

UNIVERZITA KARLOVA  
PŘÍRODOVĚDECKÁ FAKULTA

KATEDRA BUNĚČNÉ BIOLOGIE



DIPLOMOVÁ PRÁCE

**FAKTORY OVLIVŇUJÍCÍ VÝVOJ  
PARTHENOGENETICKÝCH EMBRYÍ MYŠI**

REGULATION OF DEVELOPMENT OF MOUSE  
PARTHENOGENETIC EMBRYOS

BC. DOMINIKA JETTMAROVÁ

*vedoucí práce: Ing. Josef Fulka, DrSc.*

PRAHA 2018



Experimentální práce byly provedeny v Oddělení biologie reprodukce Výzkumného ústavu živočišné výroby, v.v.i. v Praze-Uhřetěvesi, s finanční podporou Grantové agentury České republiky (projekt 17-08605S).





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

Praha 26. 4. 2018

*Dominika Jettmarová*

# ABSTRAKT

Vývoj haploidních parthenogenetických embryí myši (*Mus musculus*) nedosahuje stejné úrovně jako je tomu u normálních embryí. Cílem této diplomové práce bylo zjistit, zda se haploidní parthenogenetická embrya myši odlišují nukleocytoplasmatickým poměrem. Objem jádra parthenogenetických embryí roste s ploiditou. Nukleocytoplasmatický poměr haploidních embryí se mezi dvoubuněčným a čtyřbuněčným stádiem statisticky neliší ( $p = 0.052$ ), u diploidních a tetraploidních embryí byl naopak statisticky významný rozdíl ( $p < 0.001$ ). Nestandardní nukleocytoplasmatický poměr by mohl souviset s problematickým vývojem. Pochopení faktorů ovlivňujících preimplantační vývoj parthenogenetických embryí zvýší efektivitu derivace haploidních embryonálních kmenových buněk.

KLÍČOVÁ SLOVA: myš, embryo, parthenogenese, haploidní, diploidní, tetraploidní

# ABSTRACT

The development of mouse (*Mus musculus*) haploid parthenogenetic embryos does not reach the same level as normal embryos. The aim of this diploma thesis was to find out whether haploid parthenogenetic embryos of mice differ in the nucleocytoplasmic ratio. The volume of the nucleus increases with ploidy. The nucleocytoplasmic ratios of haploid embryos do not significantly change between the two-cell and four-cell stage ( $p = 0.052$ ), there is a significant difference ( $p < 0.001$ ) for diploid and tetraploid embryos. Non-standard nucleocytoplasmic ratio could be related to the problematic development. Understanding the regulation of preimplantational development of parthenogenetic embryos will increase the efficiency of haploid embryonic stem cell derivation.

KEYWORDS: mouse, embryo, parthenogenesis, haploid, diploid, tetraploid

# OBSAH

SEZNAM ZKRATEK	I
ÚVOD	1
<b>TEORETICKÁ ČÁST</b>	<b>4</b>
<b>1 Parthenogenese a využití parthenogenetických embryí</b>	<b>5</b>
<b>2 Příprava a vývoj parthenogenetických embryí myši</b>	<b>8</b>
2.1 Haploidní parthenogenetická embrya . . . . .	8
2.2 Diploidní parthenogenetická embrya . . . . .	10
2.3 Tetraploidní parthenogenetická embrya . . . . .	12
<b>3 Nukleocytoplasmatický poměr</b>	<b>15</b>
<b>EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST</b>	<b>20</b>
<b>4 Cíle a hypotézy diplomové práce</b>	<b>21</b>
<b>5 Materiál</b>	<b>22</b>
5.1 Pokusná zvířata . . . . .	22
5.2 Laboratorní přístroje . . . . .	22
5.3 Chemikálie . . . . .	23
<b>6 Metody</b>	<b>24</b>
6.1 Hormonální stimulace myši . . . . .	24
6.2 Izolace oocytů . . . . .	24
6.3 Parthenogenetická aktivace oocytů . . . . .	25
6.4 Elektrofúze dvoubuněčných embryí . . . . .	26
6.5 Monitorovací systém Primo Vision . . . . .	26
6.6 Karyotypy a barvení preparátů . . . . .	27
6.7 Stanovení nukleocytoplasmatického poměru . . . . .	28
<b>7 Výsledky</b>	<b>29</b>
7.1 Příprava a vývoj embryí . . . . .	29
7.2 Nukleocytoplasmatický poměr embryí . . . . .	39
<b>8 Diskuse</b>	<b>42</b>
ZÁVĚR	49
SEZNAM LITERATURY	50

# SEZNAM ZKRATEK

<b>AC</b>	střídavý proud <i>alternating current</i>
<b>BSA</b>	hovězí sérový albumin <i>bovine serum albumine</i>
<b>DAPI</b>	4',6-diamidin-2-fenylindol <i>4',6-diamidino-2-phenylindole</i>
<b>DC</b>	stejnoseměrný proud <i>direct current</i>
<b>DNA</b>	deoxyribonukleová kyselina <i>deoxyribonucleic acid</i>
<b>EGTA</b>	kyselina ethylenglykol tetraoctová <i>ethylene glycol tetraacetic acid</i>
<b>ESCs</b>	embryonální kmenové buňky <i>embryonic stem cells</i>
<b>hCG</b>	lidský choriový gonadotropin <i>human chorionic gonadotropin</i>
<b>HTF</b>	lidská tubární tekutina <i>human tubal fluid</i>
<b>ICM</b>	embryoblast <i>inner cell mass</i>
<b>IgG</b>	imunoglobulin G <i>immunoglobulin G</i>
<b>IU</b>	mezinárodní jednotka <i>international unit</i>
<b>KSOM</b>	draslíkem obohacené jednoduché optimalizované médium <i>potassium simplex optimized medium</i>
<b>MHC</b>	hlavní histokompatibilní komplex <i>major histocompatibility complex</i>
<b>PBS</b>	fosfátový pufr <i>phosphate buffer saline</i>
<b>PMSG</b>	gonadotropin ze séra březích klisen <i>pregnant mare serum gonadotropin</i>



# ÚVOD

Porozumění faktorům ovlivňujícím vývoj embryí je pro klinickou praxi i další výzkum, nejen v oblasti reprodukční biologie, zásadní. Zároveň s řadou onemocnění souvisí řízení velikosti buňky a jejích organel. Nukleocytoplasmatický poměr, tedy vztah mezi objemem jádra a objemem cytoplasmy, je již nyní součástí lékařské diagnostiky. V této práci byla obě témata propojena.

Pro ověření, zda množství DNA ovlivňuje velikost jádra a může tedy být hlavní příčinou problematického vývoje, bylo navrženo porovnání haploidních, diploidních a tetraploidních parthenogenetických embryí. Zejména haploidní parthenogenony se potýkají s vývojovými problémy, které by mohly souviset s nestandardním nukleocytoplasmatickým poměrem. Parthenogenetická embrya jsou vynikající srovnávací model, protože mají konstantní objem blastomer.

Cílem této práce je přispět k poznání nukleocytoplasmatického poměru parthenogenetických embryí myši. V první, teoretické části je téma zařazeno do kontextu předchozích publikací. Ve druhé, experimentální části je uvedeno, které metody byly zvoleny, co bylo k práci potřeba a jakých výsledků bylo dosaženo. Použité techniky zahrnují přípravu haploidních, diploidních a tetraploidních embryí myši (*Mus musculus*) a měření jejich blastomer. Jednotlivé skupiny byly porovnány mezi sebou jak podle ploidity, tak podle vývojových stádií. Závěrečnou částí je diskuse, srovnávací postupy a získané výsledky s dříve publikovanými poznatky.



# TEORETICKÁ ČÁST



# 1. Parthenogenese a využití parthenogenetických embryí

*V první kapitole je vysvětlen pojem „parthenogenese“ a následuje popis využití parthenogenetických embryí v dalším výzkumu i v klinické praxi.*

Parthenogenese (z řečtiny, česky také samoplození, pannobřezost) označuje způsob rozmnožování bez oplození. Rozlišuje se apomixie a automixie. V případě apomixie je gameta vytvořena mitosou a potomci jsou pak přesné klony matky. Vyskytuje se především u rostlin, ale je popsána i u několika druhů bezobratlých, konkrétně mezi členovci. Při automixii meiosa proběhne, ale místo oplození dojde k předmeiotickému zdvojení chromosomů, případně ke spojení dvou oocytů terminální fúzí, takže vzniklý jedinec je opět diploidní. Pokud reduplikace nebo fúze nenastane, zůstává zygota haploidní. Automixie je popsána u celé řady obratlovců – u paryb, ryb, obojživelníků, plazů a ojedinele i ptáků. K parthenogenesi u nich však dochází jen za výjimečných podmínek a běžně se rozmnožují pohlavním způsobem (shrnutí v [Mirzaghaderi a Hörandl, 2016](#); [Ramachandran a McDaniel, 2018](#)).

Pokud oplození nastane, ale na dalším vývoji se podílí jen jedna z parentálních genomů, nazývá se takový způsob rozmnožování gynogenese, respektive androgenese. V prvním případě se ve vývoji uplatňuje pouze maternální genom, v případě druhém zůstává aktivní jen paternální část (shrnutí v [Leeb a Wutz, 2013](#)).

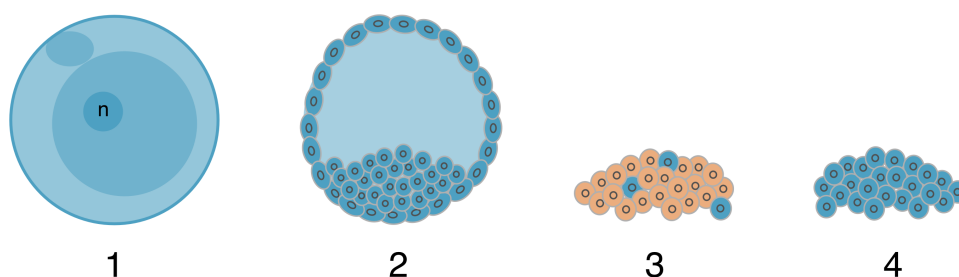
Savci popsané typy rozmnožování přirozeně nevyužívají. Zdá se, že mají dokonce vyvinuté přísné mechanismy, které vzniku a vývoji parthenogenetických potomků přímo zabraňují. Ani tato kontrolní opatření ovšem nefungují na 100 % a ke vzniku parthenogenonů může dojít. Vývoj takových embryí je však záhy ukončen.

Dnes ale savčí parthenogenetická embrya (takzvané parthenogenony nebo parthenogenoty) dokážeme vytvořit *in vitro*. Největší pozornost je v posledních letech věnována haploidní parthenogenesi. Problém však nastává již na úrovni preimplantačního vývoje a úspěšnost získání blastocyst je nízká. Příčiny narušeného vývoje nejsou zcela známy, ale pravděpodobně souvisí s nedostatečnou aktivací, narušenou genovou expresí nebo abnormálním nukleocytoplasmatickým poměrem.

## 1.0.1 Využití parthenogenetických embryí

Vzhledem k hemizygotnosti parthenogenetických embryí a polovičnímu počtu chromosomů haploidních parthenogenonů jsou z nich derivované kmenové buňky ideálním prostředkem k základnímu i aplikovanému výzkumu (Wutz, 2014). Kmenové buňky mají extenzivní proliferační potenciál a mohou diferencovat v nejrůznější typy buněk.

Embryonální kmenové buňky (ESCs), derivované z blastocysty, jsou pluripotentní, takže mohou dát vznik téměř všem buněčným typům. Myší ESCs byly získány poprvé v roce 1981 (Evans a Kaufman, 1981; Martin, 1981) a záhy po nich také myší parthenogenetické ESCs (Kaufman *et al.*, 1983). Myší haploidní parthenogenetické ESCs (obrázek 1.1) byly popsány až v roce 2011 dvěma výzkumnými týmy (Elling *et al.*, 2011; Leeb a Wutz, 2011). Jelikož haploidní embrya nejsou plnohodnotná ve smyslu tvorby nového životaschopného jedince, mohou být pro výzkum na lidských buňkách a zárodcích z etického důvodu přijatelnější (Bos-Mikich *et al.*, 2016; Brevini a Gandolfi, 2008).



**Obrázek 1.1:** Derivace haploidních embryonálních kmenových buněk.

1: Haploidní ( $n$ ) embryo. 2: Haploidní blastocysta s embryoblastem. 3: Parthenogenetické embryonální kmenové buňky, převážně zdiploidizované. 4: Čistá linie haploidních embryonálních kmenových buněk.

Následky recesivní mutace se u haploidních buněk projeví hned v první generaci. Jsou proto vhodné ke genetickému screeningu, při kterém se objasňuje vztah mezi genotypem a fenotypem. Pro vývojovou a evoluční biologii jsou zajímavé například možnosti zkoumání mechanismu inaktivace chromosomu X (Monfort *et al.*, 2015) a parentálního imprintingu. S pomocí umlčení jedné z alel dvou vybraných genů se v roce 2004 narodily diploidní bimaternální myši (Kono *et al.*, 2004), blíže popsané v kapitole 2.2. Tento úspěch naznačuje, že jednou z hlavních překážek vývoje parthenogenetických embryí je nevyvážená genová exprese.

Další využití by haploidní kmenové buňky mohly najít v regenerační medicíně, neboť nesou jen jednu alelu hlavního histokompatibilního systému (MHC)

a dají se tak snadněji přiřadit k individuálnímu pacientovi. Zatím ale absence paternálních faktorů vede u některých typů buněk k závažným vývojovým chybám, způsobeným nestandardní genovou expresí, a proto zatím nejsou vhodné k transplantaci (Stelzer *et al.*, 2011; Yilmaz *et al.*, 2016).

Protože poloviční genom není pro savčí buňky přirozený (kromě buněk pohlavních), mají tendenci spontánně diploidizovat a svůj handicap tak napravit. Již v pozdních morulách myši, připravených jako haploidní, bylo pozorováno 15–18 % diploidních buněk (Kaufman *et al.*, 1983). U lidských embryí byla diploidizace zkoumána monitorováním dělení do dvou buněk. Podařilo se pomocí monitorovacího systému Primo Vision zachytit čtyři situace: nedokončenou cytokinesi, endomitosu, endoreduplikaci a fúzi blastomer. Zajímavé bylo, že frekvence endoreduplikace a fúze se nelišila u parthenogenetických a normálních oplozených embryí, ale zvýšila se frekvence nedokončeného rozdělení buněk a endomitosis (Leng *et al.*, 2017). K spontánní diploidizaci dochází hojně i ve stádiu blastocysty, a zejména pak při udržování linie haploidních kmenových buněk.

Aby si myší ESCs zachovaly haploiditu, je zapotřebí přidat do kultivačního média „chemický koktejl“, jak ho sami autoři nazývají, sestávající z kombinace více druhů malých molekul (Li *et al.*, 2017). Stále jsou vylepšovány také techniky filtrace, které při pasážování třídí buňky podle fluorescenčních značek nebo podle velikosti, neboť haploidní buňky se svým průměrem odlišují od těch zdiploidizovaných (Qu *et al.*, 2018).

Na rozdíl od myších embryonálních kmenových buněk si ty lidské zachovávají haploiditu i po diferenciaci do buněk všech tří zárodečných listů (Sagi *et al.*, 2016). Sagi *et al.* derivovali ESCs z blastocyst připravených parthenogenetickou aktivací lidského oocyty. Získány byly také gynogenetické ESCs člověka (Zhong *et al.*, 2016). Z těchto pluripotentních kmenových buněk lze pak připravit různé typy lidských buněk – i buňky zárodečné linie.

## 2. Příprava a vývoj parthenogenetických embryí myši

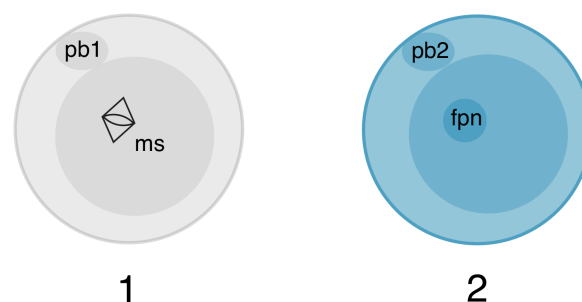
Ve druhé kapitole je popsáno, jak se parthenogenetická embrya získávají a jaké jsou zvláštnosti vývoje haploidních, diploidních a tetraploidních parthenogenetických embryí myši.

### 2.1 Haploidní parthenogenetická embrya

Přestože parthenogenese není u myši přirozená, vědci se zejména v pozdních sedmdesátých a v osmdesátých letech dvacátého století snažili myši parthenogenetická embrya vytvořit. Některé z postupů aktivace se používají dodnes, nicméně kvůli natolik problematickému vývoji embryí v dalším výzkumu tehdejší týmy nepokračovaly. Nyní je však k dispozici nová a šetrnější technika a optimalizované chemikálie. Celkově hlubší pochopení genetiky a vývojové biologie přispělo k nedávné derivaci haploidních embryonálních kmenových buněk, popsaných v předchozí kapitole.

#### 2.1.1 Příprava haploidních parthenogenetických embryí

Parthenogenetická aktivace způsobí přeměnu zralého oocyty ve vyvíjející se embryo. Dojde tedy k dokončení druhého meiotického dělení, oocyt vydělí druhé pólóvé tělíčko a utvoří jedno haploidní prvojádro (obrázek 2.1).



**Obrázek 2.1:** Haploidní parthenogenetická aktivace.

- 1: Oocyt v metafázi II s prvním pólóvým tělískem (pb1) a meiotickým vřeténkem (ms).
- 2: Haploidní embryo po parthenogenetické aktivaci, s druhým pólóvým tělískem (pb2) a jedním samičím prvojádrom (fpn).

Oocyt v metafázi II je v současné době nejčastěji aktivován chemicky, ale



začínalo se fyzikálními metodami. Jedny z prvních byly *in situ* aktivace, tedy aktivace oocytů ponechaných ve vejcovodu. Zkoušely se techniky teplotního šoku (Braden a Austin, 1954) nebo elektrických pulsů (Tarkowski *et al.*, 1970).

