

**Univerzita Karlova v Praze**

**Přírodovědecká fakulta**

**Vývojová biologie**



**Genová exprese v průběhu expanze  
oocyt-kumulárních komplexů a časného  
embryonálního vývoje savců**

**Dizertační práce 2008**

Ing. Lucie Němcová

Školitel: RNDr. Jiří Kaňka, DrSc.



Dizertační práci jsem vypracovala na Ústavu živočišné fyziologie a genetiky Akademie věd České republiky, v.v.i., v Liběchově.  
Prohlašuji, že jsem nepředložila dizertační práci ani její podstatnou část k získání jiného nebo stejného akademického titulu.



Poděkování.....

Svému školiteli, RNDr. Jiřímu Kaňkovi, DrSc. za podporu, kterou mi poskytl během studia.

MVDr. Radkovi Procházkovi, CSc. za zajímavé téma, k jehož řešení mne přizval.

Všem svým spolupracovnícím a spolupracovníkům, bez jejichž pomoci by se nemohly některé pokusy uskutečnit.

Věnování.....

Mým holčičkám a mému muži, s vděčností za pochopení a toleranci chvílí, ve kterých jsem i v rodinném kruhu dávala přednost vědě.



# OBSAH

---

---

<b>1</b>	<b>ÚVOD</b> .....	<b>1</b>
<b>1.2</b>	<b>OOGENEZE, FOLIKULOGENEZE, ČASNÝ EMBRYONÁLNÍ VÝVOJ</b> .....	<b>2</b>
1.2.1	VÝVOJ OVARIÍ.....	2
1.2.2	ČASNÝ EMBRYONÁLNÍ VÝVOJ.....	4
<b>1.3</b>	<b>GENOVÁ EXPRESE</b> .....	<b>5</b>
1.3.1	PREOVULAČNÍ FOLIKUL .....	5
1.3.2	ČASNÝ EMBRYONÁLNÍ VÝVOJ.....	6
1.3.3	MOLEKULÁRNÍ ZÁKLAD PŘECHODU MEZI VYUŽITÍM MATERNÁLNÍHO A EMBRYONÁLNÍHO GENOMU .....	8
<b>1.4</b>	<b>METODY STUDIA GENOVÉ EXPRESE</b> .....	<b>11</b>
1.4.1	STUDIA GENOVÉ EXPRESE NA ÚROVNI JEDNOTLIVÝCH RNA .....	11
1.4.2	KVANTIFIKACE GENOVÉ EXPRESE.....	12
1.4.2.1	Polymerázová řetězová reakce (PCR a RT-PCR).....	12
1.4.2.2	Real-time RT-PCR .....	13
<b>2</b>	<b>CÍLE PRÁCE</b> .....	<b>14</b>
<b>3</b>	<b>SOUHRN VÝSLEDKŮ A KOMENTÁŘE K VYBRANÝM PUBLIKACÍM</b> .....	<b>15</b>
<b>3.1</b>	<b>PUBLIKACE V IMPAKTOVANÝCH ČASOPISECH</b> .....	<b>18</b>
3.1.1	Expression of Growth Differentiation Factor 9 Messenger RNA in Porcine Growing and Preovulatory Ovarian Follicles. ....	18
3.1.2	Partial molecular characterization and mapping of the GDF9 gene to porcine chromosome 2. ....	18
3.1.3	Molecular Mechanisms of Insulin-Like Growth Factor 1 Promoted Synthesis and Retention of Hyaluronic Acid in Porcine Oocyte-Cumulus Complexes. ...	19
3.1.4	Temporal sensitivity of bovine embryos to culture environment after fertilization and the implications for blastocyst quality. ....	21
3.1.5	Gene expression in bovine embryos derived from oocytes with different developmental competence collected at the defined follicular developmental stage.....	22
<b>3.2</b>	<b>PUBLIKACE PŘIPRAVOVANÉ K TISKU</b> .....	<b>23</b>
3.2.1	Alterations in abundance of gene transcripts during bovine preimplantation development.....	23
3.2.2	Identification and characterisation of gene transcripts during preimplantation embryo development in bovine.....	25
<b>4</b>	<b>SHRNUTÍ</b> .....	<b>31</b>
<b>5</b>	<b>CITOVANÁ LITERATURA</b> .....	<b>33</b>
<b>6</b>	<b>SEZNAM PUBLIKACÍ</b> .....	<b>39</b>
<b>7</b>	<b>SEZNAM PREZENTACÍ</b> .....	<b>40</b>
<b>8</b>	<b>PŘÍLOHY</b> .....	<b>40</b>

# 1 ÚVOD

---

---

Produkce savčích embryí v podmínkách *in vitro* zahrnuje řadu aplikací. Stala se užitečnou nejen pro základní výzkum, ale také pro oblast šlechtitelských programů i produkci geneticky modifikovaných (transgenních) zvířat. Možnost uplatnění terapeuticky ceněných embryonálních kmenových buněk v regenerativní medicíně, léčení neplodností v humánní medicíně a využití přenosu jader (klonování) při záchraně ohrožených druhů zvířat jsou další aplikace, které by se neobešly bez optimálních kultivačních systémů, zaručujících vznik kvalitního a životaschopného embrya.

Prozatím metoda *in vitro* kultivace embryí dosahuje nízké procento úspěšnosti v porovnání s vývojem embryí *in vivo*. Například u skotu, zatímco až 80% oocytů izolovaných z folikulů je schopno maturovat a být oplodněno v podmínkách *in vitro*, většina vzniklých embryí zastaví svůj vývoj již brzy po prvním dělení. Procento úspěšnosti vývoje do blastocysty se pohybuje mezi 30–40%, a navíc pouze polovina takto připravených embryí je schopna po přenosu do recipientních samic implantovat. Během děložního vývoje pak dochází k dalším ztrátám, část narozených jedinců trpí zvýšenou hmotností a řadou anatomických vad (Lonergan et al. 2003b).

Embrya produkovaná *in vitro* vykazují nižší vývojový potenciál a biochemické i metabolické odlišnosti od embryí, vzniklých přirozenou cestou. Modifikace podmínek nejen pro kultivaci embryí, ale i pro dozrávání a oplodnění oocytů má zásadní vliv na expresi genů během časného vývoje (Lonergan et al. 2003a, Lonergan et al. 2006, Wrenzycki et al. 2007, Lonergan et al. 2008), což má za následek ovlivnění kvality vzniklých blastocyst. Modifikace kultivačních médií má za následek výrazné ovlivnění chování, anatomie a expresního profilu také u dospělých jedinců (Ruddock-D’Cruz et al. 2007). Vysoké procento neúspěšnosti je také dáno rozdílnou kvalitou oocytů, které jsou izolovány z ovarii a vybírány pro následné kultivace (Mermillod et al. 1999).

Každé stádium růstu folikulu, oocytu a embryonálního vývoje je charakterizováno časově i prostorově vymezeným spuštěním exprese řady genů, jejichž transkripce musí být přísně kontrolována.

Naše znalosti genů, které jsou aktivní v průběhu normálního vývoje oocytu i embrya hospodářských zvířat jsou limitovány. Identifikace těchto genů a charakterizace



profilu jejich exprese poskytuje informace o procesech, důležitých pro úspěšný embryonální vývoj.

Věříme, že výsledky našich studií prohloubí porozumění rozhodujících faktorů ve vývoji oocyty a embrya a napomohou ke stanovení kritérií pro posouzení jejich kvality a k optimalizaci kultivačních podmínek

## **1.2 OOGENEZE, FOLIKULOGENEZE, ČASNÝ EMBRYONÁLNÍ VÝVOJ**

### **1.2.1 VÝVOJ OVARIÍ**

V určité fázi embryonálního vývoje se objevuje v extraembryonální části embrya (epiblastu) linie buněk, které se barví alkalickou fosfatázou. Jejich utváření je řízeno expresí genů z nadrodiny transformačních růstových faktorů beta (transforming growth factors-beta, TGF $\beta$ ), zejména morfogenetických proteinů kostní tkáně (bone morphogenetic proteins) BMP4 a BMP8 (Ying et al. 2001). Tyto tzv. primordiální zárodečné buňky intenzivně proliferují a cestují na dorzální stranu prvostřeva do oblasti genitální lišty (nediferencované gonády). Migrace je řízena vzájemnou interakcí mezi KIT tyrosin-kinázovým receptorem na jejich povrchu a KIT ligandem (KL/STEEL/SCF, Joyce et al. 1999), exprimovaným na povrchu somatických buněk obklopujících cestující buňky. Pro utváření zárodečných buněk je nutná exprese oocytárního transkripčního faktoru FIGalpha (factor in germline alpha), který reguluje v pozdějších stádiích transkripci řady dalších genů, nezbytných pro oocyt, např. proteinů, tvořících zonu pellucidu (Soyal et al. 2000).

Zárodečné buňky se dále mitoticky dělí, stejně tak proliferují i somatické buňky diferencované z mezenchymu genitální lišty (budoucí folikulární epiteliální buňky, tzv. granulózní buňky). Samičí oogonia, obklopená jednou vrstvou plochých, málo diferencovaných somatických buněk, tvoří primordiální folikuly. Zárodečné buňky vstupují do meiotického dělení a oocyt je zastaven v diktyotenním stádiu prvního dělení, obsahuje relativně velké jádro, tzv. zárodečný váček (germinal vesicle, GV).

Přechod k primárnímu oocyty a následující růst primárních folikulů je ovlivňován řadou cytokinů a růstových faktorů, mezi které řadíme např. růstový diferencující faktor 9

(growth differentiating factor 9, GDF9) , morfogenetický protein kostní tkáně 15 (BMP15, též GDF9B) (Knight et Glister 2006). Ranný preantrální folikulární růst, nezávislý na gonadotropinech, je charakterizován zejména dramatickým nárůstem proliferace granulózních buněk. Mění svůj tvar, stávají se kulovitými, syntetizují FSH receptory a receptory pro steroidní hormony. Vznik sekundárního (preantrálního) folikulu je asociován s detekcí první RNA syntézy v oocytu (Fair et al. 1997). Oocyt je obklopen již několika vrstvami těsně přiléhajících granulózních buněk, které s ním zůstávají v kontaktu pomocí speciálních spojů procházejících přes glykoproteinový obal (zona pellucida). Zároveň somatické buňky, přiléhající k vnější části folikulu, diferencují ve speciální buňky, tvořící vnější obal (tzv. theca folliculi interna a theca folliculi externa).

Vznik terciálního (antrálního folikulu) je iniciován odpovědí granulózních buněk na uvolnění FSH hypofýzou do krevního systému. V mezibuněčných prostorech se akumuluje tekutina, vytváří se centrální dutina (antrum), kumulární buňky jsou odděleny od granulózních a obklopují oocyt, který zůstává ve stádiu zárodečného vajíčku. Komunikují s oocytem a mezi sebou pomocí kanálků, tzv. gap junctions, kterými prochází nízkomolekulární sloučeniny (ionty, metabolity, aminové kyseliny, nukleotidy), či prostřednictvím parakrinních faktorů uvolňovaných oocytem. Granulózní buňky, nacházející se na periferii, končí svou proliferaci, začínají exprimovat LH receptory a vykazují vysokou produkci steroidních hormonů. Buňky těsně přiléhající k oocytu naopak intenzivně proliferují, tvoří LH receptory a vykazují nízkou steroidogenezi (Eppig 2001). Teprve plně dorostlé oocyty jsou schopny zahájit meiotické zrání a postoupit do druhého metafázního (MII) bloku v podmínkách *in vitro*, získávají meiotickou kompetenci (Sun et Nagai 2003).

Poslední stádia folikulárního vývoje se uskutečňují ve vlnách (skot, prase, ovce, koza, kůň) nebo v určitých periodách reprodukční aktivity (velbloud, lamy). Preovulační perioda nastává *in vivo* po nárůstu koncentrace LH v krvi. U prasete probíhá proces selekce folikulů během terciálního stádia růstu a vývoje kontinuálně. Většina folikulů později zaniká (subordinantní folikuly), naproti tomu vyselektované folikuly (dominantní folikuly), jejichž počet je závislý na druhu zvířete, pokračují v růstu. Oocyt v dominantním folikulu znovuzahájí meiózu, kumulární buňky intenzivně expandují. Kolem oocytu se utváří hustá mukoproteinová síť, tvořená zejména hylauronovou kyselinou a dalšími proteiny, stabilizujícími tuto matrix. Expandovaný oocyt-kumulární komplex je po prasknutí folikulární stěny vypuzen z ovaria. Periferní granulózní buňky zůstávají ve folikulu a spolu

s buňkami theca folliculi tvoří žluté tělísko, které produkuje vysoké množství progesteronu nutného pro úspěšnou implantaci a zachování březosti.

### **1.2.2 ČASNÝ EMBRYONÁLNÍ VÝVOJ**

Preimplantační embryonální vývoj savců zahrnuje úsek od oplození oocyту do utvoření blastocysty. Během této relativně krátké doby embryo prochází několika buněčnými děleními, aniž by se měnil jeho celkový objem, jednotlivé blastomery jsou zpočátku totipotentní. Dochází k řadě morfologických i metabolických změn.

Z hlediska stavby embrya k nejdůležitější události dochází při kompaktaci ve stádiu mnohobuněčné moruly, kdy jednotlivé blastomery přecházejí do těsného kontaktu. V této fázi se také vnější povrchové buňky, nacházející se pod zonou pellucida, zvětšují a polarizují, tvoří základ budoucího trofoblastu. Vnitřní buňky jsou malé, v oblasti kontaktů se exprimují adhezní proteiny z rodiny kadherinů a kateninů (Kan et al. 2007). Jednotlivé buňky spolu začínají komunikovat pomocí gap junctions, tvořených proteiny z rodiny konexinů (Houghton 2005).

Během dalších dělení nastává diferenciacе blastomer, vnější buňky se zplošťují, získávají charakteristiku epiteliálních buněk, utváří se transportní systém, kterým je pumpována tekutina do mezibuněčných prostor. Vzniká kulovitá struktura s dutinou, blastocysta, v níž již nacházíme dva odlišné typy buněk, rozdílné morfologickými, imunologickými, endokrinologickými a metabolickými vlastnostmi. Jednobuněčná vrstva tvořící stěnu blastocysty, trofektoderm (TE), v pozdější fázi diferencuje v placentu. Buňky uvnitř blastocysty, pluripotentní inner cell mass (ICM), vytváří základ celého embrya a budoucího žloutkového váčku. V této fázi vývoje hrají důležitou roli proteiny z rodiny aquaporinů a enzymy Na/K-ATPázového komplexu, lokalizovaného na membráně trofektodermu (Watson et al. 2004). Dochází k dalšímu nárůstu v expresi mRNA pro proteiny těsných (tight junctions) spojů a gap junctions (Boni et al. 1999). Po vstupu do dělohy vnější obal (zona pellucida) expandované blastocysty praská a embryo implantuje do endometria. Preimplantační vývoj u různých druhů savců se většinou liší délkou trvání jednotlivých stádií, u ovcí, prasat i skotu dochází v porovnání s myší k prodloužení stádia blastocysty a k navýšení počtu a velikosti buněk. (Lee et DeMayo 2004).

