companion cumulus cells. *BMC Genomics* 12, 57.
- Reynier, P., May-Panloup, P., Chrétien, M.-F., Morgan, C. J., Jean, M., Savagner, F., Barrière, P. and Malthiery, Y. (2001). Mitochondrial DNA content affects the fertilizability of human oocytes. *Mol. Hum. Reprod.* 7, 425–429.
- Rieger, D. (1997). Batch analysis of the ATP content of bovine sperm, oocytes, and early embryos using a scintillation counter to measure the chemiluminescence produced by the luciferin-luciferase reaction. *Anal. Biochem.* 246, 67–70.
- Richter, J. D. (2007). CPEB: a life in translation. *Trends Biochem. Sci.* 32, 279–285.

- Rizos, D., Ward, F., Duffy, P., Boland, M. P. and Lonergan, P. (2002). Consequences of bovine oocyte maturation, fertilization or early embryo development in vitro versus in vivo: Implications for blastocyst yield and blastocyst quality. *Molecular Reproduction and Development* 61, 234–248.
- Roch, G. J. and Sherwood, N. M. (2011). Stanniocalcin Has Deep Evolutionary Roots in Eukaryotes. *Genome Biol Evol* 3, 284–294.
- Roche, J. (1996). Control and regulation of folliculogenesis--a symposium in perspective. *Reviews of Reproduction* 1, 19–27.
- Romek, M., Gajda, B., Rolka, M. and Smorąg, Z. (2011). Mitochondrial activity and morphology in developing porcine oocytes and pre-implantation non-cultured and cultured embryos. *Reprod. Domest. Anim.* 46, 471–480.
- Sagirkaya, H., Misirlioglu, M., Kaya, A., First, N. L., Parrish, J. J. and Memili, E. (2007). Developmental potential of bovine oocytes cultured in different maturation and culture conditions. *Animal Reproduction Science* 101, 225–240.
- Salamone, D. F., Adams, G. P. and Mapletoft, R. J. (1999). Changes in the cumulus-oocyte complex of subordinate follicles relative to follicular wave status in cattle. *Theriogenology* 52, 549–561.
- Savio, J. D., Keenan, L., Boland, M. P. and Roche, J. F. (1988). Pattern of growth of dominant follicles during the oestrous cycle of heifers. *J Reprod Fertil* 83, 663–671.
- Sheikh-Hamad, D. (2010). Mammalian stanniocalcin-1 activates mitochondrial antioxidant pathways: new paradigms for regulation of macrophages and endothelium. *Am J Physiol Renal Physiol* 298, F248–F254.
- Shourbagy, S. H. E., Spikings, E. C., Freitas, M. and John, J. C. S. (2006). Mitochondria directly influence fertilisation outcome in the pig. *Reproduction* 131, 233–245.
- Sirard, M. A. (2001). Resumption of meiosis: mechanism involved in meiotic progression and its relation with developmental competence. *Theriogenology* 55, 1241–1254.
- Sirard, M.-A. (2011). Follicle environment and quality of in vitro matured oocytes. *J. Assist. Reprod. Genet.* 28, 483–488.
- Sirard, M. A., Florman, H. M., Leibfried-Rutledge, M. L., Barnes, F. L., Sims, M. L. and First, N. L. (1989). Timing of nuclear progression and protein synthesis necessary for meiotic maturation of bovine oocytes. *Biol. Reprod.* 40, 1257–1263.
- Sirard, M.-A., Richard, F., Blondin, P. and Robert, C. (2006). Contribution of the oocyte to embryo quality. *Theriogenology* 65, 126–136.
- Sirois, J. and Fortune, J. E. (1988). Ovarian follicular dynamics during the estrous cycle in heifers monitored by real-time ultrasonography. *Biol. Reprod.* 39, 308–317.

