

**Jihočeská univerzita v Českých Budějovicích
Přírodovědecká fakulta**

**Role mTOR signalizační dráhy v myších
preimplantačních embryích**

Diplomová práce

Bc. Jana Tománková

Školitelka: Mgr. Lenka Gahurová, Ph.D.

České Budějovice 2022

Tománková, J., 2022: Role mTOR signalizační dráhy v myších preimplantačních embryích. [Role of the mTOR signalling pathway in mouse preimplantation embryos. Mgr. Thesis, in Czech.] – 74 p., Faculty of Science, University of South Bohemia, České Budějovice, Czech Republic.

Annotation

mTOR-regulated translation is important for mouse embryonic development, but it is not yet clear how it affects the first and second cell fate decisions that occur during the preimplantation phase of development. The aim of this work was to find out what impact mTOR signaling pathway inhibition has on the first cell fate decision, during which cells segregate into trophoctoderm and inner cell mass.

Prohlašuji, že jsem autorem této kvalifikační práce a že jsem ji vypracoval(a) pouze s použitím pramenů a literatury uvedených v seznamu použitých zdrojů.

V Českých Budějovicích, 08. 12. 2022

.....

Bc. Jana Tománková

Poděkování

V první řadě bych chtěla poděkovat vedoucímu naší laboratoře, kterým je profesor Alexander W. Bruce, za to, že mi umožnil se podílet na tomto skvělém projektu. Můj velký dík patří rovněž Ph.D. studentkám Martině Bohuslavové a Becky Collier, které byly vždy ochotné mi s čímkoli pomoci, a díky nimž v laborce neustále panovala přátelská a optimistická atmosféra. Speciální poděkování patří magisterským studentům, jmenovitě Evě Kopecké, Andy Hauserové a Valeriyu Kutsynovi, se kterými jsem strávila spoustu hezkých chvil jak v laboratoři, tak na přednáškách, a s nimiž jsem mohla sdílet veškeré strasti studia. V souvislosti s tím bych ráda poděkovala také všem členům mé rodiny za to, že mě po celou dobu studia neúnavně podporovali a povzbuzovali v těžkých chvílích. Největší poděkování ale patří mé školitelce, doktorce Lence Gahurové za obrovské množství času a energie, které mi během celého mého studia věnovala, a bez které by tato diplomová práce nikdy nevznikla.

Abstrakt

Aktivita signální dráhy mTOR umožňuje na čepičce závislou translaci specifických mRNA. Cílem této práce bylo zjistit, zda a do jaké míry tato signální dráha ovlivňuje preimplantační embryonální myší vývoj, zejména pak první rozhodnutí o buněčném osudu, během kterého dochází k prostorové a funkční segregaci prvních dvou buněčných linií, kterými jsou trofoektoderm a pluripotentní vnitřní masa buněk. Ukázali jsme, že mTOR dráha je aktivní během embryonálních dělení, včetně dělení ze stádia 8 na stádium 16 buněk, kdy jsou tvořeny první vnitřní buňky (progenitory vnitřní buněčné hmoty). Inhibice mTOR pomocí inhibitorů Torin1 a 4EGI-1 vede ke snížení počtu vnitřních buněk u šestnáctibuněčných embryí a pokud je tato inhibice prodloužena do stádia 32 buněk, mají i tato embrya méně vnitřních buněk a více vnějších buněk ve srovnání s kontrolami. Zjistili jsme však, že některé vnější buňky v embryích s inhibovanou mTOR dráhou vykazují molekulární charakteristiky vnitřních buněk. Pokud se porovnávají pouze počty vnějších buněk nesoucí charakteristiky vnějších buněk, pak mezi kontrolními a inhibovanými embryi není žádný rozdíl. To naznačuje, že se embryo snaží kompenzovat snížený počet vnitřních buněk a že tyto vnější buňky, které nesou molekulární charakteristiky vnitřních buněk budou brzy internalizovány. Výsledky této práce přispívají k lepšímu pochopení raného embryonálního vývoje savců a poskytují základ pro další výzkum mTOR regulované translace u myších preimplantačních embryí.

Klíčová slova: myší preimplantační vývoj, mTOR signální dráha, translace závislá na mRNA čepičce vnitřní buňky, vnější buňky, polarizace, buněčné dělení, 4EGI-1, Torin1

Abstract

The activity of the mTOR signaling pathway enables the cap-dependent translation of specific mRNAs. The aim of this work was to find out whether and to what extent this signaling pathway affects mouse preimplantation embryonic development, especially the first cell fate decision when first two embryonic cell lineages, differentiating trophoectoderm and pluripotent inner cell mass, are spatially and functionally segregated. We showed that the mTOR pathway is active during embryonic cell divisions, including the 8- to 16-cell division when first inner cells (inner cell mass progenitors) are generated. mTOR inhibition by Torin1 and 4EGI-1 inhibitors leads to a decrease in the number of inner cells in 16-cell embryos. If this inhibition is prolonged to the 32-cell stage, these embryos also have fewer inner cells and more outer cells compared to controls. However, we revealed that some outer cells in mTOR-inhibited embryos exhibit molecular characteristics of inner cells. If only outer cells with outer cells characteristics are compared, there is no difference between control and mTOR-inhibited embryos. This suggests that the embryo is trying to compensate the reduced number of inner cells and that these outer cells will soon be internalized. The results of this work contribute to a better understanding of mammalian early embryonic development, and provides basis for further research into the mTOR-regulated translation in mouse preimplantation embryos.

Key words: mouse preimplantation development, mTOR signalling pathway, cap-dependent translation inner cells, outer cells, polarization, cell division, 4EGI-1, Torin1

Obsah

1. Úvod	1
1.1 Preimplantační vývoj myšího embrya	1
1.1.1 Polarizace a její vliv na první rozhodnutí o buněčném osudu	3
1.1.2 Odlišné expresní vzorce v buňkách TE a ICM a Hippo signalizační dráha	5
1.1.3 Druhé rozhodnutí o buněčném osudu	8
1.2 Savčí cíl rapamycinu (mTOR)	9
1.2.1 mTOR a iniciace translace závislá na čepičce	10
1.2.2 Inhibice mTOR signální dráhy a její důsledky na regulaci translace	12
1.2.3 mTOR v myších oocytech	12
1.2.4 mTOR v myších embryích	13
2. Cíle práce	16
3. Materiály a metody	17
3.1 Superovulace samic a izolace embryí	17
3.2 Kultivace v inhibitech	18
3.3 Fixace a standardní imunofluorescenční protilátkové barvení	19
3.4 Fixace a barvení Oregon Green 488 Phalloidinem	22
3.5 Fixace a imunofluorescenční barvení primární a sekundární protilátkou v kombinaci s barvením Oregon Green 488 phalloidinem	23
3.6 Konfokální mikroskopie	23
3.7 Analýza dat a tvorba grafů	24
4. Výsledky	25
4.1 Fluorescenční barvení a analýzy intenzity fluorescenčního barvení za použití protilátek (Phospho-)4E-BP1	25
4.1.1 Fluorescenční barvení protilátkou anti-Phospho-4E-BP1 (Thr37/46)	25
4.1.2 Fluorescenční barvení protilátkou anti-4E-BP1 (53H11)	26
4.1.3 Analýza intenzity fluorescence při použití protilátek anti-Phospho-4E-BP1 (Thr37/46) a anti-4E-BP1 (53H11)	27
4.1.4 Změny hladin fosforylovaného 4E-BP1 v závislosti na fázi buněčného cyklu	28
4.1.5 Fluorescenční barvení protilátkou anti-Phospho-4E-BP1 (Thr70)	30
4.1.6 Analýza intenzity fluorescence při použití protilátky anti-Phospho-4E-BP1 (Thr70)	31
4.1.7 Fluorescenční barvení protilátkou anti-Phospho-4E-BP1 (Ser65)	33
4.1.8 Analýza intenzity fluorescence při použití protilátky anti-Phospho-4E-BP1 (Ser65)	33
4.1.9 Fluorescenční barvení protilátkou anti-Phospho-4E-BP1 (Thr37/46) (236B4)	34
4.1.10 Analýza Intenzity fluorescence při použití protilátky anti-Phospho-4E-BP1 (Thr37/46) (236B4)	36

4.2	Fluorescenční barvení fosforylované formy proteinu 4E-BP1 v dalších buněčných děleních .	37
4.3	Fluorescenční barvení a analýzy intenzity fluorescence za použití protilátek anti-Phospho-S6 Ribosomal Protein (Ser235/236) (D57.2.2E), anti-eIF4G, anti-Phospho-eIF4G (Ser1108), anti-Phospho-eIF4E (Ser209) a anti-Phospho-mTOR (Ser2448).....	40
4.3.1	Fluorescenční barvení protilátkou anti-Phospho-S6 Ribosomal Protein (Ser235/236) (D57.2.2E).....	40
4.3.2	Analýza Intenzity fluorescence při použití protilátky anti-Phospho-S6 Ribosomal Protein (Ser235/236) (D57.2.2E)	42
4.3.3	Fluorescenční barvení protilátkou anti-eIF4G.....	42
4.3.4	Fluorescenční barvení protilátkou anti-Phospho-eIF4G (Ser1108)	43
4.3.5	Fluorescenční barvení protilátkou anti-Phospho-mTOR (Ser2448) (D9C2)	44
4.3.6	Fluorescenční barvení protilátkou anti-Phospho-eIF4E (Ser209).....	45
4.3.7	Negativní kontrola	46
4.4	Inhibice mTOR-regulované translace a vliv této inhibice na počet vnitřních buněk v 16buněčných embryích	47
4.5	Fluorescenční barvení a analýzy intenzity fluorescenčního barvení za použití protilátky anti-DDX21	49
4.6	Inhibice mTOR-regulované translace a vliv této inhibice na počet vnitřních buněk a chování některých vnějších buněk ve stádiu 32 buněk	51
4.6.1	Fluorescenční barvení protilátkou anti-CDX2 v kombinaci s Oregon Green 488 phalloidinem.....	52
4.6.2	Fluorescenční barvení protilátkou anti-YAP1 v kombinaci s Oregon Green 488 phalloidinem.....	54
4.6.3	Fluorescenční barvení protilátkou anti-Cytokeratin 8.....	57
4.6.4	Fluorescenční barvení protilátkou anti-(sc-216) PKC ζ (C-20).....	58
4.6.5	Fluorescenční barvení protilátkou anti-AMOT v kombinaci s anti-CDX2, a anti-AMOT v kombinaci s anti-YAP1	59
5.	Diskuse	62
6.	Seznam literatury.....	67

1. Úvod

1.1 Preimplantační vývoj myšího embrya

Preimplantační vývoj myšího embrya začíná v okamžiku oplodnění zralého oocytu, ke kterému dochází v ampulární části vejcovodu v E0,5 (embryonální den 0,5) a končí implantací embrya do děložní sliznice v E4,5. Během tohoto časového úseku projde embryo vejcovodem, vstoupí do dělohy a dojde v něm k sedmi mitotickým dělením, k oddělení třech buněčných linií, tvorbě blastocoelové dutiny (vzniku blastocysty) a vyřeznutí blastocysty ze *zona pellucida* (Cockburn & Rossant, 2010). Výsledkem tohoto procesu je embryo obsahující zhruba 128 buněk, ve kterém jsou ustanoveny tři buněčné linie. Trofoektoderm (TE), ze kterého později vznikne placenta, primitivní endoderm (PE), který dá vzniknout žloutkovému vaku a jiným extraembryonálním tkáním, a epiblast (EPI), ze kterého se vyvine plod (Cockburn & Rossant, 2010). Jednotlivé fáze myšího preimplantačního vývoje jsou přehledně znázorněny na obrázku 1.

Vstupem spermie do zralého oocytu vznikne zygota (E0,5), která se následně mitoticky dělí a vzniká 2buněčné embryo (E1,5). V této vývojové fázi dochází k aktivaci zygotického genomu, při které se embryo zbavuje závislosti na mRNA a transkripčních faktorech zděděných od matky a začíná transkribovat a translatovat vlastní mRNA (Cockburn & Rossant, 2010; Zernicka-Goetz et al., 2009). Je ale důležité poznamenat, že v embryu během celého preimplantačního vývoje přetrvávají proteiny nasyntetizované z těchto mateřských mRNA (Mihajlović & Bruce, 2017).

Druhé mitotické dělení, ve kterém dosáhne embryo 4buněčné fáze, probíhá v E2,0 a je následováno přechodem do 8buněčného stádia v E2,5 (Yamanaka et al., 2006). Po tomto přechodu dochází v embryu k procesům takzvaného zhutnění a polarizace, které jsou nezbytné pro diferenciaci prvních dvou buněčných linií (TE a ICM) a tedy i pro další embryonální vývoj (Graham & Zernicka-Goetz, 2016). Při procesu zhutnění dochází ke zvětšení kontaktních ploch mezi jednotlivými blastomerami a v důsledku toho ke kompaktaci embrya. Během polarizace se v místech kontaktu dvou buněk tvoří bazolaterální domény a na místech bez buněčného kontaktu (části buněk na povrchu embrya) apikální domény (přehledně znázorněno na obrázku 2) (Graham & Zernicka-Goetz, 2016).

Díky procesu polarizace generuje následné mitotické dělení dva typy buněk (podrobněji popsáno v kapitole 1.1.1). Vnější polarizované, které zdědily apikální doménu a vnitřní nepolarizované, které ji nezdědily. Vnější polarizované buňky přijmou osud trofoektodermu (TE) a vnitřní nepolarizované se budou vyvíjet ve vnitřní masu buněk (ICM)

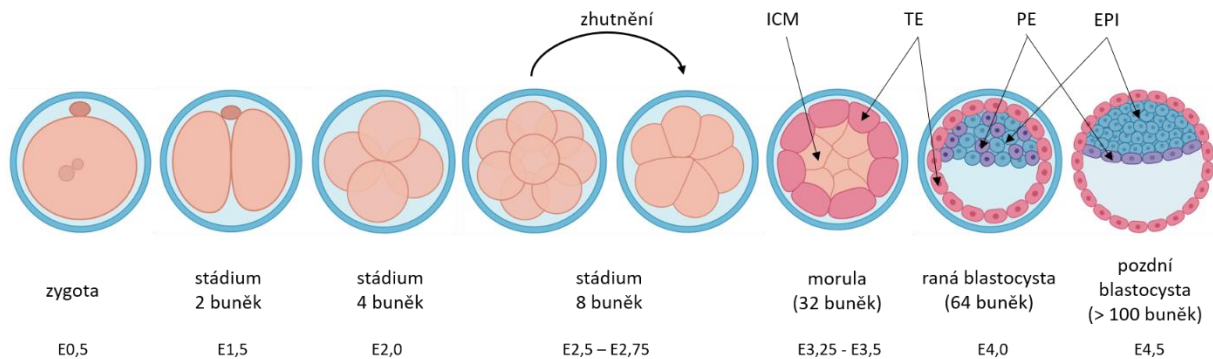
(Yamanaka et al., 2006). Navzdory rozdílné polaritě a v důsledku toho i odlišné expresi transkripčních faktorů si všechny buňky 16buněčného embrya zachovávají totipotenci (Suwińska et al., 2008), podle jiných výzkumů si buňky ICM zachovávají schopnost regenerovat TE až do stádia rané blastocysty (Posfai et al., 2017). 16buněčné embryo se opětovně dělí za vzniku dalších vnějších polárních a vnitřních nepolárních buněk a v E3,0 dosáhne stádia 32 buněk (Cockburn & Rossant, 2010). V embryu dochází k prvnímu rozhodnutí o buněčném osudu a k rozruznění prvních dvou buněčných linií, kterými jsou TE a ICM (Chazaud & Yamanaka, 2016). Celý tento proces je podrobněji popsán v kapitole 1.1.2. Díky polaritě a poloze jednotlivých buněk dochází mezi vnějšími a vnitřními buňkami k rozdílné expresi diferenciačních faktorů, která má za následek diferenciaci vnějších buněk a udržení pluripotence v buňkách vnitřních (Graham & Zernicka-Goetz, 2016).