## **1.3 GENOVÁ EXPRESE**

### **1.3.1 PŘEOVULAČNÍ FOLIKUL**

Vývoj antrálního folikulu je závislý na vzájemné kooperaci gonadotropních hormonů a intraovariálních signálů. Oocyt hraje v této regulaci aktivní úlohu. Částečně tak, že sekretuje rozpustné parakrinní růstové faktory, působící na sousedící granulózní buňky, které zpětně ovlivňují vývoj oocytu. Reguluje chování buněk ve své bezprostřední blízkosti, řídí ustanovení kumulárních buněk a brání jejich předčasné luteinizaci (Vanderhyden 2002). Exprimuje růstové faktory, umožňující expanzi kumulárních buněk a ovlivňující utváření a stabilitu extracelulární matrix. Zároveň kumulární buňky vytváří prostředí vhodné pro úspěšnou maturaci a fertilizaci oocytu. Mezi všemi buňkami ve folikulu probíhá intenzivní komunikace (Gilchrist 2004).

Oocyt je v přirozeném prostředí folikulu udržován v meiotickém bloku specifickými faktory. Znovuzahájení meiózy je bráněno vysokou hladinou cAMP (cyklický adenosin-3',5'-monofosfát), produkovaným endogenně oocytem enzymem adenylyl cyklázou (Mehlmann 2005) či uvolňovaným z kumulárních buněk a přenášeným do oocytu pomocí mezibuněčných spojů, tvořených konexiny (Kidder et Mhawi 2002).

Přesný mechanismus, kterým je navozeno znovuzahájení meiózy není plně prozkoumán. Na uvolnění LH z hypofýzy reagují thekální i granulózní buňky expresí růstových faktorů, působících parakrinně na kumulární buňky obklopující oocyt. V nedávné době byly identifikovány EGF-podobné proteiny (EGF-like proteiny), produkované granulózními buňkami po stimulaci LH. Amphiregulin (AR), epiregulin (ER) a betacellulin (BTC) patří mezi kandidátní molekuly, na myším modelu indukují po navázání na specifické EGF-receptory na kumulárních buňkách expresi genů, potřebných pro syntézu a stabilizaci extracelulární matrix (Park et al. 2004). Nejdůležitějšími enzymy jsou hyaluronansyntetáza (HAS2), kontrolující produkci hyaluronové kyseliny (HA), a prostaglandinsyntetáza (PTGS2) nebo-li cyklooxygenáza 2 (COX2), regulující tvorbu prostaglandinů v kumulárních buňkách. Hyaluronan tvoří základní kostru extracelulární matrix, stabilizovanou HA vázícími proteiny, mezi které patří např. inter-alpha-trypsin inhibitor (IalphaI), tumor necrosis factor alpha-induced protein 6 (TNFAIP6), chondroitin proteoglycan sulfate (CGS2 neboli versikan) či pentraxin 3 (PTX3) (Richards 2005).

Oocyt-kumulární komplexy expandují, následně dojde k uzavření komunikační cesty mezi oocytem a obklopujícími kumulárními buňkami nebo je navozena exprese steroidů, meiózu aktivujících látek či jiných faktorů s možnou úlohou při indukci meiotické maturace (Buccione et al. 1990). Uzavření gap junctions mezi oocytem a somatickými buňkami, tím k přerušení toku buď cAMP nebo faktoru inhibující meiózu po stimulaci gonadotropiny, je pravděpodobně jedním z induktorů dokončení meiotického zrání. Jiná signální dráha může vést přes receptory spojenými s G proteiny GPCRs/Gs na povrchu oocytu. Po vazbě meiózu aktivační látky dojde k inhibici aktivity adenylyl cyklázy nebo k aktivaci specifické cAMP fosfodiesterázy (PDE4) štěpící cAMP (Mehlmann 2005). Pokles intraoocytárního cAMP vede aktivaci proteinkinázy A (PKA), která fosforyluje klíčové enzymy meiotického dělení (Richards et al. 1998).

Oocyt během své růstové fáze akumuluje mRNA a proteiny, důležité nejen pro dokončení meiózy a oplození, ale i pro časná embryonální dělení a úspěšnou implantaci blastocysty do dělohy. Hraje klíčovou roli ve vyživování embrya až do doby, kdy dojde k přechodu z maternální na embryonální (zygotickou) expresi genů (Sirard 2001).

### **1.3.2 ČASNÝ EMBRYONÁLNÍ VÝVOJ**

Během zrání oocytu dochází při přechodu do stádia metafáze druhého buněčného dělení k utlumení transkripce i translace. Po úspěšném oplození oocyt dokončuje druhé meiotické dělení, vzniklá zygota obsahuje jedno haploidní prvojádro, pocházející z oocytu a jedno haploidní prvojádro, pocházející ze spermie. Po utvoření jaderného obalu proběhne v každém prvojádre DNA replikace. Navíc dochází k řadě změn jaderných i chromatinových struktur, vedoucích k dramatické reprogramaci genové exprese (Kanka 2003).

V řadě prvotních studiích genové exprese byla používána inkorporace radioaktivně značených aminokyselin či nukleotidů s následným autoradiografickým vyhodnocením. Kultivace myšího embrya s (<sup>35</sup>S)-methioninem prokázaly značení na úrovni 2-buněčného embrya (Flach et al. 1982). Nukleotidový prekursor (<sup>3</sup>H)-uridin je využíván RNA polymerázami a začleňován do nově syntetizovaných RNA. První studie s jeho inkorporací do jádra i jádérka a na ni navazující transmisní elektronovou mikroskopickou (TEM)

autoradiografií detekovaly syntézu nové RNA v 8–16-buněčném bovinním (Camous et al. 1986) a 4-buněčném prasečím (Kopečný et al. 1989) stádiu. Kultivace s BrUTP (5-bromouridin-5'-trifosfát) s následnou vizualizací inkorporovaného nukleotidu pomocí protilátky je další metodou, využívanou ke stanovení hladiny celkové exprese. U myši byla transkripce prokázána dokonce ještě před prvním dělením zygoty na úrovni 1-buněčného stádia (Bouniol et al. 1995). Aoki et al. (1997) prokázali, že existují rozdíly i mezi transkripční aktivitou samčího a samičího prvojádra. Použitím dlouhodobé kultivace s (<sup>3</sup>H)-uridinem mezi 2–4-buněčným stádiem embrya skotu s následnou izolací RNA a autoradiografií byla prokázána inkorporace nukleotidu do nové RNA také časněji (Viuff et al. 1996). Dokonce byla transkripční aktivita detekována i v 1-buněčném embryu (Memili et First 2000).

K aktivaci embryonálního genomu (embryonic genome activation, EGA) dochází pravděpodobně postupně, ve dvou fázích. Některé geny jsou aktivovány časněji, během tzv. minoritní aktivace genů (minor genome activation). Řada dalších je aktivována v pozdějších stádiích dělení, během tzv. majoritní aktivace genů (major genome activation) (Latham et Schultz 2001). Hamatani et al. 2004 detekovali pomocí mikročipů ještě třetí nárůst genové exprese na úrovni přechodu mezi stádiem moruly a blastocysty, tzv. mid-preimplantation genome activation, kdy se exprimují zejména geny regulující diferenciaci buněk a ustanovení dvou odlišných struktur blastocysty.

Ve studiích genové exprese se používají inhibitory transkripce, přidávané do kultivačních médií. Alfa-amanitin ( $\alpha$ -amanitin), specifický inhibitor RNA-polymeráz u většiny eukaryotních organismů, slouží k potlačení syntézy transkriptů *de novo* (Kidder et al. 1985). V případě kultivací s  $\alpha$ -amanitinem došlo k zastavení embryonálního vývoje u myších embryí na úrovni dvou buněk a u skotu v 8-16-buněčném stádiu (Memili et First 1998). Conover et al. (1991) identifikovali komplex  $\alpha$ -amanitin senzitivních proteinů (transcription-requiring complex, TRC), prvně detekovatelný ve 2-buněčném stádiu myšího embrya, považovaný za znak embryonální genomové aktivace. Kigami et al. (2003) našli gen *MuERV-L* (murine endogenous retroviral sequence 4, with leucine t-RNA primer), přechodně exprimovaný v 1-buněčném stádiu myšího embrya, syntézu mRNA bylo možno inhibovat  $\alpha$ -amanitinem. Vyblokování funkce genu vedlo k potlačení vývoje embryí do 4-buněčného stádia (Svoboda et al. 2004).

### **1.3.3 MOLEKULÁRNÍ ZÁKLAD PŘECHODU MEZI VYUŽITÍM MATERNÁLNÍHO A EMBRYONÁLNÍHO GENOMU**

Maternální transcripty jsou dále po oplození postupně degradovány a nutně musí být nahrazeny novými mRNA, přepisovanými z genomu vyvíjejícího se embrya. Odhaduje se, že pro úspěšný preimplantační a ranný fetální vývoj je nutná exprese asi 10.000 genů (Niemann et Wrenzycki 2000). Navíc musí být exprese některých specifických genů regulována tak, aby k jejich spuštění docházelo jen v určitých stádiích preimplantačního vývoje. Prozatím přechod mezi maternální a embryonální kontrolou nad genovou expresí není plně prozkoumán. Myš, díky své velikosti, nenáročnosti na chov a snadné přípravě většího počtu oocytů a embryí, je vítaným modelem pro prvotní studie. Naproti tomu, větší domestikované druhy nejsou studovány v takovém rozsahu.

Po transkripčně permissivním období na počátku vývoje se formuje transkripčně represivní stádium. V tomto stádiu se exprimují pouze geny, které jsou regulovány silnými promotory/enhancery (Schultz 2002). Jejich exprese je kritická pro embryonální vývoj a představuje majoritní genomovou aktivaci. Zatímco u myši dochází k přechodu z maternální na embryonální kontrolu genové exprese v pozdním dvoubuněčném stádiu, u ostatních savčích druhů k této aktivaci dochází o několik buněčných cyklů později.

Ačkoliv je úspěšná aktivace embryonálního genomu nezbytná pro další vývoj, specifické mechanismy, vedoucí k tomuto procesu, nejsou prozatím plně prozkoumány. Není ani známo, zda kontrola EGA je stejná u myši a u ostatních druhů savců. U myšního embrya se během G2 fáze 1-buněčného stádia utváří transkripčně permissivní stav, dovolující bazální transkripci. Přesto však transkripce neprobíhá nahodile. Expres limitovaného počtu genů během 1-buněčného stádia je závislá na syntéze proteinů z maternálních zdrojů (Wang et al. 2001) a zároveň na post-transkripčních modifikacích již existujících maternálních proteinů. Translace všech mRNA transkriptů je spojena s jejich polyadenylací v cytoplazmě (Bachvarova et al. 1992). Během růstu oocytu jsou některé mRNA ihned překládány do proteinů, jiné jsou maskovány deadenylací (Bettegowda et al. 2007). U savců je maternální mRNA, uchovávaná v oocytech, po oplození rychle degradována. U myši až 90% oocytárních transkriptů vymizí během vývoje do 2- buněčného stádia (Hamatani et al. 2004). Potireddy et al. (2006) analyzovali změny ve složení maternálních mRNA na polyzomech (místa aktivní translace) při přechodu mezi oocytem a 1-buněčným embryem u myši. Prokázali rozdíly nejen v počtu preferenčně translatovaných maternálních mRNA, ale také na úrovni funkce

proteinů, které tyto mRNA kódují. Maternální mRNA, které se exprimují pouze v 1-buněčném embryu, nebo je jimi toto stádium obohaceno, přispívají k metabolickým procesům. Jedná se zejména o geny, jejichž produkty se účastní biosyntézy proteinů, DNA a buněčných komponent, posttranslačních modifikací proteinů, DNA replikace a oprav, regulace buněčného cyklu a transkripce. V oocytu naopak nacházíme více transkriptů zajišťujících homeostázi. Proteiny, účastníci se posttranskripčních modifikací RNA, transmembránových přenosů iontů, metabolitů a signálních molekul a kontroly buněčného cyklu patří mezi ty, jejichž mRNA jsou přednostně translatovány ve zralém oocytu.

Syntéza proteinů ze specifických maternálních transkriptů ještě před prvním dělením zajišťuje úspěšné spuštění aktivace embryonálního genomu (Minami et al. 2007). Zatím bylo na myším modelu identifikováno pouze několik maternálních genů, jejichž produkty jsou důležité pro EGA. Mezi takové geny, jejichž exprese klesá během prvních dělení a vývoj embryí s vyblokovanou funkcí těchto genů je zastaven na úrovni 1- či 2-buněčného stádia, patří např. *Zar1* (zygotický arrest 1), *Hsf1* (heat shock transcription factor 1), *Bnc* (basonuclin), *Npm2* (nucleophosmin/nucleoplasmin, 2) či *Mater/Nlrp5* (Maternal antigen that embryo requires). *Mater* byl také detekován u skotu (Pennetier et al 2006), *Zar1* u prasat, skotu a člověka (Uzbekova et al. 2006).

Navození stavu umožňujícího transkripci může být také dosaženo aktivací maternálních transkripčních faktorů či syntézou nových ze zdrojů oocytu. U embrya skotu byly detekovány ještě před vlastní EGA mRNA pro funkčně odlišné transkripční faktory (Vigneault et al. 2004). Produkty těchto mRNA mohou přímo řídit transkripci či regulovat další děje během preimplantačního vývoje. Pokles hladiny transkriptů během maturace oocytu a kultivace embryí by mohl znamenat, že mRNA je degradována ihned po translaci. Proteiny, které jsou těmito geny kódovány, by pak mohly hrát důležité úlohy nejen při přechodu z maternální na embryonální kontrolu genové exprese ale také během minoritní genomové aktivace.

Falco et al. (2007) identifikovali nový gen *Zscan4d* (zinc finger and SCAN domain containing 4D), exprimovaný přechodně v pozdním 2-buněčném embryu myši, jehož funkce je důležitá pro dělení do 4-buněčného stádia.

K regulaci genové exprese u somatických buněk dochází také na úrovni modifikací histonů, popřípadě remodelací chromatinu. Proteiny z rodiny SWI/SNF (switching/sucrose non-fermenting) nukleozom-remodelačních enzymů umožňují vazbu transkripčních



faktorů a regulátorů exprese na DNA, tak mohou zprostředkovávat aktivaci či represi genu. Změny ve struktuře chromatinu působením maternálních proteinů či mRNA mají důležitou úlohu i při reprogramaci genové exprese během EGA (Thompson et al. 1998, Kanka 2003).

Acetylace histonů umožňuje transkripci genů a koreluje s transkripčně aktivním chromatinem (Schultz et Worrada 1995). U myši bylo ve 2-buněčném embryu detekováno zvýšení acetylace histonů (Stein et al. 1997). Rovnováha acetylace a deacetylace histonů je v čase aktivace EGA posunuta ve prospěch vysoké acetylace histonů. Současně může k aktivaci embryonálního genomu přispívat i změna obsahu linkeru H1, změna v metylaci histonů či globální DNA demetylace (Bettegowda et al. 2008).

Brahma-related gene 1 (BRG1/SMARCA4) ATPase tvoří DNA dependentní ATPázovou katalytickou podjednotku SWI/SNF komplexů, její exprese je vysoká v buňkách, které se obnovují nebo intenzivně proliferují. Oocyty, u nichž byl *BRG1* mutován nebo vyblokován pomocí RNA interference dokončily meiózu a byly úspěšně oplozeny. Vývoj většiny embryí byl však zastaven na 2–4-buněčné úrovni se sníženou transkripční aktivitou (Bultman et al. 2006).

Remodelaci chromatinu se mohou účastnit i jiné proteiny, u myši byl identifikován TIF1alpha (transcriptional intermediary factor 1alpha, Torres-Padilla et Zernicka-Goetz 2006), vazebný partner a potenciální koaktivátor jaderných receptorů. Exprese začíná již ve stádiu zygoty, protein je v pozdním 1-buněčném stádiu translokován do jádra do oblasti syntézy RNA. TIF1alfa je důležitý regulátor transkripce, asociuje s chromatin-remodelačními faktory (např. s BRG1) a umožňuje jejich správnou lokalizaci na chromozomu (Trotter et al. 2008).