K chemické aktivaci se v současnosti používá především stroncium, dříve byla využívána hyaluronidasa (Graham, 1970), 7% ethanol (Kaufman, 1982), inhibitory syntézy proteinů cykloheximid a puromycin (Siracusa *et al.*, 1978) nebo také vápníkové ionofory jako je A23187 (Steinhardt *et al.*, 1974) a dodnes v asistované reprodukci využívaný ionomycin (Heytens *et al.*, 2008). Většina ze zkoušených postupů způsobuje morfologické odchylky a aneuploidie. Z uvedených je ideální právě chlorid strontnatý ( $\text{SrCl}_2$ ), vyvolávající vápníkové oscilace nejpodobnější těm, které se objevují po přirozené aktivaci spermií (Bos-Mikich *et al.*, 1995). Za aktivaci signální dráhy, vedoucí k tomuto opakovanému zvyšování a snižování koncentrace vápenatých iontů v cytoplasmě, je zodpovědná fosfolipasa C $\zeta$ , kterou byly experimentálně aktivovány myšiči (Saunders *et al.*, 2002) i lidské oocyty (Rogers *et al.*, 2004).

### 2.1.2 Vývoj haploidních parthenogenetických embryí myši

Vývoj haploidních parthenogenetických embryí je značně omezený ve srovnání s normálními oplozenými i ve srovnání s diploidními parthenogenetickými embryi (Henery a Kaufman, 1992). Již při zavádění prvních fyzikálních technik aktivace oocytů se úspěšně aktivovala polovina oocytů. Do stádia blastocysty se však vyvíjelo jen 24 % elektrickým pulsem aktivovaných oocytů (Witkowska, 1973).

I s pokročilejšími technikami a vylepšenými médii haploidní embrya výrazně zaostávají ve vývoji a tvoří méně blastocyst. Kaufman (1976) získával průměrně až třikrát více blastocyst mozaikových a diploidních parthenogenetických než těch haploidních. Příčiny problematického vývoje nejsou zcela prozkoumány.

Poloviční počet chromosomů a absence paternálního zásahu vede totiž k celé řadě odchylek. Kvantifikovat lze například zvýšený poměr povrchu a objemu, protože haploidní buňky jsou v průměru menší než normální, zvýšené množství mitochondriální DNA ve srovnání s jadernou DNA, související právě s objemem cytoplasmy a s polovičním počtem chromosomů, a také zvýšenou expresi genů X chromosomu vůči autosomální expresi (shrnuto v Sagi a Benvenisty, 2017). Konkrétně počet mitochondrií je jen o třetinu nižší než je průměrný normální počet, zatímco jaderné DNA mají polovinu (Sagi *et al.*, 2016). Vzájemný poměr může mít přímý vliv na metabolismus buněk.

Oocyt/vejce je v mnoha organismech totipotentní, ale u savců tomu tak není.

Savčí oocyty obsahují epigenetické značky, navázané na DNA, které regulují expresi specifických genů. Recipročně mají spermie epigenetické značky, jimiž se s těmi samičími doplňují. Po vzájemném spojení tak má oocyt kompletní genetickou výbavu a může se dále vyvíjet v nového jedince (Surani *et al.*, 1984). Nekompensovaná ztráta imprintovaných genů a celkově narušená genová exprese může být hlavní příčinou nezdárného vývoje parthenogenonů.

Dalším aspektem vývoje parthenogenonů je samotná aktivace oocytů, neboť jde o velmi složitý proces (shrnuto v Tosti a Ménéz, 2016) a indukovaná aktivace by nemusela být dostatečná pro úspěšný vývoj embrya. Pro studium jejího vlivu se používá metoda oplození spermii a následného odebrání samčího, případně samičího prvojádra, tedy příprava gynogenonů, respektive androgenonů (Modlinski, 1975). Podle předpokladů by v jejich případě měla být aktivace srovnatelná s normálním oplozením. Tato haploidní uniparentální embrya se ovšem také dlouho nevyvíjí a vykazují deregulovanou expresi genů (Hu *et al.*, 2015), stejně jako haploidní parthenogenony (Latham *et al.*, 2002). Ukazuje se, že řízení genové exprese je velmi komplikované a citlivé. Již během preimplantačního vývoje je řada genů methylována, histony acetylovány a dochází ke genetické reprogramaci dokonce i u neimprintovaných genů (Borgel *et al.*, 2010; Guo *et al.*, 2017).

Problémem zmíněným v předchozí kapitole je pak spontánní diploidizace, provázející vývoj haploidních parthenogenonů. Dochází k ní jak během vývoje do stádia moruly, tak v rámci blastocysty, ale především i na úrovni jednotlivých embryonálních buněk při snaze udržet stabilní linie. Haploidní buňky doplní druhou sadu chromosomů například vynecháním buněčného dělení a vstoupením znovu do syntetické fáze (Takahashi *et al.*, 2014).

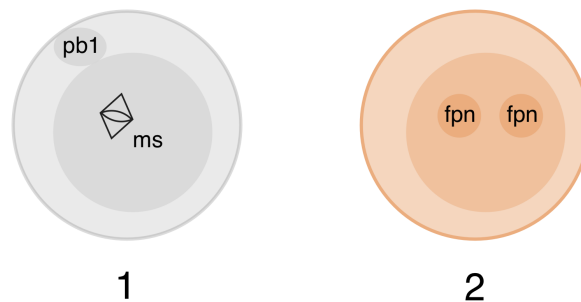
## 2.2 Diploidní parthenogenetická embrya

Na rozdíl od haploidních parthenogenonů se diploidní parthenogenetická embrya během preimplantačního vývoje téměř neliší od normálních embryí. To dokazuje, že pro preimplantační vývoje je absence poloviny chromosomů závažnější problém než samotná indukovaná aktivace probíhající bez účasti spermie.

### 2.2.1 Příprava diploidních parthenogenetických embryí

V současné době se diploidní parthenogenony získávají obdobnou cestou jako haploidní embrya, tedy chemickou aktivací metafázického oocytu. Pro zajištění

diploidního genomu se využije pólóvého tělíska. Proběhne tedy aktivace oocyty, během kterého je nutné zabránit vydělení pólóvého tělíska. Důsledkem toho je vytvoření diploidního parthenogonu (obrázek 2.2). Takto vzniklé embryo se liší od matky, neboť obsahuje pouze polovinu jejího genomu. Dá se říci, že je homozygotní, až na úseky odlišné v důsledku proběhlého crossing-overu (Kaufman, 1976). Pokud by se naopak zabránilo vydělení již prvního pólóvého tělíska, například cytochalasinem D, jednalo by se o heterozygotní parthenogenetická embryo identická s matkou (Kubiak *et al.*, 1991).



**Obrázek 2.2:** Diploidní parthenogenetická aktivace.

- 1: Oocyt v metafázi II s prvním pólóvým tělískem (pb1) a meiotickým vřeténkem (ms).
- 2: Diploidní embryo po parthenogenetické aktivaci, se dvěma samičími prvojádry (fpn).

Na zabránění vydělení pólóvého tělíska se používají inhibitory polymerizace aktinu – cytochalasin B (Balakier a Tarkowski, 1976) nebo latrunculin A. Ty naruší samotný proces dělení a pólóvé tělísko zůstane součástí embrya.

### 2.2.2 Vývoj diploidních parthenogenetických embryí myši

Co se týče preimplantačního vývoje, prakticky nelze rozpoznat diploidní parthenogony od normálních oplozených embryí (Liu *et al.*, 2002).

Postimplantační vývoj se však také u diploidních parthenogenetických embryí potýká se zásadními problémy. Nejpozději do poloviny gestace (10 dní) zárodky přestávají růst kvůli defektním placentám a dalším morfologickým odchylkám. Druhá polovina zárodečného vývoje je totiž regulována paternálně methylovanými centry imprintingu Igf2-H19 a Dlk1-Gtl2 na chromosomech 7 a 12. Navzájem se funkčně doplňují a řídí placentaci (Kawahara *et al.*, 2006). Vývoj preimplantačních embryí je naopak více ovlivněn maternálním imprintingem (shrnuto v Kawahara a Kono, 2012).

Narození diploidních gynogenetických myší sice bylo oznámeno a popsáno (Hoppe a Illmensee, 1977), ale nikomu se pokus nepodařilo zopakovat a celá studie byla zpochybněna (Surani *et al.*, 1984). S genetickou úpravou se

však podařilo získat bimaternální myši. [Kono et al. \(2004\)](#) provedli zásah do imprintovaných oblastí tak, aby napodobili stav na paternálních chromosomech, odebrali jádro takto upraveného oocyty a vložili jej do oocyty normální myši. Takto připravená embrya se začala dělit a narodily se myši, u kterých byla ověřena plodnost porozením vlastním potomků ([Kono et al., 2004](#)). Přesto u nich byly popsány abnormálně utvořené placenty, které byly atrofické a nekrotické či jinak poškozené ([Kono et al., 2002](#)).

Diploidních parthenogenetická embrya vykazují abnormální proliferaci a diferenciaci jak embryonálních, tak extraembryonálních linií buněk ([Sturm et al., 1994](#)). Růst extraembryonálních tkání za normálních okolností podporuje spíše paternální genom a samotné embryo naopak ten maternální ([Barton et al., 1984](#); [McGrath a Solter, 1984](#); [Surani et al., 1984](#)). Proto diploidní parthenogenony obstojí pouze v preimplantačním vývoji.

## 2.3 Tetraploidní parthenogenetická embrya

Stejně jako s polovičním počtem chromosomů není pro savce přirozené vyvíjet se s dvojnásobkem normálního počtu a polyploidie se omezuje jen na některé tkáně. Přestože k polyploidizaci může dojít i při vzniku embryí, spontánní duplikace savčího genomu se u myši, křavy, králíka a prasete objevuje při méně než 1 % oplození, u myši je to konkrétně v 0,1 % případů ([Dyban a Baranov, 1987](#), citováno z [Eakin a Behringer, 2003](#)).

Z výzkumného hlediska jsou polyploidní embrya ideální pro studium regulace velikosti a počtu buněk. Vzhledem k násobnému množství chromosomů jsou vhodným modelem pro pochopení lidských polysomií nebo pro metody odhalující, jak se embrya vypořádají s nerovnováhou parentálních genomů. Polyploidní pluripotentní embryonální buňky jsou rovněž využívány jako podpůrné buňky pro vývoj jinak neživotaschopných embryí. V mozaikovém embryu totiž kompenzují vývojové defekty tím, že přednostně tvoří extraembryonální struktury ([Eakin a Behringer, 2003](#)).

### 2.3.1 Příprava tetraploidních parthenogenetických embryí

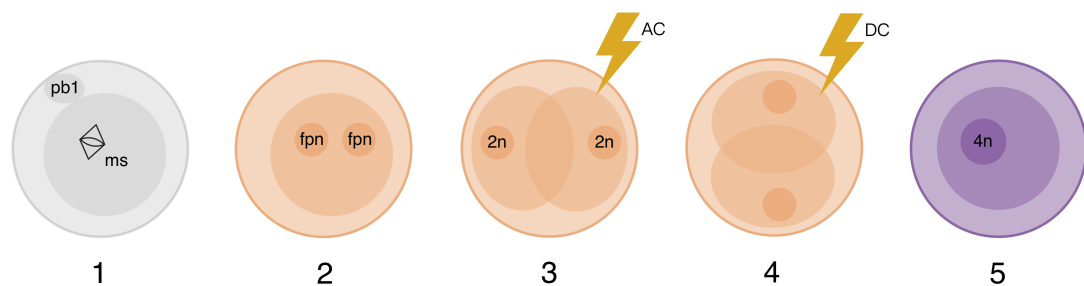
Historicky byla tetraploidní embrya připravována chirurgicky, vložením diploidního jádra do zygoty ([Modlinski, 1978](#)). Nevýhodou takového postupu je ale riziko poškození během manipulace. Podobně jako u získávání diploidních parthenogenonů lze duplikovat genom zabráněním cytokinese mezi

dvoubuněčným a čtyřbuněčným stádiem (Snow, 1973; Tarkowski *et al.*, 1977).

V dnešní době nejvíce používaným způsobem přípravy tetra- a víceploidních embryí je fúze. Začínalo se inaktivovaným Sendai virem (Soupart, 1980) nebo polyethylen glykolem (Eglitis, 1980; Gulyas *et al.*, 1984).

Pro zrychlení a zefektivnění přípravy byla později používána elektrofúze (Berg, 1982). Elektrické pulsy mají výhodu v tom, že parametry jsou přesně měřitelné, reprodukovatelné a embrya jsou působení vystavena velmi krátce, jen po dobu mikrosekund (Kubiak a Tarkowski, 1985). Elektrofúze je založena na principu degradace buněčné membrány elektrickým pulsem, kvůli čemuž se poté blastomery společně propojí (Kurischko a Berg, 1986).

Elektrofúzí diploidních embryí ve dvoubuněčném stádiu lze získat tetraploidní embrya (obrázek 2.3). Další násobné ploidity pak lze připravit opakovaným fúzováním vždy po rozdělení embryí zpět do dvou blastomer. Modifikací je fúze až čtyřbuněčných embryí (Winkel a Nuccitelli, 1989). Imai *et al.* v roce 2018 připravili a popsali dokonce hexadekaploidní (16n) embrya myši.



**Obrázek 2.3:** Příprava tetraploidního embrya.

- 1: Oocyt v metafázi II s prvním pólovým tělískem (pb1) a meiotickým vřeténkem (ms).
- 2: Diploidní embryo po parthenogenetické aktivaci, se dvěma samičími prvojádry (fpn).
- 3: Dvoubuněčné diploidní (2n) embryo, na které působí střídavý proud (AC), k srovnání blastomer paralelně s elektrodami.
- 4: Dvoubuněčné embryo s aplikovaným pulsem stejnosměrného proudu (DC) kolmo na dotyk blastomer.
- 5: Fúzované blastomery tetraploidního (4n) jednobuněčného embrya.

K elektrofúzi se využívá speciální elektrické zařízení, ke kterému se připojí destička s elektrodami umístěnými několik mikrometrů od sebe. Samotná fúze probíhá buď v elektrolytickém, nebo neelektrolytickém médiu, například v mannitolu, sacharose nebo glukose. Vždy je potřeba nastavit hodnoty dodaného napětí tak, aby nebylo pro konkrétní druh příliš silné a embryo nepoškodilo (Cheong *et al.*, 1991). V případě myši obvykle stačí jeden puls, u jiných druhů může být potřeba více slabších pulsů. Například u prasete se osvědčily dva a u králíka dokonce sedm pulsů rychle následujících za sebou. Existuje

totiž mezidruhově rozdílná rezistence k elektrickým pulsům a pro vytvoření dostatečného množství pórů v membráně musí být několikrát opakovány (shrnutí v [Chang et al., 1992](#)).

### 2.3.2 Vývoj tetraploidních parthenogenetických embryí myši

Preimplantační vývoj je kvalitativně srovnatelný s diploidními embryi. Tetraploidní embrya ale vykazují zvýšenou incidenci apoptosy, autofagie a epigenetických odchylek ([Wu et al., 2017](#)). Apoptosa v tomto případě souvisí s aktivací dráhy spouštěné proteinem p53 ([Horii et al., 2015](#)), stejně jako je tomu u haploidních embryí ([Olbrich et al., 2017](#)). Celkový počet buněk je i proto nižší než u diploidních blastocyst ([Henery et al., 1992](#); [Ishiguro et al., 2005](#); [Kawaguchi et al., 2009](#); [Koizumi a Fukuta, 1995](#)). Jen v polovině případů tvoří embryoblast ([Wen et al., 2014](#)) a buňky ICM tetraploidních blastocyst mají také přibližně 10krát nižší expresi Oct-4, Sox-2 a Klf-4 ([Park et al., 2012](#)). Přesto z nich již byly derivovány tetraploidní embryonální kmenové buňky ([Imai et al., 2015](#)), které mají více než dvakrát větší objem než diploidní ESCs ([Imai et al., 2016](#)).

Postimplantační vývoj je u tetraploidních parthenogenonů značně omezený. Nejdéle přežívající embrya histologicky odpovídala 13,5 – 14 dním po oplození a rozměrově odpovídala 13denním normálním embryím. Byly u nich popsány defekty především v oblasti předního mozku a očí, poškozené měla také zejména srdce a páteř ([Henery et al., 1992](#); [Kaufman a Webb, 1990](#)). Delší dobu se embrya údajně vyvíjela pouze v jednom případě ([Snow, 1973, 1975, 1976](#)), ale spekuluje se, že šlo pravděpodobně o mozaiky, neboť se pokus nikdy nepodařilo zopakovat ([Henery et al., 1992](#)). [Tarkowski et al. \(1977\)](#) měli z tetraploidních embryí dokonce 20 % mozaikových (obsahující tetraploidní i diploidní buňky), která se vyvíjela pouze do 10 dní, jako diploidní parthenogenony.

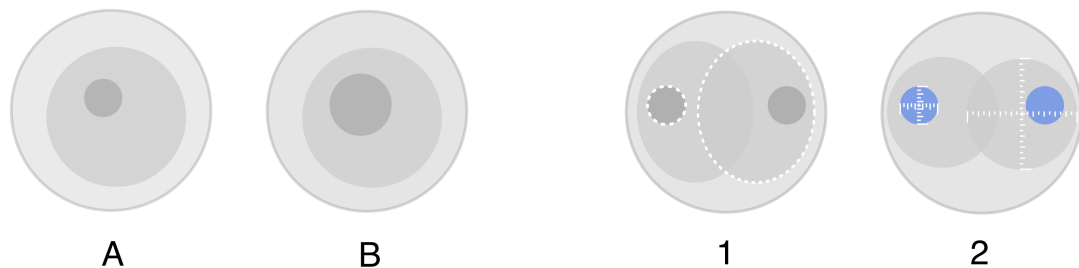
Někdy se tetraploidní embrya používají také jako podpůrné buňky. Pokud totiž vytvoříme diplo-tetraploidní chiméry, postupně se tetraploidní buňky stávají součástí pouze trofoektodermu a primitivního endodermu, ale nepodílí se na stavbě primitivního ektodermu ([Ishiguro et al., 2005](#); [James et al., 1995](#)). Přesunutí buněk do specifických oblastí ale nastává patrně až po gastrulaci. Tetraploidní buňky byly v embryonálním ektodermu nacházeny až do poloviny gestace ([Eakin et al., 2005](#)).