Poměrně brzy po oddělení linií TE a ICM (v E3,5) se v embryu začíná pomocí Na⁺/K⁺ ATPáz akumulovat Na⁺ na bazolaterální straně TE. V důsledku toho se vytváří osmotický gradient, který společně s akvaporiny, rovněž přítomnými ve vrstvě TE buněk, umožňuje průchod vody do vnitřní části embrya (Cockburn & Rossant, 2010). Tam se následně utváří dutina vyplněná vodou (blastocoelová dutina), která se postupně zvětšuje až do E4,5 (Cockburn & Rossant, 2010; Mihajlović & Bruce, 2017). Zatímco buňky TE zůstávají rozprostřené na povrchu embrya, buňky ICM se shlukují k jednomu embryonálnímu pólu a zbytek vnitřní části je okupován neustále se rozpínající blastocoelovou dutinou (Cockburn & Rossant, 2010; Mihajlović & Bruce, 2017). Výsledkem tohoto procesu je embryonální útvar, který se nazývá blastocysta.

Během následujících 24 hodin se buňky embrya ještě dvakrát mitoticky dělí a buňky ICM se diferencují do dvou různých vývojových linií. První z nich je primitivní endoderm (PE) a druhá je epiblast (EPI) (Cockburn & Rossant, 2010; Graham & Zernicka-Goetz, 2016). Způsob rozhodování o tom, které buňky se budou vyvíjet jako PE a které jako EPI zatím nebyl zcela objasněn. Bylo navrženo několik teorií, ale nebyl zatím nalezen žádný jednoznačný princip, který by pomohl předpovědět které buňky přijmou který osud (více v kapitole 1.1.3) (Graham & Zernicka-Goetz, 2016). Po diferenciaci PE a EPI probíhá přesun jednotlivých buněk, na konci kterého tvoří buňky PE jednobuněčnou vrstvu, oddělující masu EPI buněk od blastocoelové dutiny (viz obrázek 1) (Graham & Zernicka-Goetz, 2016).

Embryo se nyní nachází ve stádiu pozdní blastocysty, sestoupilo již z vejcovodu do dělohy a je téměř připraveno na implantaci do děložní sliznice (Cockburn & Rossant, 2010). Před procesem implantace ale musí dojít k vyhřeznutí embrya ze *zona pellucida*, která ho obaluje. Celý proces je velmi komplexní a zatím nebyl zcela objasněn. Důležitou funkci

v něm má ale nepochybně TE a expandující blastocoelová dutina (White et al., 2018). Pokud se embryo z nějakého důvodu nepodaří zona pellucida protrhnout a vystoupit z ní, tak se není schopné implantovat do děložní sliznice a pokračovat ve svém vývoji (White et al., 2018).



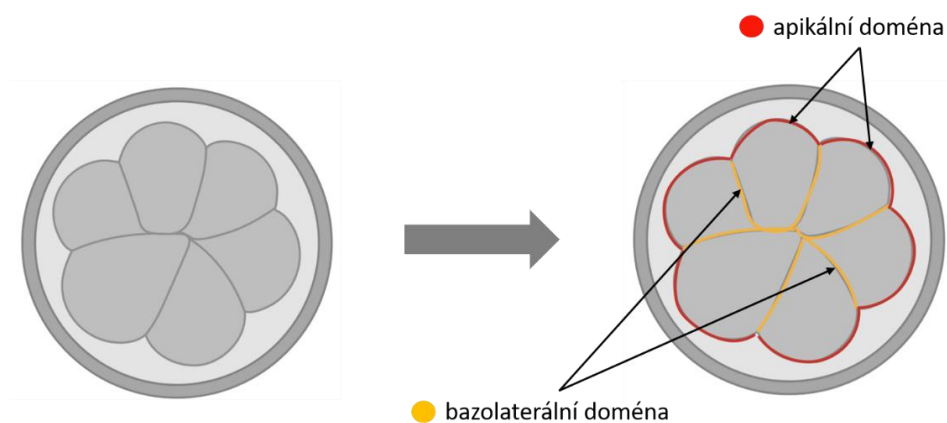
Obr. 1: Zjednodušené schéma preimplantačního vývoje myšičího embrya: Je zde zobrazen vývoj od zygoty přes 2buněčné, 4buněčné a 8buněčné embryo. Následuje proces zhutnění a oddělení prvních dvou buněčných linií (TE a ICM). Následuje tvorba blastocysty, diferenciace ICM na PE a EPI a přeskupení PE a EPI buněk do požadované polohy (Cockburn & Rossant, 2010). Schéma bylo vytvořeno s použitím šablon ve webové aplikaci BioRender (<https://app.biorender.com/>)

1.1.1 Polarizace a její vliv na první rozhodnutí o buněčném osudu

Až do 16buněčného stádia si všechny blastomery zachovávají totipotenci neboli schopnost vytvářet jakýkoli buněčný typ, vyskytující se v daném organismu. Tato vlastnost se ale ztrácí během asymetrického dělení z 16 na 32 buněk (Suwińska et al., 2008), při kterém se od sebe začínají odlišovat první dvě buněčné linie: TE a ICM. Aby mohlo k asymetrickému dělení dojít, musí mu nutně předcházet procesy zhutnění a polarizace, které probíhají v 8buněčném embryu (Cockburn & Rossant, 2010; Mihajlović & Bruce, 2017).

Nejdříve dochází k procesu zhutňování, během kterého ztrácí blastomery svůj kulatý tvar a začínají se zplošťovat. V místech kontaktu dvou buněk dochází ke hromadění E-cadherinu a ke tvorbě adhezních spojů, v důsledku čehož se zvětšují kontaktní plochy mezi buňkami a embryo se stává kompaktnějším (Graham & Zernicka-Goetz, 2016; Mihajlović & Bruce, 2017; Yamanaka et al., 2006). V kompaktním embryu následně dochází k procesu polarizace, při kterém se na povrchu všech buněk tvoří apikální a bazolaterální doména, v závislosti na poloze dané části buňky v embryu (Graham & Zernicka-Goetz, 2016; Mihajlović & Bruce, 2017). Části buněk, které jsou v kontaktu s další buňkou získávají bazolaterální doménu a části bez buněčného kontaktu (na povrchu embrya) získávají doménu apikální (zjednodušeně znázorněno na obrázku 2) (Graham & Zernicka-Goetz, 2016). Ta je

tvořena proteinovým komplexem, jehož součástí jsou mimo jiné PAR3, PAR6 a aPKC (Mihajlović & Bruce, 2017; Yamanaka et al., 2006). V oblasti apikální domény je dále lokalizován PARD6B, který se může podílet na udržování polarity, v bazolaterální doméně je potom přítomen EMK1 (Vinot et al., 2005).

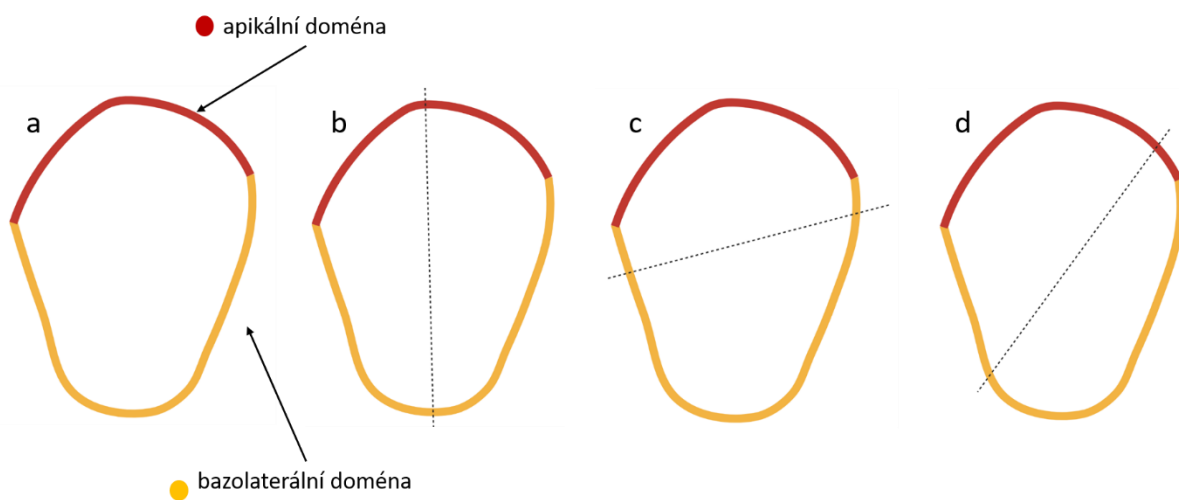


Obr. 2: Polarizace myšního preimplantačního embrya: V místech kontaktu buňka-buňka dochází ke tvorbě bazolaterální domény (znázorněna žlutě) a v místech bez buněčného kontaktu (na povrchu embrya) se tvoří apikální doména (znázorněna červeně) (Graham & Zernicka-Goetz, 2016). Obrázek byl vytvořen s použitím šablon ve webové aplikaci BioRender (<https://app.biorender.com/>)

Během dalšího mitotického dělení na konci kterého dosáhne embryo stádia 16 buněk, se mohou blastomery dělit několika způsoby, přičemž podle některých zdrojů bude způsob dělení rozhodující pro jejich další vývoj (Cockburn & Rossant, 2010). První možností je, že se blastomera rozdělí antiklinálně neboli symetricky (znázorněno na obrázku 3b), což znamená, že obě dceřiné buňky zdědí polovinu apikální domény (Sutherland et al., 1990) a stanou se z nich vnější buňky, směřující k osudu TE (Chazaud & Yamanaka, 2016; Yamanaka et al., 2006). Druhá možnost je, že se buňka rozdělí periklinálně neboli asymetricky (znázorněno na obrázku 3c), přičemž jedna dceřiná buňka získá celou apikální doménu (Sutherland et al., 1990) a stane se z ní vnější buňka směřující k osudu TE. Druhá dceřiná buňka se bude nacházet uvnitř embrya a bude směřovat k osudu ICM (Chazaud & Yamanaka, 2016; Yamanaka et al., 2006). Existuje i třetí možnost, takzvané šikmé dělení (znázorněno na obrázku 3d), což znamená, že jedna dceřiná buňka získá velkou část apikální domény a druhá pouze její malou část (Sutherland et al., 1990). Buňka s velice malou apikální doménou je označována jako SAD (z anglického „small apical domain“). Takováto buňka je během dalšího vývoje většinou zcela zatlačena do vnitřní polohy, a diferencuje se směrem k ICM, protože malá část apikální domény, kterou buňka zdědila, nestačí k její polarizaci

(Samarage et al., 2015). Embryo ve stádiu 16 buněk se výše popsaným způsobem (symetricky/asymetricky) znovu dělí a dosahuje stádia 32 buněk (Cockburn & Rossant, 2010).

Zatím nebylo objasněno, jakým mechanismem je orientace buněčného dělení regulována. Bylo navrženo, že existuje souvislost mezi rovinou dělení a polohou buněčného jádra, přičemž symetrické dělení by probíhalo při apikálním umístění jádra a asymetrické dělení by probíhalo při jeho bazálním umístění. Na polohu buněčných jader by mohla mít vliv polarita a množství proteinu CDX2 (Ajduk et al., 2014). Zde je nutno podotknout, že některé výzkumy nepotvrzují rozhodující vliv směru dělení (zejména pak ve stádiu 16 buněk) na rozhodnutí o tom, zda se dceřiné buňky přikloní k osudu TE nebo ICM (Watanabe et al., 2014).



Obr. 3: Způsoby buněčného dělení při přechodu 8buněčného embrya na embryo 16buněčné: V části **a** je zobrazena jedna buňka 8buněčného embrya s vyznačenou apikální a bazolaterální doménou. V části **b** je zobrazeno symetrické dělení, v části **c** asymetrické dělení a v části **d** šikmé dělení této buňky (Chazaud & Yamanaka, 2016; Sutherland et al., 1990; Yamanaka et al., 2006). Obrázek byl vytvořen ve webové aplikaci BioRender (<https://app.biorender.com/>)

1.1.2 Odlišné expresní vzorce v buňkách TE a ICM a Hippo signální dráha

Díky symetrickému/asymetrickému dělení z 8buněčného na 16buněčné stádium se v embryu začínají diferencovat první dvě buněčné linie s odlišnými expresními vzorci transkripčních faktorů specifických pro danou vývojovou linii (Yamanaka et al., 2006). Proces diferenciace pokračuje přes další mitotické dělení ze stádia 16 na stádium 32 buněk a je definitivně završen vytvořením rané blastocysty (Cockburn & Rossant, 2010). O přesné příčině vzniku odlišných expresních vzorců mezi buněčnými liniemi TE a ICM se stále vedou spory, ale všeobecně jsou přijímány dva modely, které mají tento jev objasňovat (Mihajlović & Bruce, 2017; Sasaki, 2017). První je poziční model, který navrhli Tarkowski a Wroblewska.

Na základě jejich pozorování je pro odlišný vývoj TE a ICM rozhodující vnější/vnitřní umístění buňky v embryu (Tarkowski & Wróblewska, 1967). Druhý model byl navržen Johnsonem a Ziomkem, kteří došli k odlišným závěrům. Podle nich nehraje hlavní roli v určování buněčného osudu buněčná poloha, ale buněčná polarita (Johnson & Ziomek, 1981).

Řada studií poukazuje na to, že se tyto dva modely navzájem nevylučují, neboť buněčná polarita/apolarita a vnější/vnitřní buněčná poloha spolu velice úzce souvisí (Mihajlović & Bruce, 2017; Sasaki, 2017). Zajímavé je, že se krátce po dělení z 8buněčného na 16buněčné stádium nenacházejí všechny nepolarizované buňky ve vnitřní poloze, ale postupně se do ní přesouvají, přičemž Hippo signalizační dráhu aktivují na základě své polarity/apolarity ještě před tímto přemístěním (Anani et al., 2014; Watanabe et al., 2014). Může ale také docházet k tomu, že tyto buňky zůstávají na povrchu embrya, získávají polaritu a vyvíjejí se v TE (Korotkevich et al., 2017).

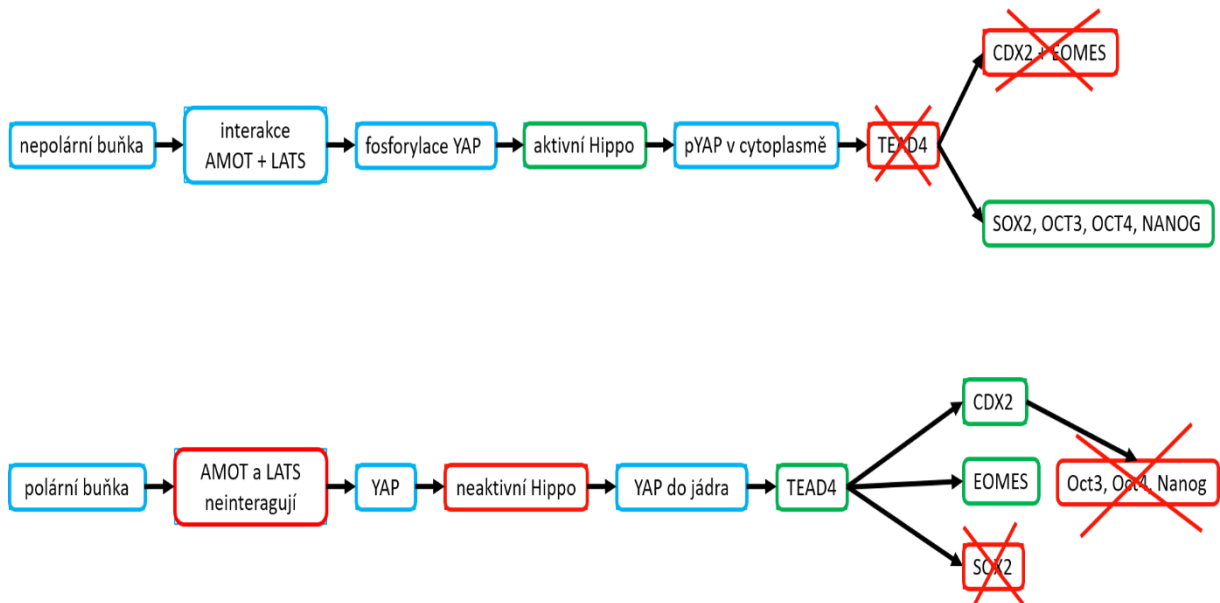
Bylo také zjištěno, že změna polohy buňky v rámci embrya (přesunutí buňky z vnitřní polohy do vnější nebo naopak) donutí buňku změnit svou polaritu (buňka získá nebo ztratí apikální doménu) a v důsledku toho dojde i ke změně osudu dané buňky (Zernicka-Goetz et al., 2009). Můžeme se ale setkat i s opačným jevem. Pokud v buňce dojde k nezvratné změně polarity (například kvůli experimentálnímu zvýšení či snížení exprese určitých mRNA), může mít daná buňka tendenci se přemístit a přijmout v embryu novou polohu, která bude odpovídat její nové polaritě (Plusa et al., 2005).