V nedávné době byly identifikovány microRNA (miRNA), krátké nekódující jednořetězcové RNA, vážící se na nepřekládané úseky transkriptů. Brání translaci nebo přispívají k deadenylaci, a tím k následné degradaci cílených mRNA. Během oogeneze u myši jsou miRNA maternální transkripty syntetizovány, ukládány, ale brzy po oplození rychle degradovány během prvního dělení. Během dalšího vývoje exprese miRNA opět narůstá z embryonálních zdrojů. Oocyty, u kterých byla vyblokována funkce genu pro DICER (protein řídící vznik miRNA) vykazovaly po maturaci v porovnání s kontrolními oocyty rozdíly v transkripční aktivitě. Embrya vzniklá z takovýchto oocytů byla ve vývoji zastavena na 2-buněčném stádiu. (Tang et al. 2007).

## **1.4 METODY STUDIA GENOVÉ EXPRESE**

### **1.4.1 STUDIA GENOVÉ EXPRESE NA ÚROVNI JEDNOTLIVÝCH RNA**

Všechny ranné studie využívající autoradiografické metody, detekují syntézu celkové RNA. Neposkytují údaje o změnách na úrovni individuálních mRNA.

Postupem, kterým lze odhalovat jednotlivé transkripty v různých specifických stádiích preimplantačního vývoje embrya, je zhotovení knihoven komplementárních DNA (cDNA). Z takovýchto knihoven byly odvozeny po osekvenování EST (expressed sequence tags) úseky, odpovídající nově nalezeným genům, jejichž exprese je kritická pro preimplantační vývoj myších i bovinních embryí (Ko et al. 2000, Ponsuksili et al. 2002) i oocytů (Yao et al. 2004).

Za pomoci metody differential display RT-PCR (DD RT-PCR) (Liang et Pardee, 1992) je možné najít geny, které se rozdílně exprimují mezi dvěmi populacemi buněk. Tato metoda byla úspěšně použita při studiích na preimplantačních embryích skotu (Natale et al. 2001, Tesfaye et al. 2003) i myši (Hwang et al. 2005). Přesto, že obě metody poskytují velké množství dat, vykazují vysoký stupeň falešné pozitivivity a transkripty, které se nacházejí v buňkách ve velmi nízké koncentraci, nemusí být vůbec detekovány.

Intenzivní studia genové exprese během posledních 20 let vedla k rozvoji mnoha technik, které jsou schopny detekovat malá množství mRNA. Většina z nich vychází z polymerázové řetězové reakce, která je založena na lineární amplifikaci transkriptů s následnou analýzou vzniklé cDNA. V řadě projektů byla použita subtraktivní hybridizační metoda (suppression subtractive hybridization, SSH, Diatchenko et al. 1996). SSH je velmi účinná pro identifikaci nových genů, rozdílně exprimovaných mezi dvěmi vzorky. Veliký přínos této metody spočívá v potlačení amplifikace těch transkriptů, které se ve vzorku nacházejí ve velké koncentraci, zatímco transkripty o nízké koncentraci jsou namnoženy více (Bui et al. 2005). SSH byla použita např. pro porovnání genových expresních profilů u myši mezi oocytem a 8-buněčným stádiem (Zeng et Schultz 2003) a u skotu mezi oocytem maturovaným *in vitro* a *in vivo* (Mourot et al. 2006).

## 1.4.2 KVANTIFIKACE GENOVÉ EXPRESE

Hladinu exprese určité specifické mRNA lze stanovit několika způsoby. Výběr vhodné metody záleží na množství a sekvenci transkriptu, přítomném ve vzorku, na požadavcích na přesnost. Autoradiografie, Northern blot analýza nebo Ribonuclease Protection Analysis (RPA) jsou metody, které byly postupně nahrazeny modernějšími postupy, poskytujícími rychlejší a přesnější výsledky.

V posledních letech narůstá popularita technologie mikročipů (Skena et al. 1995), protože umožňuje analyzovat tisíce genů najednou v celé řadě biologických modelů. Přesto, že metoda poskytuje pouze základní informaci o globálních změnách v genové expresi mezi dvěma vzorky, byla úspěšně použita při analýze savčích oocytů i embryí (Hamatani et al. 2006, Zeng et Schultz 2005, Fair et al. 2007). Přímé uplatnění ve studiích genové exprese během embryonálního vývoje je však omezeno, protože vyžaduje značné množství vstupního materiálu. Zvláště na modelech nelaboratorních zvířat je získání dostatečného množství oocytů či embryí velmi náročné.

### 1.4.2.1 Polymerázová řetězová reakce (PCR a RT-PCR)

Polymerázová řetězová reakce (polymerase chain reaction, PCR) se používá pro *in vitro* namnožení specifické nukleotidové sekvence ve vzorku biologického materiálu. Metoda byla vyvinuta v roce 1985 (Saiki et al. 1985) a její princip je založen na využití vlastností DNA polymerázy.

Metoda byla postupně zdokonalována a v současnosti nachází široké uplatnění - v molekulární diagnostice onemocnění, detekci patogenních mikroorganismů, prenatální diagnostice genetických onemocnění, kriminalistice i základním výzkumu v oblasti biologie a medicíny.

Spojením reverzní transkripce a vlastní polymerázové reakce umožňuje detekovat také mRNA, která je v prvním kroku překládána do cDNA a následně namnožena. Metodu lze využít také ke kvantifikaci hledané sekvence ve vzorcích (Freeman et al. 1999). Tradiční způsob analýzy je dvojstupňový proces, kdy je po proběhlé amplifikaci analyzován výsledný produkt (tzv. semikvantitativní analýza). Ve většině případů se provádí elektroforéza v agarózovém gelu a následná hybridizace s radioaktivně značenou sondou. Metoda je velmi zdoluhavá a hrozí nebezpečí kontaminace radioaktivním

materiálem. Proto byly vyvinuty postupy, které umožňují detekovat produkt přímo v reakční směsi, během cyklování (Bustin 2000).

#### 1.4.2.2 Real-time RT-PCR

Reverzní transkripce-polymerázová řetězová reakce s detekcí v reálném čase (rt RT-PCR, real-time RT-PCR) je metodou jednoduchou, vysoce citlivou a přesnou, která splňuje i požadavky na rychlou analýzu materiálu, zejména při rutinní diagnostice v humánní medicíně (Higuchi et al. 1993). Přístroje pro stanovení obsahu DNA či RNA ve vzorcích jsou kombinací termálního cykleru a detektoru fluorescence s následnou analýzou amplikonu. Během amplifikace je monitorována fluorescence po ukončení každého cyklu.

Pro detekci transkriptů lze využít několik chemismů - interkalační barvy či různé sondy, využívající fluorescenční rezonační přenos energie (FRET). Principiálně nejjednodušší a nejlevnější je metoda používající fluorescenčních interkalačních molekul, které se začleňují do vznikajících řetězců DNA. Tyto látky nejsou sekvenčně specifické, mohou se použít ke kvantifikaci jakéhokoliv templátu. Nejčastěji používaným barvivem je SybrGreen I, s velmi nízkou hodnotou pozadí v nenavázaném stavu a s vysokým nárůstem fluorescence po inkorporaci do DNA. Pro ověření přítomnosti jednoho produktu, alternativních variant, více produktů a/nebo dimerů primerů, tedy specifčnosti reakce, probíhá po ukončení cyklování ve vzorcích tzv. „melting“ analýza – první derivace závislosti fluorescence na teplotě (jeden vrchol křivky svědčí o jediném produktu) (Bustin 2002).

Mezi vstupní koncentrací analyzované DNA či RNA a množstvím vzniklého produktu během exponenciální fáze amplifikace existuje přímý vztah, který lze využít při matematickém zpracování naměřených hodnot. Při absolutní kvantifikaci vkládáme ke vzorkům před izolací standard (plazmidová DNA či in vitro transkribovaná RNA) o známé koncentraci. Při relativní kvantifikaci vztahujeme množství templátu k nějakému jinému vzorku, tzv. kalibrátoru (Bustin et al. 2005).

PCR/RT-PCR v reálném čase za použití interkalačního barviva SybrGreen I se využívá v řadě studiích k porovnání rozdílné úrovně genové exprese v oocytech i embryích. Poskytuje rychlé a přesné údaje o dočasných změnách v hladině mRNA. Metodu lze použít též na úrovni jednoho oocytu či embrya (Ruddock-D’Cruz et al. 2007).

## CÍLE PRÁCE

---

Cílem této práce, zabývající se nukleovými kyselinami je základní výzkum procesů regulace transkripce během expanze oocyt-kumulárních komplexů a časného embryonálního vývoje. Toto úsilí je prezentováno pracemi publikovanými v biologických a reprodukčních časopisech.

Dílčí cíle studia lze shrnout v následujících bodech:

- zavést real-time RT-PCR mezi metodiky laboratoře
- objasnit mechanismy expanze oocyt-kumulárních komplexů na prasečím modelu
- využít známé geny, jejichž hladina exprese se mění v průběhu embryonálního vývoje, k analýze embryí (blastocyst) získaných za rozdílných experimentálních podmínek
- pomocí vhodných metod najít nové geny, které hrají důležitou roli během preimplantačního embryonálního vývoje savců a stanovit jejich expresi

### 3 SOUHRN VÝSLEDKŮ A KOMENTÁŘE K VYBRANÝM PUBLIKACÍM

---

Němcová Lucie, Mbaye Abdou Madjib, Vignon Xavier, Kaňka Jiří **Cell cycle synchronization of bovine fibroblasts: Polo-like kinase expression after serum deprivation.**

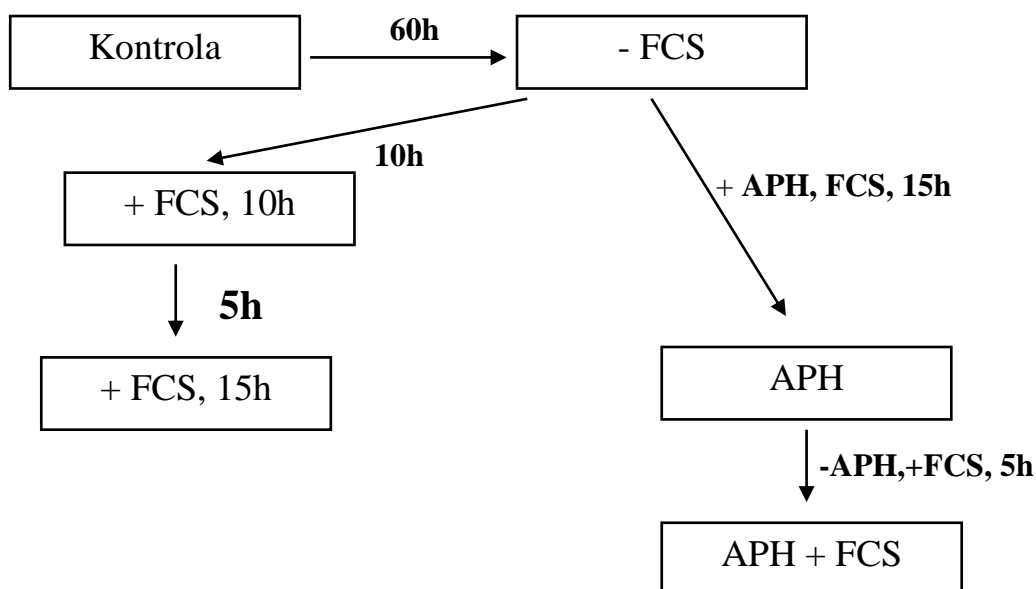
Základním úkolem, který bylo nutno zvládnout, bylo zavedení metodiky real-time RT-PCR do rutinních postupů naší laboratoře. Vzhledem k tomu, že většina metod ke stanovení kvantitativních změn v genové expresi využívala detekci amplifikovaného produktu až po proběhlé PCR reakci, pokusili jsme se v prvních studiích porovnat metodu semikvantitativní analýzy genové exprese s RT-PCR v reálném čase. Jako modelové buňky jsme používali synchronizované bovinní fibroblasty (linie OV 7711M19), ustanovené z ucha telete po narození (ve spolupráci s laboratoří X. Vignona, Institut National de la Recherche Agronomique, Jouy-en-Josas, Francie). Buňky byly kultivovány v DMEM médiu buď v přítomnosti aphidicolinu (APH) nebo za snížené koncentrace fetálního telecího séra (FCS) (schéma pokusu viz obr.1).

K synchronizaci buněk bylo potřeba použít bezsérové prostředí (koncentrace 0,2% FCS v tomto případě nestačila k zastavení buněčného dělení). Po odmytí inhibitorů či po přidavku FCS buňky dále proliferovaly. Vzorky byly odebírány tak, abychom postihli jednotlivá stádia buněčného cyklu. Úspěšnost synchronizace buněk byla prokázána analýzou pomocí průtokové cytometrie (FACS, Fluorescence-activated cell sorting) po značení jader propidium jodidem. Zároveň jsme ve vzorcích určovali hladinu mRNA pro *Plk1*, (Polo-like kinase1), důležitého regulátoru buněčného cyklu (Eckerdt et al. 2006).

Po izolaci RNA ze vzorků byla provedena semikvantitativní jednokroková RT-PCR s následnou hybridizací vzniklých DNA úseků po přebílení na agarózovém gelu. Jako sonda byl použit PCR produkt radioaktivně značený <sup>32</sup>P. Paralelně byly vzorky podrobeny real-time RT-PCR s použitím interkalačního barviva SybrGreen I na cykleru Rotor-Gene 2000 firmy Corbett Research, Austrálie. V reakcích byly použity primery, specifické pro bovinní *Plk1* (F : GGA TCT GGA GGT GAA AAT AGG GGA T , R: GGG TTG ATG TGC TTG GGA ATA CTG T), amplifikující úsek v délce 270 bp.