### 3. Nukleocytoplasmatický poměr

Třetí kapitola je zaměřena na nukleocytoplasmatický poměr, zejména na souvislost s vývojem embryí.

Pro správnou funkci buněk, tkání a z nich složených orgánů je nutné, aby každá buňka řídila svou velikost i velikost svých organel. Buňky „ví“, jaký mají tvar (shrnutí v [Haupt a Minc, 2018](#)) a jaký mají poměr mezi objemem jádra a cytoplasmy (shrnutí v [Amodeo a Skotheim, 2016](#); [Levy a Heald, 2016](#)). Přestože nukleocytoplasmatický poměr není u všech typů buněk konstantní – pouze větší buňky mají obecně větší jádra než malé buňky –, o jeho souvislosti s velikostí dalších organel a řídicí roli pro buňku se psalo již před více než 100 lety ([Conklin, 1912](#)).

Lékaři, zejména histologové a patologové, dnes používají stanovení nukleocytoplasmatického poměru buněk k určení nebo zpřesnění diagnózy ([Vaickus a Tambouret, 2015](#)). Rozlišují podle něj u nádorových buněk různé fáze a závažnost onemocnění. V některých případech je příznakem snížený poměr, v jiných naopak zvýšený poměr (obrázek 3.1). Důležitost v diagnostice a léčbě dokazuje fakt, že se stále vyvíjí nové metody, jak buňky měřit přesněji a lépe výsledky vyhodnocovat. V roce 2016 zveřejnili [Moore et al.](#) velmi přesnou techniku, která využívá ultrazvuk pro měření objemu cytoplasmy a fotoakustický jev pro měření objemu jádra.



**Obrázek 3.1:** Nukleocytoplasmatický poměr.

A: Menší nukleocytoplasmatický poměr. B: Větší nukleocytoplasmatický poměr.

1: Dvoubuněčné embryo vybrané k měření. 2: Měření průměrů zakulacených blastomer a obarvených jader.

Faktor řídící velikost jádra je pravděpodobně importin  $\alpha$ , který reguluje seskupování laminu. Podle velikosti jádra je pak upravena densita DNA a délka mitotických chromosomů. Jak přesně je ovlivněna kondenzace chromosomů ale není prozkoumáno (shrnutí v [Heald a Gibeaux, 2018](#)). Byly provedeny pokusy

s limitací prostoru kolem jádra u žáby (*Xenopus laevis*). Porovnáním růstu jádra ve zkumavce a růstu jádra v úzkém prostoru [Hara a Merten \(2015\)](#) ověřili, že rychlost růstu závisí na objemu, kterým je jádro obklopeno. Dá se proto usuzovat, že velikost jádra je ovlivněna okolní dostupnou cytoplasmou.

Nukleocytoplasmatický poměr je zásadní pro normální segregaci meiotických chromosomů, tvorbu metafázního vřetenka, uspořádání chromosomů na něm a rozdělení buňky. [Kárníková et al. \(1998\)](#) bisekcí oocytů ve fázi zárodečného vajíčka zjistili, že pokud je objem cytoplasmy snížen, oocyty dozrávají později a méně úspěšně. Práh, za kterým se oocyt již nerozdělí do dvou buněk, je polovina normálního objemu ([Cui et al., 2005](#)).

V rané embryogenesi žáby se každým buněčným dělením zvyšuje nukleocytoplasmatický poměr. Objem jader i cytoplasmy se postupně snižuje, avšak jádra se při dělení zmenšují relativně pomaleji než množství cytoplasmy. Dosažením maxima nukleocytoplasmatického poměru dojde k přechodu do stádia střední blastuly, kdy je aktivována transkripce genů zygoty a zpomalí se buněčný cyklus ([Newport a Kirschner, 1982](#)). Pravděpodobně je v cytoplasmě přítomný represor transkripce, kterého je během dělení blastomer postupně méně a méně, až se dostane pod kritickou hladinu a způsobí prodloužení syntetické fáze ([Murphy a Michael, 2013](#)).

V případě, kdy byla při oplození oocytů *Xenopa* indukována polyspermie, tedy došlo k polyploidizaci a nárůstu objemu jádra, transkripce začala dříve než u kontrolních embryí ([Newport a Kirschner, 1982](#)). Toto pozorování podporuje experiment, při kterém byl embryím *Xenopa* zvýšen nukleocytoplasmatický poměr pomocí mikroinjikace jaderných faktorů, ovlivňujících velikost jádra. V důsledku změny poměru bylo u diploidních embryí urychleno buněčné dělení a počátek genové exprese. Připravená haploidní embrya byla naopak výrazně opožděna ([Jevtić a Levy, 2017](#)). Množství DNA i poměr jádra a cytoplasmy jsou tedy pro načasování přechodu do stádia střední blastuly srovnatelně důležité.

I u myši je formace blastocysty zahájena spíše na základě vnitřních faktorů a rozměrů než na prostém počtu hodin po oplození ([Smith a McLaren, 1977](#)). Měření objemu jádra a cytoplasmy normálních myších embryí během celého preimplantačního vývoje potvrdilo, že součet objemu cytoplasmy všech buněk zygoty zůstává stejný, ale nukleocytoplasmatický poměr jednotlivých blastomer se během vývoje do blastocysty exponenciálně zvyšuje ([Aiken et al., 2004](#)).

Také [Tsihlaki a Fitzharris \(2016\)](#) popsali korelaci mezi velikostí blastomer a jader ve všech vývojových stádiích myši a dokázali, že experimentální redukce cytoplasmy může pozměnit velikost jádra. Primární je však určitý vývojový



program řídící jadernou velikost nezávisle na velikosti buňky. Teprve po určení velikosti jádra cytoplasmatickými faktory jsou rozměry doladěny podle velikosti buňky.

Přestože se nukleocytoplasmatický poměr nezdá jako dostatečné vysvětlení narušeného vývoje haploidních embryí a hlavní příčinou je patrně problém v genové expresi (Latham *et al.*, 2002; McGrath a Solter, 1986), studium jeho vlivu na vývoj parthenogenonů může pomoci objasnit fungování regulace preimplantačního vývoje savčích embryí. Parthenogenetická embrya různých ploidit jsou totiž unikátním modelem pro objasnění, zda se objem DNA odráží na velikosti jádra.



# EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST



## 4. Cíle a hypotézy diplomové práce

*„Odráží se množství DNA na velikosti jádra? Liší se tedy haploidní, diploidní a tetraploidní parthenogenetická embrya myši nukleocytoplasmatickým poměrem?“*

- Zvládnutí techniky hormonální stimulace myši a izolace myších oocytů.
- Příprava haploidních, diploidních a tetraploidních parthenogenetických embryí myši a ověření jejich ploidity.
- Monitorování vývoje parthenogenetických embryí myši. Vizualizace embryoblastu (ICM) a ověření pluripotence.
- Měření a porovnání nukleocytoplasmatického poměru haploidních, diploidních a tetraploidních parthenogenetických embryí myši ve dvoubuněčném a čtyřbuněčném stádiu.

# 5. Materiál

V této kapitole jsou uvedeny informace o pokusných zvířatech, přístrojích a chemikáliích, které byly použity pro experimenty uskutečněné v rámci této práce.

## 5.1 Pokusná zvířata

Samice myši (*Mus musculus*), jejichž oocyty byly využity k této práci, pocházejí z chovu společnosti Velaz, s.r.o. Pro potřeby pokusu byly zvoleny myši kmene B6D2F1. Teplota místnosti chovu je udržována na 23 °C, vlhkost 50 %, denní cyklus je nastaven na 12 hodin světla a 12 hodin tmy.

Bylo postupováno v souladu se zákonem č. 246/1992 Sb., na ochranu zvířat proti týrání, a vyhláškou č. 419/2012 Sb., o ochraně pokusných zvířat, a dle projektu pokusu schválného odbornou komisí.

## 5.2 Laboratorní přístroje

Tabulka 5.1: Používané laboratorní přístroje.

Název	Výrobce
Analytické váhy 240 A 290-9231/A	Precisa
Centrifuga Mini Spin PLUS	Eppendorf AG
Elektrody GPT-250	BLS
Fotoaparát C5060	Olympus Optical
Inkubátor MCO-18AIC	Sanyo Electric Co., Ltd.
Konfokální mikroskop BX61	Olympus Optical
Laminární box Helios 48	Steril, S.p.A.
Monitorovací systém Primo Vision	Vitrolife
Pipety Nichipet EX	Nichiryo America, Inc.
Pulsní generátor CF-150	BLS
Stereomikroskop SMZ 645	Nikon Inc.

## 5.3 Chemikálie

Tabulka 5.2: Používané chemikálie.

Název chemikálie	Výrobce	Katalogové č.
BSA	Sigma-Aldrich	A6003
Citrát sodný	Sigma-Aldrich	S1804
Cytochalasin B	Sigma-Aldrich	C6762
Demekolcin	Sigma-Aldrich	D1925
Donkey anti-Mouse IgG	Jackson ImmunoResearch	715-005-150
EGTA	Sigma-Aldrich	E8145
Ethanol 96%	Merci	64-17-5
Formaldehyd	Penta	140907F
Glukosa	Sigma-Aldrich	G6152
hCG	Merck	230734
Hoechst 33342	Sigma-Aldrich	B2261
HTF	Zenith Biotech	ZFHM-100
Hyaluronidasa	Sigma-Aldrich	H3506
Chlorid strontnatý	Sigma-Aldrich	441899
KSOM	Zenith Biotech	ZEKS-050
Kyselina octová 99%	Lach-Ner	10047-A99
Latrunculin A	Sigma-Aldrich	L5163
Methanol	Lach-Ner	20038-AT0
Minerální olej	Sigma-Aldrich	M8410
Oct-3/4 Antibody	Santa Cruz Biotechnology	SC-5279
Parafinový olej	Vitrolife	OVOIL
PBS	Gibco	21600-069
PBS bez Ca <sup>2+</sup>	Sigma-Aldrich	D8537
PMSG	Merck	367222
ProLong Gold Antifade Mountant with DAPI	ThermoFisher Scientific	P36935
Pronasa	BDH Laboratory Supplies	80601-398
Triton X-100	Sigma-Aldrich	X100

## 6. Metody

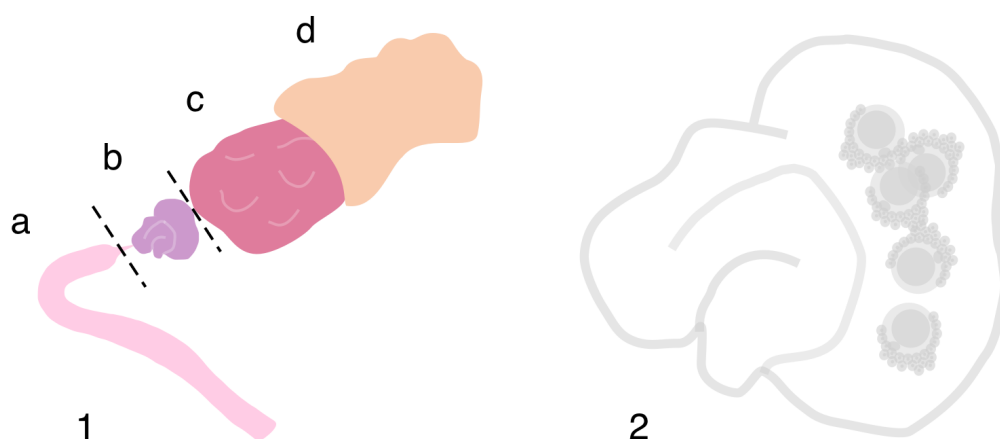
V této kapitole jsou popsány konkrétní metody práce nezbytné pro získání výsledků. Zahrnují hormonální stimulaci myši, izolaci a parthenogenetickou aktivaci oocytů, elektrofúzi dvoubuněčných embryí, monitoring vývoje, přípravu preparátů k mikroskopování a měření. Experimenty jsem prováděla samostatně.

### 6.1 Hormonální stimulace myši

Samici myši kmene B6D2F1 bylo nejprve intraperitoneálně injikováno 7,5 IU PMSG, následně po 48 hodinách pak 5 IU hCG. Při načasování stimulace byl zohledněn 12hodinový denní cyklus myši.

### 6.2 Izolace oocytů

Hormonálně stimulovaná myš byla 16 hodin po aplikaci hCG usmrcena cervikální dislokací. Vejcovody (obrázek 6.1) byly vyříznuty a přeneseny na Petriho misku do 50 $\mu$ l kapky manipulačního média HTF. Pracovní plocha byla vyhřívána na teplotu 37 °C. Nástroje byly dezinfikovány 70% ethanolem. Po protržení ampully byly obsažené kumulární komplexy (oocyty obklopené kumulárními buňkami) přeneseny do 50 $\mu$ l kapky 0,1% hyaluronidasy. Po uvolnění kumulárních buněk byly oocyty promyty v kapce HTF.



**Obrázek 6.1:** Izolace kumulárních komplexů.

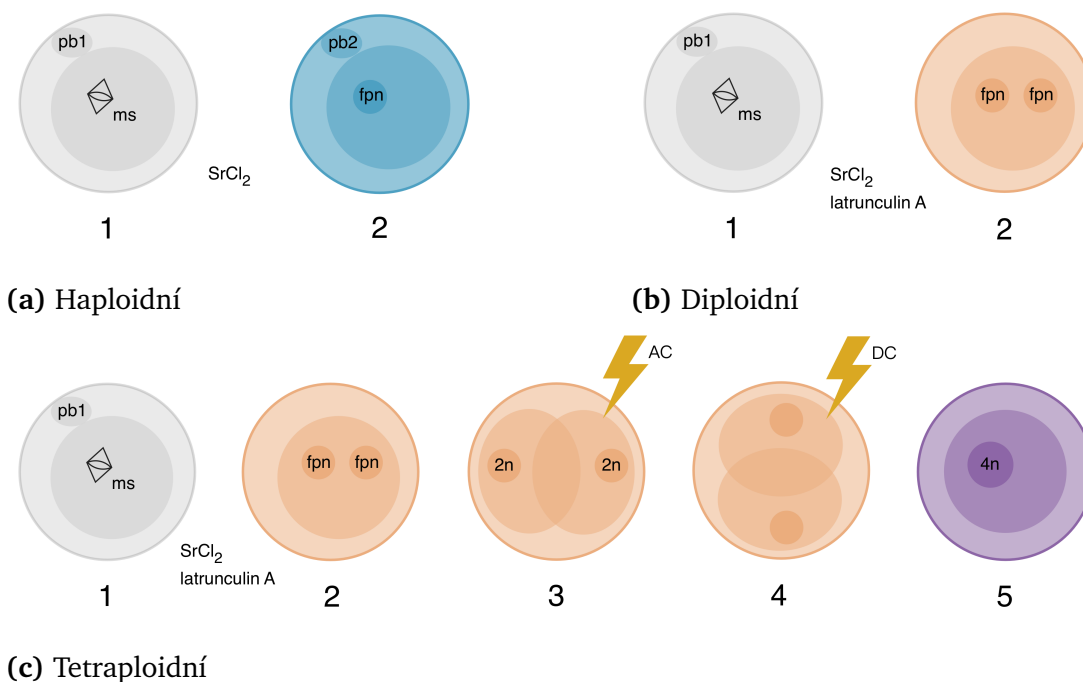
1: Extrakce vejcovodu myši. a: Děloha, b: Vejcovod. c: Vaječník, d: Tuková tkáň.

2: Vejcovod se zvětšenou ampullou, ve které jsou oocyty s kumulárními buňkami.



## 6.3 Parthenogenetická aktivace oocytů

Oocyty v metafázi II, očištěné od kumulárních buněk, byly parthenogeneticky aktivovány v čtyřjamkové destičce a umístěny do inkubátoru (37 °C, 5 % CO<sub>2</sub>). Po uplynutí doby nezbytné pro úspěšnou aktivaci byly promyty a kultivovány v kultivačním médiu KSOM.



**Obrázek 6.2:** Příprava parthenogenetických embryí.

a) Příprava haploidního embrya. 1: Oocyt v metafázi II s prvním pólovým tělískem (pb1) a meiotickým vřeténkem (ms). 2: Haploidní embryo po parthenogenetické aktivaci, s druhým pólovým tělískem (pb2) a jedním samičím prvojádrem (fpn).

b) Příprava diploidního embrya. 1: Oocyt v metafázi II s prvním pólovým tělískem (pb1) a meiotickým vřeténkem (ms). 2: Diploidní embryo po parthenogenetické aktivaci, se dvěma samičími prvojádry (fpn).

c) Příprava tetraploidního embrya. 1: Oocyt v metafázi II s prvním pólovým tělískem (pb1) a meiotickým vřeténkem (ms). 2: Diploidní embryo po parthenogenetické aktivaci, se dvěma samičími prvojádry (fpn). 3: Dvoubuněčné diploidní (2n) embryo, na které působí střídavý proud (AC), k srovnání blastomer paralelně s elektrodami. 4: Dvoubuněčné embryo s aplikovaným pulsem stejnosměrného proudu (DC) kolmo na dotyk blastomer. 5: Fúzované blastomery tetraploidního (4n) jednobuněčného embrya.

### 6.3.1 Haploidní parthenogenetická aktivace

K získání haploidních embryí byl do kultivačního média KSOM přidán SrCl<sub>2</sub> (5 mM) a EGTA (2 mM). Dostatečná doba k aktivaci byla 4 hodiny. Poté byla pod

mikroskopem ověřena přítomnost druhého pólového tělíska a jednoho prvojádra (obrázek 6.2a).

### **6.3.2 Diploidní parthenogenetická aktivace**

K získání haploidních embryí byl do kultivačního média KSOM přidán  $\text{SrCl}_2$  (5 mM), EGTA (2 mM) a cytochalasin B (5  $\mu\text{g}/\text{ml}$ ), nebo latrunculin A (5  $\mu\text{g}/\text{ml}$ ). Dostatečná doba k aktivaci byla 5 hodin. Poté byla pod mikroskopem ověřena přítomnost dvou prvojader a absence druhého pólového tělíska (obrázek 6.2b).