Jedním z nejdůležitějších faktorů, který má zásadní vliv na diferenciaci TE a ICM je Hippo signalizační dráha (zjednodušený přehled na obrázku 4). Její aktivita je ovlivňována buněčnou polaritou (Hirate et al., 2013) a do určité míry i buněčným kontaktem (Stephenson et al., 2010). Po přechodu z 8buněčného na 16buněčné embryo se začínají mezi polárními a nepolárními buňkami tvořit zásadní rozdíly v množství a lokalizaci proteinu AMOT (Hirate et al., 2013).

V nepolárních buňkách je protein AMOT přítomen ve větším množství než v polárních buňkách a je lokalizován v cytoplasmatické membráně a slabě v cytoplasmě (Hirate et al., 2013; Sasaki, 2017), kde interaguje s LATS kinázami (Hirate et al., 2013). Díky této interakci mohou LATS kinázy fosforylovat transkripční koaktivátorový protein YAP, ten je poté v důsledku fosforylace zadržován v cytoplasmě (Nishioka et al., 2009). Hippo dráha je aktivní (přehled v Sasaki, 2017). Neschopnost YAP vstupovat do buněčného jádra znamená, že v jádře nedochází k aktivaci transkripčního faktoru TEAD4 (Nishioka et al., 2009). To má za následek ukončení exprese *Cdx2* a *Eomes*, které jsou pomocí TEAD4 regulovány (Nishioka et al., 2008; Nishioka et al., 2009) a pokračující expresi genů *Sox2* (důležitého pro pluripotenci

buněk) (Wicklow et al., 2014), *Oct3*, *Oct4* a *Nanog* (Nishioka et al., 2008; Nishioka et al., 2009; Niwa et al., 2005; Strumpf et al., 2005). Během vývoje ICM je *Amot* v této linii nadále exprimován (Leung & Zernicka-Goetz, 2013).

V polárních buňkách je protein AMOT přítomen v menším množství než v nepolárních buňkách a je lokalizován pouze v apikální doméně (Hirate et al., 2013; Sasaki, 2017), kde nemůže interagovat s LATS kinázami, protože ty jsou přítomny pouze v bazolaterální doméně (Sasaki, 2017). V důsledku toho zůstává protein YAP bez fosforylace, což mu umožňuje pronikat do jádra, kde se hromadí (Nishioka et al., 2009). Hippo dráha není aktivní (přehled v Sasaki, 2017). Nefosforylovaný YAP přítomný v buněčném jádře následně aktivuje transkripční faktor TEAD4 (Nishioka et al., 2009), v důsledku čehož dochází k potlačení exprese pluripotentního transkripčního faktoru *Sox2* (Wicklow et al., 2014). Aktivace TEAD4 ale rovněž zapříčiní pokračující expresi transkripčních faktorů *Cdx2* a *Eomes*, specifických pro TE (Nishioka et al., 2008; Strumpf et al., 2005; Zernicka-Goetz et al., 2009). CDX2 následně potlačuje expresi *Oct3*, *Oct4* a *Nanog* (Nishioka et al., 2008; Nishioka et al., 2009; Niwa et al., 2005; Strumpf et al., 2005), čímž se znemožní vzniku ICM (Nishioka et al., 2008). CDX2 také zvyšuje apikální lokalizaci aPKC a tím ovlivňuje pozitivní zpětnou vazbu buněčnou polaritu, což pravděpodobně napomáhá ke stabilizaci TE (Jedrusik et al., 2008). S postupujícím vývojem TE je *Amot* exprimován stále méně, a nakonec se stává téměř nedetekovatelným (Leung & Zernicka-Goetz, 2013).



Obr. 4: Diferenciace TE a ICM od polaritě přes Hippo signální dráhu: V nepolárních buňkách interaguje protein AMOT s LATS kinázami, které jsou díky této interakci schopné fosforylovat YAP. Fosforylovaný YAP nemůže proniknout do buněčného jádra, hromadí se v cytoplasmě a v jádře nedochází k aktivaci TEAD4. V důsledku toho nejsou exprimovány *Cdx2* a *Eomes* a naopak jsou exprimovány *Sox2*, *Oct3*, *Oct4* a *Nanog*. V polárních buňkách AMOT s LATS kinázami neinteraguje. Díky tomu zůstává bez fosforylace a proniká do buněčného jádra, kde aktivuje TEAD4. Aktivní TEAD4 následně potlačuje expresi *Sox2* a ponechává aktivní expresi transkripčních faktorů *Cdx2* a *Eomes*. CDX2 potlačuje expresi *Oct3*, *Oct4* a *Nanog* (přehled v Sasaki, 2017).

1.1.3 Druhé rozhodnutí o buněčném osudu

Krátce po vytvoření blastocysty dochází v embryu ke druhému rozhodnutí o buněčném osudu. Během něho dochází k diferenciaci ICM buněk na další dvě buněčné linie. První z nich je PE, ze kterého později vznikají extraembryonální tkáně. Druhou buněčnou linií je EPI, ze kterého vznikají pluripotentní embryonální kmenové buňky a také samotné embryo (Yamanaka et al., 2006).

Nejdůležitější úlohu při vzniku PE a EPI mají transkripční faktory OCT4, NANOG a GATA6, které jsou v E3,5 přítomny v každé buňce ICM (Chazaud et al., 2006). Historicky bylo navrženo několik modelů vysvětlujících, jak by mohlo docházet k rozhodnutí o tom, které buňky se budou vyvíjet v PE a které v EPI. Jedním z nejznámějších modelů je model „soli a pepře“. Ten předpokládá, že k rozhodnutí mezi osudem PE a EPI dochází napříč celou masou ICM nezávisle na poloze buněk (Graham & Zernicka-Goetz, 2016; Mihajlović & Bruce, 2017).

Mnoho výzkumů přináší poznatek, že ICM není homogenní populací a že buňky ze kterých se skládá mají různý vývojový potenciál, což znamená, že je předem určeno, která

buňka ICM bude přispívat k PE a která k EPI (Chazaud et al., 2006; Meilhac et al., 2009). Objevují se důkazy, že již v E3,5 je ICM mozaikou obsahující dvě buněčné populace s rozdílnými hladinami exprese transkripčních faktorů OCT4, NANOG a GATA6 (Chazaud et al., 2006; Plusa et al., 2008). Příslušnost buněk k populaci PE/EPI by mohla být dána vlnou buněčného dělení při které buňky vznikly. Konkrétně, čím později jsou buňky vytvořeny dělením vnějších buněk na povrchu embrya, tím spíše se budou vyvíjet v PE (Morris et al., 2010).

Pokud je v buňce potlačena exprese *Oct4* a *Nanog*, a nadále je exprimován pouze *Gata6*, bude se buňka vyvíjet v PE (Chazaud et al., 2006). Později začne v těchto buňkách také exprese *Gata4*, který není důležitý pro samotný vznik PE, ale podporuje další vývoj této buněčné linie (Graham & Zernicka-Goetz, 2016). V případě že má z dané buňky vzniknout EPI, je nezbytná pokračující exprese *Oct4* spolu s *Nanog* a *Sox2* (Avilion et al., 2003; Wicklow et al., 2014) a naopak musí dojít k potlačení exprese *Gata6* (Yamanaka et al., 2006). SOX2 je důležitý i během dalšího vývoje EPI, protože ho pomáhá udržovat v pluripotentním stavu (Avilion et al., 2003; Wicklow et al., 2014).

Jednotlivé blastomery se výše uvedeným způsobem diferencují na PE a EPI a následně musí zaujmout pozici odpovídající tomu, ve kterou buněčnou linii se vyvíjí. Buňky EPI zůstávají uvnitř buněčné masy, zatímco buňky PE se přesouvají na její okraj a vytváří jednobuněčnou vrstvu, oddělující linii EPI od blastocoelové dutiny (znázorněno na obrázku 1) (Mihajlović & Bruce, 2017). Špatně umístěné buňky se relokalizují za pomoci aktinu (Meilhac et al., 2009; Plusa et al., 2008), nebo jsou vedeny ke spuštění apoptózy (Plusa et al., 2008).

1.2 Savčí cíl rapamycinu (mTOR)

Savčí cíl rapamycinu (mTOR) je serin/threonin proteinkináza, která na základě mnoha faktorů (mezi které patří například dostupnost živin a stres) reguluje expresi specifických mRNA, čímž následně ovlivňuje hlavní buněčné procesy, jako například buněčný růst a proliferaci. Kvůli své funkci při řízení procesů nezbytných pro přežití buňky hraje roli také v mnoha onemocněních, mezi která patří obezita, cukrovka 2. typu, rakovina, a další (Ma & Blenis, 2009; Qin et al., 2016). Tato signální dráha je tvořena dvěma proteinovými komplexy, pojmenovanými mTORC1 a mTORC2 (Fonseca et al., 2014; Qin et al., 2016), které jsou evolučně konzervovány od kvasinek ke člověku (Loewith et al., 2002). mTORC1 obsahuje mTOR, mLST8 a RAPTOR a ovlivňuje mimo jiné translaci některých mRNA, syntézu rRNA a ribozomálních proteinů a buněčný růst (Fonseca et al.,

2014; Ma & Blenis, 2009; Zoncu et al., 2010). mTORC2 obsahuje mTOR, mLST8 a mAVO3 a řídí hlavně reorganizaci aktinového cytoskeletu prostřednictvím Rho a Rac GTPáz (Jacinto et al., 2004).

1.2.1 mTOR a iniciace translace závislá na čepičce

Komplex mTORC1 (schéma na obrázku 5) reguluje translaci různých mRNA v různé míře. S největší účinností reguluje translaci mRNA obsahujících takzvané 5' terminální oligopyrimidinové (TOP) motivy (sekvence začínající hned za mRNA čepičkou nukleotidem C a pak nepřerušovaným řetězcem 4-14 pyrimidinů) nebo 5-15 nukleotidů dlouhé pyrimidinové motivy dále od 5' čepičky v 5' netranslatované oblasti. V menší míře může ovlivňovat (a často ovlivňuje) také ostatní mRNA (Thoreen et al., 2012).

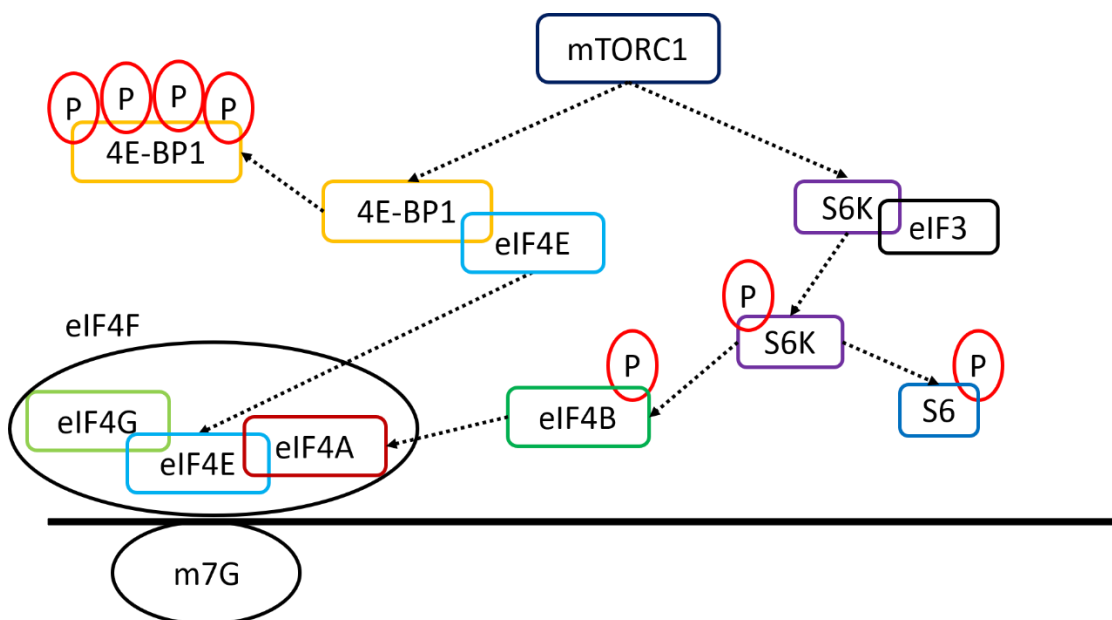
K regulaci translace dochází přes protein 4E-BP1 během iniciační fáze, tedy v době, kdy na mRNA nasedá malá ribosomální podjednotka (40S). Pro její úspěšné nasednutí je nezbytně důležitá přítomnost iniciačních faktorů eIF4A, eIF4E a eIF4G a jejich uspořádání do translačního iniciačního faktoru eIF4F. Tvorba tohoto komplexu začíná navázáním eIF4E na 5' čepičku mRNA, na eIF4E se následně váže eIF4G a nakonec eIF4A (Gingras et al., 1999; Ma & Blenis, 2009). Protein 4EBP1 v nefosforylované formě má tendenci s eIF4E tvořit komplex, čímž zabraňuje vazbě eIF4E-eIF4G (Gingras et al., 1999) a tím i tvorbě komplexu eIF4F (Ma & Blenis, 2009). Pro zrušení vazby mezi eIF4E a 4E-BP1 musí být 4E-BP1 plně fosforylován mTOR proteinem, k čemuž je nutná aktivita mTORC1 (Gingras et al., 1999; Ma & Blenis, 2009; Zoncu et al., 2010). K fosforylaci dochází ve dvou fázích. V první fázi fosforylace probíhá na fosforylačních místech Thr-37 a Thr-46, poté následuje druhá fáze, při které jsou fosforylována místa Ser-65 a Thr-70. Vazba 4E-BP1 a eIF4E je uvolněna až po dokončení fosforylace na všech čtyřech vazebných místech, přičemž započetí druhé fáze fosforylace musí přecházet ukončení fáze první (Gingras et al., 1999b; Gingras et al., 2001b).

Druhým cílem mTOR fosforylace jsou ribosomální S6 protein kinázy, vyskytující se ve dvou formách: S6K1 a S6K2 (Shima et al., 1998). Nefosforylovaná S6K1 je vázána v komplexu společně s eIF3 až do okamžiku, kdy díky fosforylaci mTOREM dojde k jejímu vyvázání. Impulsem k tomuto kroku může být například stimulace inzulínem (Holz et al., 2005). S6K dále fosforyluje například ribosomální protein S6, který je považován za ukazatele aktivity S6K (Hay & Sonenberg, 2004), nebo eIF4B, který následně vstupuje do

komplexu s eIF4A a 40S ribosomální podjednotkou a umožňuje translační elongaci (Holz et al., 2005).

Kontrola buněčného cyklu závislá na mTOR-regulované translaci probíhá paralelně a nezávisle prostřednictvím drah 4E-BP1 a S6K1. Inhibice pouze jedné z nich nevede k úplné inhibici translace. Potlačení obou má ale na translaci závažné dopady a vykazuje značnou podobnost s inhibicí rapamycinem (Fingar et al., 2004). Regulace se rovněž účastní protein RAPTOR, který zde díky tvorbě vazby mTOR-RAPTOR plní funkci adaptorového proteinu (Hay & Sonenberg, 2004; Kim et al., 2002) a zprostředkovává tak interakci mezi mTOR a nefosforylovanými formami 4E-BP1 a S6K1, čímž zajišťuje jejich fosforylaci (Coffman et al., 2014; Hara et al., 2002; Hay & Sonenberg, 2004). Samotné interakce RAPTOR-4E-BP1 a RAPTOR-S6K1 jsou pak možné díky motivu pěti aminokyselin nazývanému TOS, přítomnému na N-koncích 4E-BP1 a S6K1 (Hay & Sonenberg, 2004).