Po 60 hodinách kultivace v bezsérovém prostředí byla většina buněk zastavena v G<sub>0</sub>/G<sub>1</sub> fázi a zároveň došlo ke snížení exprese mRNA pro *Plk1* na téměř nulovou úroveň. Po výměně média s přidavkem 10% FCS buňky prostupovaly po 10 hodinách G<sub>1</sub> fázi (hladina *Plk1* transkriptu zůstala nízká), po dalších 5 hodinách se většina buněk nacházela v S fázi (*Plk1* se opět zvýšila). Po 60 hodinách kultivace v 10% FCS s APH (6μM) došlo k zastavení většiny buněk před S fázi, exprese *Plk1* byla nízká (ale vyšší, než po kultivaci bez FCS). Již 5 hodin po odmytí APH se většina buněk nacházela v G<sub>2</sub>/M fázi, hladina pro *Plk1* silně vzrostla. (výsledky viz. obr. 2)

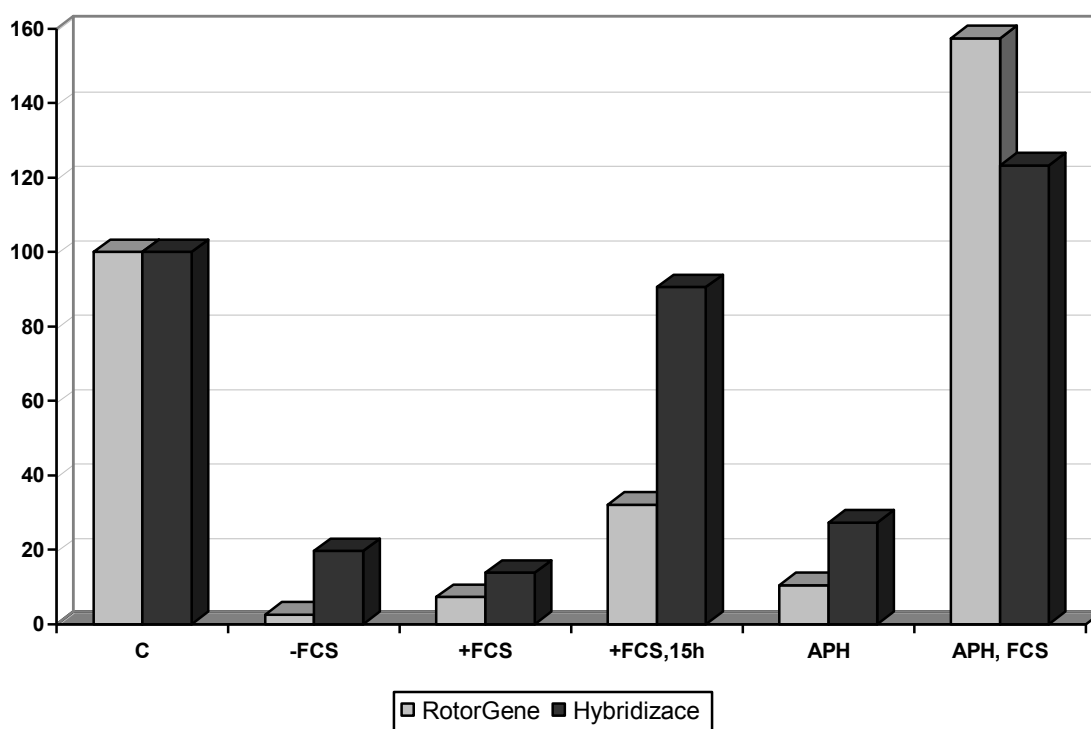
Výsledky byly prezentovány na mezinárodní konferenci: From Oocyte to Embryonic Stem Cell. Z porovnání obou použitých metod stanovení koncentrace mRNA lze shrnout, že RT-PCR s detekcí v reálném čase je rychlá, spolehlivá a opakovatelná. Na rozdíl od RT-PCR s následnou analýzou produktů lze detekovat rozdíly v koncentracích templátů až v rozpětí šesti řádů.



Obr.1: Schéma kultivace

	<b>C</b>	<b>- FCS</b>	<b>+ FCS, 10h</b>	<b>+FCS, 15h</b>	<b>APH</b>	<b>APH + FCS</b>
<b>G<sub>0</sub>/G<sub>1</sub></b>	75,6	96,0	95,0	47,5	93,5	13,5
<b>S</b>	21,1	1,5	3,0	52,5	4,1	25,8
<b>G<sub>2</sub>/M</b>	3,3	2,3	2,0	0	2,4	60,7

Obr.2: FACS analýza bovinních fibroblastů



Obr.3: Porovnání výsledků real-time RT-PCR (RotorGene) a semikvantitativní RT-PCR (Hybridizace)



### 3.1 PUBLIKACE V IMPAKTOVANÝCH ČASOPISECH

#### 3.1.1 **Expression of Growth Differentiation Factor 9 Messenger RNA in Porcine Growing and Preovulatory Ovarian Follicles.**

Prochazka R, Nemcova L, Nagyova E, Kanka J  
*Biol Reprod.* 2004 Oct;71(4):1290-5. Epub 2004 Jun 9, IF=3,550

#### 3.1.2 **Partial molecular characterization and mapping of the GDF9 gene to porcine chromosome 2.**

Čepica S, Procházka R, Cívánová, K., Knoll, A, Němcová, L, Masopust M, Kubíčková S, Musilová P, Rubeš J.

*Animal Genetics.* 2004: 35:261-262, IF= 3,108

Folikulární růst je řízen vzájemnou komunikací mezi oocytem a somatickými buňkami. Oocyt sekretuje řadu parakrinních faktorů, ovlivňujících proliferaci a diferenciaci granulózniých buněk. Mezi potenciální regulátory funkce ovárií patří proteiny z rodiny transformujících růstových faktorů (TGF $\beta$ ), kandidátními molekulami jsou GDF9, GDF9B (BMP15) a/nebo BMP6 (Elvin et al. 2000).

U myši a ovce je *GDF9* exprimován pouze v oocytech, a to již ve stádiu primárního folikulu. Přítomnost proteinu je nezbytná pro správný vývoj folikulu, mutanty s vyblokovanou funkcí genu jsou neplodné, vývoj je zastaven na hranici primárního stádia. (Dong et al. 1996). V případě myšního modelu je k expanzi kumulárních buněk nutná přítomnost tzv. kumulus expanzi umožňujícího faktoru CEEF (cumulus expansion enabling factor, Vanderhyden et al. 1990). Oproti tomu může být u prasat a skotu expanze kumulu indukována FSH i bez přítomnosti oocytu (Prochazka et al. 1991).

Rekombinantní GDF9 reguluje expresi enzymů, účastnících se expanze kumulárních buněk – zvyšuje syntézu zejména hyaluronan syntázy 2 (*HAS2*) a cyklooxygenázy 2 (*COX2*) mRNA u myši. GDF9 stabilizuje extracelulární matrix v oocyt-kumulárních komplexech ještě v době, kdy již došlo k ovulaci a oocyt se nachází ve vejcovodu (Richards 2005). Protože rekombinantní GDF9 indukuje u myši expanzi kumulárních komplexů *in vitro* i v nepřítomnosti oocytu (stejně jako CEEF), mohly by být oba proteiny identické (Elvin et al. 1999).

V naší studii jsme se zaměřili na stanovení hladiny *GDF9* mRNA v průběhu kultivace prasečích oocyt-kumulárních komplexů (OCC) a granulózniých buněk. *In vivo* vzorky byly odebírány po stimulaci prasníc hormonu PMSG a hCG. Transkript jsme detekovali nejen v oocytu, ale byl nalezen poprvé též v granulózniých i kumulárních buňkách rostoucích a preovulačniých folikulů. Hladina mRNA v oocytu dosahovala

čtyřnásobné úrovně v porovnání s množstvím transkriptu v somatických buňkách. Během kultivace a expanze OCC v podmínkách *in vitro* zůstávala však hladina transkriptu v oocytu konstantní, v kumulárních buňkách významně poklesla. Ani *in vivo* připravené OCC se nelišily v expresi *GDF9*. Expanzi kumulárních buněk tedy nepředchází zvýšení exprese mRNA (ani v oocytu ani v granulózních buňkách).

Prasečí mRNA byla osekvenována, získaná sekvence byla vložena do databáze (EMBL/GenBank/DDBJ). Byla provedena též lokalizace genu pomocí FISH (fluorescent *in situ* hybridization) metody na chromozomu 2q26-q27.

Několik autorů, jejichž práce byl publikovány v nedávné době, uvádí stejné výsledky jako naše skupina. Při *in vitro* maturaci prasečích COC s přidavkem FSH, LH, EGF nebo hCG hladina mRNA pro *GDF9* klesala (Zhu et al. 2008, Lee et al. 2008). Li et al. (2008) navíc stanovili klesající hladinu i *GDF9* pro-proteinu, maturovaný protein nebyli schopni detekovat. Prasečí preovulační vývoj je pravděpodobně řízen jinými mechanismy, než je tomu u hlodavců. Existují velké mezidruhové rozdíly v úloze jednotlivých členů TGF $\beta$  rodiny proteinů.

### **3.1.3 Molecular Mechanisms of Insulin-Like Growth Factor 1 Promoted Synthesis and Retention of Hyaluronic Acid in Porcine Oocyte-Cumulus Complexes.**

Nemcova L, Nagyova E, Petlach M, Tomanek M, Prochazka R  
*Biol Reprod.* 2007 Jun;76(6):1016-24. Epub 2007 Feb 28, IF(2006)=3,498

Expanze kumulárních buněk vyvolaná vzrůstem koncentrace gonadotropních hormonů v krvi je nezbytnou podmínkou pro navození ovulace i luteinizace, přispívá k úspěšnému oplodnění (Nagyova et al. 2008). Během preovulačního vývoje se ve folikulu exprimuje řada faktorů, např. morfogenetické proteiny kostní tkáně a inzulínu podobné růstové faktory (insulin-like growth factors, IGFs), podílející se spolu s gonadotropiny na kontrole maturace oocytů.

V *in vitro* podmínkách se po izolaci oocyt-kumulárních komplexů z folikulů používá pro navození expanze přidavek FSH do maturačního média (Salustri et al. 1989). Po opuštění přirozeně inhibičního prostředí folikulu oocyty spontánně zahájí meiózu. Mechanismy, které jsou klíčové při tomto nepřirozeném procesu, se liší od signálních drah, které se spouštějí *in vivo* po indukci gonadotropiny.

Inzulínu podobné růstové faktory tvoří rodinu proteinů, regulujících buněčnou proliferaci, diferenciaci a metabolismus. Jsou potenciální stimulatory znovuzahájení a dokončení meioického dělení.

IGFI hraje důležitou úlohu ve vývoji folikulu, při kultivacích již preantrálních folikulů v součinnosti s estradiolem a FSH stimuluje proliferaci granulózních buněk, vytvoření antra a přežití granulózních buněk zvýšením jejich rezistence k apoptóze (Mao et al. 2004). IGFI tvoří složku fetálního bovinního séra, která umožňuje expanzi prasečích oocyt-kumulárních komplexů *in vitro* (Singh et Armstrong 1997). Faktor sám nemůže indukovat produkci steroidů v ovariálních buňkách, ale umocňuje účinek FSH. Působí společně jako autokrinní a parakrinní regulátory kumulárních buněk, aktivující signální dráhy pro znovuzahájení meiózy. V podmínkách *in vitro* při kultivacích oocyt-kumulárních komplexů (OCC) v bezsérovém prostředí byla schopnost prasečích kumulárních buněk syntetizovat hyaluronovou kyselinu zvýšena přidavkem IGFI (Nagyova et al 1999).

Cílem naší práce bylo nalézt signální dráhu, přes kterou IGFI stimuluje v součinnosti s FSH syntézu hyaluronové kyseliny (HA), hlavní složky extracelulární matrix. Prasečí OCC jsme kultivovali v bezsérovém prostředí s přidavkem FSH, s IGFI popřípadě v kombinaci obou složek. Při kultivacích s FSH došlo k navýšení hladiny cAMP a jím aktivované cAMP-dependentní protein kinázy A (PKA). Přídavek IGFI neměl vliv na koncentraci cAMP ani fosforylované formy PKA. V kombinaci FSH s IGFI došlo k signifikantnímu zvětšení průměru expandovaných oocyt-kumulárních komplexů a produkci HA v porovnání se samotným hormonem. Zároveň byla detekována vyšší koncentrace jak mitogen-aktivující protein kinázy 3/1 (MAPK3/1), tak AKT (proteinkinázy B, v-akt murine thymoma viral oncogene homolog). Při použití specifických inhibitorů obou kináz byla signifikantně snížena produkce HA vázaná v oocyt-kumulárních komplexech i uvolněná do kultivačního média. Fosforylace pouze AKT a nikoliv MAPK3/1 byla signifikantně snížena specifickým inhibitorem phosphoinositid-3-kinázy (PIK3).

Během kultivace OCC byla stanovena relativní koncentrace mRNA pro *Has2*, klíčového enzymu syntézy HA. Exprese genu byla aktivována již po 2 hodinách jak samotným FSH, tak i v kombinaci FSH a IGFI, bez signifikantních rozdílů po 4 hodinách. Po 24 hodinách však bylo množství transkriptu pro *Has2* vyšší v případě přidavku obou induktorů.

Výsledky potvrzují pozitivní roli IGFI při expanzi oocyt-kumulárních komplexů indukované FSH. Produkce hyaluronové kyseliny je přidavkem IGFI stimulována, není však ovlivněna signální dráhou přes cAMP. Pravděpodobně se po vazbě IGFI na membránový receptor aktivuje PIK3 a přes fosfatidil-inositol-3-fosfát je signál přiveden k AKT kináze.

### **3.1.4 Temporal sensitivity of bovine embryos to culture environment after fertilization and the implications for blastocyst quality.**

Lonergan P, Rizos D, Kanka J, Nemcova L, Mbaye AM, Kingston M, Wade M, Duffy P, Boland MP  
*Reproduction* 2003 Sep;126(3):337-46. IF=2,606

Hlavním faktorem, který ovlivňuje úspěšnost *in vitro* produkce embryí je kvalita oocytu, kultivační podmínky po oplození ovlivňují vývojovou schopnost vzniklých blastocyst (Rizos et al. 2001, 2002a, 2002b). Zjišťovali jsme, jak je ovlivněna genová exprese na úrovni blastocysty, pokud jsou embrya po oplodnění kultivována *in vitro* v SOF (synthetic oviductal fluid) médiu a *in vivo* po zavedení do ovčího vejcovodu, popřípadě v kombinaci obou prostředí.

Jednotlivé skupiny embryí se lišily na úrovni obsahu mRNA. V této práci byla využita metoda semikvantitativní RT-PCR s následnou detekcí produktu pomocí hybridizace s radioaktivně značenou sondou. V blastocystách, kultivovaných kompletně v SOF, byly prokázány nejvyšší relativní koncentrace mRNA pro proapoptický gen *Bax* (BCL2-associated X protein). Zatímco v embryích, získaných *in vivo* z ovčího vejcovodu, byla detekována jeho nízká hladina. Embrya, která jsou v kultivována v obou prostředích exprimují více mRNA pro *BAX*. Zygoty skotu, produkované v podmínkách *in vitro* a poté kultivované v ovčím vejcovodu dosahovaly ve výrazně nižším procentu stádia blastocysty, než embrya připravená ostatními metodami. Transkript pro *L37* ribosomální protein byl exprimován velmi silně ve všech studovaných skupinách, mRNA pro *S3a* ribosomální protein byla naopak detekována ve velmi nízké koncentraci.

Lze shrnout, že nejkritičtější fází vývoje embrya je počáteční období, ve kterém dochází k přechodu z maternální k embryonální kontrole genové exprese. Blastocysty kultivované od druhého do sedmého dne vývoje v ovčím vejcovodu jsou vývojově schopnější a kvalitou vysoce podobné embryím získaným *in vivo*. Podmínky pro *in vitro*

kultivace neposkytují zřejmě přísun všech potřebných faktorů, které by zabezpečily kvalitní vývoj embryí.

### **3.1.5 Gene expression in bovine embryos derived from oocytes with different developmental competence collected at the defined follicular developmental stage.**

Nemcova L, Machatkova M, Hanzalova K, Horakova J, Kanka J  
*Theriogenology* 2006 Apr 15;65(7):1254-64. Epub 2005 Sep 19. IF=1,898

Pro většinu *in vitro* kultivací jsou oocyty získávány z ovárií jatečných zvířat. Proto je kvalita zárodečné buňky důležitým faktorem pro úspěšnou produkci embryí. U skotu dosahují oocyty v konečné fázi svého růstu meiotickou kompetenci (schopnost dokončit meiotické dělení) (Fair et al. 1995). Naproti tomu vývojovou kompetenci (schopnost zajistit vznik a růst embrya až do období přechodu na řízení vývoje z vlastních genetických zdrojů) získávají až v preovulačním stádiu, v průběhu tzv. kapacitace oocyty (Mermillod et al. 1999). Maturace v podmínkách *in vitro* není ve většině případů schopná zabezpečit vznik kompetentního oocyty, který by se po oplodnění normálně vyvíjel.