- Sisco, B., Hagemann, L. J., Shelling, A. N. and Pfeffer, P. L. (2003). Isolation of Genes Differentially Expressed in Dominant and Subordinate Bovine Follicles. *Endocrinology* 144, 3904–3913.
- Song, J., Lee, Y.-G., Houston, J., Petroll, W. M., Chakravarti, S., Cavanagh, H. D. and Jester, J. V. (2003). Neonatal Corneal Stromal Development in the Normal and Lumican-Deficient Mouse. *IOVS* 44, 548–557.
- Stojkovic, M., Machado, S. A., Stojkovic, P., Zakhartchenko, V., Hutzler, P., Gonçalves, P. B. and Wolf, E. (2001). Mitochondrial distribution and adenosine triphosphate content of bovine oocytes before and after in vitro maturation: correlation with morphological criteria and developmental capacity after in vitro fertilization and culture. *Biol. Reprod.* 64, 904–909.
- Stucke, V. M., Silljé, H. H. W., Arnaud, L. and Nigg, E. A. (2002). Human Mps1 kinase is required for the spindle assembly checkpoint but not for centrosome duplication. *EMBO J.* 21, 1723–1732.
- Su, Y.-Q., Sugiura, K., Woo, Y., Wigglesworth, K., Kamdar, S., Affourtit, J. and Eppig, J. J. (2007). Selective degradation of transcripts during meiotic maturation of mouse oocytes. *Dev. Biol.* 302, 104–117.
- Subkhankulova, T. and Livesey, F. J. (2006). Comparative evaluation of linear and exponential amplification techniques for expression profiling at the single-cell level. *Genome Biology* 7, R18.
- Sutton, M. L., Gilchrist, R. B. and Thompson, J. G. (2003). Effects of in-vivo and in-vitro environments on the metabolism of the cumulus-oocyte complex and its influence on oocyte developmental capacity. *Hum. Reprod. Update* 9, 35–48.
- Tan, J.-H., Wang, H.-L., Sun, X.-S., Liu, Y., Sui, H.-S. and Zhang, J. (2009). Chromatin configurations in the germinal vesicle of mammalian oocytes. *Mol. Hum. Reprod.* 15, 1–9.
- Tarazona, A. M., Rodríguez, J. I., Restrepo, L. F. and Olivera-Angel, M. (2006). Mitochondrial activity, distribution and segregation in bovine oocytes and in embryos produced in vitro. *Reprod. Domest. Anim.* 41, 5–11.
- Thomas, R. E., Thompson, J. G., Armstrong, D. T. and Gilchrist, R. B. (2004). Effect of specific phosphodiesterase isoenzyme inhibitors during in vitro maturation of bovine oocytes on meiotic and developmental capacity. *Biol. Reprod.* 71, 1142–1149.
- Thouas, G. A., Trounson, A. O., Wolvetang, E. J. and Jones, G. M. (2004). Mitochondrial Dysfunction in Mouse Oocytes Results in Preimplantation Embryo Arrest in Vitro. *Biol Reprod* 71, 1936–1942.
- Tomek, W., Torner, H. and Kanitz, W. (2002). Comparative Analysis of Protein Synthesis, Transcription and Cytoplasmic Polyadenylation of mRNA during Maturation of Bovine Oocytes in vitro. *Reproduction in Domestic Animals* 37, 86–91.

- Torner, H., Brüßow, K.-P., Alm, H., Ratky, J., Pöhlend, R., Tuchscherer, A. and Kanitz, W. (2004). Mitochondrial aggregation patterns and activity in porcine oocytes and apoptosis in surrounding cumulus cells depends on the stage of pre-ovulatory maturation. *Theriogenology* 61, 1675–1689.
- Tremblay, G., Delbecchi, L., Loisel, M. C., Ster, C., Wagner, G. F., Talbot, B. G. and Lacasse, P. (2009). Serum levels of stanniocalcin-1 in Holstein heifers and cows. *Domestic Animal Endocrinology* 36, 105–109.
- Vallée, M., Gravel, C., Palin, M.-F., Reghenas, H., Stothard, P., Wishart, D. S. and Sirard, M.-A. (2005). Identification of Novel and Known Oocyte-Specific Genes Using Complementary DNA Subtraction and Microarray Analysis in Three Different Species. *Biol Reprod* 73, 63–71.
- Van Blerkom, J. (2009). Mitochondria in early mammalian development. *Seminars in Cell & Developmental Biology* 20, 354–364.
- Varghese, R., Wong, C. K. C., Deol, H., Wagner, G. F. and DiMattia, G. E. (1998). Comparative Analysis of Mammalian Stanniocalcin Genes. *Endocrinology* 139, 4714–4725.
- Vassena, R., Adams, G. P., Mapletoft, R. J., Pierson, R. A. and Singh, J. (2003). Ultrasound image characteristics of ovarian follicles in relation to oocyte competence and follicular status in cattle. *Anim. Reprod. Sci.* 76, 25–41.
- Wagner, G. F., Jaworski, E. M. and Haddad, M. (1998). Stanniocalcin in the seawater salmon: structure, function, and regulation. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* 274, R1177–R1185.
- Wang, L., Wang, D., Zou, X. and Xu, C. (2009). Mitochondrial functions on oocytes and preimplantation embryos. *J Zhejiang Univ Sci B* 10, 483–492.
- Wang, X., Marcinkiewicz, M., Gatain, Y., Bouchard, M., Mao, J., Tremblay, M., Uetani, N., Hanissian, S., Qi, S., Wu, J., et al. (2013). Investigation of Tissue-Specific Expression and Functions of MLF1-IP during Development and in the Immune System. *PLoS ONE* 8, e63783.
- Wrenzycki, C., Herrmann, D., Lucas-Hahn, A., Korsawe, K., Lemme, E. and Niemann, H. (2005). Messenger RNA expression patterns in bovine embryos derived from in vitro procedures and their implications for development. *Reprod. Fertil. Dev.* 17, 23–35.
- Xie, D., Chen, C.-C., Ptaszek, L. M., Xiao, S., Cao, X., Fang, F., Ng, H. H., Lewin, H. A., Cowan, C. and Zhong, S. (2010). Rewirable gene regulatory networks in the preimplantation embryonic development of three mammalian species. *Genome Res.* 20, 804–815.
- Xu, Z., Garverick, H. A., Smith, G. W., Smith, M. F., Hamilton, S. A. and Youngquist, R. S. (1995). Expression of follicle-stimulating hormone and luteinizing hormone receptor messenger ribonucleic acids in bovine follicles during the first follicular wave. *Biol. Reprod.* 53, 951–957.