Dalším regulátorem translace je LARP1. Ten má dva objekty, se kterými je schopen tvořit vazbu: Protein RAPTOR, který je taktéž součástí mTORC1 komplexu, a TOP mRNA. Při vazbě LARP1 na mRNA je znemožněno nasednutí eIF4G a v důsledku toho se netvoří komplex eIF4F. V případě inhibice mTOR dráhy dochází k vyššímu množství interakcí mezi LARP1 a TOP mRNA, čímž se potlačuje jejich translace (Fonseca et al., 2015).



Obr. 5: Zjednodušené schéma komplexu mTORC1, jehož aktivita je nepostradatelná pro započítí translace závislé na čepičce. Fosforylace 4E-BP1 vede k uvolnění eIF4E a ke tvorbě translačního iniciačního faktoru eIF4F na 5' čepičce mRNA. Fosforylace S6K umožňuje fosforylací ribosomálního proteinu S6 a eIF4B, který interaguje s eIF4A (Gingras et al., 1999; Hay & Sonenberg, 2004; Holz et al., 2005; Ma & Blenis, 2009).

1.2.2 Inhibice mTOR signální dráhy a její důsledky na regulaci translace

Jedním z nejznámějších inhibitorů mTOR dráhy je rapamycin. Byl prokázán jeho účinek (a rovněž účinek jeho analogů) na inhibici mTORC1, a je všeobecně přijímáno, že na aktivitu komplexu mTORC2 nemá vliv (Loewith et al., 2002; Sarbassov et al., 2006). Je ale možné, že inhibice mTORC2 rapamycinem je závislá na buněčném typu (Sarbassov et al., 2006). Rapamycin funguje na základě narušení vazby mTOR-RAPTOR, což snižuje fosforylaci 4E-BP1 a S6K1/2, čímž se zesiluje vazba 4E-BP1-eIF4E a v důsledku toho je inhibovaná translace závislá na čepičce (Beretta et al., 1996; Fingar et al., 2004; Hay & Sonenberg, 2004; Kim et al., 2002; Shima et al., 1998). Rapamycin rovněž působí pozitivně na vazbu LARP1-mRNA (nezávisle na přítomnosti TOP motivu) a negativně na vazbu LARP1-RAPTOR (Fonseca et al., 2018), ale není známo, že by měl větší vliv na interakci mezi eIF4E a eIF4G (Fonseca et al., 2015).

Vedle rapamycinu má schopnost potlačovat mTOR signalizační dráhu například Torin 1. Ten zabraňuje fosforylaci 4E-BP1 i S6K1 (Thoreen et al., 2012) a ruší interakci eIF4E s eIF4G (Fonseca et al., 2015), což má následně negativní vliv na iniciaci translace mRNA závislých na mTOR. Nejvíce jsou postiženy mRNA obsahující TOP nebo jiné pyrimidinové motivy, které jsou na fosforylaci 4E-BP1 nejcitlivější, ale alespoň k mírnému potlačení translace dochází téměř u všech mRNA (Thoreen et al., 2012). Torin 1 rovněž podporuje vazbu LARP1-mRNA (nezávisle na přítomnosti TOP motivu), ale na rozdíl od rapamycinu nemá velký vliv na vazbu LARP1-RAPTOR (Fonseca et al., 2018).

Kromě farmakologické inhibice lze snížit aktivitu mTOR také pomocí nastolení aminokyselinového deficitu v buňce, čehož lze pro naše potřeby dosáhnout kultivací embryí v médiu bez obsahu aminokyselin. Platí přitom, že dlouhodobé vystavení médiu s těmito parametry má na snížení aktivity mTORC1 větší vliv než vystavení krátkodobé (Zamfirescu et al., 2021). Bylo prokázáno, že fosforylace 4E-BP1 a S6K1 je ovlivňována přítomností aminokyselin v mnoha typech buněk (Beugnet et al., 2003). Aminokyselinová nedostatečnost může reprodukovat účinek mTOR inhibice pomocí inhibitorů a dochází při ní ke stabilizaci 5'TOP mRNA v translačně neaktivním stavu pomocí redistribuce LARP1-5'TOP s podjednotkou 40S (Fuentes et al., 2021).

1.2.3 mTOR v myších oocytech

Správná funkce mTOR dráhy je, mimo jiné, důležitá v myších oocytech, kde spolu s mnoha dalšími faktory zajišťuje správné sestavení dělicího vřeténka v první a druhé

metafázi meiotického dělení (Jansova et al., 2017; Lee et al., 2012; Severance & Latham, 2017). Děje se tak přes fosforylaci 4E-BP1 na dělicím vřeténku (Jansova et al., 2017). Zajímavé je, že pro správnou fosforylaci 4E-BP1 jsou v oocytech vedle proteinu mTOR nezbytné i další fosforylační faktory, a není zcela objasněné, jak důležitou roli hraje mTOR. V metafázi I je fosforylace 4E-BP1 na dělicím vřeténku pravděpodobně zajišťována kinázami PLK1 a CDK1, přičemž PLK1 je označována za hlavního regulátora této fosforylace a protein mTOR na ni nejspíš nemá zásadní vliv (Severance & Latham, 2017).

Protein mTOR začíná být důležitější během metafáze II, kdy jeho inhibice negativně působí na sestavování dělicího vřeténka, ale opět platí, že pravděpodobně není jediným fosforylačním faktorem působícím na 4E-BP1. Nejdůležitější roli pravděpodobně opět hrají kinázy PLK1 a CDK1, i když názory na to, která z nich je pro fosforylaci 4E-BP1 stěžejní, se dosti liší. Jansova a spol. přinesli výsledky, dle kterých je důležitá pouze kináza CDK1, která fosforylaci ovlivňuje prostřednictvím aktivace mTOR, a PLK1 se podle nich na fosforylaci 4E-BP1 vůbec nepodílí (Jansova et al., 2017). To je v kontrastu s dalším výzkumem, podle kterého je pro fosforylaci 4E-BP1 stěžejní kináza PLK1, jako je tomu během metafáze I (Severance & Latham, 2017).

V případě narušení funkce eIF4F komplexu nedochází během meiózy I a II k fatálním defektům translace, oocyt je schopen maturace a vydělení prvního pólového tělíska. Vývoj ale selhává v důsledku špatné organizace dělicího vřeténka, ke které dochází v metafázi I i II. Defektní dělicí vřeténko je příčinou špatného chromosomálního uspořádání v metafázové destičce, to vede k chybné segregaci chromosomů, a vzniklé chromosomální aneuploidie nemusí být slučitelné s dalším vývojem (Susor et al., 2015).

1.2.4 mTOR v myších embryích

Zásadní role mTOR dráhy během vývoje myších embryí byla opakovaně potvrzena. Z výzkumů vyplývá, že mTOR ovlivňuje buněčný růst a proliferaci a jeho inhibice rapamycinem vede k narušení proliferace trofoblastů (Murakami et al., 2004). Embrya s deletovaným mTOR genem (-/- embrya) jsou v E6,5 a v E7,5 výrazně opožděna ve svém vývoji oproti embryím s heterozygotně deletovaným mTOR genem (+/- embryím) a kontrolním embryím (+/+ embryím) a vykazují určité vývojové defekty (Gangloff et al., 2004). Jiná studie přinesla výsledky, dle kterých nejsou mTOR -/- embrya schopna přežít déle než do E6,5 (Shor et al., 2009). Podle novějších výzkumů je možné u *ex vivo* embryí použít inhibici obou komplexů mTOR (například pomocí inhibitoru RapaLink-1) k navození

reverzibilního pozastaveného stavu, který připomíná diapauzu. Není ale možné pozastavení embrya během buněčného dělení (Bulut-Karslioglu et al., 2016).

Zajímavé je, že mezi mTOR +/- a mTOR ++ embryi ani myšmi nebyly pozorovány žádné rozdíly, a to jak během preimplantačního a postimplantačního vývoje, tak ani během prvního roku života myši. Vše tedy nasvědčuje tomu, že pro vývoj a život je plně dostačující jedna funkční mTOR alela (Shor et al., 2009).

Podstatnou roli ve vývoji hraje také S6K1, která kontroluje velikost buněk a jejíž nedostatek je u myši příčinou prokazatelně menšího tělesného vzrůstu, a to i navzdory přítomnosti funkční S6K2 a její zvýšené aktivitě napříč buněčnými typy a tkáněmi, prostřednictvím čehož dochází ke zmírnění dopadů S6K1 deficitu (Fingar et al., 2002; Murakami et al., 2004; Pende et al., 2004; Shima et al., 1998). Odlišné důsledky má delece S6K2. Při ní nedochází ke změně velikosti těla, ale ke snížení hladin fosforylovaného S6. Delece obou forem S6K vede k úmrtí mláďat krátce po narození (Pende et al., 2004). Velikost buněk může být regulována pomocí S6K1 a 4E-BP1/eIF4E. Nadměrná exprese S6K1 nebo eIF4E stimuluje buňky k většímu růstu a nadměrná exprese 4E-BP1 jejich růst naopak inhibuje (Fingar et al., 2002). Nezastupitelnou roli v preimplantačním myším vývoji má rovněž RAPTOR, jehož delece vede k podobným abnormalitám v blastocystě jako u mTOR -/- embryí a k jejich smrti krátce po implantaci. mLST8 -/- embrya nevykazují poruchy mTORC1 ve fosforylaci 4E-BP1 a S6K1 a přežívají zhruba do E10,5 (Guertin et al., 2006).

Z předchozích experimentů provedených v naší laboratoři vyplynulo, že v důsledku inhibice mTOR signalizační dráhy se v embryích ve stádiu 16 buněk vyskytuje méně vnitřních buněk, než je tomu u kontrolních embryí, a tento trend byl dále pozorován také ve stádiu 32 buněk (Gahurova et al., manuskript v přípravě). U inhibovaných embryí ve stádiu časně blastocysty dále dochází k celkovému zpomalení vývoje, k nárůstu podílu buněk koexprimujících v ICM proteiny NANOG a GATA6 a k vytvoření nespecifické ICM (Bora et al., 2020).

V této práci se zabýváme mTOR regulovanou translací, řízenou přes fosforylaci 4EBP1 a S6K1 a rovněž o důsledky její inhibice na rozhodování o buněčném osudu během myšního preimplantačního vývoje. Dokládáme, že mTOR regulovaná translace je aktivní během buněčného dělení u preimplantačních embryí, kdy dochází ke změnám poměru fosforylovaného a nefosforylovaného 4E-BP1. Dále potvrzujeme, že inhibice mTOR signální dráhy od stádia 8 buněk vede ke snížení počtu vnitřních buněk ve stádiích 16 a 32 buněk a dále se zabýváme dopady tohoto jevu na vývoj embryí. Rovněž ukážeme,

že navzdory vyššímu množství vnějších buněk, vyskytujících se u embryí inhibovaných Torinem 1, vykazuje část těchto buněk charakteristiky vnitřních buněk, což by mohlo znamenat, že tyto buňky budou brzy internalizovány. Pokud by k tomu došlo, tak by se počet vnitřních buněk embrya vrátil k očekávaným hodnotám, které vykazují embrya bez inhibované mTOR dráhy.

2. Cíle práce

- Ověřit aktivitu mTOR signální dráhy a mTOR-regulované translace během buněčného dělení z 8 na 16 buněk
- Ověřit aktivitu mTOR signální dráhy během dalších buněčných děleních preimplantačního vývoje
- Ověřit úlohu mTOR-regulované translace při vzniku prvních vnitřních buněk preimplantačních embryí v 16buněčném stádiu
- Zjistit, zda 32buněčné embryo reguluje nízký počet vnitřních buněk po inhibici mTOR dráhy a blíže charakterizovat mechanismus regulace

3. Materiály a metody

3.1 Superovulace samic a izolace embryí

Myším samicím generace F1 hybridů vzniklých křížením samice kmene C57Bl6 se samcem kmene CBA/W, v minimálním stáří 8 týdnů, byl v odpoledních hodinách intraperitoneálně podán hormon PMSG (pregnant mare serum gonadotrophin extract; Sigma Aldrich – Merck) v množství 7,5 IU. Po 46 – 48 hodinách byl samicím intraperitoneálně podán hormon hCG (human chorionic gonadotrophic hormone; SigmaAldrich – Merck) a byly ponechány každá s jedním myším samcem stejných F1 hybridů a nebo F1 transgenních mT/mG hybridů, aby mohlo dojít k oplození zralých oocytů. Původní myši transgenní linie mT/mG (Jackson Laboratories, STOCK Gt(ROSA)26Sortm4(ACTB-tdTomato,-EGFP)Luo/J., <https://www.jax.org/strain/007576>) byla předtím v laboratoři překřížena do kmenů C57Bl6 a CBA/W pro získávání F1 hybridů. Tyto myši mají aktivní gen tdTomato pro červený fluorescenční protein s lokalizačním signálem pro membránovou lokalizaci proteinu (mT). Buněčné membrány těchto myší jsou proto červeně zbarvené.

Alespoň 4 hodiny před pitvou byly připraveny kultivační misky s 20 kapkami média KSOM (Embryo-Max; Millipore), přikrytými minerálním olejem (Irvine Scientific) a byly ponechány v inkubátoru při teplotě 37 °C a 5% obsahu CO₂ v atmosféře pro ustálení požadovaného pH a teploty (na každou myši samici jedna miska). Déle byly alespoň 1 hodinu před pitvou připraveny pitevní misky s 20 kapkami média M2 (složení M2 média popsáno v tabulce 1), přikrytými minerálním olejem a mikrozkuhavky se 700 µl M2 (jedna mikrozkuhavka a jedna pitevní miska na jednu myši samici) a byly ponechány v inkubátoru (37 °C) pro získání požadované teploty.

V období mezi 44 – 48 hodinami po podání hormonu hCG byly samice usmrceny metodou cervikální dislokace, byly z nich vypitvány vejcovody obsahující embrya ve stádiu E1,5 a ty byly uloženy do předem připravené mikrozkuhavky s předehřátým médiem M2. Embrya byla z vejcovodů získána pod stereomikroskopem Nikon SMZ475 vypitváním z vejcovodů a následně byla přenesena na pitevní misku a promyta alespoň v pěti kapkách předehřátého M2 média. Poté byla embrya přenesena do média KSOM na kultivační misce a promyta alespoň v šesti kapkách média, ve kterém byla posléze kultivována v inkubátoru při teplotě 37 °C a 5% obsahu CO₂ v atmosféře.

Tab. 1: Složení média M2, používaného při manipulaci s embryi.

zásobní roztok	složka zásobního roztoku	g/100ml	objem
A (x10)	NaCl	5,534	10,0 ml
	KCl	0,356	
	KH ₂ PO ₄	0,162	
	MgSO ₄ x7H ₂ O	0,293	
	Na-laktát 60% sirup	3,2 (ml)	
	Glukóza	1,000	
	Penicilin	0,060	
	Streptomycín	0,050	
B (x10)	NaHCO ₃	2,101	1,6 ml
	Fenol Red	0,010	
C (x100)	Na pyruvát	3,600	1,0 ml
D (x100)	CaCl ₂ x2H ₂ O	2,520	1,0 ml
E (x10)	HEPES	5,958	8,4 ml
F	BSA		400 mg
G	H ₂ O		78,0 ml

3.2 Kultivace v inhibitech

Pro každý experiment byla embrya rozdělena do dvou stejně velkých skupin (jedna byla experimentální a druhá sloužila jako kontrola), přičemž polovina embryí od každé samice byla přidělena do experimentální skupiny a druhá polovina do skupiny kontrolní, aby se předešlo zkreslení experimentu v důsledku odlišné rychlosti vývoje embryí od různých samic.

K inhibici mTOR komplexu byly použity dva inhibitory, 4EGI-1 (Sigma-Aldrich/Merck) a Torin 1 (Selleckchem). Požadované koncentrace inhibitorů bylo dosaženo nejprve jejich ředěním v dimetylsulfoxide (DMSO; Sigma) a následně přidáním této směsi do média KSOM v požadovaném množství, ve kterém byla embrya od určitého vývojového stádia kultivována. V období, kdy byla experimentální skupina embryí kultivována za přítomnosti inhibitoru, byla kontrolní skupina embryí kultivována ve směsi KSOM s přidáním DMSO stejného objemu, jako přidáný inhibitor v experimentální skupině. Přehled použitých inhibitorů, jejich koncentrace a vývojová období, ve kterých byly používány, je v tabulce 2.