Savčí oocyty po izolaci z folikulu spontánně zahájí meiózu. Všechny oocyty izolované z ovárií jatečných zvířat však nejsou vývojově kompetentní, získaná směs je vysoce heterogenní, oocyty se liší v expresi genů (Wrenzycki et al. 2007). Přítomnost dominantního folikulu či žlutého tělíska a vývojová fáze folikulu výrazně ovlivňuje kvalitu oocytů v subordinantních folikulech stejného ovária (Machatkova et al. 2000, Machatkova et al. 2004).

Cílem naší práce bylo stanovit, zda exprese vybraných genů ve stádiu blastocysty koreluje s funkčním stavem oocytů. *Bax* (BCL2-associated X protein) patří do rodiny genů, majících úlohu při apoptóze. Produkty dalších dvou genů z rodiny gap junctions proteinů *Cx43* (gap junction protein, alpha 1) a *Cx31* (gap junction protein, beta 3) tvoří strukturální proteiny důležité při mezibuněčné komunikaci. Ovária byla ještě před izolací oocytů charakterizována na přítomnost žlutého tělíska a jednotlivé subpopulace oocytů byly izolovány z folikulů rozdílného stádia (růst/stagnace nebo dominance/regrese) a odlišných průměrů (malé: 2–5 mm nebo střední: 6–10 mm folikuly).

Ke kvantifikaci genové exprese byla použita metodika RT-PCR s detekcí v reálném čase. Expese genů pro *Bax* i *Cx31* nevykazovaly rozdíly mezi jednotlivými skupinami blastocyst. U embryí kultivovaných 7 dní nebyly prokázány rozdíly ani pro *Cx43*, avšak po 8 dnech hladina mRNA pro *Cx43* signifikantně vzrostla u blastocyst, pocházejících

z oocytů izolovaných z folikulů ve fázi růstu/stagnace. Taková embrya vytváří více spojů mezi jednotlivými buňkami a jsou vývojově schopnější, než embrya získaná z oocytů izolovaných z folikulů v fázi dominance/regrese.

Z výsledků vyplývá, že kvalita oocytů, které jsou vybírány z ovárií pro následné *in vitro* manipulace, je významným faktorem úspěšnosti produkce embryí. Zejména velikost a vývojové stádium folikulu či přítomnost dominantního folikulu v ováriu ovlivňuje genovou expresi nejen v samotném oocytu, ale i během celého preimplantačního embryonálního vývoje. Ghanem et al. (2007) studovali rozdíly v genové expresi u oocytů, izolovaných z malých folikulů v růstové nebo dominantní fázi první folikulární vlny. Transkripty u oocytů, vybíraných v růstové fázi, byly obohaceny zejména o geny, regulující biosyntézu proteinů. Oocyty, získané v dominantní fázi, přednostně exprimovaly geny, jejichž produkty řídí buněčný cyklus a transkripci. Nejen rozdílné složení médií a kultivační podmínky pro *in vitro* přípravu embryí, ale i vlastní zárodečná buňka ovlivňuje vývojovou schopnost vzniklých blastocyst.

## **3.2 PUBLIKACE PŘIPRAVOVANÉ K TISKU**

### **3.2.1 Alterations in abundance of gene transcripts during bovine preimplantation development**

Jiří Kaňka, Kateřina Kepková and Lucie Němcová

podáno do Anim. Reprod. Sci. IF(2006)=2,186; manuskript přiložen

Správné načasování exprese genů, řízené již vlastním embryem, je jednou z podmínek pro zdárný vývoj embrya. V oblasti studia přechodu z maternální na embryonální genom u savců je prozatím myš nejvíce probádaným savcem. Pokud se týče hospodářských zvířat, v dané problematice jsou nové poznatky velmi vzácné a ceněné. Neexistují komerčně a široce využívané mikročipy, tak jako je tomu u myši. Genom skotu není osekvenován, neznáme ani všechny transkripty, specifické pro embryonální stádia. V naší studii jsme se zaměřili na nalezení takových genů v časném embryonálním vývoji skotu, které by bylo možno následně využít pro porovnání efektivnosti rozdílných způsobů přípravy embryí v podmínkách *in vitro*.

Aplikovali jsme metodu supresivní subtraktivní hybridizace (SSH) k nalezení genů, rozdílně exprimovaných mezi stádiem maturovaného oocytu a 4-buněčného embrya.

Z osekvenovaných a identifikovaných úseků genů jsme na základě již známých nebo předpovězených funkcí na modelech buněk somatických i zárodečných u skotu, myši či člověka, vybrali geny vhodné pro další studium. Zaměřili jsme se na takové geny, u kterých by produkty translace mohly hrát důležitou roli během přechodu z maternální na embryonální kontrolu genomové exprese (minor nebo major EGA).

Splicing factor (SFRS3) je protein rodiny serin-arginin-(SR) bohatých proteinů, účastní se postranlačních modifikací RNA. Během vývoje myšího embrya byl SFRS3 detekován v oocytu i v časných vývojových stádiích. Je nepostradatelný pro úspěšný preimplantační vývoj, mutanty jsou neschopné utvořit blastocysty (Jumaa et al. 1999).

Centromerický neboli kinetochorový protein (CENPF, mitosin) plní úlohu při dělení buňky, podílí se na tvorbě dělicího vřeténka a segregaci chromozomů. Odpovídá pravděpodobně i za kontrolu a opravu chybného nasednutí chromozomů na kinetochory (Ma et al. 2006).

Nehistonový chromozomální protein HMG17 modifikuje strukturu komplexů DNA s transkripčními faktory nebo histony a zvyšuje tak efektivnost iniciace transkripce RNA polymerázou II (Paranjape et al. 1995). Knockdown HMG17 v 1-buněčném myším embryu způsobil zpomalení vývoje a sníženou tvorbu celkové RNA na úrovni čtyřech buněk (Mohamed et al. 2001).

Eukaryotický translační iniciační 4F (EIF4F) je proteinový komplex, zprostředkovávající nasednutí ribozomů na mRNA. Mezi jeho komponenty řadíme eukaryotické translační iniciační faktory 4A (EIF4A) a 4E (eIF4E). EIF4A vykazuje RNA helikázovou aktivitu, rozplétá mRNA prostorovou strukturu v nepřekládané oblasti a tím napomáhá vazbě ribozomů. EIF4E se váže se na 5'-čepičku mRNA a zprostředkovává nasednutí dalších translačních faktorů a ribozomů, je důležitý pro postup buněčným cyklem (Pestova et al. 2001).

Všechny vybrané geny vykazují nárůst exprese během majoritní genomové aktivace (u skotu na úrovni 8-buněčného stádia). Poprvé během embryonálního vývoje byla stanovena exprese mRNA pro mitosin. Zvýšení genové exprese u mRNA pro SFRS3 byla poprvé identifikována během minoritní aktivace genomu (u skotu na úrovni 2–4-buněčného stádia).

V případech ostatních genů, u kterých byl nalezen přechodný vzestup v expresi během velmi časného embryonálního vývoje (ještě před major EGA, ke které dochází na úrovni pozdního 8-buněčného stádia) se nepodařilo prokázat pomocí kultivace s  $\alpha$ -amanitinem. Důvodem detekce změn v jejich expresi by mohlo být to, že většina těchto

transkriptů je maternálního původu, které byly modifikovány po úspěšném oplození. Tyto změny postihují polyadenylaci (Potireddy et al. 2006), přítomnost polyA konce vede k účinnější vazbě na oligo-dT při izolaci mRNA (za použití magnetických kolonek Dynabeads) a tudíž ke zdánlivému zvýšení koncentrace transkriptu.

### **3.2.2 Identification and characterisation of gene transcripts during preimplantation embryo development in bovine**

L Nencova and J Kanka, připravovaný článek.

Pokračovali jsme ve studii zaměřené na identifikaci mRNA rozdílně exprimovaných během embryonálního růstu na modelu bovinního embrya. Jedná se o skupinu 9 genů vybraných ze skupiny sekvenovaných produktů po SSH a identifikovaných na základě podobnosti s geny o známé funkci.

NCOR1 (Nuclear receptor corepressor) interaguje s jadernými receptory, je důležitým regulátorem transkripce. Studie na myším modelu prokázaly, že vyblokování exprese mRNA i proteinu je pro embryo letální. (Jepsen et al. 2000).

RNF4 (Small nuclear RING finger protein) je regulátor transkripce, účastní se s dalšími jadernými proteiny na řízení buněčného růstu, apoptózy a senescence. Protein i mRNA byly detekovány na krysím modelu v oocytech i somatických buňkách během folikulogeneze s maximem v oocytech preantrálních folikulů (Hirvonen-Santti et al. 2004).

Postranlační modifikace proteinů enzymem SUMO1 (Small ubiquitine-related modifier) je důležitým regulátorem řady buněčných procesů, jako je např. jaderný přenos, replikace a oprava DNA, mitóza a přenos signálů. Sumoylace jaderného korepresoru NCOR1 přispívá k potlačení transkripce (Tiefenbach et al. 2006).

TMSB4 (Thymosin beta 4) se podílí se na tvorbě cytoskeletonu v eukaryotických buňkách. Je schopen vázat aktinové podjednotky (G aktin) a tím reguluje polymerizaci a depolymerizaci aktinu a prodlužování filamentových vláken (Dedova et al. 2006).

JMD2 (Jumonji domain containing 2D) je rodina proteinů, modifikujících strukturu chromatinu, důležitých pro vývoj řady tkání. JMJD2A katalyzuje demetylaci di- a trimetylovaných zbytků lysinů 9 a 36 na histonu 3 (Chen et al. 2007).

SSU72 je vysoce konzervovaný transkripční faktor, plní úlohu ve všech třech fázích transkripce malých jaderných i mediátorových RNA. V nedávné době byla detekována



jeho fosfatázová aktivita, která spojuje SSU72 s CTD (carboxy-terminal domain) RNA polymerázy II (Reyes-Reyes et Hampsey 2007).

JP2 (Junctophilin2) tvoří strukturní složku membránových komplexů, spojujících plazmatickou membránu s endoplazmatickým retikulem (Takeshima et al. 2000).

PSMD9 (26S proteasome non-ATPase regulatory subunit 9) tvoří regulační podjednotku velkého proteinového komplexu, klíčové buněčné struktury, kde probíhá proteolytické štěpení peptidů (Hoffman et Rechsteiner 1997).

PMCA ( Plasma membrane Calcium transporting ATPase) reguluje obsahu  $Ca^{2+}$  v buňce, tím ovlivňuje řadu signálních drah. U savců hrají všechny 4 geny PMCA1-4 důležité funkce během vývoje. PMCA1 byl detekován v myším embryu kolem 10. dne vývoje, o tři dny dříve než ostatní tři geny (Zacharias et Kappen 1999).

Expresní profil jsme stanovovali ve vzorcích maturovaných oocytů a embryí kultivovaných v *in vitro* podmínkách pomocí jednokrokové RT-PCR s detekcí signálu v reálném čase. Embrya byla kultivována za normálních podmínek a též v přítomnosti  $\alpha$ -amanitinu.

Pomocí zvolené metodiky jsme stanovili expresi studovaných genů na bovinním modelu během preimplantačního vývoje (oocyt maturovaný, 2-, 4-, časné 8-, pozdní 8-buněčné stádium, morula a blastocysta). Výsledky prokazují, že většina studovaných genů vykazuje nízkou hladinu mRNA ve stádiu maturovaného oocyty. U genů pro NCOR1, TMSB4, RNF4 a SUMO1 dochází k dvěma navýšením v expresi mRNA, během 2–4-buněčného a v pozdním 8-buněčném stádiu. Při expresi mRNA pro JMD2 a SSU72 dochází k navýšení během časného 8-buněčného stádia a stádia blastocysty. Pouze u JP2 není koncentrace mRNA v oocyty stanovitelná, v tomto případě se nejspíše jedná o gen, který se začíná přepisovat ve stádiích embryonálního vývoje (od 2–4-buněčného stádia). Oproti tomu, mRNA pro PSMD9 je silně exprimována již v maturovaném oocyty, její obsah po oplození klesá až do časného 8-buněčného stádia, poté dochází k opětovnému nárůstu hladiny. Zvýšení exprese u genů na úrovni 8-buněčného stádia (major genome activation) lze úspěšně inhibovat pomocí  $\alpha$ -amanitinu, u TMSB4 je exprese citlivá k  $\alpha$ -amanitinu také na 2–4-buněčné úrovni (minor genome activation), oproti tomu u RNF4, NCOR1 ani SUMO1 není možné na tomto stádiu zvýšení exprese blokovat.

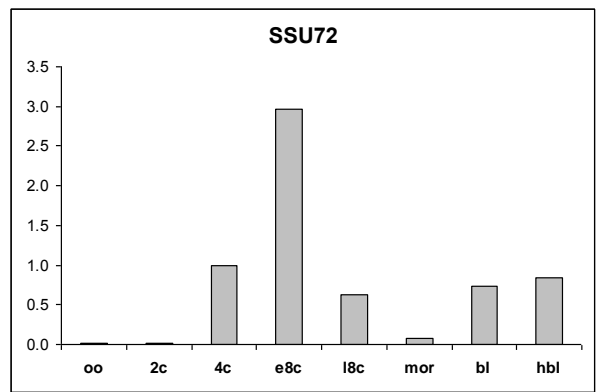
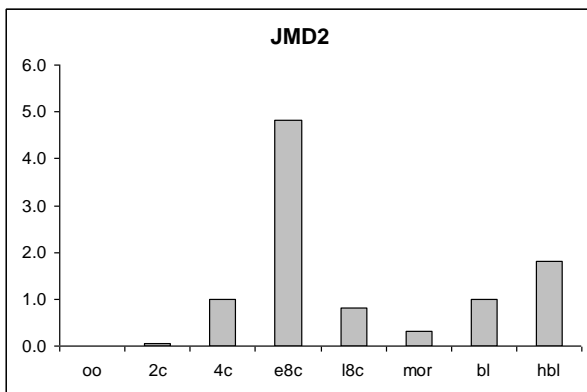
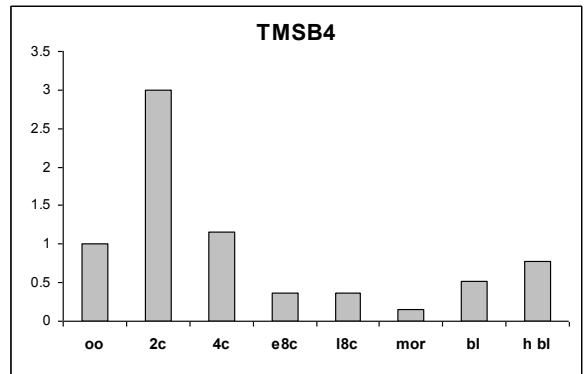
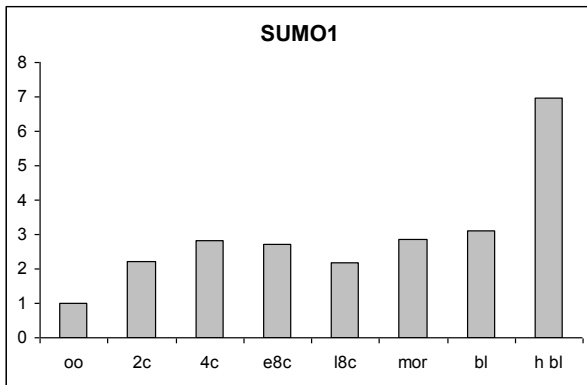
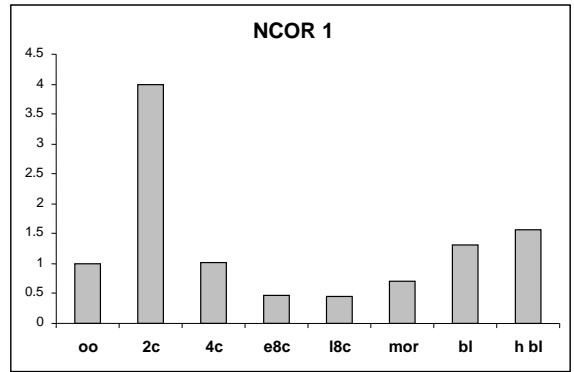
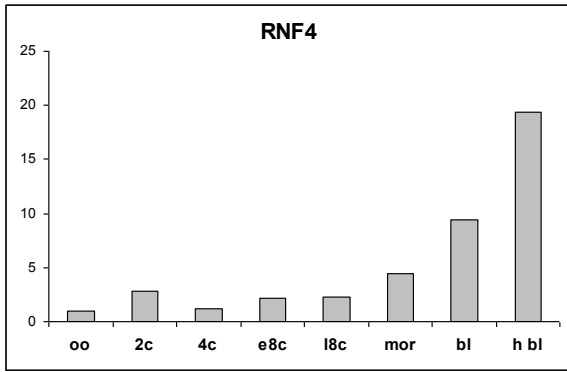
Nejzajímavějším výsledkem je nalezení přechodné zvýšení exprese transkriptu pro TMSB4. Depolymerizace a polymerizace aktinu je dynamický proces, bez něž by se neobešla řada buněčných dějů. Mitóza i meióza, vývojové události, jako např. vydělení pólového tělíska, migrace buněčných organel, exprese některých mRNA či dělení