## **6.4 Elektrofúze dvoubuněčných embryí**

Pro získání tetraploidních parthenogenetických embryí byla použita diploidní parthenogenetická embrya ve dvoubuněčném stádiu (následující den po parthenogenetické aktivaci). Embrya byla přenesena do 100  $\mu\text{l}$  kapky 5,5% glukosy umístěné mezi elektrodami. Na pulsním generátoru byly nastaveny hodnoty střídavého proudu (AC) na 2,5 V a 1 puls stejnosměrného proudu (DC) na 25 V s délkou trvání 50  $\mu\text{s}$ . Po srovnání embryí oběma blastomerami paralelně s elektrodami pomocí AC a po následné aplikaci DC pulsu byla embrya promyta v manipulačním médiu HTF, poté v kultivačním médiu KSOM, ve kterém byla následně kultivována. Po 30 minutách byla pod mikroskopem ověřena úspěšnost elektrofúze pozorováním jednobuněčného stádia (obrázek 6.2c).

## **6.5 Monitorovací systém Primo Vision**

Z důvodu vhodného načasování následného měření nukleocytoplasmatického poměru byl sledován vývoj jednotlivých skupin embryí. Embrya se vyvíjela ve speciální šestnáctijamkové misce v kultivačním médiu KSOM, překrytá parafinovým olejem. Monitorovací systém Primo Vision, pod kterým byla miska v inkubátoru umístěna, byl nastaven na snímání každých 20 minut po dobu 5 dní. Po ukončení experimentu byly zaznamenané snímky vyhodnoceny v příslušném programu EVO.

## 6.6 Karyotypy a barvení preparátů

Ověření ploidity a pluripotence bylo provedeno na zvlášť připravených blastocystách. Snímky byly pořízeny konfokálním fluorescenčním mikroskopem Olympus BX61 prostřednictvím programu AnalySIS a následně upraveny v programu ImageJ.

### 6.6.1 Stanovení karyotypů

Buněčný cyklus buněk blastocyst byl zastaven v metafázi mitotického dělení přidáním demekolcinu (0,1 µg/ml) na 1,5 hodiny do kultivačního média. Poté byla embrya 10 minut ponechána v hypotonickém 1% citrátu sodném. Následně byla po malých skupinách (3–4 embrya) přenesena na podložní sklo Superfrost a zakápnuta prvním fixačním roztokem (voda:methanol:kyselina octová 4:5:1). Ihned byla zakápnuta druhým fixačním roztokem (methanol:kyselina octová 3:1) a téměř před vyschnutím znovu z výšky zakápnuta 20 µl druhého fixačního roztoku, což bylo zopakováno celkem pětkrát. Po posledním vyschnutí bylo podložní sklo přikryto krycím sklíčkem s kapkou montovacího média Antifade DAPI.

### 6.6.2 Fixace a imunofluorescenční barvení

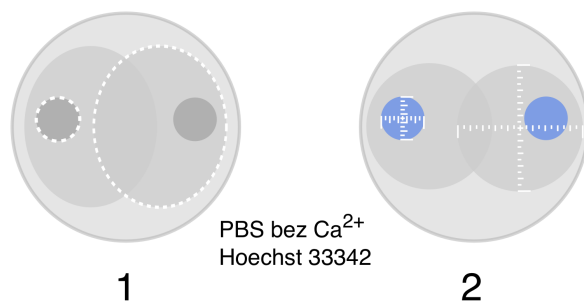
Blastocysty pro průkaz pluripotence ICM pomocí protilátky Oct-3/4 byla fixována přenesením do 4% paraformaldehydu na 15 minut. Byly promyty v PBS/BSA a ponechány v PBS pod parafilmem v lednici do barvení.

V den barvení byly blastocysty promyty v PBS/BSA 3x po 10 minutách, 15 minut permeabilisovány 0,2% Tritonem X-100 v PBS/BSA, opět promyty v PBS/BSA 3x po 10 minutách a byla přidána primární protilátka (Oct-3/4, 1:200). Poté byly blastocysty ponechány přes noc v lednici.

Druhý den byly blastocysty promyty v PBS/BSA 3x po 10 minutách a byla přidána sekundární protilátka (Donkey anti-Mouse IgG, 1:1000) na 2 hodiny ve tmě při pokojové teplotě. Obarvené blastocysty byly přeneseny na podložní sklo do kapky montovacího média Antifade DAPI a přikryty krycím sklíčkem.

## 6.7 Stanovení nukleocytoplasmatického poměru

Dvoubuněčná a čtyřbuněčná embrya určená pro měření průměru jader a blastomer byla přenesena z kultivačního média do PBS bez  $\text{Ca}^{2+}$ /BSA s Hoechst 33342 (10  $\mu\text{g}/\text{ml}$ ) a ponechána 15 minut v inkubátoru. Obarvená embrya byla promyta v kapce PBS bez  $\text{Ca}^{2+}$ /BSA a umístěna po skupinách do čtyř 50 $\mu\text{l}$  kapek PBS bez  $\text{Ca}^{2+}$ /BSA na Petriho misce pod minerálním olejem.



**Obrázek 6.3:** Měření nukleocytoplasmatického poměru.

1: Dvoubuněčné embryo vybrané k měření. 2: Měření průměrů zakulacených blastomer a obarvených jader.

Embrya byla hodnocena v programu Image-Pro 5.1. Vzdálenosti byly měřeny do kříže (obrázek 6.3). Z průměru hodnot pak byl podle vzorce 6.1 vypočítán objem dvou koulí: jádra a blastomery. Odečtením objemu jádra od objemu blastomery byla vypočítána hodnota objemu cytoplasmy. Jejich poměr, dle vzorce 6.2 je pak nukleocytoplasmatický poměr,  $N/C$ .

$$V = \frac{\pi}{6} \cdot d^3 \quad (6.1)$$

$$N/C = \frac{V_N}{V_C - V_N} \quad (6.2)$$

kde

$V$  je objem,

$d$  je průměr,

$N/C$  je nukleocytoplasmatický poměr,

$V_N$  je objem jádra,

$V_C$  je objem cytoplasmy.

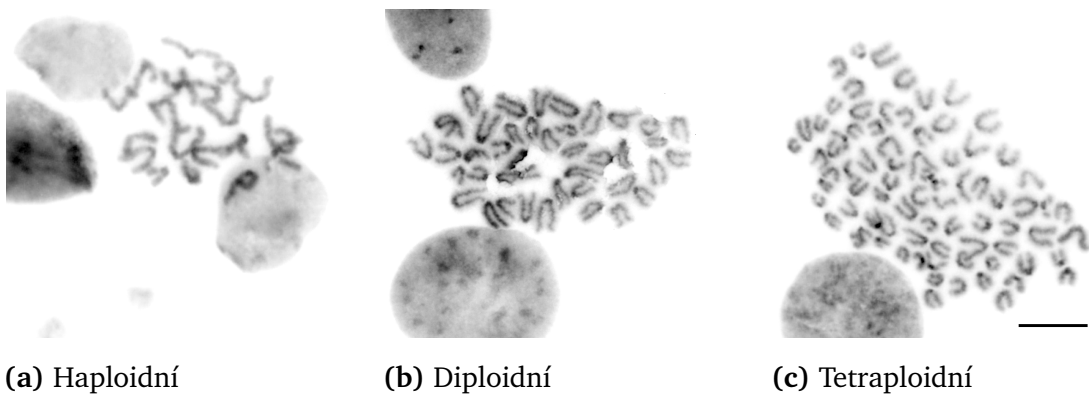
# 7. Výsledky

V této kapitole jsou prezentovány získané výsledky. Naměřené hodnoty jsou uvedeny v tabulkách a znázorněny v grafech. Stanovení karyotypů a ověření pluripotence blastocyst dokládají pořázené snímky.

## 7.1 Příprava a vývoj embryí

Z jedné myši bylo průměrně izolováno kolem 30 kvalitních oocytů v metafázi II. Při všech dílčích experimentech byly hormonálně injikovány dvě myši, aby byla případně kompenzována nedostatečná stimulace.

Při ověřování karyotypů bylo hodnotitelných 58,3 % (88/151) vyšetřovaných blastocyst. Podařilo se získat haploidní, diploidní i tetraploidní parthenogenetická embrya a blastocysty, jak je vidět ze srovnání jednotlivých karyotypů blastocyst na obrázku 7.1.



**Obrázek 7.1:** Karyotypy parthenogenetických blastocyst.

a) Haploidní karyotyp. b) Diploidní karyotyp. c) Tetraploidní karyotyp.  
Chromosomy obarvené DAPI. Měřítko 5  $\mu\text{m}$ .

### 7.1.1 Haploidní parthenogenetická embrya

Průměrná úspěšnost přípravy haploidních parthenogenetických embryí (tabulka 7.1) byla srovnatelná s průměrnou úspěšností přípravy diploidních parthenogenetických embryí (84,3 % a 79,7 %,  $t(2) = 1.26$ ,  $p = 0.17$ )<sup>1</sup>. Počet získaných blastocyst byl ale výrazně nižší než parthenogenetických diploidních. Ve třech uvedených experimentech dosáhlo blastocysty 61,5 % haploidních parthenogenonů, v případě diploidních to bylo 88,0 % ( $t(2) = 8.76$ ,  $p = 0.01$ ).

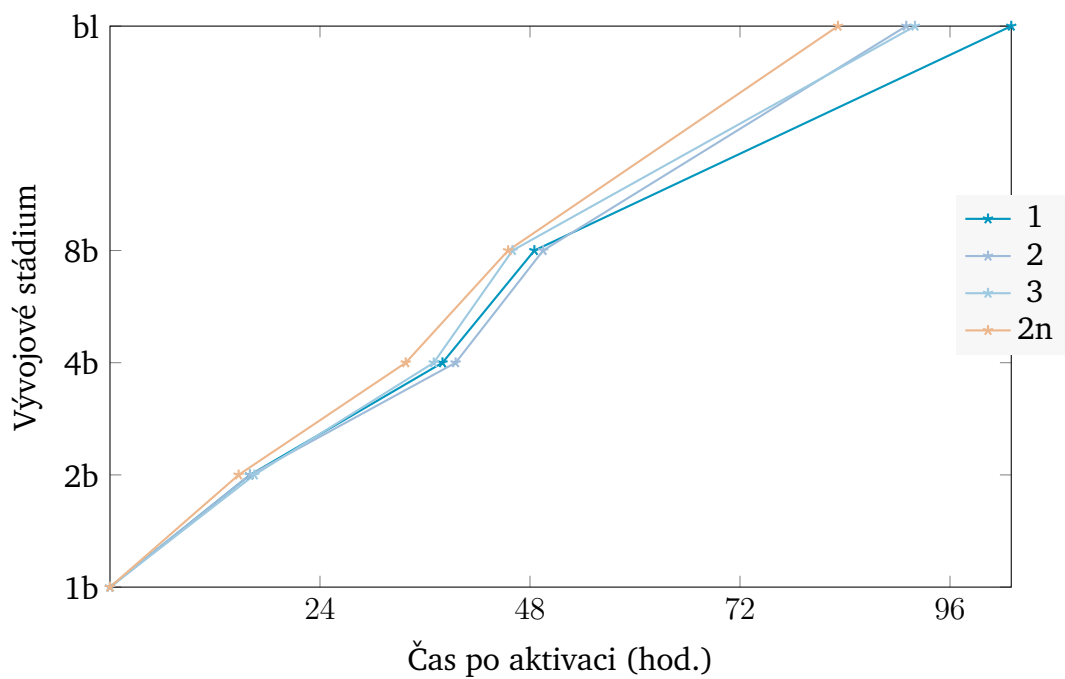
**Tabulka 7.1:** Příprava a vývoj haploidních embryí.

Pokus	Aktivace (%)	Blastocysty (%)
1	84,0 (42/50)	47,6 (20/42)
2	75,0 (18/24)	66,7 (12/18)
3	94,0 (47/50)	70,2 (33/47)
Průměr	84,3	61,5

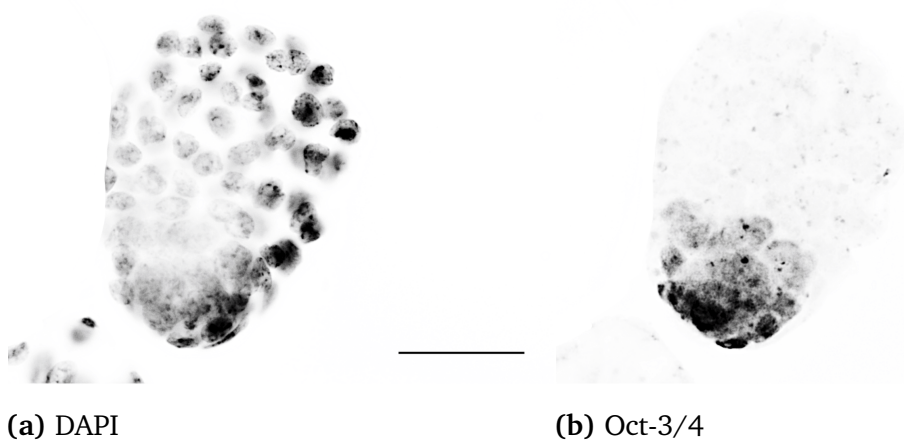
Haploidní embrya postupně zaostávají ve vývoji za diploidními embryi (obrázek 7.2). Dělení do dvou buněk probíhá o 1 hodinu později, do čtyřbuněčného stádia o 4 hodiny. Haploidní blastocysty, určené pro další části postupu, byly ponechány ve vývoji o den déle.

Haploidní blastocysty byly menší než diploidní blastocysty, obsahovaly méně buněk a méně kavitovaly. Embryoblast byl standardně vytvořen a podařilo se ověřit jeho pluripotenci průkazem exprese Oct-3/4 (obrázek 7.3b). Při karyotypování (obrázek 7.4) se kromě haploidních jader objevovaly průměrně v 30,6 % diploidní karyotypy (tabulka 7.2).

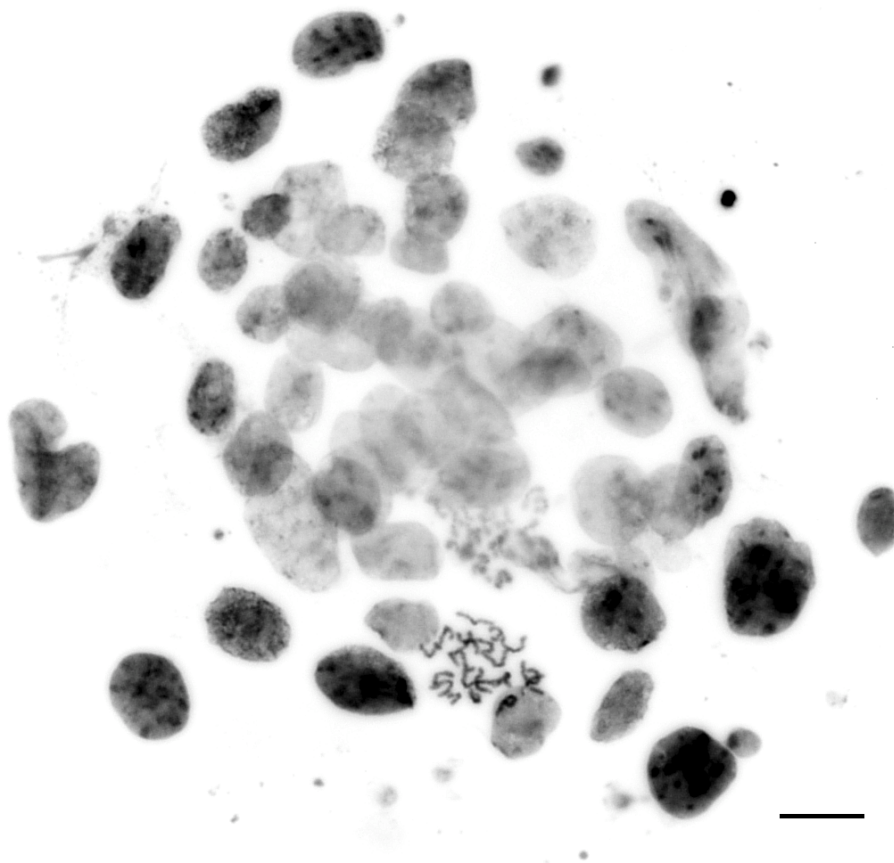
<sup>1</sup>Výsledek statistického testu, kde  $t$  je hodnota výsledku provedeného  $t$ -testu, v závorce stupně volnosti,  $p$  je pravděpodobnost chyby prvního druhu.



**Obrázek 7.2:** Graf raného vývoje haploidních parthenogenetických embryí. 1, 2, 3 – haploidní embrya, 2n – diploidní embrya, 1b – jednobuněčné stádium = aktivace, 2b – dvoubuněčné stádium, 4b – čtyřbuněčné stádium, 8b – osmibuněčné stádium, bl – blastocysta.



**Obrázek 7.3:** Haploidní blastocysta. a) DNA blastomer obarvená DAPI. b) Embryoblast značený prostřednictvím Oct-3/4. Měřítko 35  $\mu\text{m}$ .