Tab. 2: Přehled použitých inhibitorů a jejich koncentrace, embryonální fáze, ve které byla embrya do inhibitoru umístěna, embryonální fáze, kdy byla embrya z inhibitoru vrácena do čistého KSOM a embryonální fáze, ve které byla embrya fixována.

inhibitor	koncentrace inhibitoru/DMSO	přenesení embryí do inhibitoru/DMSO	přenesení embryí z inhibitoru/DMSO do KSOM	fixace embryí	kapitola
4EGI-1	100 μ M	E2,5 + 4h	-	E3,0 + 5h	4.4
4EGI-1	100 μ M	E2,5 + 6h	E2,5 + 11h	E3,0 + 5h	4.4
Torin 1	20 μ M	E2,5 + 6h	E2,5 + 11h	E3,0 + 5h	4.4
Torin 1	20 μ M	E2,5 + 4h	-	E2,5 + 9h	4.1 a 4.3
Torin 1	20 μ M	E2,5 + 4h	-	E3,5	4.6

Alespoň 4 hodiny před přenesením embryí z KSOM do KSOM s inhibitorem/DMSO byly připraveny kultivační misky s 20 kapkami KSOM s přidaným inhibitorem/DMSO, překrytými minerálním olejem, pro experimentální/kontrolní skupinu. Misky byly kultivovány v inkubátoru při teplotě 37 °C a 5% obsahu CO₂ v atmosféře pro ustálení požadovaného pH a teploty.

V požadovaném vývojovém stádiu (viz tabulka 2) byla embrya přenesena na kultivační misky s požadovanou koncentrací inhibitoru/DMSO, byla promyta minimálně přes 6 kapek média a kultivována v inkubátoru při teplotě 37 °C a 5% obsahu CO₂ v atmosféře.

Pokud experiment vyžadoval, aby byla embrya z média s inhibitorem/DMSO přenesena zpět do čistého KSOM, byly alespoň 4 hodiny předem připraveny nové kultivační misky podle postupu uvedeného v kapitole 3.2.

3.3 Fixace a standardní imunofluorescenční protilátkové barvení

Alespoň 30 minut před začátkem fixace byly připraveny misky pro odstranění *zona pellucida* a 96-jamková destička. Na polovinu kultivační misky bylo napipetováno 13 kapek média M2, na druhou polovinu misky bylo napipetováno 10 kapek kyseliny Tyrode's (AT; Sigma) a kapky byly překryty minerálním olejem. Takto připravené misky byly nahřáty na teplotu 37 °C. Na dno první jamky 96-jamkové destičky byl napipetován 1,5% agar, na který bylo po jeho ztuhnutí napipetován 4% paraformaldehyd (PFA; Santa Cruz Biotechnology) a to bylo překryto několika kapkami minerálního oleje. Destička poté byla přikryta alobalem a nahřáta na teplotu 37 °C.

Po dosažení požadovaného vývojového stádia byla z embryí pomocí krátkých inkubací v kapkách AT odstraněna *zona pellucida* a následně byla embrya promyta v médiu M2. Bezprostředně poté byla embrya fixována a imunofluorescenčně barvena v 96-jamkových destičkách (maximálně 25 embryí na jednu jamku). Pro zafixování embryí bylo na jednu

jamku použito 50 μ l 4% PFA překryté malým množstvím minerálního oleje a předeřtáé na teplotu 37 °C, kterému byla embrya vystavena po dobu 20 minut. Poté byla embrya promyta přes tři 70 μ l kapky PBST (fosfátem puřrovaný fyziologický roztok s 0.15% Tween 20) a ve třetí kapce 20 minut ponechána při pokojové teplotě. Následně byla embrya (při pokojové teplotě) na 20 minut umístěna do 50 μ l 0.5% tritonu-X100 (Sigma-Aldrich) v PBS (fosfátem puřrovaný fyziologický roztok), načež byla promyta přes tři nové, 70 μ l kapky PBST a v poslední z nich ponechána, opět při pokojové teplotě. Po uplynutí 20 minut byla embrya na 30 minut přenesena do 50 μ l 3% BSA (sérum hovězího albuminu; Sigma-Aldrich) v PBST, ve kterém byla ponechána při 4 °C. Z BSA byla embrya přenesena do 5 μ l kapky primární protilátky naředěné v BSA a překryté 100 μ l minerálního oleje. V primární protilátce byla embrya skladována v naprosté tmě po dobu 15-18 hodin při 4°C.

Po dokončení barvení primární protilátkou byla embrya promyta přes tři 70 μ l kapky PBST a v poslední kapce byla ponechána 20 minut při pokojové teplotě. Následně byla přemístěna do 50 μ l 3% BSA, ve kterém byla uchována při 4 °C po dobu 30 minut. Následovalo hodinové barvení v 5 μ l kapce sekundární protilátky, překryté 100 μ l minerálního oleje. Stejně jako během barvení primární protilátkou probíhalo i toto barvení v naprosté tmě při teplotě 4 °C. Po uplynutí jedné hodiny byla embrya opět promyta přes tři 70 μ l kapky PBST a v poslední kapce 20 minut ponechána. Nakonec byla embrya barvena na DAPI tak, že byla přenesena do malých kapek Vectashieldu (Vector) na nové kultivační misce, která byla následně uchována při teplotě -21°C po dobu minimálně 40 minut a maximálně tří dnů. Během celé fixace bylo dbáno na to, aby byla embrya co nejméně vystavena světelnému záření. Zjednodušený přehled fixace a protilátkového barvení naleznete v tabulce 3. Přehled použitých protilátek a jejich ředění je uveden v tabulce 4.

Tab. 3: Zjednodušený přehled fixace a protilátkového barvení.

chemikálie	čas	teplota
PFA	20 min	37 °C
PBST	20 min	pokojová
Triton	20 min	pokojová
PBST	20 min	pokojová
BSA	30 min	4 °C
primární protilátka	15-18 h	4 °C
PBST	20 min	pokojová
BSA	30 min	4 °C
sekundární protilátka	1 h	4 °C
PBST	20 min	pokojová
Vectashield	40 min-3 dny	-21 °C

Tab. 4: Přehled použitých primárních protilátek a jejich kombinace se sekundárními protilátkami

primární protilátka	BSA: primární protilátce	sekundární protilátka	BSA: sekundární protilátce	fixace	číslo kapitoly
králičí anti-Phospho-4E-BP1 (Thr37/46) (Cell Signaling Technology, 9459)	50:1	oslí protilátka proti králičím IgG Alexa Fluor 647 (Abcam, ab150075)	500:1	E2,5 + 9h	4.1.1
králičí anti-4E-BP1 (53H11) mAb (Cell Signaling Technology, 9644)	50:1	oslí protilátka proti králičím IgG Alexa Fluor 647 (Abcam, ab150075)	500:1	E2,5 + 9h	4.1.2
králičí anti-Phospho-4E-BP1 (Thr70) (Cell Signaling Technology, 9455)	50:1	oslí protilátka proti králičím IgG Alexa Fluor 647 (Abcam, ab150075)	500:1	E2,5 + 9h; E3,0 + 9h	4.1.5; 4.2
králičí anti-Phospho-4E-BP1 (Ser65) (Cell Signaling Technology, 9451)	50:1	oslí protilátka proti králičím IgG Alexa Fluor 647 (Abcam, ab150075)	500:1	E2,5 + 9h; E1,75; E2,25; E3,0 + 9h; E3,5 + 9h	4.1.7; 4.2
králičí anti-Phospho-4E-BP1 (Thr37/46) (236B4) mAb (Cell signaling Technology, 2855)	200:1	oslí protilátka proti králičím IgG Alexa Fluor 647 (Abcam, ab150075)	500:1	E2,5 + 9h	4.1.9
králičí anti-Phospho-4E-BP1 (Thr37/46) (236B4) mAb (Cell signaling Technology, 2855)	100:1	oslí protilátka proti králičím IgG Alexa Fluor 647 (Abcam, ab150075)	500:1	E2,5 + 9h	4.1.9
králičí anti-Phospho-S6 Ribosomal Protein (Ser235/236) (D57.2.2E) XP® (Cell Signaling, 4858)	100:1	oslí protilátka proti králičím IgG Alexa Fluor 647 (Abcam, ab150075)	500:1	E2,5 + 9h	4.3.1
králičí anti-Phospho-S6 Ribosomal Protein (Ser235/236) (D57.2.2E) XP® (Cell Signaling, 4858)	50:1	oslí protilátka proti králičím IgG Alexa Fluor 647 (Abcam, ab150075)	500:1	E2,5 + 9h	4.3.1.
králičí anti-eIF4G (Cell Signaling, 2498)	100:1	oslí protilátka proti králičím IgG Alexa Fluor 647 (Abcam, ab150075)	500:1	E2,5 + 9h	4.3.3
králičí anti-Phospho-eIF4G (Ser1108) (Cell Signaling Technology, 2441)	100:1	oslí protilátka proti králičím IgG Alexa Fluor 647 (Abcam, ab150075)	500:1	E2,5 + 9h	4.3.4
králičí anti-Phospho-mTOR (Ser2448) (D9C2) XP® mAb (Cell	50:1	oslí protilátka proti králičím IgG Alexa Fluor 647 (Abcam, ab150075)	500:1	E2,5 + 9h	4.3.5

Signaling Technology, 5536)					
myší anti-Phospho-eIF4E (Ser209) (Cell Signaling Technology, 9741)	100:1	oslí protilátka proti myším IgG Alexa Fluor 647 (Abcam, ab150107)	500:1	E2,5 + 9h	4.3.6
X	X	oslí protilátka proti králíčím IgG Alexa Fluor 647 (Abcam, ab150075)	500:1	E2,5 + 9h	4.3.7
králíčí anti-DDX21 (BSA Free) (Novus Biologicals)	100:1	oslí protilátka proti králíčím IgG Alexa Fluor 647 (Abcam, ab150075)	500:1	E2,5 + 9h	4.5
myší anti-CDX2 mAb (Biogenex)	200:1	oslí protilátka proti myším IgG Alexa Fluor 647 (Abcam, ab150107)	500:1	E3,5	4.6.1; 4.6.5
myší anti-YAP1 (63.7): sc-101199 mAb (Santa Cruz Biotechnology)	100:1	oslí protilátka proti myším IgG Alexa Fluor 647 (Abcam, ab150107)	500:1	E3,5	4.6.2; 4.6.5
kryší anti-Cytokeratin 8, clone TROMA-1 mAb (Sigma-Aldrich)	100:1	oslí protilátka proti kryší Alexa Fluor 488 (Invitrogen, A21208)	500:1	E3,5	4.6.3
králíčí anti-(sc-216) PKC ζ (C-20) (Santa Cruz Biotechnology)	200:1	oslí protilátka proti králíčí Alexa Fluor 555 (Invitrogen, A21572)	500:1	E3,5	4.6.4
králíčí anti-AMOT 10061-1 (dar od H. Sasakiho)	100:1	oslí protilátka proti králíčí Alexa Fluor 488 (Abcam, ab150073)	500:1	E3,5	4.6.5

3.4 Fixace a barvení Oregon Green 488 Phalloidinem

Příprava M2/AT misek, příprava 96-jamkové destičky a zbavení embryí zóny pellucidy probíhalo tak, jak je popsáno v kapitole 3.4. Pro zafixování embryí bylo na jednu jamku použito 50 µl 4% PFA překrytého malým množstvím minerálního oleje a předeřtáče na teplotu 37 °C, kterému byla embrya vystavena po dobu 20 minut. Poté byla embrya promyta přes tři 70µl kapky PBST a ve třetí kapce 20 minut ponechána při pokojové teplotě. Následně byla embrya (při pokojové teplotě) na 20 minut umístěna do 50 µl 0.5% tritonu-X100 v PBS, načež byla promyta přes tři nové, 70µl kapky PBST a v poslední z nich ponechána, opět při pokojové teplotě. Po uplynutí 20 minut byla embrya na 30 minut přenesena do 5µl kapky Oregon Green 488 Phalloidinu (O7466, ThermoFisher Scientific), naředěného v PBST v poměru 1:50, překryté 100 µl minerálního oleje a byla ponechána při pokojové teplotě. Po dokončení barvení Oregon Green 488 Phalloidinem byla embrya promyta přes tři 70µl kapky PBST a v poslední kapce byla ponechána 20 minut při pokojové teplotě. Nakonec byla embrya barvena na DAPI tak, že byla přenesena do malých kapek Vectashieldu (Vector) na nové kultivační misce, která byla následně uchovávána při teplotě -21 °C po dobu minimálně 40 minut a maximálně tři dnů. Během celé fixace bylo dbáno na to, aby byla

embrya co nejméně vystavena světelnému záření. Zjednodušený přehled fixace a barvení Oregon Green 488 Phalloidinem naleznete v tabulce 5.

Tab. 5: Zjednodušený přehled fixace a barvení Oregon Green 488 Phalloidinem.

chemikálie	čas	teplota
PFA	20 min	37 °C
PBST	20 min	pokožová
Triton	20 min	pokožová
PBST	20 min	pokožová
PBST	20 min	pokožová
Oregon Green 488 Phalloidin	30 min	pokožová
PBST	20 min	pokožová
Vectashield	40 min-3 dny	-21 °C

3.5 Fixace a imunofluorescenční barvení primární a sekundární protilátkou v kombinaci s barvením Oregon Green 488 phalloidinem

Fixace i barvení probíhalo podle postupu popsáném v kapitole 3.3 až do promytí embryí ve třech kapkách PBST po barvení sekundární protilátkou. Po uplynutí 20 minut v PBST byla embrya 30 minut barvena v 5 μ l kapce Oregon Green 488 Phalloidinu (O7466, ThermoFisher Scientific) naředěného v PBST, překryté 100 μ l minerálního oleje a byla ponechána při pokojové teplotě. Po dokončení barvení Oregon Green 488 Phalloidinem byla embrya promyta přes tři 70 μ l kapky PBST a v poslední kapce byla ponechána 20 minut při pokojové teplotě. Nakonec byla embrya barvena na DAPI tak, že byla přenesena do malých kapek Vectashieldu (Vector) na nové kultivační misce, která byla následně uchovávána při teplotě -21 °C po dobu minimálně 40 minut a maximálně tři dnů. Během celé fixace bylo dbáno na to, aby byla embrya co nejméně vystavena světelnému záření.

3.6 Konfokální mikroskopie

Pro skenování v konfokálním mikroskopu bylo připravena skenovací miska. Na otvor v misce bylo lakem na nehty přilepeno krycí sklíčko a na něj byly poté napipetovány čtyři malé kapky PBST, které byly následně překryty minerálním olejem. Do kapek PBST byla z Vectashieldu přenesena embrya (maximálně 5 embryí do jedné kapky) a miska byla umístěna do konfokálního mikroskopu Olympus FLUOVIEW FV10i. Embrya byla skenována pomocí laserů vhodných pro použité sekundární protilátky, phalloidin a membránový signál mTmG embryí.

3.7 Analýza dat a tvorba grafů

Pro experimenty, které to vyžadovaly, byly počítány buňky v jednotlivých embryích v programu FV10-ASW 4.2 Viewer (Olympus). Intenzita fluorescence byla kvantifikována v programu Fiji (Schindelin et al., 2012) jako tzv. upravená celková buněčná fluorescence (CTCF, z anglického corrected total cell fluorescence, vypočítaná z naměřených hodnot jako: integrated density – (area of cell x mean fluorescence of background)). Pro měření objektů s odlišnou velikostí byly hodnoty CTCF ještě normalizovány na velikost objektu. Grafy byly vytvořeny v programu RStudio (<https://posit.co/>) s výjimkou sloupcových diagramů, které byly vytvořeny v programu Microsoft Excel a následně byly graficky upraveny v programu Inkscape (<https://inkscape.org/>). Krabicové diagramy s vizualizovanými jednotlivými naměřenými hodnotami byly vytvořeny pomocí R skriptu jako například:

```
> boxplot(data=ddx, value~category, col="white")
> stripchart(data=ddx,value~category,method = "jitter", pch = 20, col =
c("grey","orange",vertical = TRUE,add = TRUE)
```

Houslové diagramy s vizualizovanými jednotlivými naměřenými hodnotami byly vytvořeny pomocí R skriptu jako například:

```
> vioplot(data=tegr, value~category,h=0.2,col=("white"), drawRect=FALSE)
> beeswarm(data=tegr, value~category, method = "compactswarm", col = "blue",vertical =
TRUE, pch = 19, cex=0.8, add = TRUE)
```

Způsob vyhodnocování výsledků bude pro lepší srozumitelnost detailněji popsán u jednotlivých experimentů v kapitole 4. Statistické testy byly provedeny v programu R Studio. Nejdříve byla u každého datasetu testována normalita distribuce pomocí Shapiro testu a v případě normality distribuce obou porovnávaných datasetů byly porovnány pomocí Studentova t-testu a v případě zamítnutí normální distribuce alespoň u jednoho datasetu byly porovnány pomocí Mann-Whitney U testu.