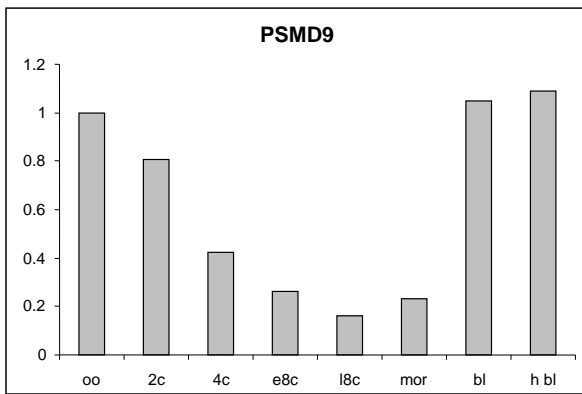
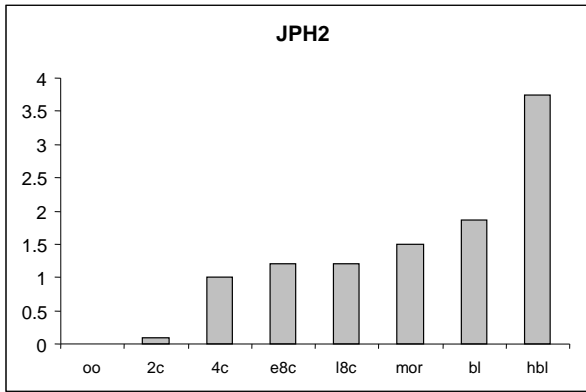
blastomer v časném embryu jsou procesy, závislé na neustálé reorganizaci aktinových filament (Wang et al. 2000). V časném embryonálním vývoji je výstavba nových vláken řízena spíše dostupností jednotlivých monomerů, než syntézou nového aktinu. Protože TMSB4 je schopen vyvázat G-aktin a tím zabezpečit buňce dostatečnou zásobu stavebních jednotek pro polymerizaci, stejně jako profilin (Wang et al. 2000), mohl by se podílet na stabilizaci a kinetických vlastnostech aktinových vláken (celkové výsledky shrnuty v obr.4).

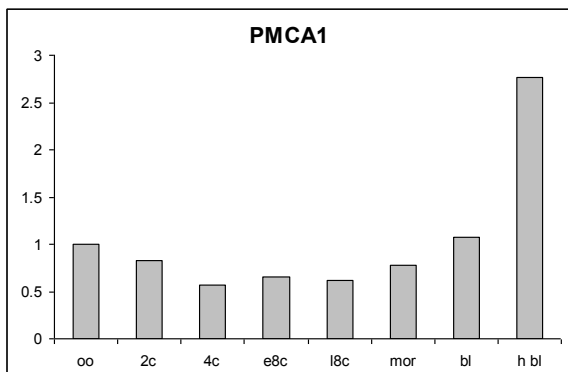
Transkripty, u nichž nebylo možno snížit zvýšení exprese na úrovni 2–4-buněčného embrya, jsou pravděpodobně maternálního původu, které byly modifikovány polyadenylací po úspěšném oplození (Potireddy et al. 2006).

Tab.1: Seznam genů použitých pro rel-time RT/PCR

Identity	Abbreviation	Homology	Gene Bank Accession Number
<i>Bos taurus</i> similar to nuclear receptor co-repressor 1, transcript variant 3	NCOR1	86%	XM_866711
<i>Bos taurus</i> similar to RING finger protein 4	RNF4	98%	NM_001046589
<i>Bos taurus</i> SMT3 suppressor of mif two 3 homolog 1 ( <i>S. cerevisiae</i> )	SUMO1	90%	BC102884
<i>Bos taurus</i> thymosin, beta 4	TMSB4	96%	BC133478
<i>Bos taurus</i> similar to Jumonji domain containing 2D	JMD2	94%	XM_870306
<i>Bos taurus</i> hypothetical LOC519104	SSU72	96%	XM_597314
<i>Bos taurus</i> junctophilin 2 (JPH2), mRNA	JPH2	91%	NM_001040579
<i>Homo sapiens</i> 26S proteasome, subunit 9	PSMD9	96%	AF001212
<i>Bos taurus</i> plasma membrane Calcium transporting ATPase mRNA	PMCA1	95%	AF 332982







Obr. 4: Genová exprese v průběhu preimplantačního vývoje skotu

(oo – oocyt MII, 2c – 2-buněčné, 4c – 4-buněčné, e8c – časně 8-buněčné, l8c – pozdní 8-buněčné, mor – morula, bl – blastocysta, hbl – vyklubaná „hatchovaná“ - blastocysta)

## 4 SHRNUTÍ

---

Zavedla jsem real-time RT-PCT mezi základní metodiky, využívané v naší laboratoři.

Během *in vitro* kultivace prasečích oocytů, kumulárních a granulózních buněk a *in vivo* expanze oocyt kumulárních komplexů byl stanoven expresní profil *GDF9* mRNA, proteinu z rodiny TGF $\beta$  faktorů. Získaná parciální sekvence byla vložena do databáze EMBL/GenBank/DDBJ a gen byl lokalizován na prasečím chromozomu 2. Na rozdíl od myši byl transkript detekován poprvé též v granulózních i kumulárních buňkách rostoucích a preovulačních folikulů. Hladina *GDF9* mRNA během *in vitro* kultivace i *in vivo* expanze klesala ve všech vzorcích.

Popsali jsme signální dráhy, kterými insulínový růstový faktor I (IGFI) zvyšuje FSH-stimulovanou expanzi oocyt-kumulárních komplexů. Potvrdili jsme, že IGFI v kombinaci s FSH zvyšuje produkci hyaluronové kyseliny. Během kultivace kumulárních buněk s FSH došlo k postupnému snížení exprese *Has2* mRNA. Avšak po 20 hodinách byla hladina stále detekovatelná v případě, kdy byl do média přidán i IGFI. Pomocí inhibitorů Akt a MAP kinázy jsme prokázali, že aktivita obou kináz je důležitá pro produkci i retenci HA.

U bovinních blastocyst, připravených za rozdílných experimentálních podmínek (*in vitro*, *in vivo* v ovčím vejcovodu a v kombinaci obou způsobů) byla stanovena exprese genů pro *Bax*, *L37* a *S3a*. V blastocystách, kultivovaných kompletně nebo v konečné fázi v SOF, byly prokázány nejvyšší relativní koncentrace mRNA pro proapoptický gen *Bax*. Lze shrnout, že nejkritičtější fázi vývoje embrya je počáteční období, ve kterém dochází k přechodu z maternální k embryonální kontrole genové exprese. Blastocysty kultivované od druhého do sedmého dne vývoje v ovčím vejcovodu jsou vývojově schopnější a kvalitou vysoce podobné embryím získaným *in vivo*. Podmínky *in vitro* kultivace neposkytují přísun všech potřebných faktorů, které by zabezpečily kvalitní vývoj embryí.

U bovinních blastocyst, připravených z oocytů po izolaci s přesně definovaných folikulů, byla stanovena exprese genů pro *Bax*, *Cx31* a *Cx43*. U embryí kultivovaných 8 dní v *in vitro* podmínkách po izolaci oocytů z folikulů ve fázi růstu/stagnace byla detekována nejvyšší hladina transkriptu pro *Cx43*. Konexiny tvoří hlavní proteinovou jednotku mezibuněčných spojů, blastocysty v embryích s větším obsahem takovýchto gap junctions spolu intenzivně komunikují a jsou vývojově schopnější. *Cx43* by bylo možné použít jako jeden z markerů kvality blastocyst.

Pomocí metody subtraktivní hybridizace bylo nalezeno přes 200 pozitivních sekvencí genů, rozdílně exprimovaných mezi oocytem MII a 4-buněčným embryem skotu. Celkem u 14 vybraných genů s rozdílnými funkcemi jejich produktů byla stanovena exprese během preimplantačního vývoje skotu.

## 5 CITOVANÁ LITERATURA

---

- 1) Aoki F, Worrada DM, Schultz RM. **Regulation of transcriptional activity during the first and second cell cycles in the preimplantation mouse embryo.** *Dev Biol* 1997 Jan 15; 181: 296-307.
- 2) Bachvarova RF: **A maternal tail of poly(A): the long and the short of it.** *Cell*. 1992 Jun 12; 69(6): 895-7. Review.
- 3) Bettegowda A, Smith GW. **Mechanisms of maternal mRNA regulation: implications for mammalian early embryonic development.** *Front Biosci*. 2007 May 1; 12: 3713-26. Review.
- 4) Bettegowda A, Lee KB, Smith GW. **Cytoplasmic and nuclear determinants of the maternal-to-embryonic transition.** *Reprod Fertil Dev*. 2008; 20(1):45-53.
- 5) Boni R, Tosti E, Roviello S, Dale B. **Intercellular communication in in vivo- and in vitro-produced bovine embryos.** *Biol Reprod*. 1999 Oct; 61(4):1050-5.
- 6) Bouniol C, Nguyen E, Debey P. **Endogenous transcription occurs at the 1-cell stage in the mouse embryo.** *Exp Cell Res* 1995; 218:57-62.
- 7) Buccione R, Vanderhyden BC, Caron PJ, Eppig JJ. **FSH-induced expansion of the mouse cumulus oophorus in vitro is dependent upon a specific factor(s) secreted by the oocyte.** *Dev Biol*. 1990 Mar; 138(1):16-25.
- 8) Bui LC, Leandri RD, Renard JP, and Duranthon V. **SSH adequacy to preimplantation mammalian development: scarce specific transcripts cloning despite irregular normalisation.** *BMC Genomics* 2005; 6:155.
- 9) Bultman SJ, Gebuhr TC, Pan H, Svoboda P, Schultz RM, Magnuson T. **Maternal BRG1 regulates zygotic genome activation in the mouse.** *Genes Dev* 2006 Jul 1; 20(13):1744-54.
- 10) Bustin SA. **Absolute quantification of mRNA using real-time reverse transcription polymerase chain reaction assays.** *J Mol Endocrinol*. 2000 Oct; 25(2):169-93.
- 11) Bustin SA. **Quantification of mRNA using real-time reverse transcription PCR (RT-PCR): trends and problems.** *J Mol Endocrinol*. 2002 Aug; 29(1):23-39. Review.
- 12) Bustin SA, Benes V, Nolan T, Pfaffl MW. **Quantitative real-time RT-PCR-a perspective.** *J Mol Endocrinol* 2005 Jun; 34(3):597-601. Review.
- 13) Camous S, Kopečný V, Flechon JE. **Autoradiographic detection of the earliest stage of [3/H]-uridine incorporation into the cow embryo.** *Biol Cell* 1986; 58:195-200.
- 14) Conover JC, Temeles GL, Zimmermann JW, Burke B, Schultz RM. **Stage-specific expression of a family of proteins that are major products of zygotic gene activation in the mouse embryo.** *Dev Biol* 1991 Apr; 144:392-404.
- 15) Dedova IV, Nikolaeva OP, Safer D, De La Cruz EM, dos Remedios CG. **Thymosin beta4 induces a conformational change in actin monomers.** *Biophys J*. 2006 Feb 1; 90(3):985-92. Epub 2005 Nov 4.
- 16) Diatchenko L, Lau YF, Campbell AP, Chenchik A, Moqadam F, Huang B, Lukyanov S, Lukyanov K, Gurskaya N, Sverdlov ED, Siebert PD. **Suppression subtractive hybridization: a method for generating differentially regulated or tissue-specific cDNA probes and libraries.** *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1996 Jun 11; 93(12):6025-30.
- 17) Dong J, Albertini DF, Nishimori K, Kumar TR, Lu N, Matzuk MM. **Growth differentiation factor-9 is required during early ovarian folliculogenesis.** *Nature*. 1996 Oct 10; 383(6600):531-5.
- 18) Eckerdt F, Strebhardt K. **Polo-like kinase 1: target and regulator of anaphase-promoting complex/cyclosome-dependent proteolysis.** *Cancer Res*. 2006 Jul 15; 66(14):6895-8.
- 19) Elvin JA, Clark AT, Wang P, Wolfman NM, Matzuk MM. **Paracrine actions of growth differentiation factor-9 in the mammalian ovary.** *Mol Endocrinol*. 1999 Jun; 13(6):1035-48.
- 20) Elvin JA, Yan C, Matzuk MM.: **Oocyte-expressed TGF-beta superfamily members in**