- Yamamoto, T., Iwata, H., Goto, H., Shiratuki, S., Tanaka, H., Monji, Y. and Kuwayama, T. (2010). Effect of maternal age on the developmental competence and progression of nuclear maturation in bovine oocytes. *Molecular Reproduction and Development* 77, 595–604.
- Ying, S., Shiraishi, A., Kao, C. W.-C., Converse, R. L., Funderburgh, J. L., Swiergiel, J., Roth, M. R., Conrad, G. W. and Kao, W. W.-Y. (1997). Characterization and Expression of the Mouse Lumican Gene. *J. Biol. Chem.* 272, 30306–30313.
- Yogosawa, S., Kayukawa, K., Kawata, T., Makino, Y., Inoue, S., Okuda, A., Muramatsu, M. and Tamura, T. (1999). Induced Expression, Localization, and Chromosome Mapping of a Gene for the TBP-Interacting Protein 120A. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 266, 123–128.
- Zeng, F., Baldwin, D. A. and Schultz, R. M. (2004). Transcript profiling during preimplantation mouse development. *Dev. Biol.* 272, 483–496.
- Zeuner, A., Müller, K., Reguszynski, K. and Jewgenow, K. (2003). Apoptosis within bovine follicular cells and its effect on oocyte development during in vitro maturation. *Theriogenology* 59, 1421–1433.
- Zheng, W. and Flavell, R. A. (1997). The Transcription Factor GATA-3 Is Necessary and Sufficient for Th2 Cytokine Gene Expression in CD4 T Cells. *Cell* 89, 587–596.
- Zheng, J., Yang, X., Harrell, J. M., Ryzhikov, S., Shim, E.-H., Lykke-Andersen, K., Wei, N., Sun, H., Kobayashi, R. and Zhang, H. (2002). CAND1 Binds to Unneddylated CUL1 and Regulates the Formation of SCF Ubiquitin E3 Ligase Complex. *Molecular Cell* 10, 1519–1526.
- Zhou, J., Ma, J., Zhang, B.-C., Li, X.-L., Shen, S.-R., Zhu, S.-G., Xiong, W., Liu, H.-Y., Huang, H., Zhou, M., et al. (2004). BRD7, a novel bromodomain gene, inhibits G1–S progression by transcriptionally regulating some important molecules involved in ras/MEK/ERK and Rb/E2F pathways. *Journal of Cellular Physiology* 200, 89–98.

11.1 Elektronické zdroje

Gene Ontology Consortium Classifications [online]. Dostupné z <http://www.geneontology.org/>

NCBI public database [online]. Dostupné z (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>

The Jackson laboratory: Mouse Genome Informatics [online]. Dostupné z <http://www.informatics.jax.org/javawi2/servlet/WIFetch?page=alleleDetail&key=624227>

The Jackson laboratory: Mouse Genome Informatics [online]. Dostupné z <http://www.informatics.jax.org/javawi2/servlet/WIFetch?page=alleleDetail&key=571550>