**Obrázek 7.4:** Karyotypy haploidní blastocysty.  
Chromosomy obarvené DAPI. Měřítko 10  $\mu\text{m}$ .

**Tabulka 7.2:** Karyotypy haploidních blastocyst.  
n – haploidní karyotyp, 2n – diploidní karyotyp, m – mozaika.

<b>Pokus</b>	<b>Analyzovatelné bl. (%)</b>	<b>n (%)</b>	<b>2n/m (%)</b>
1	50,0 (10/20)	70,0	30,0
2	70,0 (7/10)	85,7	14,3
3	63,6 (21/33)	52,4	47,6
<b>Průměr</b>	<b>61,2</b>	<b>69,4</b>	<b>30,6</b>



### 7.1.2 Diploidní parthenogenetická embrya

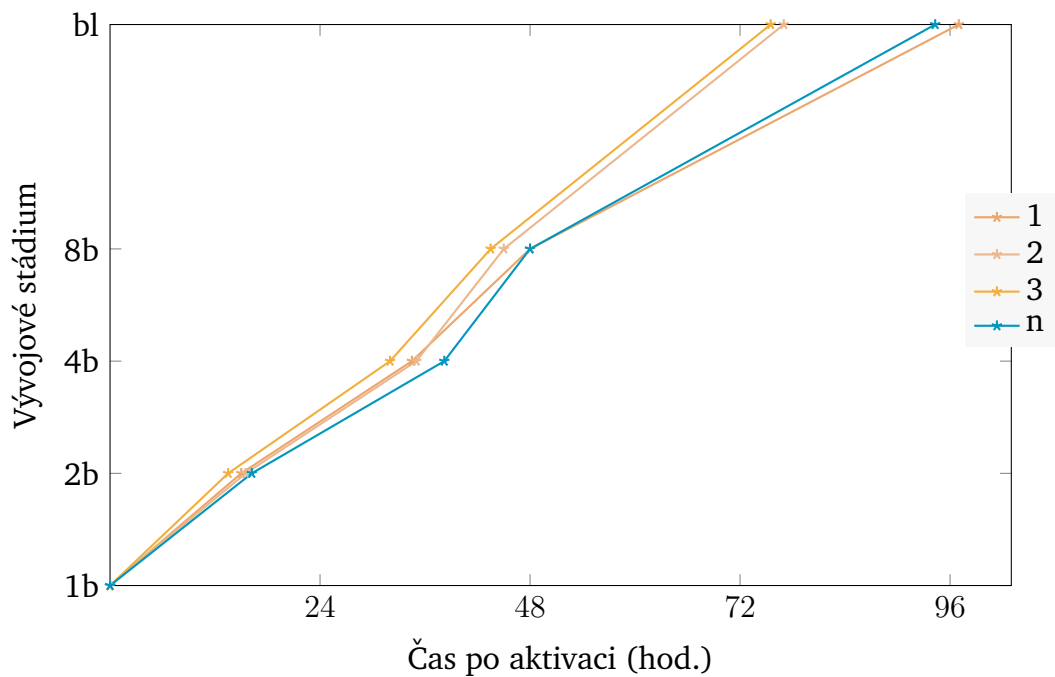
Nejprve byl používán k přípravě diploidních parthenogenetických embryí cytochalasin B. Neočekávaně však přestal spolehlivě fungovat (podrobněji v kapitole 8), a proto bylo přistoupeno k používání latrunculinu A. Úspěšnost aktivace (tabulka 7.3) nebyla statisticky odlišná od úspěšnosti přípravy haploidních embryí ( $t(2) = 1.26$ ,  $p = 0.17$ ). Do stádia blastocysty se naopak vyvíjela většina embryí, v uvedených třech pokusech průměrně 88,0 %.

**Tabulka 7.3:** Příprava a vývoj diploidních embryí.

Pokus	Aktivace (%)	Blastocysty (%)
1	82,0 (50/61)	80,0 (20/25)
2	75,0 (18/24)	88,9 (8/9)
3	82,0 (41/50)	95,2 (20/21)
Průměr	79,7	88,0

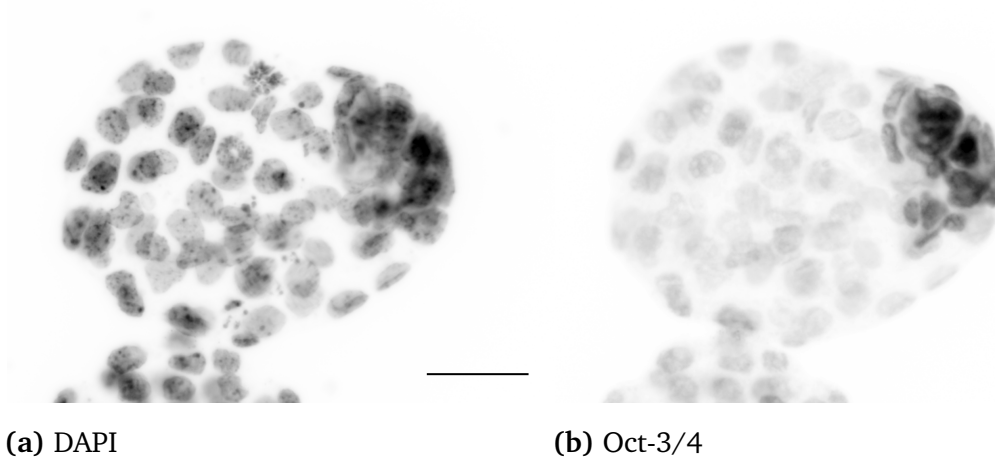
Vývoj diploidních parthenogenonů je rychlejší než vývoj haploidních embryí (obrázek 7.5). Blastomery embryí byly proto měřeny o odpovídající počet hodin dříve.

Karyotypy (obrázek 7.7) vyšly pro všechna embrya podle očekávání, analyzovatelná jádra byla diploidní (tabulka 7.4). Exprese Oct-3/4 v normálně utvořeném embryoblastu byla též prokázána (obrázek 7.6b).



**Obrázek 7.5:** Graf raného vývoje diploidních parthenogenetických embryí.

1, 2, 3 – diploidní embrya, n – haploidní embrya, 1b – jednobuněčné stádium = aktivace, 2b – dvoubuněčné stádium, 4b – čtyřbuněčné stádium, 8b – osmibuněčné stádium, bl – blastocysta.

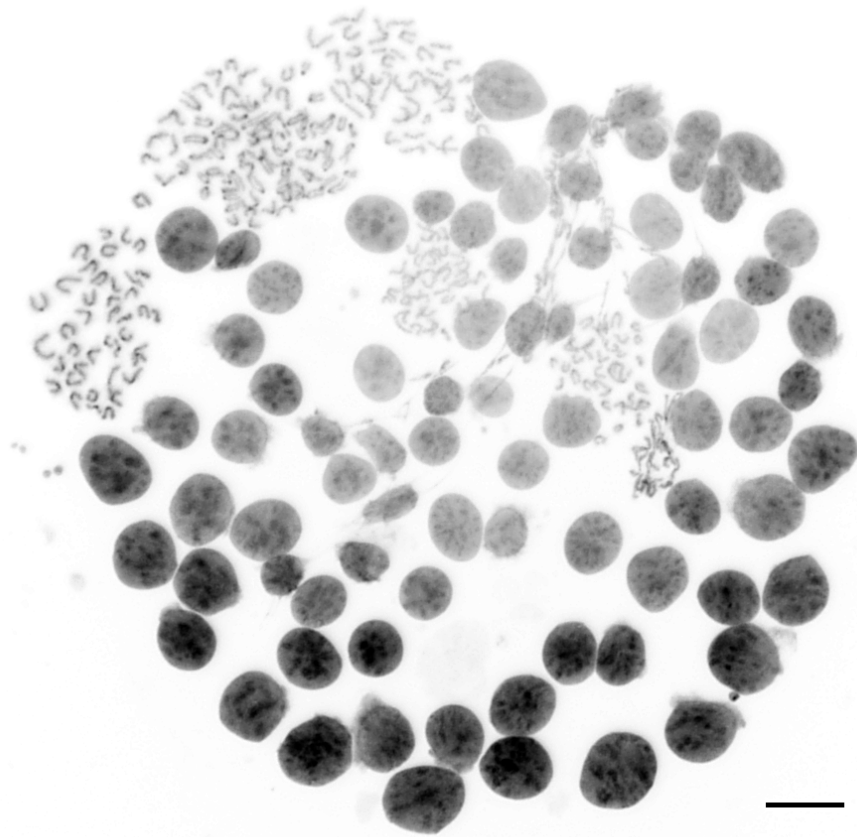


(a) DAPI

(b) Oct-3/4

**Obrázek 7.6:** Diploidní blastocysta.

a) DNA blastomer obarvená DAPI. b) Embryoblast značený prostřednictvím Oct-3/4. Měřítko 35  $\mu\text{m}$ .



**Obrázek 7.7:** Karyotypy diploidní blastocysty.  
Chromosomy obarvené DAPI. Měřítko 10  $\mu\text{m}$ .

**Tabulka 7.4:** Karyotypy diploidních blastocyst.  
n – haploidní karyotyp, 2n – diploidní karyotyp.

Pokus	Analyzovatelné bl. (%)	n (%)	2n (%)
1	40,0 (6/15)	0,0	100,0
2	50,0 (4/8)	0,0	100,0
3	70,0 (14/20)	0,0	100,0
Průměr	53,3	0,0	100,0

### 7.1.3 Tetraploidní parthenogenetická embrya

V případě tetraploidních embryí byl řešen stejný problém jako v případě diploidních parthenogenonů, neboť postup aktivace je shodný. Po nahrazení cytochalasinu B latrunculinem A byl opět dostatečný počet pro elektrofúzi a přípravu tetraploidních parthenogenetických embryí.

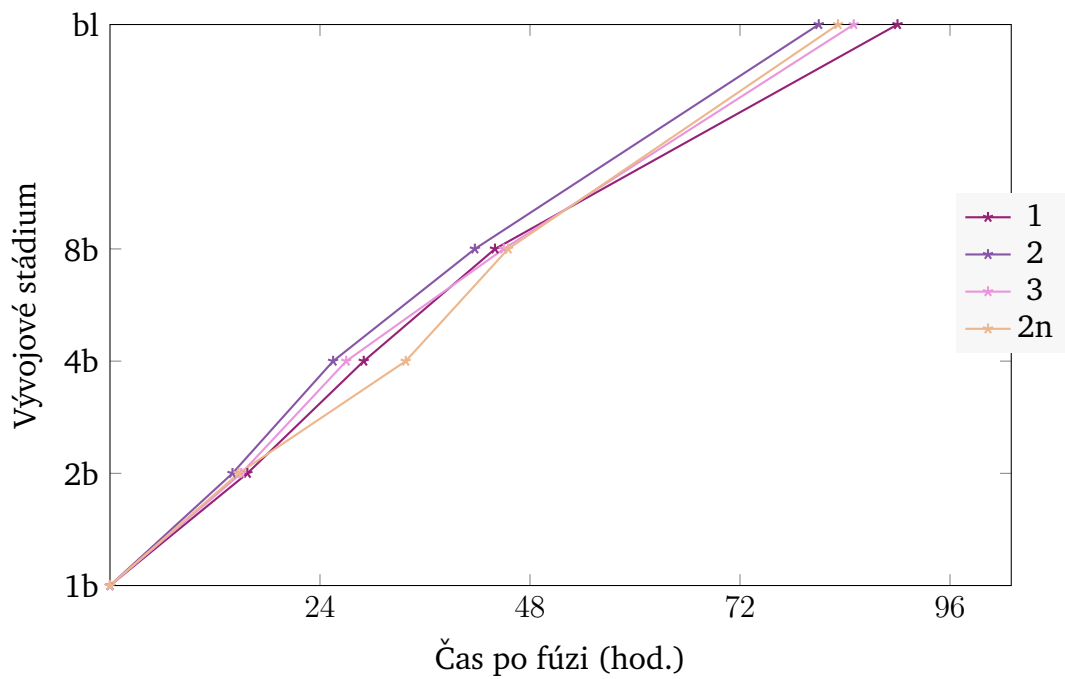
Elektrofúze měla po vyladění nastavení téměř 100% úspěšnost (tabulka 7.5), přičemž embrya nelyzovala a úspěšně se vyvíjela do kvalitních blastocyst (94,2%).

**Tabulka 7.5:** Příprava a vývoj tetraploidních embryí.

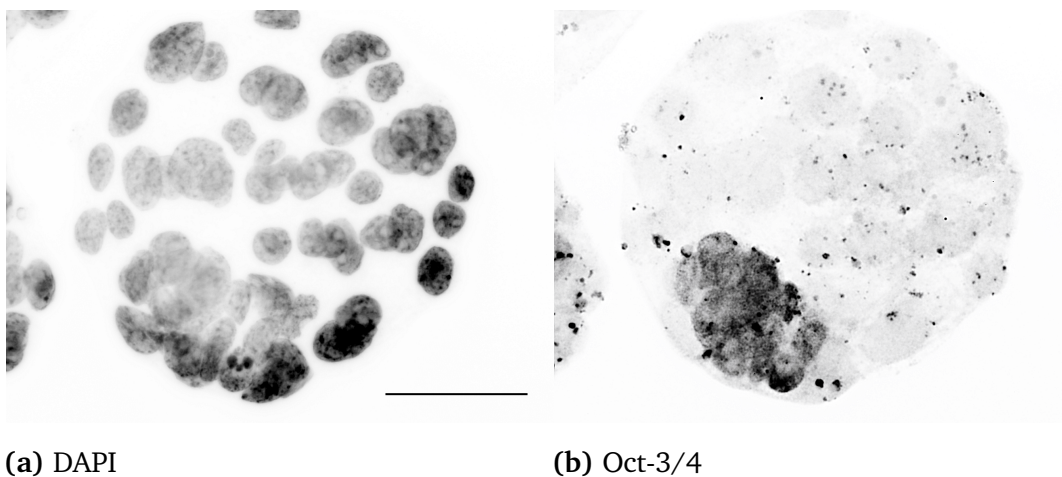
Pokus	Elektrofúze (%)	Blastocysty (%)
1	92,0 (23/25)	82,6 (19/23)
2	100,0 (8/8)	100,0 (8/8)
3	100,0 (20/20)	100,0 (20/20)
Průměr	97,3	94,2

Vývoj tetraploidních embryí je zpočátku mírně urychlen oproti diploidním parthenogenonům (obrázek 7.8). Dělení do čtyř buněk nastává dříve než u diploidních (průměrně o 6 hodin) a rozměry pro výpočet nukleocytoplasmatického poměru byla proto měřena dříve.

Embryoblast většina blastocyst obsahuje a je pozitivní na Oct-3/4 (obrázek 7.9b). Tetraploidní blastocysty obsahují méně buněk než diploidní, ale není statisticky významný rozdíl v získaném počtu blastocyst ( $t(2) = 2.41$ ,  $p = 0.07$ ). Karyotypy analyzovatelných tetraploidních embryí (obrázek 7.10) obsahovaly čtyři sady chromosomů (tabulka 7.6).

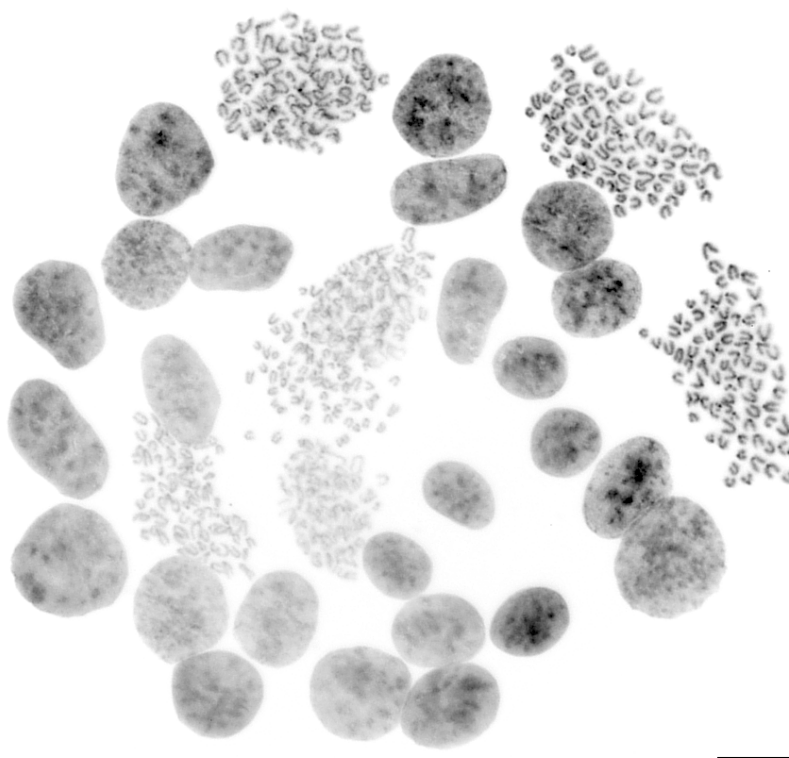


**Obrázek 7.8:** Graf raného vývoje tetraploidních parthenogenetických embryí. 1, 2, 3 – tetraploidní embrya, 2n – diploidní embrya, 1b – jednobuněčné stádium = fúze, 2b – dvoubuněčné stádium, 4b – čtyřbuněčné stádium, 8b – osmibuněčné stádium, bl – blastocysta.



**Obrázek 7.9:** Tetraploidní blastocysta.

a) DNA blastomer obarvená DAPI. b) Embryoblast značený prostřednictvím Oct-3/4. Měřítko 35  $\mu\text{m}$ .



**Obrázek 7.10:** Karyotypy tetraploidní blastocysty.  
Chromosomy obarvené DAPI. Měřítko 10  $\mu\text{m}$ .

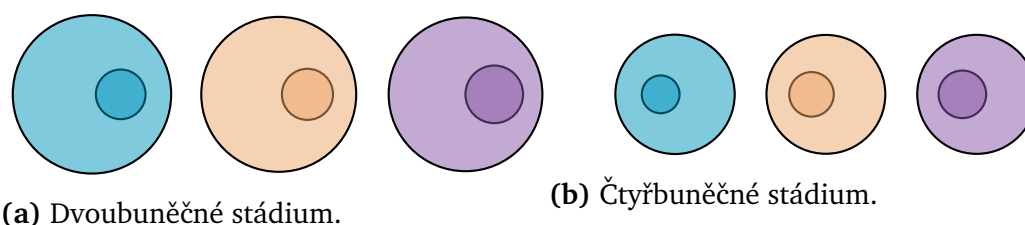
**Tabulka 7.6:** Karyotypy tetraploidních blastocyst.  
2n – diploidní karyotyp, 4n – tetraploidní karyotyp.

Pokus	Analyzovatelné bl. (%)	2n (%)	4n (%)
1	57,9 (11/19)	0,0	100,0
2	85,7 (6/7)	0,0	100,0
3	47,4 (9/19)	0,0	100,0
Průměr	63,7	0,0	100,0

## 7.2 Nukleocytoplasmatický poměr embryí

Nukleocytoplasmatický poměr byl vypočítán podle vzorců 6.1 a 6.2. Pro každou skupinu byl stanoven minimální počet 50 embryí a alespoň 3 experimenty. Celkově bylo připraveno a měřeno přes 400 embryí. Nebyla měřena všechna připravená embrya, například ta, která měla poškozené blastomery nebo nestandardní rozměry.