4. Výsledky

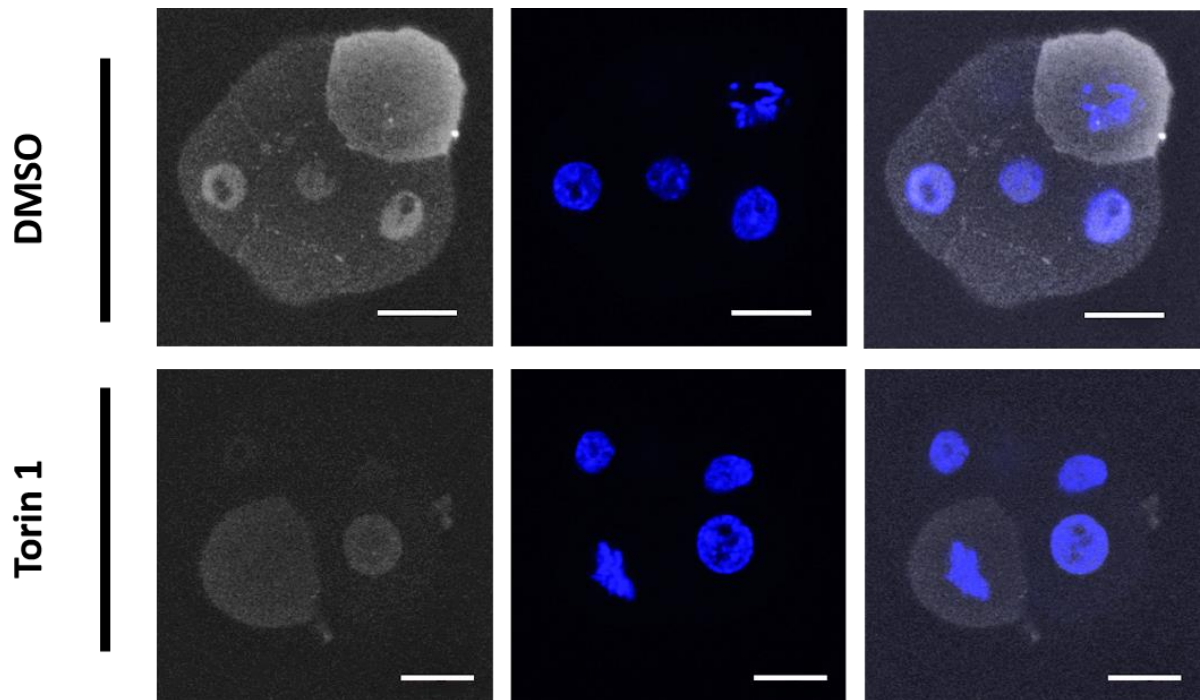
Předchozí výsledky v naší laboratoři ukázaly, že inhibice mTOR signální dráhy během dělení z 8 na 16 buněk u myších preimplantačních embryí má za následek signifikantně nižší počet vnitřních buněk v 16buněčných embryích (Gahurova et al., manuskript v přípravě). V této práci jsme chtěli dokázat, že je zjištěný fenotyp způsoben vlivem mTOR dráhy na regulaci translace (a ne působením mTOR signalizace na jiné buněčné funkce). Rovněž jsme chtěli zjistit, jaký má vliv snížený počet buněk v 16buněčném stádiu na pozdější vývoj embrya, konkrétně na 32buněčné stádium.

4.1 Fluorescenční barvení a analýzy intenzity fluorescenčního barvení za použití protilátek (Phospho-)4E-BP1

Postupem popsaným v kapitole 3.1 byla získána myší embrya ve stádiu dvou buněk a následně byla inkubována do stádia osmi buněk v E2,5 + 4h v médiu KSOM (rovněž popsáno v kapitole 3.1). Po dosažení tohoto stádia byla embrya přenesena do KSOM média s inhibítorem Torin 1 nebo do KSOM média se stejným objemem DMSO pro kontrolní embrya. Následně byla kultivována do období dělení z 8buněčného na 16buněčné stádium v E2,5 + 9h (popsáno v kapitole 3.2). Poté byla embrya fluorescenčně barvena (popsáno v kapitole 3.3) a skenována na konfokálním mikroskopu (popsáno v kapitole 3.6).

4.1.1 Fluorescenční barvení protilátkou anti-Phospho-4E-BP1 (Thr37/46)

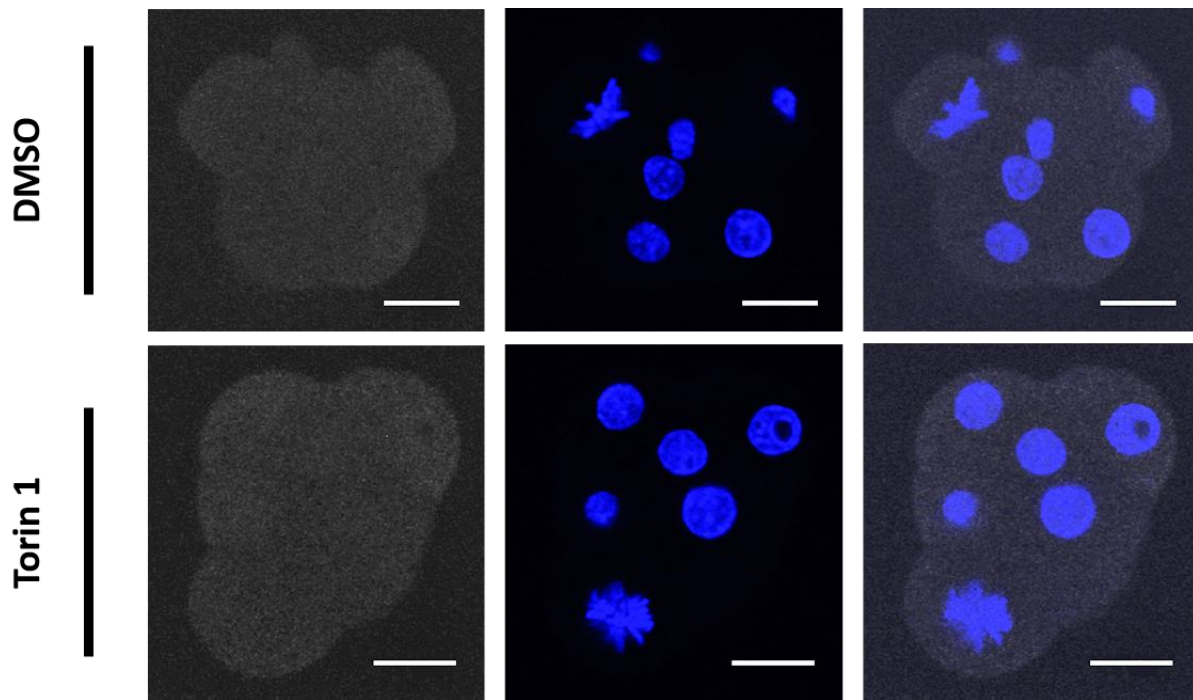
Jako první primární protilátka byla použita anti-Phospho-4E-BP1 (Thr37/46) (ředěná 1:50), v kombinaci se sekundární oslí protilátkou proti králičím IgG Alexa Fluor 647 (ředěnou 1:500). Tato primární protilátka je specifická pro fosforylační místa Thr 37/46 proteinu 4E-BP1, což znamená, že se specificky váže pouze na jeho fosforylovanou formu. Na obrázku 6 je ukázkový příklad jejího barvení. V souladu s naším předpokladem byla pozorována vyšší intenzita fluorescenčního barvení v dělicích se buňkách než v buňkách interfázních, což znamená přítomnost vyššího množství fosforylovaného 4E-BP1 během buněčného dělení. Rovněž je zde patrný rozdíl mezi inhibovanými a neinhibovanými embryi, přičemž v těch inhibovaných došlo k viditelnému poklesu fluorescence, což ukazuje na pokles množství fosforylovaného 4E-BP1. Z toho usuzujeme, že během dělení je skutečně aktivní mTOR signalizace, která fosforyluje 4E-BP1, a tím umožňuje iniciačnímu faktoru eIF4E vytvořit translační iniciační komplex a zahájit translaci.



Obr. 6: Fosforylovaný 4E-BP1 během dělení ze stádia 8 na stádium 16 buněk. Jako primární protilátka byla použita anti-Phospho-4E-BP1 (Thr37/46) (ředěná 1:50) a jako sekundární oslí protilátka proti králičím IgG Alexa Fluor 647 (ředěná 1:500). Bíle je znázorněn p4E-BP1, modře je znázorněna jaderná DNA (Vectashield). V neinhibovaném embryu můžeme pozorovat výraznější barvení v dělicí se buňce, oproti buňkám interfázním. V inhibovaném embryu je barvení méně výrazné, než je tomu u neinhibovaného embrya, ale rovněž je možné si povšimnout výraznějšího barvení v dělicí se buňce. Velikost měřítka je 20 μ m.

4.1.2 Fluorescenční barvení protilátkou anti-4E-BP1 (53H11)

Pro další experiment byla použita primární protilátka anti-4E-BP1 (53H11) (ředěná 1:50), barvící všechny formy 4E-BP1, tedy jak fosforylované, tak nefosforylované. Jako sekundární protilátka k ní byla použita oslí protilátka proti králičím IgG Alexa Fluor 647 (ředěná 1:500). Chtěli jsme zjistit, jestli změny ve množství p4E-BP1 nesouvisejí se změnami v množství celkového 4E-BP1. Z obrázku 7 je patrné, že mezi dělicími se a nedělicími se buňkami, ani mezi inhibovanými a neinhibovanými embryi nebyly na první pohled patrné žádné rozdíly v intenzitě fluorescence. To by mohlo znamenat, že během buněčného cyklu nedochází k změnám celkového množství 4E-BP1 a mění se pouze množství jeho fosforylované formy.



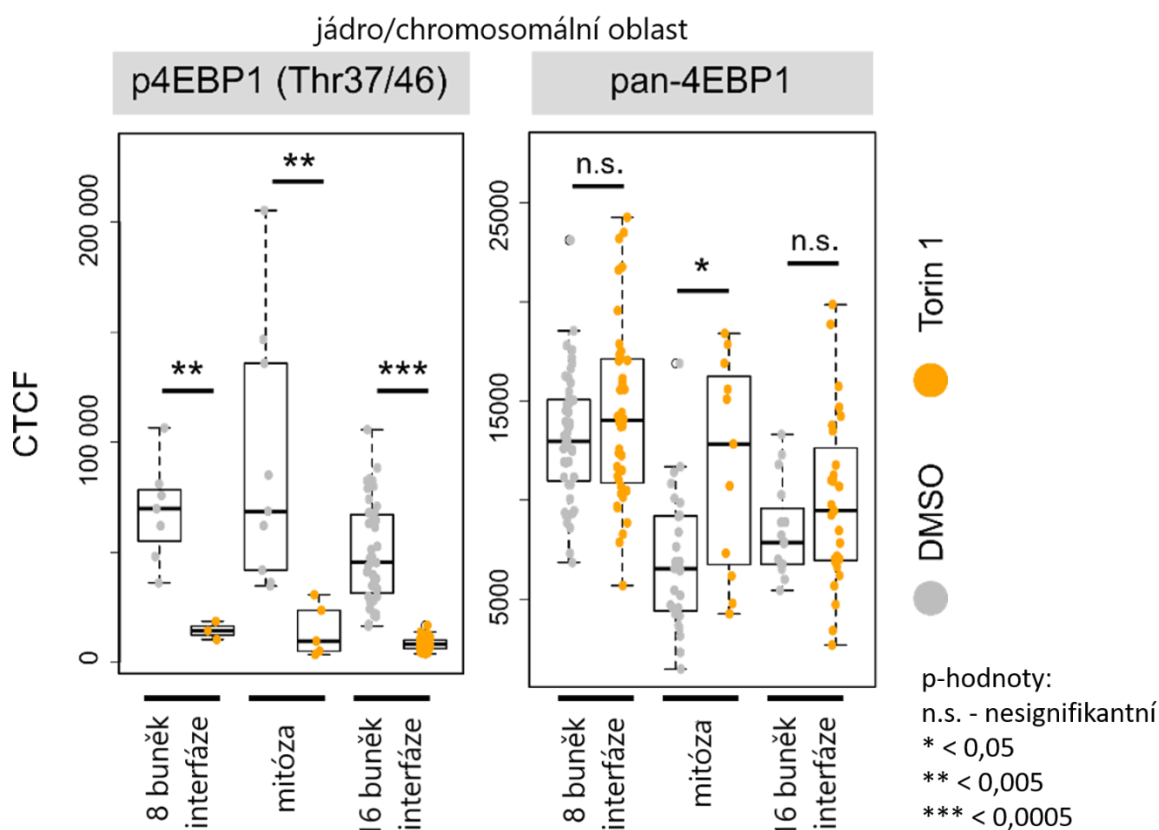
Obr. 7: Celkový 4E-BP1 během dělení ze stádia 8 na stádium 16 buněk. Jako primární protilátka byla použita anti-4E-BP1 (53H11) (ředěná 1:50) a jako sekundární oslí protilátka proti králičím IgG Alexa Fluor 647 (ředěná 1:500). Bíle je znázorněn 4E-BP1, jehož barvení je bohužel velice slabé, modře je znázorněna jaderná DNA (Vectashield). Na první pohled zde není patrný rozdíl mezi dělicími se a nedělicími se buňkami, ani mezi inhibovanými a neinhibovanými embryi, což znamená, že v průběhu buněčného cyklu pravděpodobně nedochází ke změnám v množství celkového 4E-BP1. Velikost měřítka je 20 μ m.

4.1.3 Analýza intenzity fluorescence při použití protilátek anti-Phospho-4E-BP1 (Thr37/46) a anti-4E-BP1 (53H11)

Aby bylo možné vyvodit z výsledků imunofluorescenčních barvení konkrétní závěry a potvrdit naše pozorování změn barvení v závislosti na buněčném cyklu a inhibici mTOR dráhy, musela být data z provedených fluorescenčních barvení kvantifikována v programu Fiji a dále zpracována. U obou použitých protilátek byla porovnána intenzita fluorescence v jednotlivých interfázních buňkách 8buněčných a 16buněčných embryí a během mitotického dělení mezi inhibovanými a neinhibovanými embryi (viz obrázek 8).

Inhibice mTOR signální dráhy inhibitorem Torin 1 nezpůsobila signifikantní rozdíly v množství celkového 4E-BP1 (značeného protilátkou anti-4E-BP1 (53H11)) v interfázích jádrech 8buněčných (p-hodnota = 0,163) a 16buněčných embryí (p-hodnota = 0,159). Překvapivě ale způsobila nárůst celkového 4E-BP1 během mitózy, v porovnání s neinhibovanými embryi (p-hodnota = 0,014). Tato inhibice dále vedla k signifikantnímu snížení fosforylované formy 4E-BP1 proteinu (značeného protilátkou anti-Phospho-4E-BP1 (Thr37/46)) během mitotického dělení (p-hodnota = 0,0047) a rovněž v interfázních jádrech 8buněčného (p-hodnota = 0,0006) i 16buněčného embryonálního stádia (p-hodnota = 2,2 x

10^{-16}). Na základě těchto dat jsme potvrdili naše pozorování, že množství celkového 4E-BP1 se po inhibici mTOR dráhy mění jen minimálně, zatímco u anti-4E-BP1 (53H11) je zjevné signifikantní snížení po inhibici mTOR dráhy. To dokazuje naši hypotézu, že během dělení z 8 na 16 buněk je aktivní translace regulovaná aktivitou mTOR signalizace.