- female fertility.** *Mol Cell Endocrinol.* 2000 Jan 25; 159(1-2):1-5.
- 21) Eppig JJ. **Oocyte control of ovarian follicular development and function in mammals.** *Reproduction.* 2001 Dec; 122(6):829-38. Review.
  - 22) Fair T, Hyttel P, Greve T. **Bovine oocyte diameter in relation to maturational competence and transcriptional activity.** *Mol Reprod Dev.* 1995 Dec; 42(4):437-42.
  - 23) Fair T, Hulshof SC, Hyttel P, Greve T, Boland M. **Nucleus ultrastructure and transcriptional activity of bovine oocytes in preantral and early antral follicles.** *Mol Reprod Dev.* 1997 Feb; 46(2):208-15.
  - 24) Fair T, Carter F, Park S, Evans AC, Lonergan P. **Global gene expression analysis during bovine oocyte in vitro maturation.** *Theriogenology.* 2007 Sep 1; 68 Suppl 1:S91-7. Epub 2007 May 18. Review.
  - 25) Falco G, Lee SL, Stanghellini I, Bassey UC, Hamatani T, Ko MS. **Zscan4: a novel gene expressed exclusively in late 2-cell embryos and embryonic stem cells.** *Dev Biol.* 2007 Jul 15; 307(2):539-50. Epub 2007 May 8.
  - 26) Flach G, Johnson MH, Braude PR, Taylor RA, Bolton VN. **The transition from maternal to embryonic control in the 2-cell mouse embryo.** *EMBO J.* 1982; 1(6):681-6
  - 27) Freeman WM, Walker SJ, Vrana KE. **Quantitative RT-PCR: pitfalls and potential.** *Biotechniques.* 1999 Jan; 26(1):112-22, 124-5. Review
  - 28) Ghanem N, Hölker M, Rings F, Jennen D, Tholen E, Sirard MA, Torner H, Kanitz W, Schellander K, Tesfaye D. **Alterations in transcript abundance of bovine oocytes recovered at growth and dominance phases of the first follicular wave.** *BMC Dev Biol.* 2007 Jul 27; 7:90.
  - 29) Gilchrist RB, Ritter LJ, Armstrong DT. **Oocyte-somatic cell interactions during follicle development in mammals.** *Anim Reprod Sci.* 2004 Jul; 82-83:431-46. Review.
  - 30) Gilchrist RB, Lane M, Thompson JG. **Oocyte-secreted factors: regulators of cumulus cell function and oocyte quality.** *Hum Reprod Update.* 2008 Mar-Apr; 14(2):159-77. Epub 2008 Jan 5. Review.
  - 31) Hamatani T, Carter MG, Sharov AA, Ko MS. **Dynamics of global gene expression changes during mouse preimplantation development.** *Dev Cell* 2004 Jan; 6(1):117-31.
  - 32) Hamatani T, Ko MSh, Yamada M, Kuji N, Mizusawa Y, Shoji M, Hada T, Asada H, Maruyama T, Yoshimura Y. **Global gene expression profiling of preimplantation embryos.** *Hum Cell.* 2006 Aug; 19(3):98-117. Review.
  - 33) Higuchi R, Fockler C, Dollinger G, Watson R. **Kinetic PCR analysis: real-time monitoring of DNA amplification reactions.** *Biotechnology (N Y).* 1993 Sep; 11(9):1026-30.
  - 34) Hirvonen-Santti SJ, Sriraman V, Anttonen M, Savolainen S, Palvimo JJ, Heikinheimo M, Richards JS, Jänne OA. **Small nuclear RING finger protein expression during gonad development: regulation by gonadotropins and estrogen in the postnatal ovary.** *Endocrinology.* 2004 May; 145(5):2433-44. Epub 2004 Jan 28.
  - 35) Hoffman L, Rechsteiner M. **Molecular cloning and expression of subunit 9 of the 26S proteasome.** *FEBS Lett.* 1997 Mar 10; 404(2-3):179-84.
  - 36) Houghton FD. **Role of gap junctions during early embryo development.** *Reproduction.* 2005 Feb; 129(2):129-35. Review.
  - 37) Hwang KC, Park SY, Park SP, Lim JH, Cui XS, Kim NH. **Specific maternal transcripts in bovine oocytes and cleaved embryos: identification with novel DDRT-PCR methods.** *Mol Reprod Dev.* 2005 Jul; 71(3):275-83.
  - 38) Chen Z, Zang J, Kappler J, Hong X, Crawford F, Wang Q, Lan F, Jiang C, Whetstone J, Dai S, Hansen K, Shi Y, Zhang G. **Structural basis of the recognition of a methylated histone tail by JMJD2A.** *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2007 Jun 26; 104(26):10818-23. Epub 2007 Jun 13.
  - 39) Jepsen K, Hermanson O, Onami TM, Gleiberman AS, Lunyak V, McEvelly RJ, Kurokawa R, Kumar V, Liu F, Seto E, Hedrick SM, Mandel G, Glass CK, Rose DW, Rosenfeld MG. **Combinatorial roles of the nuclear receptor corepressor in transcription and development.** *Cell.* 2000 Sep 15; 102(6):753-63.
  - 40) Jumaa H, Wei G, Nielsen PJ. **Blastocyst formation is blocked in mouse embryos lacking the splicing factor SRp20.** *Curr Biol.* 1999 Aug 26; 9(16):899-902.

- 41) Joyce IM, Pendola FL, Wigglesworth K, Eppig JJ. **Oocyte regulation of kit ligand expression in mouse ovarian follicles.** *Dev Biol.* 1999 Oct 15; 214(2):342-53.
- 42) Kan NG, Stemmler MP, Junghans D, Kanzler B, de Vries WN, Dominis M, Kemler R. **Gene replacement reveals a specific role for E-cadherin in the formation of a functional trophoctoderm.** *Development.* 2007 Jan; 134(1):31-41. Epub 2006 Nov 30.
- 43) Kanka J. **Gene expression and chromatin structure in the pre-implantation embryo.** *Theriogenology* 2003 Jan 1; 59:3-19.
- 44) Kidder GM, Green AF, McLachlin JR. **On the use of alpha-amanitin as a transcriptional blocking agent in mouse embryos: a cautionary note.** *J Exp Zool.* 1985 Jan; 233(1):155-9
- 45) Kidder GM, Mhawi AA. **Gap junctions and ovarian folliculogenesis.** *Reproduction.* 2002 May; 123(5):613-20.
- 46) Kigami D, Minami N, Takayama H, Imai H. **MuERV-L is one of the earliest transcribed genes in mouse one-cell embryos.** *Biol Reprod.* 2003 Feb; 68(2):651-4.
- 47) Knight PG, Glister C. **TGF-beta superfamily members and ovarian follicle development.** *Reproduction.* 2006 Aug; 132(2):191-206. Review.
- 48) Ko MS, Kitchen JR, Wang X, Threat TA, Wang X, Hasegawa A, Sun T, Grahovac MJ, Kargul GJ, Lim MK, Cui Y, Sano Y, Tanaka T, Liang Y, Mason S, Paonessa PD, Sauls AD, DePalma GE, Sharara R, Rowe LB, Eppig J, Morrell C, Doi H. **Large-scale cDNA analysis reveals phased gene expression patterns during preimplantation mouse development.** *Development* 2000 Apr; 127(8):1737-49.
- 49) Kopecny V. **High-Resolution Autoradiographic studies of comparative nucleogenesis and genome reactivation during early embryogenesis in pig, man and cattle.** *Reprod Nutr Dev* 1989; 29:589-600.
- 50) Latham KE, Schultz RM. **Embryonic genome activation.** *Front Biosci* 2001 Jun; 6:748-759. Review.
- 51) Lee KY, DeMayo FJ. **Animal models of implantation.** *Reproduction.* 2004 Dec; 128(6):679-95. Review.
- 52) Lee GS, Kim HS, Hwang WS, Hyun SH. **Characterization of porcine growth differentiation factor-9 and its expression in oocyte maturation.** *Mol Reprod Dev.* 2008 May; 75(5):707-14.
- 53) Li HK, Kuo TY, Yang HS, Chen LR, Li SS, Huang HW. **Differential gene expression of bone morphogenetic protein 15 and growth differentiation factor 9 during in vitro maturation of porcine oocytes and early embryos.** *Anim Reprod Sci.* 2008 Jan 30; 103(3-4):312-22. Epub 2006 Dec 17.
- 54) Liang P, Pardee AB. Differential display of eukaryotic messenger RNA by means of the polymerase chain reaction. *Science* 1992 Aug; 257: 967-971.
- 55) Lonergan P, Rizos D, Gutierrez-Adan A, Fair T, Boland MP. **Oocyte and embryo quality: effect of origin, culture conditions and gene expression patterns.** *Reprod Domest Anim* 2003a Aug; 38:259-67. Review.
- 56) Lonergan P, Rizos D, Gutiérrez-Adán A, Fair T, Boland MP. **Effect of culture environment on embryo quality and gene expression - experience from animal studies.** *Reprod Biomed Online.* 2003b Dec; 7(6):657-63. Review.
- 57) Lonergan P, Fair T, Corcoran D, Evans AC. **Effect of culture environment on gene expression and developmental characteristics in IVF-derived embryos.** *Theriogenology.* 2006 Jan 7; 65(1):137-52. Epub 2005 Nov 9. Review.
- 58) Lonergan P, Fair T. **In vitro-produced bovine embryos: dealing with the warts.** *Theriogenology.* 2008 Jan 1; 69(1):17-22. Epub 2007 Oct 24. Review.
- 59) Ma L, Zhao X, Zhu X. **Mitosis/CENP-F in mitosis, transcriptional control, and differentiation.** *J Biomed Sci.* 2006 Mar; 13(2):205-13. Epub 2006 Feb 3. Review.
- 60) Mao J, Smith MF, Rucker EB, Wu GM, McCauley TC, Cantley TC, Prather RS, Didion BA, Day BN. **Effect of epidermal growth factor and insulin-like growth factor I on porcine preantral follicular growth, antrum formation, and stimulation of granulosa cell proliferation and suppression of apoptosis in vitro.** *J Anim Sci.* 2004 Jul; 82(7):1967-75.
- 61) Machatkova M, Jokesova E, Horoky F, Krepelova A. **Utilization of the growth phase of the first follicular wave for bovine oocyte collection improves blastocyst**

- production.** *Theriogenology*. 2000 Sep 1;54(4):543-50.
- 62) Machatkova M, Krausova K, Jokesova E, Tomanek M. **Developmental competence of bovine oocytes: effects of follicle size and the phase of follicular wave on in vitro embryo production.** *Theriogenology*. 2004 Jan 15; 61(2-3):329-35.
  - 63) Mehlmann LM. **Stops and starts in mammalian oocytes: recent advances in understanding the regulation of meiotic arrest and oocyte maturation.** *Reproduction*. 2005 Dec; 130(6):791-9. Review.
  - 64) Memili E, First NL. **Developmental changes in RNA polymerase II in bovine oocytes, early embryos, and effect of alpha-amanitin on embryo development.** *Mol Reprod Dev* 1998; 51(4):381-9.
  - 65) Memili E, First NL. **Zygotic and embryonic gene expression in cow: a review of timing and mechanisms of early gene expression as compared with other species.** *Zygote* 2000 Feb; 87-96. Review
  - 66) Mermillod P, Oussaid B, Cognié Y. **Aspects of follicular and oocyte maturation that affect the developmental potential of embryos.** *J Reprod Fertil Suppl*. 1999; 54:449-60. Review.
  - 67) Minami N, Suzuki T, Tsukamoto S. **Zygotic gene activation and maternal factors in mammals.** *J Reprod Dev*. 2007 Aug; 53(4):707-15. Review.
  - 68) Mohamed OA, Bustin M, Clarke HJ. **High-mobility group proteins 14 and 17 maintain the timing of early embryonic development in the mouse.** *Dev Biol* 2001; 229:237-249.
  - 69) Mourot M, Dufort I, Gravel C, Algriany O, Dieleman S, Sirard MA: **The influence of follicle size, FSH-enriched maturation medium and early cleavage on bovine oocyte maternal mRNA levels.** *Mol Reprod Dev*. 2006 Nov; 73(11):1367-79.
  - 70) Natale DR, De Sousa PA, Westhusin ME, Watson AJ. **Sensitivity of bovine blastocyst gene expression patterns to culture environments assessed by differential display RT-PCR** *Reproduction* 2001; 122:687-93.
  - 71) Nagyová E, Procházka R, Vanderhyden BC. **Oocyectomy does not influence synthesis of hyaluronic acid by pig cumulus cells: retention of hyaluronic acid after insulin-like growth factor-I treatment in serum-free medium.** *Biol Reprod*. 1999 Sep; 61(3):569-74.
  - 72) Nagyova E, Camaioni A, Prochazka R, Day AJ, Salustri A. **Synthesis of tumor necrosis factor alpha-induced protein 6 in porcine preovulatory follicles: a study with A38 antibody.** *Biol Reprod*. 2008 May; 78(5):903-9. Epub 2008 Feb 6.
  - 73) Niemann H and Wrenzycki C. **Alterations of expression of developmentally important genes in preimplantation bovine embryos by in vitro culture conditions: Implications for subsequent development.** *Theriogenology* 2000; 53:21-34. Review
  - 74) Paranjape SM, Krumm A, Kadonaga JT. **HMG17 is a chromatin-specific transcriptional coactivator that increases the efficiency of transcription initiation.** *Genes Dev*. 1995 Aug 15; 9(16):1978-91.
  - 75) Park JY, Su YQ, Ariga M, Law E, Jin SL, Conti M: **EGF-like growth factors as mediators of LH action in the ovulatory follicle.** *Science*. 2004 Jan 30; 303(5658):682-4. Epub 2004 Jan 15.
  - 76) Pestova TV, Kolupaeva VG, Lomakin IB, Pilipenko EV, Shatsky IN, Agol VI, Hellen CU. **Molecular mechanisms of translation initiation in eukaryotes.** *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2001 Jun 19; 98(13):7029-36. Review.
  - 77) Pernetier S, Perreau C, Uzbekova S, Thélie A, Delaleu B, Mermillod P, Dalbiès-Tran R. **MATER protein expression and intracellular localization throughout folliculogenesis and preimplantation embryo development in the bovine.** *BMC Dev Biol*. 2006 Jun 6; 6:26.
  - 78) Ponsuksili S, Tesfaye D, El-Halawany N, Schellander K, Wimmers K. **Stage-specific expressed sequence tags obtained during preimplantation bovine development by differential display RT-PCR and suppression subtractive hybridization.** *Prenat Diagn* 2002; 22(12):1135-42.
  - 79) Potireddy S, Vassena R, Patel BG, Latham KE. **Analysis of polysomal mRNA populations of mouse oocytes and zygotes: dynamic changes in maternal mRNA utilization and function.** *Dev Biol* 2006; 298(1):155-66