Mezi skupinami haploidních dvoubuněčných a haploidních čtyřbuněčných embryí nebyl statisticky významný rozdíl ( $t(112) = 1.96$ ,  $p = 0.052$ ) a ani mezi skupinami diploidních čtyřbuněčných a tetraploidních dvoubuněčných embryí ( $t(103) = 0.47$ ,  $p = 0.64$ ) nemohla být zamítnuta nulová hypotéza, tedy že se porovnávané skupiny statisticky neliší. V případě ostatních skupin embryí byl nalezen významný rozdíl ( $p < 0.001$ ) a je tedy možné usuzovat, že se od sebe tyto soubory embryí odlišují nukleocytoplasmatickým poměrem.



**Obrázek 7.11:** Schematické obrázky blastomerů.

a) Dvoubuněčné stádium. b) Čtyřbuněčné stádium. Modře blastomera haploidního parthenogenetického embrya, oranžově blastomera diploidního parthenogenetického embrya, fialově blastomera tetraploidního parthenogenetického embrya.

Zobrazení dat zahrnuje tabulku 7.7, ve které jsou pro každou skupinu uvedeny počty embryí připravených k měření, průměrné hodnoty objemů jádra a cytoplasmy, vypočítané průměrné nukleocytoplasmatické poměry a k nim směrodatné odchylky. Na základě průměrných objemů jádra a cytoplasmy byly pak vytvořeny schematické obrázky blastomerů jednotlivých skupin (obrázek 7.11). Doplnuje je bodový graf (obrázek 7.12), ve kterém jsou průměrné hodnoty vyneseny proti sobě. Průměrné nukleocytoplasmatické průměry jsou znázorněny za prvé pomocí sloupcového grafu (obrázek 7.13) a za druhé kvartilového grafu (obrázek 7.14), ve kterém horní a dolní vousy dosahují k minimální a maximální hodnotě, krabice představují 1. až 3. kvartil dat, vodorovná čára označuje medián a vyznačený bod odpovídá průměrné hodnotě.

Pro ověření stanovených hypotéz a provedení statistické analýzy byl použit dvouvýběrový nepárový Studentův t-test v programu LibreOffice.

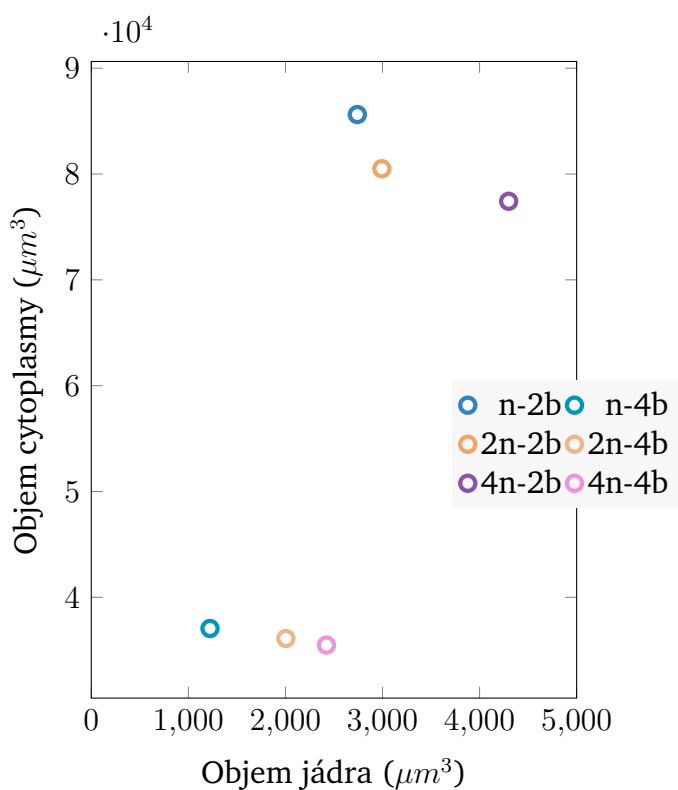
**Tabulka 7.7:** Nukleocytoplasmatický poměr.

n – haploidní parthenogenetická embrya, 2n – diploidní parthenogenetická embrya,

4n – tetraploidní embrya, 2b – dvoubuněčné stádium, 4b – čtyřbuněčné stádium,

N/C – nukleocytoplasmatický poměr,  $\pm$  SD – směrodatná odchylka.

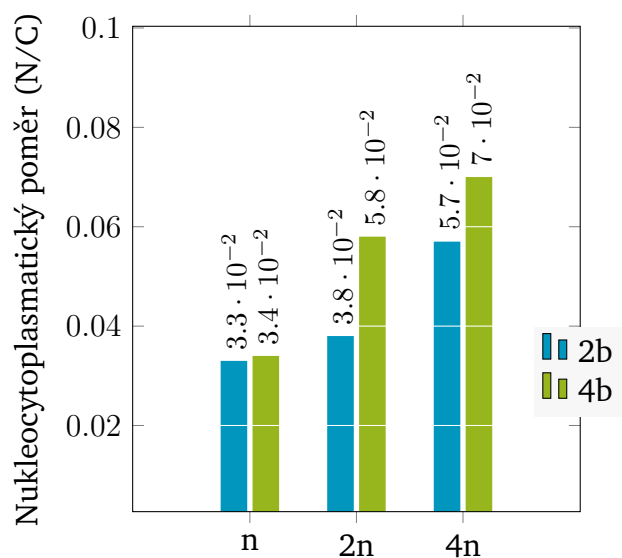
Skupina	Počet	Jádro ( $\mu m^3$ )	Cytoplasma ( $\mu m^3$ )	N/C	$\pm$ SD
n-2b	70	2740,543	85620,927	0,033	0,007
2n-2b	78	2993,449	80501,591	0,038	0,007
4n-2b	70	4300,045	77425,744	0,057	0,010
n-4b	54	1223,208	37054,455	0,034	0,008
2n-4b	72	2004,514	36111,263	0,058	0,009
4n-4b	60	2422,648	35487,963	0,070	0,010



**Obrázek 7.12:** Bodový graf průměrných objemů cytoplasmy a jádra.

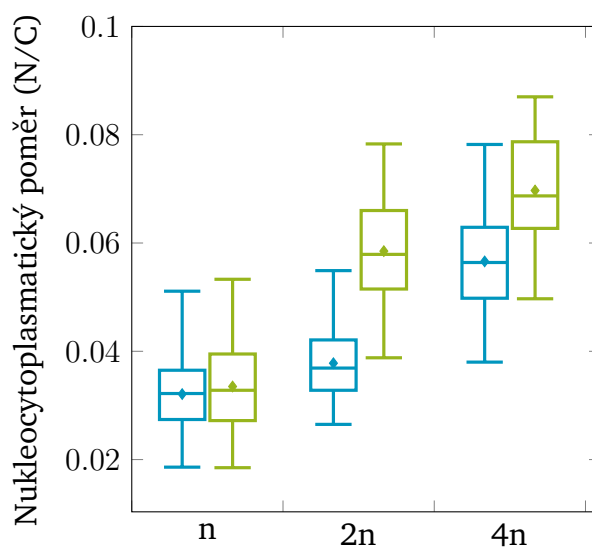
a) Průměrné objemy blastomer. b) Přibližné zobrazení. n – haploidní parthenogenetická embrya, 2n – diploidní parthenogenetická embrya, 4n – tetraploidní embrya, 2b – dvoubuněčné stádium, 4b – čtyřbuněčné stádium.





**Obrázek 7.13:** Sloupcový graf nukleocytoplasmatického poměru.

n – haploidní parthenogenetická embrya, 2n – diploidní parthenogenetická embrya, 4n – tetraploidní embrya, 2b (modře) – dvoubuněčné stádium, 4b (zeleně) – čtyřbuněčné stádium.



**Obrázek 7.14:** Kvartilový graf nukleocytoplasmatického poměru.

Krabice reprezentují 1. až 3. kvartil, čára uvnitř označuje medián, vyznačený bod odpovídá aritmetickému průměru. Vousy dosahují k minimální a maximální hodnotě. n – haploidní parthenogenetická embrya, 2n – diploidní parthenogenetická embrya, 4n – tetraploidní embrya, modře – dvoubuněčné stádium, zeleně – čtyřbuněčné stádium.

## 8. Diskuse

*V poslední kapitole jsou diskutovány dosažené výsledky a metody práce, které k nim vedly. Získané poznatky jsou srovnávány s dříve publikovanými a jsou navrženy další postupy.*

### 8.1 Hormonální stimulace myši a izolace oocytů

Myši byly stimulovány k superovulaci vždy po dvojicích. Na kvalitu stimulace má vliv například stáří myši. Při každém experimentu se tedy obvykle podařilo získat kolem 60 oocytů.

Během izolace, při odstraňování kumulárních buněk hyaluronidasou i při samotné mechanické manipulaci mohou být některé oocyty poškozeny, takže konečný počet oocytů použitých k aktivaci bývá nižší.

### 8.2 Parthenogenetická aktivace oocytů

Uvedená procenta aktivovaných oocytů mohla být ovlivněna vytríděním oocytů vhodných k aktivaci. Třídění se provádí subjektivně, podle vzhledu. Hodnotí se symetrie a velikost oocytů i vzhled cytoplasmy. Odstranění kumulárních buněk umožňuje následně dokonalejší selekci kvalitních oocytů.

Pro přípravu diploidních parthenogenonů byl nejprve zvolen cytochalasin B, který byl používán již během bakalářské práce.<sup>1</sup> Nastal však problém s fungováním cytochalasinu B a embrya se ihned po odmytí dělila, během vývoje fragmentovala a nedařilo se získat žádné blastocysty. Nejprve byla opakovaně upravována koncentrace chemikálií v aktivačním médiu, ale bez úspěchu, přestože v případě haploidních embryí nebyl při aktivaci problém. Musel být tedy nahrazen cytochalasin B obdobně působícím latrunculinem A, a to vedlo k úspěšným výsledkům.

### 8.3 Monitorovací systém Primo Vision

Aby mohlo být načasováno měření blastomer v obou vývojových stádiích pro různé ploidity, bylo potřeba sestavit časovou osu dělení jednotlivých skupin. Byl

---

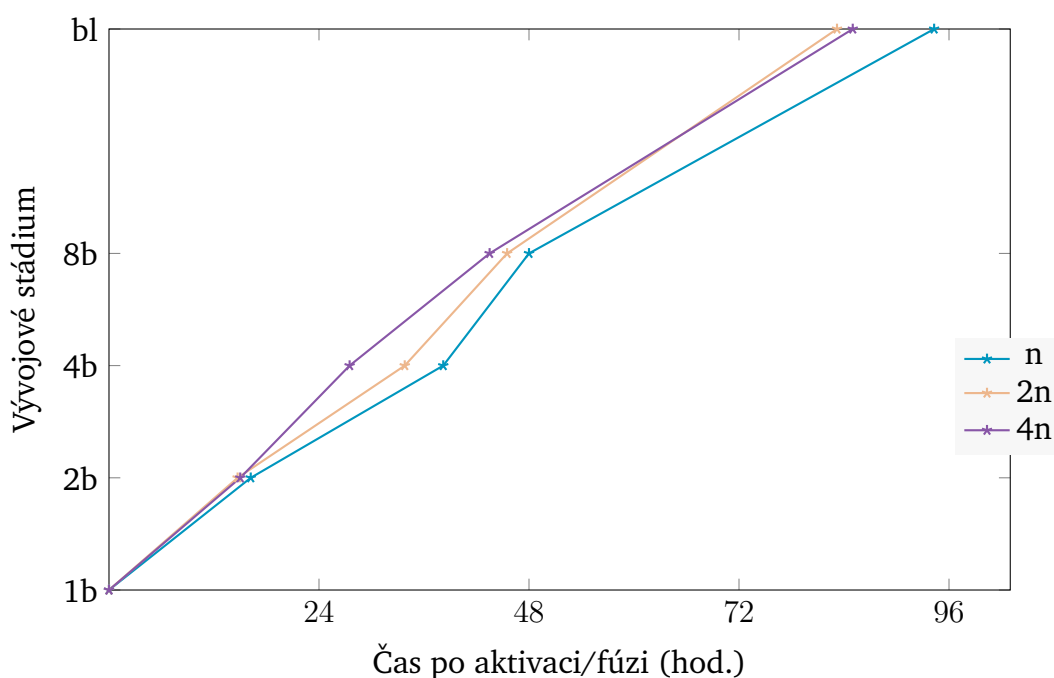
<sup>1</sup>Jettmarová, D. (2016). *Produkce a vývoj haploidních embryí myši*. Bakalářská práce. Katedra buněčné biologie PŘF UK, Praha, 32 s.

zvolen monitorovací systém Primo Vision, který umožňuje pravidelné snímání embryí uložených v inkubátoru. Frekvence pořizování snímků byla nastavena na 20 minut.

Monitorovací systém je k embryím šetrný, protože není nutné je opakovaně vystavovat působení světelného záření a změnám teploty.

Kultivační misky určené k vývoji sledovaných embryí mají šestnáct jamek. Z nich je nutné po přidání kultivačního média odstranit vzduchové bubliny důrazným poklepem na dno misky.

Snímání bylo provedeno celkem třikrát. Na obrázku 8.1 jsou zobrazeny průměrné časy dělení sledovaných embryí. Je třeba brát v úvahu individuální rozdíly mezi embryi, které se pohybují v řádu hodin. Proto byly stanoveny průměrné hodnoty pro jednotlivé skupiny a obě vývojová stádia.



**Obrázek 8.1:** Graf raného vývoje parthenogenetických embryí.

n – haploidní parthenogenetická embrya, 2n – diploidní parthenogenetická embrya, 4n – tetraploidní parthenogenetická embrya, 1b – jednobuněčné stádium = aktivace/fúze, 2b – dvoubuněčné stádium, 4b – čtyřbuněčné stádium, 8b – osmibuněčné stádium, bl – blastocysta.

## 8.4 Vývoj parthenogenetických embryí

Dynamika vývoje parthenogenetických embryí pozorovaná při provedených pokusech byla v souladu s dříve publikovanými studiemi: haploidní

parthenogenony se vyvíjely nejpomaleji a bylo z nich nejméně blastocyst, tetraploidní parthenogenony byly úspěšností srovnatelné s diploidními, a ty se ve vývoji příliš nelišily od normálních oplozených embryí (porovnání na základě dříve nasnímaných embryí z jiného experimentu).

Celková úspěšnost aktivace a preimplantačního vývoje byla vyšší než v letech, kdy se s parthenogenetickými embryi začínalo experimentovat. V moderních laboratořích jsou dnes k dispozici například vhodnější kultivační média. Dříve se média individuálně upravovala a nazývala se pak podle jejich autora. Whittenovo médium (Whitten a Biggers, 1968; Whitten, 1971) používali Graham a Deussen (1974) a Whittinghamovo médium (Whittingham, 1971) si oblíbil Kaufman (1976). V současnosti je standardem kultivace v KSOM, draslíkem obohaceném optimalizovaném médiu (Erbach *et al.*, 1994; Ho *et al.*, 1995).

#### 8.4.1 Vývoj haploidních parthenogenetických embryí

Úspěšnost aktivace haploidních parthenogenonů (84,3 %) byla průměrně nižší než v případě diploidních embryí, nikoli však statisticky významná. Prvojádra byla rozpoznatelná po 3–4 hodinách po vložení do aktivačního média, stejně jako pozoroval Kaufman (1973). Zpomalení vývoje bylo znatelné již od prvního mitotického dělení, ale hlavní problém nastával při kompakci. Do blastocysty se vyvíjelo méně haploidních než diploidních embryí, v uvedených třech experimentech průměrně 61,5 %. Je to srovnatelné množství s 52 % haploidních blastocyst, které uvádějí Latham *et al.* (2002).

#### 8.4.2 Vývoj diploidních parthenogenetických embryí

Měření a karyotypování diploidních embryí bylo prováděno po záměně cytochalasinu B za latrunculin A.

Úspěšnost aktivace byla standardní (79,7 %), i když v případě uvedených třech experimentů procentuálně nižší než u haploidních parthenogenonů.

Blastocysty byly získány z většiny aktivovaných oocytů (88,0 %). Jde opět o srovnatelný výsledek s Latham *et al.* (2002), kteří uvádějí 93 % diploidních parthenogenetických blastocyst.

#### 8.4.3 Vývoj tetraploidních parthenogenetických embryí

Stejně jako v případě diploidních parthenogenonů byla měřená embrya aktivovaná za přítomnosti latrunculinu A.

Při vyladěné elektrofúzi embrya nelyzují a do 30 minut jsou prakticky všechna fúzovaná (Cheong *et al.*, 1991; Kubiak a Tarkowski, 1985). Pokud je elektrický puls příliš silný, embrya se mohou rozpadnout, když příliš slabý, tak nedojde ke spojení blastomer. Používány byly hodnoty střídavého proudu (AC) 2,5 V a stejnosměrného proudu (DC) 25 V s délkou trvání 50  $\mu$ s. Puls byl zvolen jeden, jak je doporučeno pro myší embrya (shrnuto v Chang *et al.*, 1992). Za hodinu po provedené elektrofúzi byla vytríděna případná diploidní embrya.

Vývoj byl očekáván stejný jako u diploidních embryí například na základě srovnání s embryi vzniklými oplozením, které provedli např. Koizumi a Fukuta (1995). Eglitis a Wiley (1981) a Henery a Kaufman (1991) popisují, že tetraploidní parthenogenony kavituji a tvoří blastocystu ve stejné době jako diploidní. V případě sledovaných vzorků se dokonce zdála do stádia moruly urychlená. Mezi dvoubuněčným a čtyřbuněčným stádiem bylo naměřeno průměrně jen 12 hodin, u diploidních 19 hodin a u haploidních 22 hodin (graf 8.1). Za příčinu lze pokládat fakt, že dvojbuněčné embryo bylo celkově starší o jedno stádium, protože fúzí se vrátilo o stádium zpět. Mohla si zachovat určité faktory v cytoplasmě, přestože morfoloicky odpovídala mladším embryím.

Roli v regulaci dělení by mohl hrát právě nukleocytoplasmatický poměr. Dvoubuněčná tetraploidní embrya ho totiž mají stejný jako čtyřbuněčná diploidní embrya. Pokud by řízení buněčného cyklu souviselo přímo s velikostí jádra, rozdělila by se po stejné době jako diploidní čtyřbuněčná embrya. A ta se skutečně dělila po 12 hodinách. Smith a McLaren (1977) tento jev popisují ve stádiu osmibuněčných tetraploidních embryí, u kterých předpokládají, že mají stejný nukleocytoplasmatický poměr jako kontroly v šestnáctibuněčném stádiu. Do osmibuněčného stádia však tetraploidní parthenogenony v námi pozorovaných případech dospívaly naopak později, v průměru o 4 hodiny.