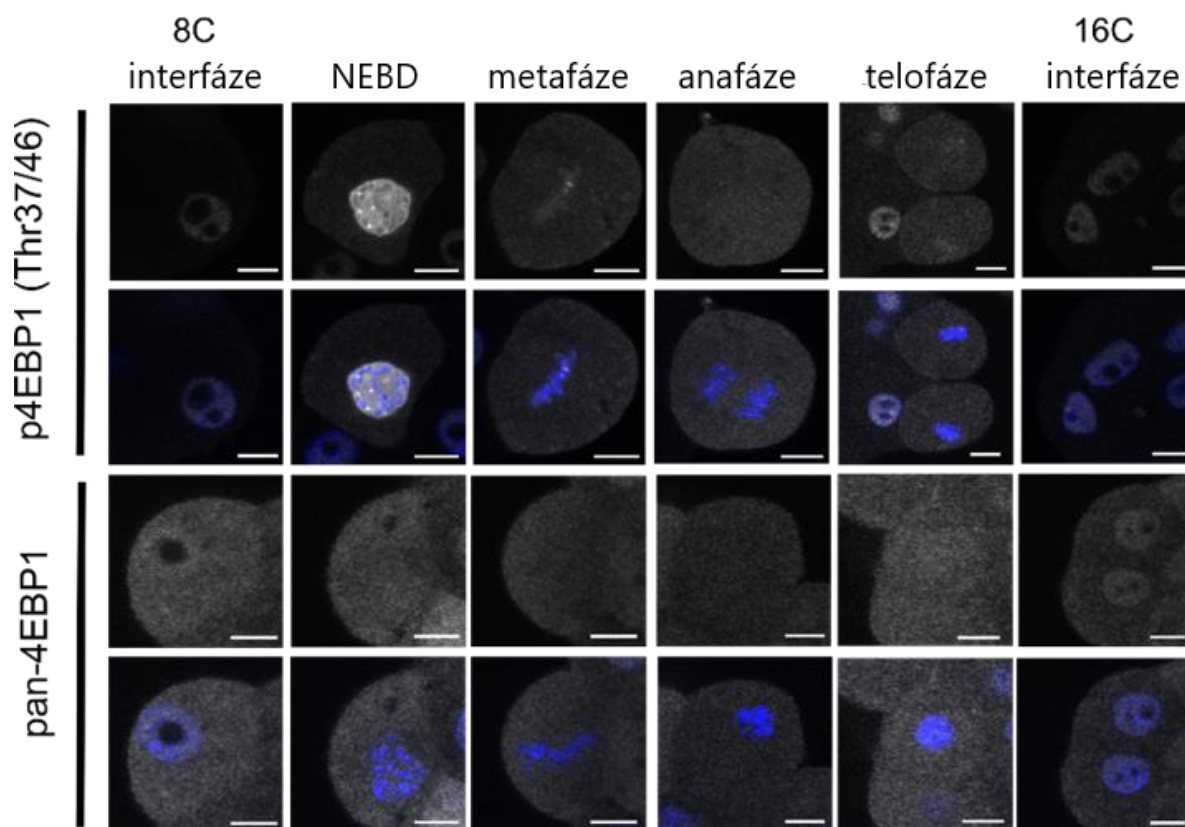


Obr. 8: Rozdíly v intenzitě fluorescenčního barvení fosforylované a nefosforylované formy 4E-BP1 proteinu v buněčných jádrech od stádia osmi do stádia šestnácti buněk mezi inhibovanými a neinhibovanými embryi. Sekce p4EBP1 (Thr37/46) znázorňuje fosforylovanou formu 4E-BP1. Z grafu lze vyčíst, že v interfázních jádrech inhibovaných 8buněčných a 16buněčných embryí došlo k signifikantnímu poklesu intenzity fluorescence p4E-BP1, a že k podobnému poklesu došlo rovněž během mitotického dělení mezi těmito dvěma embryonálními stádii. V sekci pan-4EBP1 je znázorněna síla fluorescence celkového množství proteinu 4E-BP1. V interfázních jádrech 8buněčných a 16buněčných embryí neměla na tuto intenzitu inhibice Torinem 1 signifikantní vliv. Je ale zajímavé, že během mitotického dělení došlo v inhibovaných embryích ke zvýšení této intenzity oproti embryích neinhibovaným. Intenzita fluorescence je v jednotkách CTCF (corrected total cell fluorescence).

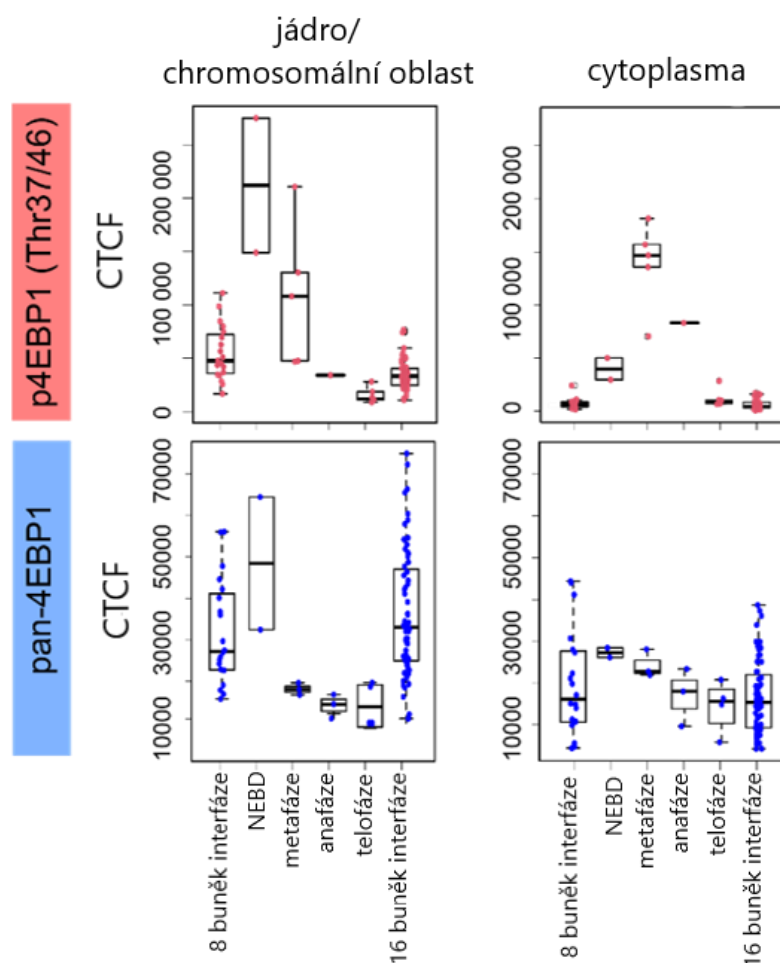
4.1.4 Změny hladin fosforylovaného 4E-BP1 v závislosti na fázi buněčného cyklu

Jelikož se při barvení protilátkami anti-Phospho-4E-BP1 (Thr37/46) a anti-4E-BP1 (53H11) podařilo v kontrolních embryích zachytit všechny fáze buněčného dělení (obrázek 9), bylo díky kvantifikaci intenzity fluorescence možné analyzovat aktivitu fosforylace

4E-BP1 během celého buněčného cyklu (obrázek 10). Intenzita fluorescence byla kvantifikována samostatně pro jádro v interfázních buňkách nebo oblast chromozomů během mitózy, a samostatně pro cytoplazmu. Bylo zjištěno, že množství celkového 4E-BP1 v buňkách je stabilní, ale v závislosti na fázi buněčného cyklu se mění hladiny jeho fosforylované formy. Nejvyšší hladiny p4E-BP1 dosahují buňky na začátku mitotického dělení, kdy dochází k prudkému nárůstu fosforylace. Během dalších fází mitózy dochází k postupnému snižování p4E-BP1.



Obr. 9: Porovnání interfázních jader v 8buněčném a 16buněčném embryu a jednotlivých fází buněčného dělení mezi těmito embryonálními stádii. Bíle je znázorněno fluorescenční barvení 4E-BP1 proteinu za použití dvou protilátek. První protilátkou, anti-Phospho-4E-BP1 (Thr37/46) (ředěnou 1:50), byla barvena pouze fosforylovaná forma tohoto proteinu. Druhou protilátkou, anti-4E-BP1 (53H11) (ředěnou 1:50), byly barveny obě jeho formy (fosforylovaná i nefosforylovaná). Jako sekundární protilátka byla v obou případech použita oslí protilátka proti králičím IgG Alexa Fluor 647 (ředěná 1:500). Modře je znázorněna jaderná DNA (Vectashield). V embryích barvených protilátkou anti-4E-BP1 (53H11) je nápadný výraznější fluorescenční signál, který byl vzhledem k povaze použitých protilátek očekáván. Velikost měřítka je 10 μ m.

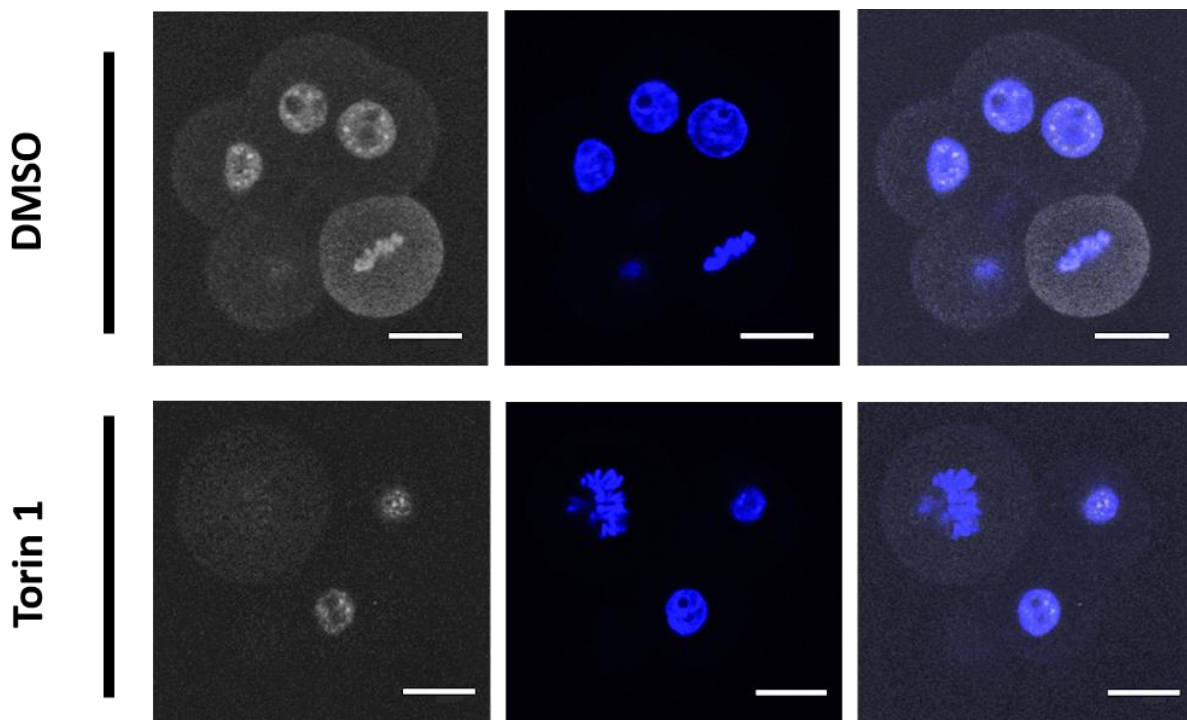


Obr. 10: Fosforylace 4E-BP1 proteinu během buněčného cyklu, analyzovaná na základě dat získaných z fluorescenčních barvení protilátkami anti-Phospho-4E-BP1 (Thr37/46) a anti-4E-BP1 (53H11). Z grafu lze vyčíst, že intenzita fluorescence celkového 4E-BP1 v buňkách se v průběhu buněčného cyklu nemění, ale dochází pouze ke změnám v intenzitě fluorescenčního barvení jeho fosforylované formy. K prudkému nárůstu fosforylovaného 4E-BP1 dochází na začátku mitotického dělení a během dalších fází mitózy se toto množství postupně snižuje. Intenzita fluorescence je v jednotkách CTCF (corrected total cell fluorescence).

4.1.5 Fluorescenční barvení protilátkou anti-Phospho-4E-BP1 (Thr70)

Pro ověření našich výsledků s protilátkou značící p4E-BP1 Thr37/46 jsme chtěli zjistit, zda značení specifické pro 4E-BP1 fosforylované na jiném místě bude vést ke stejnému zbarvení a rozdílu mezi interfázními a mitotickými buňkami. Rovněž nás zajímalo, zda povede k poklesu fluorescence u embryí s inhibovanou mTOR dráhou. Předpokládali jsme, že výsledné barvení bude podobné jako u anti-Phospho-4E-BP1 (Thr37/46), protože protein 4E-BP1 potřebuje být fosforylován na všech místech, aby přestal vázat translační iniciační faktor eIF4E (Gingras et al., 1999b; Gingras et al., 2001b). Jako další primární protilátka proti fosforylované formě proteinu 4E-BP1 byla použita anti-Phospho-4E-BP1 (Thr70) (ředěná

1:50), v kombinaci se sekundární oslí protilátkou proti králičím IgG Alexa Fluor 647 (ředěnou 1:500). Tato primární protilátka je specifická pro fosforylační místo Thr 70 proteinu 4E-BP1, což znamená, že se specificky váže pouze na jeho fosforylovanou formu v místě Thr 70. Na obrázku 11 je ukázkový příklad jejího barvení. Stejně jako u protilátky anti-Phospho-4E-BP1 (Thr37/46) byla i zde pozorována vyšší intenzita fluorescenčního barvení v dělicích se buňkách než v buňkách interfázních a taktéž byla pozorována vyšší intenzita fluorescenčního barvení v kontrolních embryích, než v embryích inhibovaných Torinem 1.

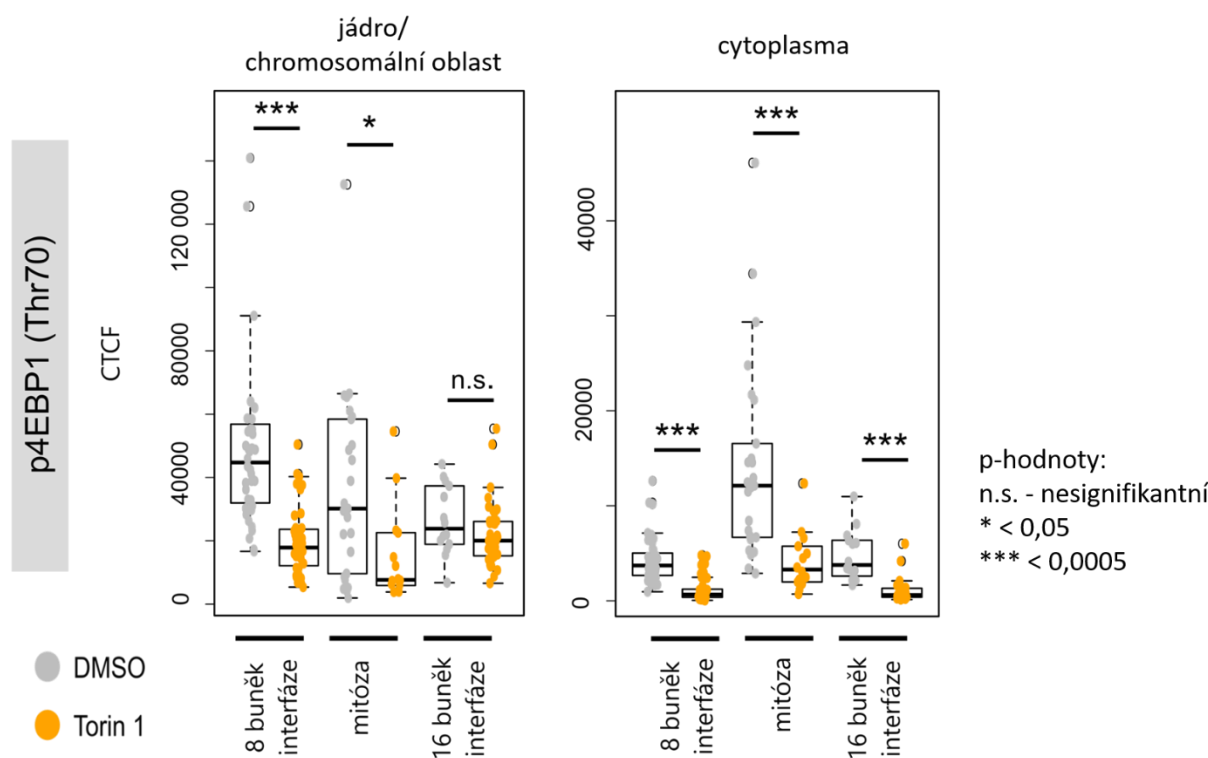


Obr. 11: Fosforylovaný 4E-BP1 během dělení ze stádia 8 na stádium 16 buněk. Jako primární protilátka byla použita anti-Phospho-4E-BP1 (Thr70) (ředěná 1:50) a jako sekundární oslí protilátka proti králičím IgG Alexa Fluor 647 (ředěná 1:500). Bíle je znázorněn p4E-BP1, modře je znázorněna jaderná DNA (Vectashield). V neinhibovaném embryu můžeme pozorovat výraznější barvení v dělicí se buňce, oproti buňkám interfázním. V inhibovaném embryu je barvení méně výrazné, než je tomu u neinhibovaného embrya, a rozdíl mezi dělicí se buňkou a nedělicími se buňkami je stěží pozorovatelný. Velikost měřítka je 20 μ m.