- 80) Procházka R, Nagyová E, Rimkevicová Z, Nagai T, Kikuchi K, Motlík J. **Lack of effect of oocyctectomy on expansion of the porcine cumulus.** *J Reprod Fertil.* 1991 Nov; 93(2):569-76.
- 81) Reyes-Reyes M, Hampsey M. **Role for the Ssu72 C-terminal domain phosphatase in RNA polymerase II transcription elongation.** *Mol Cell Biol.* 2007 Feb; 27(3):926-36. Epub 2006 Nov 13.
- 82) Richards JS, Russell DL, Robker RL, Dajee M, Alliston TN. **Molecular mechanisms of ovulation and luteinization.** *Mol Cell Endocrinol.* 1998 Oct 25; 145(1-2):47-54. Review.
- 83) Richards JS. **Ovulation: new factors that prepare the oocyte for fertilization.** *Mol Cell Endocrinol.* 2005; 234(1-2):75-9. Review.
- 84) Rizos D, Ward F, Boland MP, Lonergan P. **Effect of culture system on the yield and quality of bovine blastocysts as assessed by survival after vitrification.** *Theriogenology* 2001; 56(1):1-16.
- 85) Rizos D, Lonergan P, Boland MP, Arroyo-Garcia R, Pintado B, de la Fuente J, Gutierrez-Adan A. **Analysis of differential messenger RNA expression between bovine blastocysts produced in different culture systems: implications for blastocyst quality.** *Biol Reprod* 2002a; 66:589-95.
- 86) Rizos D, Ward F, Duffy P, Boland MP, Lonergan P. **Consequences of bovine oocyte maturation, fertilization or early embryo development *in vitro* versus *in vivo*: implications for blastocyst yield and blastocyst quality.** *Mol Reprod Dev.* 2002b; 61:234-248.
- 87) Ruddock-D'Cruz NT, Hall VJ, Tecirlioglu RT, French AJ. **Gene expression analysis of single preimplantation bovine embryos and the consequence for developmental potential.** *Soc Reprod Fertil Suppl.* 2007; 64:341-63.
- 88) Saiki, R.K., Scharf, S., Faloona, F., Mullis, K.B., Horn, G.T., Erlich, H.A. and Arnheim, N. **Enzymatic amplification of beta-globin genomic sequences and restriction site analysis for diagnosis of sickle cell anemia.** *Science* 1985; 230(4732):1350-4.
- 89) Salustri A, Yanagishita M, Hascall VC. **Synthesis and accumulation of hyaluronic acid and proteoglycans in the mouse cumulus cell-oocyte complex during follicle-stimulating hormone-induced mucification.** *J Biol Chem.* 1989 Aug 15; 264(23):13840-7.
- 90) Singh B, Armstrong DT.: **Insulin-like growth factor-1, a component of serum that enables porcine cumulus cells to expand in response to follicle-stimulating hormone *in vitro*.** *Biol Reprod.* 1997 Jun; 56(6):1370-5.
- 91) Sirard MA. **Resumption of meiosis: mechanism involved in meiotic progression and its relation with developmental competence.** *Theriogenology* 2001; 55:1241-54. Review
- 92) Sirard MA, Richard F, Blondin P, Robert C. **Contribution of the oocyte to embryo quality.** *Theriogenology* 2006; 65(1):126-36. Review
- 93) Schena M, Shalon D, Davis RW, Brown PO. **Quantitative monitoring of gene expression patterns with a complementary DNA microarray.** *Science* 1995; 270(5235):467-470
- 94) Schultz RM, Worrad DM: **Role of chromatin structure in zygotic gene activation in the mammalian embryo.** *Semin Cell Biol.* 1995 Aug; 6(4):201-8. Review.
- 95) Schultz RM. **The molecular foundations of the maternal to zygotic transition in the preimplantation embryo.** *Hum Reprod Update.* 2002; 8(4):323-31. Review.
- 96) Soyal SM, Amleh A, Dean J. **FIGalpha, a germ cell-specific transcription factor required for ovarian follicle formation.** *Development* 2000; 127(21):4645-54.
- 97) Sun QY, Nagai T. **Molecular mechanisms underlying pig oocyte maturation and fertilization.** *J Reprod Dev.* 2003 Oct; 49(5):347-59. Review.
- 98) Stein P, Worrad DM, Belyaev ND, Turner BM, Schultz RM. **Stage-dependent redistributions of acetylated histones in nuclei of the early preimplantation mouse embryo.** *Mol Reprod Dev.* 1997 Aug; 47(4):421-9.
- 99) Svoboda P, Stein P, Anger M, Bernstein E, Hannon GJ, Schultz RM. **RNAi and expression of retrotransposons MuERV-L and IAP in preimplantation mouse embryos.** *Dev Biol* 2004; 269(1):276-85.
- 100) Takeshima H, Komazaki S, Nishi M, Iino M, Kangawa K. **Junctophilins: a novel family of junctional membrane complex proteins.** *Mol Cell.* 2000 Jul; 6(1):11-22.

- 101) Tang F, Kaneda M, O'Carroll D, Hajkova P, Barton SC, Sun YA, Lee C, Tarakhovsky A, Lao K, Surani MA. **Maternal microRNAs are essential for mouse zygotic development.** *Genes Dev.* 2007 Mar 15; 21(6):644-8.
- 102) Tesfaye D, Ponsuksili S, Wimmers K, Gilles M, Schellander K. **Identification and quantification of differentially expressed transcripts in in vitro-produced bovine preimplantation stage embryos.** *Mol Reprod Dev.* 2003 Oct; 66(2):105-14.
- 103) Thompson EM, Legouy E, Renard JP. **Mouse embryos do not wait for the MBT: chromatin and RNA polymerase remodeling in genome activation at the onset of development.** *Dev Genet.* 1998; 22(1):31-42. Review.
- 104) Tiefenbach J, Novac N, Ducasse M, Eck M, Melchior F, Heinzl T. **SUMOylation of the corepressor N-CoR modulates its capacity to repress transcription.** *Mol Biol Cell.* 2006 Apr; 17(4):1643-51. Epub 2006 Jan 18.
- 105) Torres-Padilla ME, Zernicka-Goetz M. **Role of TIF1alpha as a modulator of embryonic transcription in the mouse zygote.** *J Cell Biol.* 2006 Jul 31; 174(3):329-38.
- 106) Trotter KW, Archer TK. **The BRG1 transcriptional coregulator.** *Nucl Recept Signal.* 2008 Feb 1; 6: e004. Review.
- 107) Uzbekova S, Roy-Sabau M, Dalbiès-Tran R, Perreau C, Papillier P, Mompert F, Thelie A, Penetier S, Cognie J, Cadoret V, Royere D, Monget P, Mermillod P. **Zygote arrest 1 gene in pig, cattle and human: evidence of different transcript variants in male and female germ cells.** *Reprod Biol Endocrinol.* 2006 Mar 21; 4:12.
- 108) Vanderhyden BC, Caron PJ, Buccione R, Eppig JJ. **Developmental pattern of the secretion of cumulus expansion-enabling factor by mouse oocytes and the role of oocytes in promoting granulosa cell differentiation.** *Dev Biol.* 1990 Aug; 140(2):307-17.
- 109) Vanderhyden B. **Molecular basis of ovarian development and function.** *Front Biosci.* 2002 Sep 1; 7:d2006-22. Review.
- 110) Vigneault C, McGraw S, Massicotte L, Sirard MA. **Transcription factor expression patterns in bovine in vitro-derived embryos prior to maternal-zygotic transition.** *Biol Reprod.* 2004; 70(6):1701-9.
- 111) Viuff D, Avery B, Greve T, King WA, Hyttel P **Transcriptional activity in in vitro produced bovine two- and four-cell embryos.** *Mol Reprod Dev* 1996; 43(2):171-179.
- 112) Wang WH, Abeydeera LR, Prather RS, Day BN. **Polymerization of nonfilamentous actin into microfilaments is an important process for porcine oocyte maturation and early embryo development.** *Biol Reprod.* 2000 May; 62(5):1177-83.
- 113) Wang Q, Chung YG, deVries WN, Struwe M, Latham KE. **Role of protein synthesis in the development of a transcriptionally permissive state in one-cell stage mouse embryos.** *Biol Reprod* 2001; 65(3):748-54
- 114) Watson AJ, Natale DR, Barcroft LC: **Molecular regulation of blastocyst formation.** *Anim Reprod Sci.* 2004 Jul; 82-83:583-92. Review.
- 115) Wrenzycki C, Herrmann D, Niemann H. **Messenger RNA in oocytes and embryos in relation to embryo viability.** *Theriogenology* 2007; 68 Suppl 1:S77-83. Epub 2007 May 23.
- 116) Yao J, Ren X, Ireland JJ, Coussens PM, Smith TP, Smith GW. **Generation of a bovine oocyte cDNA library and microarray: resources for identification of genes important for follicular development and early embryogenesis.** *Physiol Genomics.* 2004 Sep 16; 19(1):84-92.
- 117) Ying Y, Qi X, Zhao GQ. **Induction of primordial germ cells from murine epiblasts by synergistic action of BMP4 and BMP8B signaling pathways.** *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2001 Jul 3; 98(14):7858-62. Epub 2001 Jun 26.
- 118) Zacharias DA, Kappen C. **Developmental expression of the four plasma membrane calcium ATPase (Pmca) genes in the mouse.** *Biochim Biophys Acta.* 1999 Aug 5; 1428(2-3):397-405.
- 119) Zeng FY, Schultz RM. **Gene expression in mouse oocytes and preimplantation embryos: Use of suppression subtractive hybridization to identify oocyte- and embryo-specific genes.** *Biol Reprod* 2003; 68: 31-39.
- 120) Zeng F, Schultz RM. **RNA transcript profiling during zygotic gene activation in the preimplantation mouse. RNA transcript profiling during zygotic gene activation in the**

- preimplantation mouse embryo.** *Dev Biol.* 2005 Jul 1; 283(1):40-57.
- 121) Zhu G, Guo B, Pan D, Mu Y, Feng S.: **Expression of bone morphogenetic proteins and receptors in porcine cumulus-oocyte complexes during in vitro maturation.** *Anim Reprod Sci.* 2008 Mar 3; 104(2-4):275-83. Epub 2007 Feb 23.

## 6 SEZNAM PUBLIKACÍ

---

---

- 1 Lonergan P, Rizos D, Kanka J, **Nemcova L**, Mbaye AM, Kingston M, Wade M, Duffy P, Boland MP. **Temporal sensitivity of bovine embryos to culture environment after fertilization and the implications for blastocyst quality.** *Reproduction* 2003 Sep; 126(3):337-46.
- 2 Prochazka R, **Nemcova L**, Nagyova E, Kanka J. **Expression of Growth Differentiation Factor 9 Messenger RNA in Porcine Growing and Preovulatory Ovarian Follicles.** *Biol Reprod.* 2004 Oct; 71(4):1290-5. Epub 2004 Jun 9.
- 3 Cepica S, Prochazka R, Civanova K, Knoll A, **Nemcova L**, Masopust M, Kubickova S, Musilova P, Rubes J. :Partial molecular characterization and mapping of the GDF9 gene to porcine chromosome 2. *Anim Genet.* 2004 Jun; 35(3):261-2.
- 4 Jan Motlík, Milan Blaha, **Lucie Němcová** : Kinázy rodiny polo. *Vesmír* 8/2005,482-3
- 5 **Nemcova L**, Machatkova M, Hanzalova K, Horakova J, Kanka J. **Gene expression in bovine embryos derived from oocytes with different developmental competence collected at the defined follicular developmental stage.** *Theriogenology.* 2006 Apr 15; 65(7):1254-64. Epub 2005 Sep 19
- 6 **Nemcova L**, Nagyova E, Petlach M, Tomanek M, Prochazka R. **Molecular Mechanisms of Insulin-Like Growth Factor 1 Promoted Synthesis and Retention of Hyaluronic Acid in Porcine Oocyte-Cumulus Complexes.** *Biol Reprod.* 2007 Jun 76(6):1016-24. Epub 2007 Feb 28
- 7 Kaňka J, Kepkova K and **Nemcova L**: Alterations in abundance of gene transcripts during bovine preimplantation development – podáno do *Anim. Reprod. Sci.*

## 7 SEZNAM PREZENTACÍ

---

- 1 Němcová Lucie, Mbaye Abdou Madjib, Vignon Xavier, Kaňka Jiří: Expression of Polo-like kinase in bovine fibroblasts after serum deprivation – sborník mezinárodní konference: *From Oocyte to Embryonic Stem Cell: A Lesson from Pluripotency*, 6.-9.6. 2002, Čejkovice, Česká republika
- 2 R Prochazka, **L Nemcova**, AM Mbaye, J Kanka, E Nagyova, S Malek: Expression of growth differentiation factor-9 (GDF-9) in porcine ovarian follicles, *European Conference on Reproduction.*, Dec 2002, Tours, France
- 3 Kanka J, **Nemcova L.**, Kepkova K.: Alterations in the abundance of gene transcripts during bovine pre-implantation development, sborník mezinárodní konference: *21st Scientific Meeting of A.E.T.E.*, Keszthely 9<sup>th</sup> and 10<sup>th</sup> September 2005
- 4 **Nemcova L**, Machatkova M, Hanzalova K, Horakova J, Kanka J.: Abundance of gene transcripts in bovine embryos derived from oocytes with different meiotic competence collected at a defined follicular developmental stage, , sborník mezinárodní konference: *21st Scientific Meeting of A.E.T.E.*, Keszthely 9<sup>th</sup> and 10<sup>th</sup> September 2005
- 5 **Nemcova L**, Kepkova K and Kaňka J: Gene expression in the pre-implantation bovine embryo, sborník mezinárodní konference: *22nd Scientific Meeting of A.E.T.E.*, Zug 8.-9.9. 2006
- 6 Moravkova A, Malek O, **Nemcova L and** Horak V: Cytokine profiles of melanoma infiltrating lymphocytes in pig. *7th EFIS Tatra Immunology Conference*. Bratislava: EFIS, 2006. s. 35-35
- 7 Prochazka R, **Nemcova L** and Nagyova E: Development of LH receptors in pig oocytes-cumulus complexes cultured in medium with dibutyryl cAMP, sborník abstraktů mezinárodní konference: *Conference on Reproductive and Developmental Biology*. Praha, 21.-22.6. 2007
- 8 Kaňka J, **Nemcova L**, Kepková K, Moravcová T: Gene expression in the pre-implantation bovine embryo, sborník abstraktů mezinárodní konference: *Conference on Reproductive and Developmental Biology*. Praha, 21.-22.6. 2007
- 9 **Nemcova L**, Kepkova K and Kaňka J: Identification and characterization of gene transcripts during preimplantation embryo development in bovine, sborník mezinárodní konference: *2nd International Meeting on Mammalian Embryogenomics*. Paris,: 17-20.10. 2007, Paris
- 10 Eva Nagyova, **Lucie Nemcova** and Radek Prochazka: Expression of tumor necrosis factor –stimulated gene-6 in the porcine preovulatory ovarian follicles, sborník mezinárodní konference: *National Ovarian Workshop 9*, Cambridge, 8.-9.9. 2007
- 11 Nagyova Eva, **Nemcova Lucie**, Sutovsky Peter, Scsukova Sona, Sutovsky Miriam, Young-Joo Yi, Mlynarcikova Alzbeta and Prochazka Radek: Altered organization of the oocyte-cumulus extracellular matrix in the presence of proteasomal inhibitor MG132, *33rd FEBS Congress & 11th IUBMB Conference*, 28.6.-3.7. 2008

## 8 PŘÍLOHY

---

---

### **Expression of Growth Differentiation Factor 9 Messenger RNA in Porcine Growing and Preovulatory Ovarian Follicles.**

Prochazka R, Nemcova L, Nagyova E, Kanka J  
*Biol Reprod.* 2004 Oct;71(4):1290-5. Epub 2004 Jun 9.

### **Partial molecular characterization and mapping of the GDF9 gene to porcine chromosome 2.**

Čepica S, Procházka R, Cíváňová, K., Knoll, A, Němcová, L, Masopust M, Kubíčková S, Musilová P, Rubeš J.  
*Animal Genetics.* 2004: 35:261-262.

### **Molecular Mechanisms of Insulin-Like Growth Factor 1 Promoted Synthesis and Retention of Hyaluronic Acid in Porcine Oocyte-Cumulus Complexes.**

Nemcova L, Nagyova E, Petlach M, Tomanek M, Prochazka R  
*Biol Reprod.* 2007 Jun;76(6):1016-24. Epub 2007 Feb 28.

### **Temporal sensitivity of bovine embryos to culture environment after fertilization and the implications for blastocyst quality.**

Lonergan P, Rizos D, Kanka J, Nemcova L, Mbaye AM, Kingston M, Wade M, Duffy P, Boland MP  
*Reproduction* 2003 Sep;126(3):337-46.

### **Gene expression in bovine embryos derived from oocytes with different developmental competence collected at the defined follicular developmental stage.**

Nemcova L, Machatkova M, Hanzalova K, Horakova J, Kanka J  
*Theriogenology* 2006 Apr 15;65(7):1254-64. Epub 2005 Sep 19.

### **Alterations in abundance of gene transcripts during bovine preimplantation development**

Jiří Kaňka, Kateřina Kepková and Lucie Němcová  
podáno do *Anim. Reprod. Sci.*