Blastocysty tvořila většina tetraploidních embryí, ale obsahovaly méně buněk než diploidní blastocysty, což je v souladu s tím, co pozorovali Koizumi a Fukuta (1995), Smith a McLaren (1977) i Wen *et al.* (2017). Koizumi a Fukuta uvádějí 90,1 % tetraploidních parthenogenetických blastocyst a 88,1 % diploidních. Stejně jako v jejich případě bylo pozorováno více tetraploidních než diploidních blastocyst. Lze usuzovat, že příčina tkví v předchozí selekci v rámci elektrofúze. Byla pro ni vybírána jen kvalitní vyvíjející se embrya a případná poškozená embrya fúzi nepřezila. Tak došlo k vytrídění nejkvalitnějších embryí. Naopak u diploidních embryí byla do statistiky zahrnuta i embrya, která se přestala vyvíjet záhy po aktivaci.

Embryoblast měla většina blastocyst vytvořený alespoň v minimálním

množství. Podle [Wen et al. \(2014\)](#) je průměrně jen 56 % tetraploidních blastocyst s ICM a 44 % bez ní.

## 8.5 Stanovení karyotypů blastocyst

Pro ověření ploidity připravených blastocyst bylo potřeba stanovit karyotypy. Postupováno bylo podle protokolu [Tarkowski \(1966\)](#) se dvěma úpravami. První spočívala v přidání druhého fixačního roztoku podle [Kamiguchi a Mikamo \(1986\)](#), aby se blastocysty rychleji přilepily k podložnímu sklu a při následujícím zakápnutí z výšky zůstaly rozmístěné ve středu skla. Místo obarvení orceinem pro mé účely postačovalo montovací médium obsahující DAPI.

Jak je uvedeno v tabulkách 7.2, 7.4 a 7.6, z karyotypovaných blastocyst bylo hodnotitelných celkově 58,3 %. Tento počet byl očekáván na základě použití stejného postupu jako popisují [Kamiguchi a Mikamo \(1986\)](#) a uvádějí 54 % analyzovatelných zygot křečka (*Mesocricetus auratus*).

Především u haploidních embryí byly často (30,6 %) odhaleny genetické mozaiky. Diploidizací se embrya snaží napravit svůj nevýhodný poloviční počet chromosomů, jak je popsáno v kapitole 1. Mezi tetraploidními parthenogenony byla naopak očekávána i některá jádra s diploidním genomem. Je ale možné, že takový nález byl zkreslen někdy nepřehledným počtem chromosomů, takže mohlo jít o nerozlišitelný obsah dvou sousedních jader.

Jelikož je při karyotypování vidět vždy jen malá část blastomer (analyzovatelných karyotypů bývá obvykle 3–5 z celé blastocysty), je problematické odhalit, jaký poměr mezi haploidními a diploidními buňkami v blastocystách je. Techniky umožňující vyšetřit více buněk dané blastocysty se objevují až v posledních letech a spadají do oblasti tzv. sekvenování nové generace ([Munné a Wells, 2017](#)).

## 8.6 Průkaz pluripotence

Ověření pluripotence ICM preimplantačních blastocyst je exprese transkripčního faktoru Oct-4 ([Palmieri et al., 1994](#)). Množství Oct-4 by mělo být u tetraploidních parthenogenonů buď stejné jako u diploidních parthenogenonů a normálních embryí, jako dokládají [Liu et al. \(2004\)](#), nebo o 10 % snižené, jak popisují [Park et al. \(2012\)](#). Množství nebylo na zkoumaných vzorcích kvantifikováno, ale byla prokázána přítomnost Oct-4 v embryoblastu haploidních, diploidních i tetraploidních parthenogenetických blastocyst.

## 8.7 Nukleocytoplasmatický poměr

Blastomery jsou propojeny těsnými spojeními (tight junctions, zonulae occludentes). Pro rozvolnění adheze membrán je používáno médium bez vápenatých a hořčnatých iontů. Embrya v tomto médiu dekompektují a buňky se zakulatí. Je pak možné přesněji změřit jejich průměr (Pratt, 1987, citováno ze Santaló *et al.*, 1996). U myších (Santaló *et al.*, 1996) i lidských embryí (Dumoulin *et al.*, 1998) bylo prokázáno, že na další vývoj nemá toto médium negativní vliv. Přesto nebyla měřená embrya dále kultivována, i z důvodu, že byla obarvena Hoechstem a exponována záření.

Dekompektovaná a obarvená embrya byla měřena na počítači. Naměřené hodnoty jsou tedy zatíženy jistou nepřesností. Přesnější čísla by se dala získat například použitím laseru (Tsichlaki a Fitzharris, 2016) nebo inovativní metodou s využitím ultrazvukových vln a fotoakustického jevu (Moore *et al.*, 2016). Vzhledem k poměrně vysokému počtu měření a ovlivnění všech skupin stejně nepřesným postupem, mohly být soubory porovnávány mezi sebou.

Bylo potvrzeno, že velikost jádra je ovlivněna obsahem DNA. Objem jader se zvětšoval s ploeditou, zatímco velikost blastomer byla v rámci shodných vývojových stádií srovnatelná. Například Smith a McLaren (1977) souvislost mezi počtem chromosomů a velikostí jádra předpokládali. K opačnému závěru však došli Austin a Braden (1955), kteří uvádějí, že se od sebe tyto tři skupiny ve velikosti jádra neliší.

Bylo zjištěno, že nukleocytoplasmatický poměr roste s ploeditou a během preimplantačního vývoje se postupně zvyšuje: ve dvoubuněčném stádiu byl nižší než ve čtyřbuněčném. Výjimkou byla haploidní parthenogenetická embrya, která měla poměr objemu jádra a cytoplasmy v obou stádiích stejný (0,033 a 0,034,  $p = 0.052$ ). Poměr diploidních embryí se změnil z 0,038 na 0,058. Stejný poměr jako diploidní čtyřbuněčná pak měla dvoubuněčná tetraploidní embrya (0,057,  $p = 0.64$ ), která se odlišovala až ve čtyřbuněčném stádiu, kdy se jejich nukleocytoplasmatický poměr zvýšil na 0,070.

V rámci vývoje se nukleocytoplasmatický poměr haploidních parthenogenonů mezi dvoubuněčným a čtyřbuněčným stádiem statisticky neměnil. Naopak u diploidních i tetraploidních parthenogenetických embryí se tento poměr lišil výrazně, přibližně o třetinu. Exponenciální nárůst nukleocytoplasmatického poměru dokládají i Aiken *et al.* (2004). Změna poměru mezi těmito stádii by mohla souviset s aktivací genomu, která u myši probíhá již ve dvoubuněčném stádiu (shrnutí ve Svoboda, 2017).

## 8.8 Možnosti pokračování

Zpočátku se velikost mitotického vřeténka řídí vnitřními procesy buňky a velikost buňky přímo limituje délku vřeténka. Po druhé mitose se velikost buněk postupně zmenšuje a vřeténko se rozměrově blíží průměru buňky, takže roli hrají patrně i vnější vlivy (shrnuto ve [Vázquez-Diez a Fitzharris, 2018](#)). Při větším než normálním obsahu cytoplasmy se vřeténka netvoří správně, jsou širší a delší, v důsledku čehož způsobují aneuploidie ([Kyogoku a Kitajima, 2017](#)). Proto by mohly být zjištěné výsledky doplněny měřením velikosti dělicího vřeténka v jednotlivých stádiích, zda by se vřeténka lišila svými rozměry nebo morfologií.

Další možností by mohla být experimentální změna objemu cytoplasmy mikromanipulační metodou. Například odebrat haploidním parthenogenonům část cytoplasmy, podobně jako experimentovali [McGrath a Solter \(1986\)](#), [Evsikov \*et al.\* \(1990\)](#) nebo [Kárníková \*et al.\* \(1998\)](#). Dalo by se tak zjistit, zda lze kompenzovat menší objem haploidních jader snížením objemu cytoplasmy natolik, aby měla upravená embrya normální nukleocytoplasmatický poměr.

Co se týče přípravy a vývoje parthenogenetických embryí, od sedmdesátých a osmdesátých let minulého století se jejich výzkum posunul natolik, že byla derivovány haploidní embryonální kmenové buňky řady mnoha druhů živočichů, dokonce i člověka. Pokud bude důkladněji prozkoumáno, jaké jsou hlavní faktory ovlivňující vývoj embryí, možná se v budoucnu dočkáme i technik umožňujících implantaci a narození dalších parthenogenetických zvířat, obdobně jako tomu bylo v případě diploidních bimaternálních myší.



# ZÁVĚR

Teoretická část práce shrnuje dosavadní poznatky potřebné pro provedení a pochopení experimentů této diplomové práce. V prvních třech kapitolách je popsána příprava, vývoj a využití parthenogenetických embryí a definován pojem nukleocytoplasmatický poměr.

Osvojila jsem si všechny metody popsané v experimentální části, které vedly k dosažení předem stanovených cílů práce. Byla připravena haploidní, diploidní a tetraploidní parthenogenetická embrya myši, sledován a vyhodnocen jejich vývoj monitorovacím systémem a ověřena ploidita a pluripotence příslušných blastocyst. Nukleocytoplasmatický poměr byl stanoven pro jednotlivé skupiny embryí ve dvoubuněčném a čtyřbuněčném stádiu vývoje.

Diploidní i tetraploidní embrya se vyvíjela úspěšněji a rychleji než ta haploidní. Objem jádra se s ploiditou zvětšoval. Nukleocytoplasmatický poměr haploidních embryí byl ve dvoubuněčném a čtyřbuněčném stádiu nižší než u ostatních skupin a zůstal po rozdělení přibližně stejný. Tento fakt by mohl přímo souviset s jejich opožděným vývojem. Pro rozlišení, zda je tato souvislost příčinou, či následkem, nabízí se v dalším výzkumu například experimentálně přidat nebo odebrat část objemu cytoplasmy mikromanipulační metodou.

Pochopení vývoje haploidních embryí nejen zefektivní derivaci kmenových buněk, ale přispěje obecně k poznání v reprodukční biologii, genetice a dalších příbuzných oborech. Studium zákonitostí kolem nukleocytoplasmatického poměru je aktuální i z hlediska klinické aplikace a pomůže s velkým množstvím dalších neprobádaných problémů v buněčné biologii a medicíně. Díky novým technologiím a znalostem má smysl se k dosud nevyřešeným tématům znovu vracet, jak dokládá tato diplomová práce zaměřená na vývoj parthenogenetických embryí.

# SEZNAM LITERATURY

- Aiken, C. E., Swoboda, P. P., Skepper, J. N., Johnson, M. H. (2004). The direct measurement of embryogenic volume and nucleo-cytoplasmic ratio during mouse pre-implantation development. *Reproduction*, 128(5):527–535.
- Amodeo, A. A., Skotheim, J. M. (2016). Cell-size control. *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology*, 8(4):a019083.
- Austin, C. R., Braden, A. W. H. (1955). Observations on nuclear size and form in living rat and mouse eggs. *Experimental Cell Research*, 8(1):163–172.
- Balakier, H., Tarkowski, A. K. (1976). Diploid parthenogenetic mouse embryos produced by heat-shock and Cytochalasin B. *Journal of Embryology and Experimental Morphology*, 35(1):25–39.
- Barton, S. C., Surani, M. A. H., Norris, M. L. (1984). Role of paternal and maternal genomes in mouse development. *Nature*, 311(5984):374–376.
- Berg, H. (1982). Biological implications of electric field effects: Part V. Fusion of blastomeres and blastocysts of mouse embryos. *Bioelectrochemistry and Bioenergetics*, 9:223–228.
- Borgel, J., Guibert, S., Li, Y., Chiba, H., Schübeler, D., Sasaki, H., Forné, T., Weber, M. (2010). Targets and dynamics of promoter DNA methylation during early mouse development. *Nature Genetics*, 42(12):1093–1100.
- Bos-Mikich, A., Bressan, F. F., Ruggeri, R. R., Watanabe, Y., Meirelles, F. V. (2016). Parthenogenesis and human assisted reproduction. *Stem Cells International*, doi:10.1155/2016/1970843.
- Bos-Mikich, A., Swann, K., Whittingham, D. G. (1995). Calcium oscillations and protein synthesis inhibition synergistically activate mouse oocytes. *Molecular Reproduction and Development*, 41(1):84–90.
- Braden, A. W. H., Austin, C. R. (1954). Reactions of unfertilized mouse eggs to some experimental stimuli. *Experimental Cell Research*, 7(1):277–280.
- Brevini, T. A. L., Gandolfi, F. (2008). Parthenotes as a source of embryonic stem cells. *Cell Proliferation*, 41(S1):20–30.
- Chang, D. C., Chassy, B. M., Saunders, J., Sowers, A. E. (1992). *Guide to Electroporation and Electrofusion*. Academic Press, Inc.
- Cheong, H. T., Taniguchi, T., Hishinuma, M., Takahashi, Y., Kanagawa, H. (1991). Effects of various electric fields on the fusion and in vitro development of mouse two-cell embryos. *Theriogenology*, 36(5):875–885.
- Conklin, E. G. (1912). Cell size and nuclear size. *Journal of Experimental Zoology*, 12(1):1–98.
- Cui, L. B., Huang, X. Y., Sun, F. Z. (2005). Nucleocytoplasmic ratio of fully grown germinal vesicle oocytes is essential for mouse meiotic chromosome segregation and alignment, spindle shape and early embryonic development. *Human Reproduction*, 20(10):2946–2953.

- Dumoulin, J. C., Bras, M., Coonen, E., Dreesen, J., Geraedts, J. P., Evers, J. L. (1998). Effect of  $\text{Ca}^{2+}/\text{Mg}^{2+}$ -free medium on the biopsy procedure for preimplantation genetic diagnosis and further development of human embryos. *Human Reproduction*, 13(10):2880–2883.
- Dyban, A. P., Baranov, V. S. (1987). *Cytogenetics of Mammalian Embryonic Development*. Oxford University Press.
- Eakin, G. S., Behringer, R. R. (2003). Tetraploid development in the mouse. *Developmental Dynamics*, 228(4):751–766.
- Eakin, G. S., Hadjantonakis, A. K., Papaioannou, V. E., Behringer, R. R. (2005). Developmental potential and behavior of tetraploid cells in the mouse embryo. *Developmental Biology*, 288(1):150–159.
- Eglitis, M. A. (1980). Formation of tetraploid mouse blastocysts following blastomere fusion with polyethylene glycol. *The Journal of Experimental Zoology*, 213:309–313.
- Eglitis, M. A., Wiley, L. M. (1981). Tetraploidy and early development: effects on developmental timing and embryonic metabolism. *Journal of Embryology and Experimental Morphology*, 66:91–108.
- Elling, U., Taubenschmid, J., Wirnsberger, G., O'Malley, R., Demers, S. P., Vanhaelen, Q., Shukalyuk, A. I., Schmauss, G., Schramek, D., Schnuetgen, F., Von Melchner, H., Ecker, J. R., Stanford, W. L., Zuber, J., Stark, A., Penninger, J. M. (2011). Forward and reverse genetics through derivation of haploid mouse embryonic stem cells. *Cell Stem Cell*, 9(6):563–574.
- Erbach, G. T., Lawitts, J. A., Papaioannou, V. E., Biggers, J. D. (1994). Differential growth of the mouse preimplantation embryo in chemically defined media. *Biology of Reproduction*, 50(5):1027–1033.
- Evans, M. J., Kaufman, M. H. (1981). Establishment in culture of pluripotential cells from mouse embryos. *Nature*, 292(5819):154–156.
- Evsikov, S. V., Morozova, L. M., Solomko, A. P. (1990). The role of the nucleocytoplasmic ratio in development regulation of the early mouse embryo. *Development*, 109(2):323–328.
- Graham, C. F. (1970). Parthenogenetic mouse blastocysts. *Nature*, 226(5241):165–167.
- Graham, C. F., Deussen, Z. A. (1974). In vitro activation of mouse eggs. *Journal of Embryology and Experimental Morphology*, 31(2):497–512.
- Gulyas, B. J., Wood, M., Whittingham, D. G. (1984). Fusion of oocytes and development of oocyte fusion products in the mouse. *Developmental Biology*, 101:246–250.
- Guo, F., Li, L., Li, J., Wu, X., Hu, B., Zhu, P., Wen, L., Tang, F. (2017). Single-cell multi-omics sequencing of mouse early embryos and embryonic stem cells. *Cell Research*, 27(8):967–988.
- Hara, Y., Merten, C. A. (2015). Dynein-based accumulation of membranes regulates nuclear expansion in *Xenopus laevis* egg extracts. *Developmental Cell*, 33(5):562–575.