Uniprot Consortium: Uniprot [online]. Dostupné z <http://www.uniprot.org/>

12 Seznam příloh

- Příloha č. 1 – Složení médií a roztoků
- Příloha č. 2 – Morfologické znaky nematurovaných oocytů bez atrézie CC a nematurovaných oocytů s mírnou atrézií CC (*obrázek*)
- Příloha č. 3 – Seznam 50 genů vybraných z mikročipu zvýšených v oocytech izolovaných z MF oproti oocytům izolovaným z SF (*tabulka*)
- Příloha č. 4 – Seznam 11 genů vybraných z mikročipu snížených v oocytech izolovaných z MF oproti oocytům izolovaným z SF (*tabulka*)

Příloha č. 1 – Složení médií a rozotků

MPM/PVA izolační médium

Pyruvát sodný	40 mg
HEPES	400 mg
L-Glutamin	20 mg
d-Penicilamin/Streptomycin (10000 u + 10 mg/ml)	1 ml
Amphotericin B (250 µl/ml)	50 µl
H199	18,8 ml
NaHCO ₃ 7,5%	3,2 ml
Polyvinylalkohol	600 mg
dH ₂ O doplnit do	200 ml

MPM zrací kultivační medium

Laktát vápenatý	100 mg
Pyruvát sodný	40 mg
HEPES	300 mg
L-Glutamin	20 mg
d-Penicilamin/Streptomycin (10000 u + 10 mg/ml)	1 ml
Amphotericin B (250 µl/ml)	50 µl
H199	16,8 ml
NaHCO ₃ 7,5%	7,8 ml
dH ₂ O doplnit do	200 ml

MPM zrací kultivační medium - základ

8,5 ml MPM + 1,5 ml OBS

MPM – kultivační komplet na jednu jamku

MPM zrací kultivační medium – základ	0,5ml
P.G.600	12,5µl

FM fertilizační medium

Laktát vápenatý	70 mg
Pyruvát sodný	20mg
HEPES	150mg

Chlorid sodný	640 mg
Chlorid draselný	40 mg
Síran hořečnatý heptahydrát	9,7 mg
Dihydrogenfosforečnan draselný	7 mg
PVA	100mg
d-Penicilamin/Streptomycin (10000 + 10 mg/ml)	0,5 ml
Amphotericin B (250 µl/ml)	25 µl
Glukóza	250 mg
NaHCO ₃ 7,5%	5 ml
Fenol red 0,5%	200 µl
dH ₂ O doplnit do	100ml

FM kapacitační medium - základ

5 ml FM fertilizační médium + 7,5 mg BSA

FM na jednu jamku

FM kapacitační médium - základ	0,5 ml
Oestrální bovinní serum	10 µl
D-penicillamin	12,5 µl
Heparin	5 µl

Použité roztoky

PBS koncentrovaný 10x

NaCl	10 g
KCl	0,25 g
Na ₂ HPO ₄ ·12H ₂ O	1,44 g
KH ₂ PO ₄	0,25 g
H ₂ O doplnit do	100 ml
Úprava pH = 7,2	

PBS pufr 1x

PBS koncentrát	10 ml
H ₂ O	90 ml

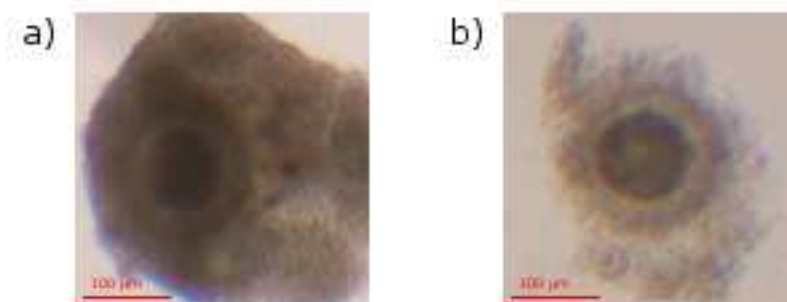
TBE pufr 10x

Tris base	108 g
Kyselina boritá	55 g
EDTA	3,7 g
H ₂ O doplnit do	1000 ml
Úprava pH = 7,2	

TBE pufr 1x

TBE pufr 10x	100 ml
H ₂ O doplnit do	1000 ml

Příloha č. 2 – Morfologické znaky nematurovaných oocytů bez atrézie CC a nematurovaných oocytů s mírnou atrézií CC



a) Oocyty izolované z SF bez atrézie CC; b) oocyty izolované z SF s mírnou atrézií CC;
Obrázek převzat od MVDr. Pavlínny Hulínské a upraven pro potřeby této práce.