- Haupt, A., Minc, N. (2018). How cells sense their own shape – mechanisms to probe cell geometry and their implications in cellular organization and function. *Journal of Cell Science*, 131(6):jcs214015.
- Heald, R., Gibeaux, R. (2018). Subcellular scaling: does size matter for cell division? *Current Opinion in Cell Biology*, 52:88–95.
- Henery, C. C., Bard, J. B., Kaufman, M. H. (1992). Tetraploidy in mice, embryonic cell number, and the grain of the developmental map. *Developmental Biology*, 152(2):233–241.
- Henery, C. C., Kaufman, M. H. (1991). Cleavage rates of diploid and tetraploid mouse embryos during the preimplantation period. *Journal of Experimental Zoology*, 259(3):371–378.
- Henery, C. C., Kaufman, M. H. (1992). Cleavage rate of haploid and diploid parthenogenetic mouse embryos during the preimplantation period. *Molecular Reproduction and Development*, 31(4):258–263.
- Heytens, E., Soleimani, R., Lierman, S., De Meester, S., Gerris, J., Dhont, M., Van der Elst, J., De Sutter, P. (2008). Effect of ionomycin on oocyte activation and embryo development in mouse. *Reproductive BioMedicine Online*, 17(6):764–771.
- Ho, Y., Wigglesworth, K., Eppig, J. J., Schultz, R. M. (1995). Preimplantation development of mouse embryos in KSOM: augmentation by amino acids and analysis of gene expression. *Molecular Reproduction and Development*, 41(2):232–238.
- Hoppe, P. C., Illmensee, K. (1977). Microsurgically produced homozygous-diploid uniparental mice. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 74(12):5657–5661.
- Horii, T., Yamamoto, M., Morita, S., Kimura, M., Nagao, Y., Hatada, I. (2015). p53 suppresses tetraploid development in mice. *Scientific Reports*, 5:8907.
- Hu, M., Zhao, Z., TuanMu, L.-C., Wei, H., Gao, F., Li, L., Ying, J., Zhang, S. (2015). Analysis of imprinted gene expression and implantation in haploid androgenetic mouse embryos. *Andrologia*, 47(1):102–108.
- Imai, H., Fujii, W., Kusakabe, K. T., Kiso, Y., Kano, K. (2016). Effects of whole genome duplication on cell size and gene expression in mouse embryonic stem cells. *Journal of Reproduction and Development*, 62(6):2016–2037.
- Imai, H., Fujii, W., Kusakabe, K. T., Kiso, Y., Kano, K. (2018). Aggregation recovers developmental plasticity in mouse polyploid embryos. *bioRxiv*, doi:10.1101/263533.
- Imai, H., Kano, K., Fujii, W., Takasawa, K., Wakitani, S., Hiyama, M., Nishino, K., Kusakabe, K. T., Kiso, Y. (2015). Tetraploid embryonic stem cells maintain pluripotency and differentiation potency into three germ layers. *PLoS ONE*, 10(6):1–15.
- Ishiguro, N., Kano, K., Yamamoto, Y., Taniguchi, K. (2005). Tetraploid cells of enhanced green fluorescent protein transgenic mice in tetraploid/diploid-chimeric embryos. *Journal of Reproduction and Development*, 51(5):567–572.

- James, R. M., Klerkx, A. H., Keighren, M., Flockhart, J. H., West, J. D. (1995). Restricted distribution of tetraploid cells in mouse tetraploid ↔ diploid chimaeras. *Developmental Biology*, 167(1):213–226.
- Jevtić, P., Levy, D. L. (2017). Both nuclear size and DNA amount contribute to midblastula transition timing in *Xenopus laevis*. *Scientific Reports*, 7(1):7908.
- Kamiguchi, Y., Mikamo, K. (1986). An improved, efficient method for analyzing human sperm chromosomes using zona-free hamster ova. *American Journal of Human Genetics*, 38:724–740.
- Kárníková, L., Urban, F., Moor, R., Fulka, J. (1998). Mouse oocyte maturation: the effect of modified nucleocytoplasmic ratio. *Reproduction Nutrition Development*, 38(6):665–670.
- Kaufman, M. H. (1973). Timing of the first cleavage division of haploid mouse eggs, and the duration of its component stages. *Journal of Cell Science*, 13(2):553–566.
- Kaufman, M. H. (1976). Complete preimplantation development in culture of parthenogenetic mouse embryos. *Journal of Embryology and Experimental Morphology*, 35(1):179–190.
- Kaufman, M. H. (1982). The chromosome complement of single-pronuclear haploid mouse embryos following activation by ethanol treatment. *Journal of Embryology and Experimental Morphology*, 71:139–154.
- Kaufman, M. H., Robertson, E. J., Handyside, A. H., Evans, M. J. (1983). Establishment of pluripotential cell-lines from haploid mouse embryos. *Journal of Embryology and Experimental Morphology*, 73:249–261.
- Kaufman, M. H., Webb, S. (1990). Postimplantation development of tetraploid mouse embryos produced by electrofusion. *Development*, 110(4):1121–1132.
- Kawaguchi, J., Kano, K., Naito, K. (2009). Expression profiling of tetraploid mouse embryos in the developmental stages using a cDNA microarray analysis. *Journal of Reproduction and Development*, 55(6):670–675.
- Kawahara, M., Kono, T. (2012). Roles of genes regulated by two paternally methylated imprinted regions on chromosomes 7 and 12 in mouse ontogeny. *Journal of Reproduction and Development*, 58(2):175–179.
- Kawahara, M., Wu, Q., Yaguchi, Y., Ferguson-Smith, A. C., Kono, T. (2006). Complementary roles of genes regulated by two paternally methylated imprinted regions on chromosomes 7 and 12 in mouse placentation. *Human Molecular Genetics*, 15(19):2869–2879.
- Koizumi, N., Fukuta, K. (1995). Preimplantation development of tetraploid mouse embryo produced by cytochalasin B. *Experimental Animals*, 44(2):105–109.
- Kono, T., Obata, Y., Wu, Q., Niwa, K., Ono, Y., Yamamoto, Y., Park, E. S., Seo, J.-S., Ogawa, H. (2004). Birth of parthenogenetic mice that can develop to adulthood. *Nature*, 428(6985):860–864.

- Kono, T., Sotomaru, Y., Katsuzawa, Y., Dandolo, L. (2002). Mouse parthenogenetic embryos with monoallelic H19 expression can develop to day 17.5 of gestation. *Developmental Biology*, 243(2):294–300.
- Kubiak, J., Paldi, A., Weber, M., Maro, B. (1991). Genetically identical parthenogenetic mouse embryos produced by inhibition of the first meiotic cleavage with cytochalasin D. *Development*, 111(3):763–769.
- Kubiak, J. Z., Tarkowski, A. K. (1985). Electrofusion of mouse blastomeres. *Experimental Cell Research*, 157(2):561–566.
- Kurischko, A., Berg, H. (1986). Electrofusion of rat and mouse blastomeres. *Bioelectrochemistry and Bioenergetics*, 15:513–519.
- Kyogoku, H., Kitajima, T. S. (2017). Large cytoplasm is linked to the error-prone nature of oocytes. *Developmental Cell*, 41(3):287–298.
- Latham, K. E., Akutsu, H., Patel, B., Yanagimachi, R. (2002). Comparison of gene expression during preimplantation development between diploid and haploid mouse embryos. *Biology of Reproduction*, 67(2):386–392.
- Leeb, M., Wutz, A. (2011). Derivation of haploid embryonic stem cells from mouse embryos. *Nature*, 479(7371):131–134.
- Leeb, M., Wutz, A. (2013). Haploid genomes illustrate epigenetic constraints and gene dosage effects in mammals. *Epigenetics & Chromatin*, 6(1):41–50.
- Leng, L., Ouyang, Q., Kong, X., Gong, F., Lu, C., Zhao, L., Shi, Y., Cheng, D., Hu, L., Lu, G., Lin, G. (2017). Self-diploidization of human haploid parthenogenetic embryos through the Rho pathway regulates endomitosis and failed cytokinesis. *Scientific Reports*, 7(1):1–10.
- Levy, D. L., Heald, R. (2016). Biological scaling problems and solutions in amphibians. *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology*, 8(1):a019166.
- Li, H., Guo, A., Xie, Z., Tu, W., Yu, J., Wang, H., Zhao, J., Zhong, C., Kang, J., Li, J., Huang, S., Shen, L. (2017). Stabilization of mouse haploid embryonic stem cells with combined kinase and signal modulation. *Scientific Reports*, 7(1):1–14.
- Liu, L., Czerwicz, E., Keefe, D. L. (2004). Effect of ploidy and parental genome composition on expression of Oct-4 protein in mouse embryos. *Gene Expression Patterns*, 4(4):433–441.
- Liu, L., Trimarchi, J. R., Keefe, D. L. (2002). Haploidy but not parthenogenetic activation leads to increased incidence of apoptosis in mouse embryos. *Biology of Reproduction*, 66(1):204–210.
- Martin, G. R. (1981). Isolation of a pluripotent cell line from early mouse embryos cultured in medium conditioned by teratocarcinoma stem cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 78(12):7634–7638.
- McGrath, J., Solter, D. (1984). Completion of mouse embryogenesis requires both the maternal and paternal genomes. *Cell*, 37(1):179–183.

- McGrath, J., Solter, D. (1986). Nucleocytoplasmic interactions in the mouse embryo. *Journal of Embryology and Experimental Morphology*, 97:277–289.
- Mirzaghaderi, G., Hörandl, E. (2016). The evolution of meiotic sex and its alternatives. *Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences*, 283(1838):516–525.
- Modlinski, J. A. (1975). Haploid mouse embryos obtained by microsurgical removal of one pronucleus. *Journal of Embryology and Experimental Morphology*, 33(4):897–905.
- Modlinski, J. A. (1978). Transfer of embryonic nuclei to fertilised mouse eggs and development of tetraploid blastocysts. *Nature*, 273:466–467.
- Monfort, A., Di Minin, G., Postlmayr, A., Freimann, R., Arieti, F., Thore, S., Wutz, A. (2015). Identification of Spen as a crucial factor for Xist function through forward genetic screening in haploid embryonic stem cells. *Cell Reports*, 12(4):554–561.
- Moore, M. J., Strohm, E. M., Kolios, M. C. (2016). Assessment of the nucleus-to-cytoplasmic ratio in MCF-7 cells using ultra-high frequency ultrasound and photoacoustics. *International Journal of Thermophysics*, 37(12):118.
- Munné, S., Wells, D. (2017). Detection of mosaicism at blastocyst stage with the use of high-resolution next-generation sequencing. *Fertility and Sterility*, 107(5):1085–1091.
- Murphy, C. M., Michael, W. M. (2013). Control of DNA replication by the nucleus/cytoplasm ratio in *Xenopus*. *Journal of Biological Chemistry*, 288(41):29382–29393.
- Newport, J., Kirschner, M. (1982). A major developmental transition in early *Xenopus* embryos: I. characterization and timing of cellular changes at the midblastula stage. *Cell*, 30(3):675–686.
- Olbrich, T., Mayor-Ruiz, C., Vega-Sendino, M., Gomez, C., Ortega, S., Ruiz, S., Fernandez-Capetillo, O. (2017). A p53-dependent response limits the viability of mammalian haploid cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 114(35):9367–9372.
- Palmieri, S. L., Werner, P., Schöler, H. R. (1994). Oct-4 transcription factor is differentially expressed in the mouse embryo during establishment of the first two extraembryonic cell lineages involved in implantation. *Developmental Biology*, 166:259–267.
- Park, M.-R., Hwang, K.-C., Bui, H.-T., Cho, S.-G., Park, C., Song, H., Oh, J.-W., Kim, J.-H. (2012). Altered gene expression profiles in mouse tetraploid blastocysts. *Journal of Reproduction and Development*, 58(3):344–352.
- Pratt, H. (1987). Isolation, culture and manipulation of preimplantation mouse embryos. In *Mammalian Development: A Practical Approach*, 13–42. IRL Press, Oxford.
- Qu, C., Yan, M., Yang, S., Wang, L., Yin, Q., Liu, Y., Chen, Y., Li, J. (2018). Haploid embryonic stem cells can be enriched and maintained by simple filtration. *The Journal of Biological Chemistry*, 293(14):5230–5235.
- Ramachandran, R., McDaniel, C. D. (2018). Parthenogenesis in birds: A review. *Reproduction*, doi:10.1530/REP-17-0728.

- Rogers, N. T., Hobson, E., Pickering, S., Lai, F. A., Braude, P., Swann, K. (2004). Phospholipase C $\zeta$  causes Ca<sup>2+</sup> oscillations and parthenogenetic activation of human oocytes. *Reproduction*, 128(6):697–702.
- Sagi, I., Benvenisty, N. (2017). Haploidy in humans: An evolutionary and developmental perspective. *Developmental Cell*, 41(6):581–589.
- Sagi, I., Chia, G., Golan-Lev, T., Peretz, M., Weissbein, U., Sui, L., Sauer, M. V., Yanuka, O., Egli, D., Benvenisty, N. (2016). Derivation and differentiation of haploid human embryonic stem cells. *Nature*, 532(7597):107–111.
- Santaló, J., Grossmann, M., Egozcue, J. (1996). Does Ca<sup>2+</sup>/Mg<sup>2+</sup>-free medium have an effect on the survival of the preimplantation mouse embryo after biopsy? *Human Reproduction Update*, 2(3):257–261.
- Saunders, C. M., Larman, M. G., Parrington, J., Cox, L. J., Royse, J., Blayney, L. M., Swann, K., Lai, F. A. (2002). PLC $\zeta$ : a sperm-specific trigger of Ca<sup>2+</sup> oscillations in eggs and embryo development. *Development*, 129(15):3533–3544.
- Siracusa, G., Whittingham, D. G., Molinaro, M., Vivarelli, E. (1978). Parthenogenetic activation of mouse oocytes induced by inhibitors of protein synthesis. *Journal of Embryology and Experimental Morphology*, 43:157–166.
- Smith, R., McLaren, A. (1977). Factors affecting the time of formation of the mouse blastocoele. *Journal of Embryology and Experimental Morphology*, 41(1):79–92.
- Snow, M. H. (1973). Tetraploid mouse embryos produced by cytochalasin B during cleavage. *Nature*, 244(5417):513–515.
- Snow, M. H. L. (1975). Embryonic development of tetraploid mice during the second half of gestation. *Journal of Embryology and Experimental Morphology*, 34(3):707–721.
- Snow, M. H. L. (1976). The immediate postimplantation development of tetraploid mouse blastocysts. *Journal of Embryology and Experimental Morphology*, 35:81–86.
- Soupart, P. (1980). Initiation of mouse embryonic development by oocyte fusion. *Archives of Andrology*, 5:55–57.
- Steinhardt, R. A., Epel, D., Carroll, E. J., Yanagimachi, R. (1974). Is calcium ionophore a universal activator for unfertilised eggs? *Nature*, 252(5478):41–43.
- Stelzer, Y., Yanuka, O., Benvenisty, N. (2011). Global analysis of parental imprinting in human parthenogenetic induced pluripotent stem cells. *Nature Structural and Molecular Biology*, 18(6):735–741.
- Sturm, K. S., Flannery, M. L., Pedersen, R. A. (1994). Abnormal development of embryonic and extraembryonic cell lineages in parthenogenetic mouse embryos. *Developmental Dynamics*, 201(1):11–28.
- Surani, M. A. H., Barton, S. C., Norris, M. L. (1984). Development of reconstituted mouse eggs suggests imprinting of the genome during gametogenesis. *Nature*, 308(5959):548–550.



- Svoboda, P. (2017). Mammalian zygotic genome activation. *Seminars in Cell & Developmental Biology*, S1084-9521(17):30056–3.
- Takahashi, S., Lee, J., Kohda, T., Matsuzawa, A., Kawasumi, M., Kanai-Azuma, M., Kaneko-Ishino, T., Ishino, F. (2014). Induction of the G2/M transition stabilizes haploid embryonic stem cells. *Development*, 141(20):3842–3847.
- Tarkowski, A. K. (1966). An air-drying method for chromosome preparations from mouse eggs. *Cytogenetics*, 5:394–400.
- Tarkowski, A. K., Witkowska, A., Nowicka, J. (1970). Experimental parthenogenesis in the mouse. *Nature*, 226(5241):162–165.
- Tarkowski, a. K., Witkowska, A., Opas, J. (1977). Development of cytochalasin in B-induced tetraploid and diploid/tetraploid mosaic mouse embryos. *Journal of Embryology and Experimental Morphology*, 41:47–64.
- Tosti, E., Ménézo, Y. (2016). Gamete activation: Basic knowledge and clinical applications. *Human Reproduction Update*, 22(4):420–439.
- Tsichlaki, E., Fitzharris, G. (2016). Nucleus downscaling in mouse embryos is regulated by cooperative developmental and geometric programs. *Scientific Reports*, 6(28040):1–7.
- Vaickus, L. J., Tambouret, R. H. (2015). Young investigator challenge: The accuracy of the nuclear-to-cytoplasmic ratio estimation among trained morphologists. *Cancer Cytopathology*, 123(9):524–530.
- Vázquez-Diez, C., Fitzharris, G. (2018). Causes and consequences of chromosome segregation error in preimplantation embryos. *Reproduction*, 155(1):R63–R76.
- Wen, B., Li, R., Cheng, K., Li, E., Zhang, S., Xiang, J., Wang, Y., Han, J. (2017). Tetraploid embryonic stem cells can contribute to the development of chimeric fetuses and chimeric extraembryonic tissues. *Scientific Reports*, 7(1):1–9.
- Wen, D., Saiz, N., Rosenwaks, Z., Hadjantonakis, A. K., Rafii, S. (2014). Completely ES cell-derived mice produced by tetraploid complementation using inner cell mass (ICM) deficient blastocysts. *PLoS ONE*, 9(4):e94730.
- Whitten, W. K. (1971). Nutrient requirements for the culture of preimplantation embryos in vitro. In *Advances in the Biosciences*, 6, 129–141. Pergamon Press.
- Whitten, W. K., Biggers, J. D. (1968). Complete development in vitro of the pre-implantation stages of the mouse in a simple chemically defined medium. *Journal of Reproduction and Fertility*, 17(2):399–401.
- Whittingham, D. G. (1971). Culture of mouse ova. *Journal of Reproduction and Fertility*, 14(Suppl.):7–12.
- Winkel, G. K., Nuccitelli, R. (1989). Octaploid mouse embryos produced by electrofusion polarize and cavitate at the same time as normal embryos. *Gamete Research*, 24(1):93–107.

- Witkowska, A. (1973). Parthenogenetic development of mouse embryos in vivo. I. Preimplantation development. *Journal of Embryology and Experimental Morphology*, 30(3):519–545.
- Wu, B. J., Zhao, L. X., Zhu, C. C., Chen, Y. L., Wei, M. Y., Bao, S. Q., Sun, S. C., Li, X. H. (2017). Altered apoptosis/autophagy and epigenetic modifications cause the impaired postimplantation octaploid embryonic development in mice. *Cell Cycle*, 16(1):82–90.
- Wutz, A. (2014). Haploid animal cells. *Development*, 141(7):1423–1426.
- Yilmaz, A., Peretz, M., Sagi, I., Benvenisty, N. (2016). Haploid human embryonic stem cells: half the genome, double the value. *Cell Stem Cell*, 19(5):569–572.
- Zhong, C., Zhang, M., Yin, Q., Zhao, H., Wang, Y., Huang, S., Tao, W., Wu, K., Chen, Z. J., Li, J. (2016). Generation of human haploid embryonic stem cells from parthenogenetic embryos obtained by microsurgical removal of male pronucleus. *Cell Research*, 26(6):743–746.