Příloha č. 3 – Seznam 50 genů vybraných z mikročipu zvýšených v oocytech izolovaných z MF oproti oocytům izolovaným z SF

Zkratka genu	Název proteinu
<i>THAP9</i>	THAP9 protein
<i>KIF23</i>	Kinesin-like protein KIF23
<i>NGDN</i>	Neuroguidin
<i>METTL18</i>	Methyltransferase-like protein 18
<i>MLF1IP</i>	MLF1IP-interacting protein
<i>SCFD1</i>	Sec1 family domain-containing protein 1
<i>KTN1</i>	Kinectin
<i>NUP155</i>	Nuclear pore complex protein Nup155
<i>DSCC1</i>	Sister chromatid cohesion protein DCC 1
<i>TUBD1</i>	Tubulin delta1 chain
<i>CEPT</i>	Choline/ethanolaminephosphotransferase
<i>KIF18A</i>	Kinesin-like protein KIF18A
<i>PAICS</i>	Multifunctional protein ADE2
<i>MPHOSPH6</i>	M-phase phosphoprotein 6
<i>NUP54</i>	Nucleoporin p54
<i>MRPL47</i>	39S ribosomal protein L47, mitochondrial
<i>PABPC1</i>	Polyadenylate-binding protein 1
<i>BRD7</i>	Bromodomain-containing protein 7
<i>CCZ1</i>	Vacuolar Psion protein CCZ1 homolog
<i>TAF1A</i>	TATA box-binding protein-associated factor RNA polymerase I subunit A
<i>ZDHHC13</i>	Zinc finger DHHC domain-containing protein 13
<i>MRE11A</i>	Meiotic recombination 11 homolog 1
<i>PPIL4</i>	Peptidyl-prolyl cis-trans isomerase-like 4
<i>OSBPL9</i>	Oxysterol-binding protein-related protein 9
<i>C9H17ORF42</i>	Transcription elongation factor
<i>PPP2CA</i>	Serine/threonine-protein phosphatase 2A catalytic subunit alpha isoform
<i>ZNF665</i>	Zinc finger protein 665
<i>LOC492809</i>	hypothetical protein LOC492809
<i>ARF4</i>	ADP-ribosylation factor 4
<i>NCK1</i>	Cytoplasmic protein NCK1
<i>SMAD2</i>	Mothers against decapentaplegic homolog 2
<i>TTK</i>	Phosphotyrosine picked threonine-protein kinase
<i>MNAT1</i>	Menage a trois homolog 1
<i>ZFAND5</i>	Zinc finger A20 domain-containing protein 2
<i>EIF3E</i>	Eukaryotic translation initiation factor 3 subunit E
<i>CAND1</i>	Cullin-associated NEDD8-dissociated protein 1
<i>NFYB</i>	Nuclear transcription factor Y subunit beta
<i>LOC783507</i>	Hypothetical protein LOC783507

<i>RIT1</i>	GTP-binding protein Rit1
<i>BORA</i>	Protein aurora borealis
<i>GTF2B</i>	General transcription factor TFIIB
<i>BLZF1</i>	Basic leucine zipper nuclear factor 1
<i>ACOT9</i>	Acyl-coenzyme A thioesterase 9
<i>NHLRC2</i>	NHL repeat containing protein 2
<i>SERINC1</i>	Serine incorporator 1
<i>MAD2L1</i>	Mitotic spindle assembly checkpoint protein MAD2A
<i>NEDD1</i>	Neural precursor cell expressed developmentally down-regulated protein 1
<i>NPM1</i>	Nucleophosmin
<i>PRPF18</i>	PRP18 pre-mRNA processing factor 18 homolog

V tabulce je zobrazeno pouze 49 genů, protože jeden gen (*EIF3P48*) byl na mikročipu duplikován.

Příloha č. 4 – Seznam 11 genů vybraných z mikročipu snížených v oocytech izolovaných z MF oproti oocytům izolovaným z SF

Zkratka genu	Název proteinu
<i>CHD7</i>	Chromodomain-helicase-DNA-binding protein 7
<i>PRKD2</i>	Serine/treonine-protein kinase D2
<i>UBTF</i>	Upstream-binding factor1
<i>UBL5</i>	Ubiquitin-like protein 5
<i>MAP3K13</i>	Mitogen-activated protein kinase kinase kinase 13
<i>RIMS2</i>	Regulating synaptic membrane exocytosis 2
<i>GATA3</i>	GATA binding protein 3
<i>HIC2</i>	Hypermethylated in cancer 2 protein
<i>ORF</i>	- (<i>open reading frame, unknown protein</i>)
<i>CHD2</i>	Chromodomain-helicase-DNA-binding protein 2
<i>TRIO</i>	Triple functional domain protein