4.1.6 Analýza intenzity fluorescence při použití protilátky anti-Phospho-4E-BP1 (Thr70)

Stejně jako u protilátky anti-Phospho-4E-BP1 (Thr37/46), byla i u protilátky anti-Phospho-4E-BP1 (Thr70) analyzována intenzita fluorescenčního barvení v programu Fiji v jednotlivých buňkách, samostatně pro jádro buněk v interfázi, pro oblast chromozomů v dělicích se buňkách a pro cytoplasmu. Kvantifikovaná intenzita fluorescence byla porovnávána mezi inhibovanými a neinhibovanými embryi ve stádiu osmi buněk, během

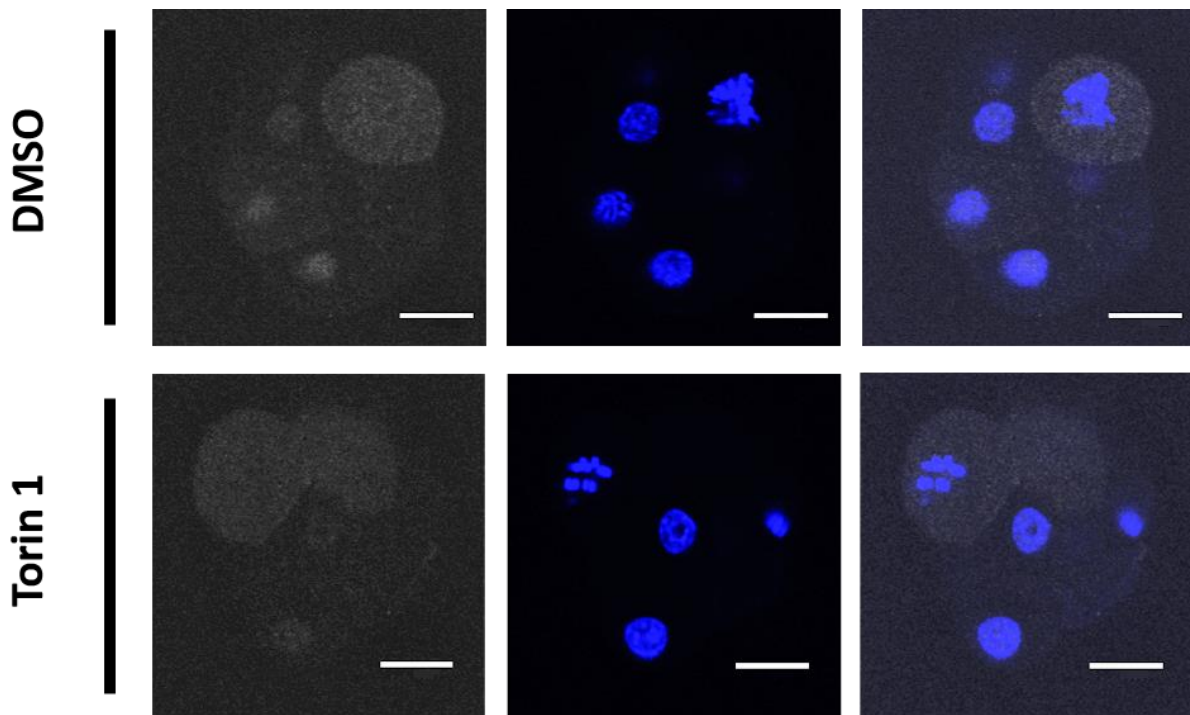
mitotického dělení, a rovněž ve stádiu šestnácti buněk (viz obrázek 12). V chromosomální oblasti byla během mitózy intenzita fluorescence u inhibovaných embryí signifikantně nižší než u neinhibovaných embryí (p-hodnota = 0,013), a stejně tomu bylo i v interfázních jádrech 8buněčného stádia (p-hodnota = $6,36 \times 10^{-12}$). V interfázních jádrech 16buněčného stádia nebyl mezi inhibovanými a neinhibovanými embryi signifikantní rozdíl (p-hodnota = 0,083). V cytoplasmě byla u inhibovaných embryí signifikantně nižší intenzita fluorescence ve všech třech porovnávaných skupinách (p-hodnota = $7,7 \times 10^{-12}$ pro jádra 8buněčných embryí, p-hodnota = $2,29 \times 10^{-5}$ pro dělicí se buňky, a p-hodnota = $6,94 \times 10^{-10}$ pro jádra 16buněčných embryí). Tyto výsledky odpovídaly výsledkům protilátky anti-Phospho-4E-BP1 (Thr37/46), konkrétně nárůstu intenzity fluorescence během mitózy (pozorovatelný u zbarvení cytoplasmy) a nižší intenzitě fluorescence po inhibici mTOR dráhy.



Obr. 12: Rozdíly v intenzitě fluorescenčního barvení fosforylované formy proteinu 4E-BP1 při použití protilátky anti-Phospho-4E-BP1 (Thr70). Porovnávaná byla inhibovaná a neinhibovaná embrya ve stádiu osmi buněk, během mitotického dělení, a rovněž ve stádiu šestnácti buněk. Z grafu lze vyčíst, že v chromosomální oblasti byla během mitózy intenzita fluorescence u inhibovaných embryí signifikantně nižší než u neinhibovaných embryí. Signifikantně nižší intenzita fluorescence byla rovněž v interfázních jádrech 8buněčných inhibovaných embryí, nikoli však 16buněčných embryí. V cytoplasmě byla u inhibovaných embryí signifikantně nižší intenzita fluorescence ve všech třech porovnávaných skupinách. Intenzita fluorescence je v jednotkách CTCF (corrected total cell fluorescence).

4.1.7 Fluorescenční barvení protilátkou anti-Phospho-4E-BP1 (Ser65)

Analýza intenzity fluorescenčního signálu byla provedena také u protilátky anti-Phospho-4E-BP1 (Ser65), která se rovněž specificky váže na fosforylovanou formu 4E-BP1 proteinu, konkrétně na aminokyselině Ser 65. Stejně jako předchozí protilátky byla ředěna v BSA v poměru 1:50 a byla použita v kombinaci se sekundární oslí protilátkou proti králíčímu IgG Alexa Fluor 647, ředěnou v poměru 1:500. Podobně jako u předešlých použitých protilátek proti fosforylované formě 4E-BP1 proteinu, i zde bylo patrné výraznější barvení v neinhibovaných embryích a v dělicích se buňkách (obrázek 13).

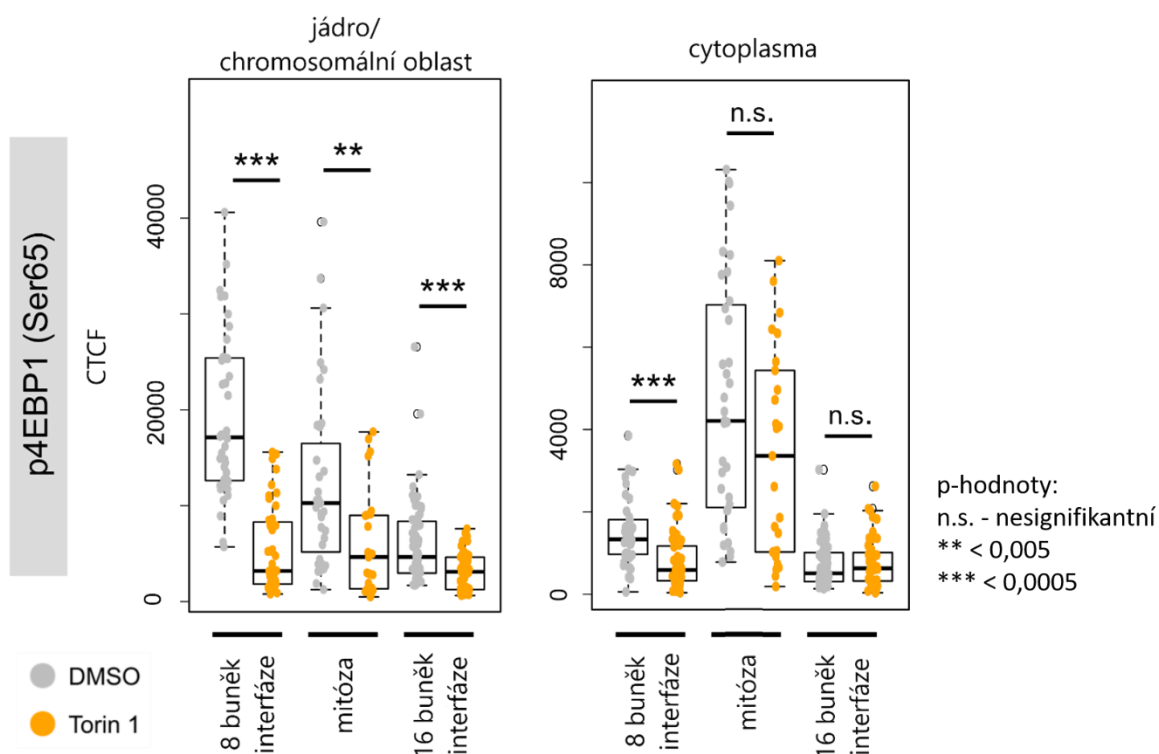


Obr. 13: Fosforylovaný 4E-BP1 během dělení ze stádia 8 na stádium 16 buněk. Jako primární protilátka byla použita anti-Phospho-4E-BP1 (Ser65) (ředěná 1:50) a jako sekundární oslí protilátka proti králíčímu IgG Alexa Fluor 647 (ředěná 1:500). Bíle je znázorněn p4E-BP1, modře je znázorněna jaderná DNA (Vectashield). V neinhibovaném embryu můžeme pozorovat výraznější barvení v dělicí se buňce, oproti buňkám interfázním. V inhibovaném embryu je barvení méně výrazné, ale rovněž je v něm patrný rozdíl mezi dělicími se a nedělicími se buňkami. Velikost měřítka je 20 μ m.

4.1.8 Analýza intenzity fluorescence při použití protilátky anti-Phospho-4E-BP1 (Ser65)

Analýza fluorescence byla prováděna zvláště v cytoplasmě a zvláště v buněčném jádře u buněk v interfázi, případně v oblasti chromosomů u dělicích se buněk, stejným způsobem jako u předchozích protilátek. Byla porovnávána inhibovaná a neinhibovaná embrya ve stádiu osmi buněk, během mitotického dělení a ve stádiu šestnácti buněk (viz obrázek 14). V chromosomální oblasti byla během mitózy intenzita fluorescence u buněk inhibovaných

embryí signifikantně nižší než u buněk neinhibovaných embryí (p -hodnota = 0,0009), a stejně tomu bylo i v interfázních jádrech 8buněčného (p -hodnota = $2,51 \times 10^{-16}$) a 16buněčného stádia (p -hodnota = $4,11 \times 10^{-5}$). V cytoplasmě byla u buněk inhibovaných embryí signifikantně nižší intenzita fluorescence pouze v 8buněčném embryonálním stádiu (p -hodnota = $5,67 \times 10^{-6}$), rozdíl ve zbylých dvou skupinách signifikantní nebyl (p -hodnota = 0,058 pro dělicí se buňky a p -hodnota = 0,547 pro jádra 16buněčných embryí). Celkově jsme ale i u této protilátky potvrdili výsledky předchozích protilátek pro p4E-BP1, i když nárůst intenzity fluorescence během mitózy byl u této protilátky také zjevný pouze v cytoplasmě.

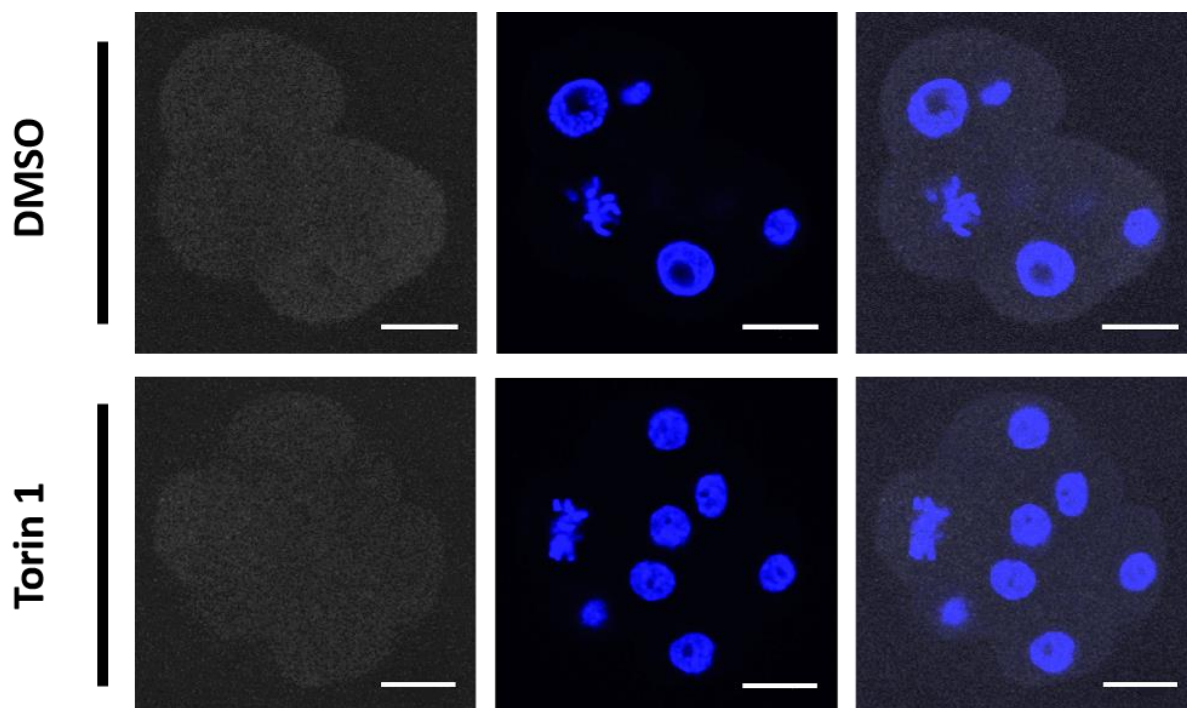


Obr. 14: Rozdíly v intenzitě fluorescenčního barvení fosforylované formy proteinu 4E-BP1 při použití protilátky anti-Phospho-4E-BP1 (Ser65). Porovnávána byla inhibovaná a neinhibovaná embrya ve stádiu osmi buněk, během mitotického dělení, a rovněž ve stádiu šestnácti buněk. V chromosomální oblasti byla během mitózy intenzita fluorescence u inhibovaných embryí signifikantně nižší než u neinhibovaných embryí. Signifikantně nižší intenzita fluorescence byla rovněž v interfázních jádrech 8buněčných a 16buněčných inhibovaných embryí. V cytoplasmě byla u inhibovaných embryí signifikantně nižší intenzita fluorescence pouze v 8buněčném embryonálním stádiu, rozdíl ve zbylých dvou skupinách signifikantní nebyl. Intenzita fluorescence je v jednotkách CTCF (corrected total cell fluorescence).

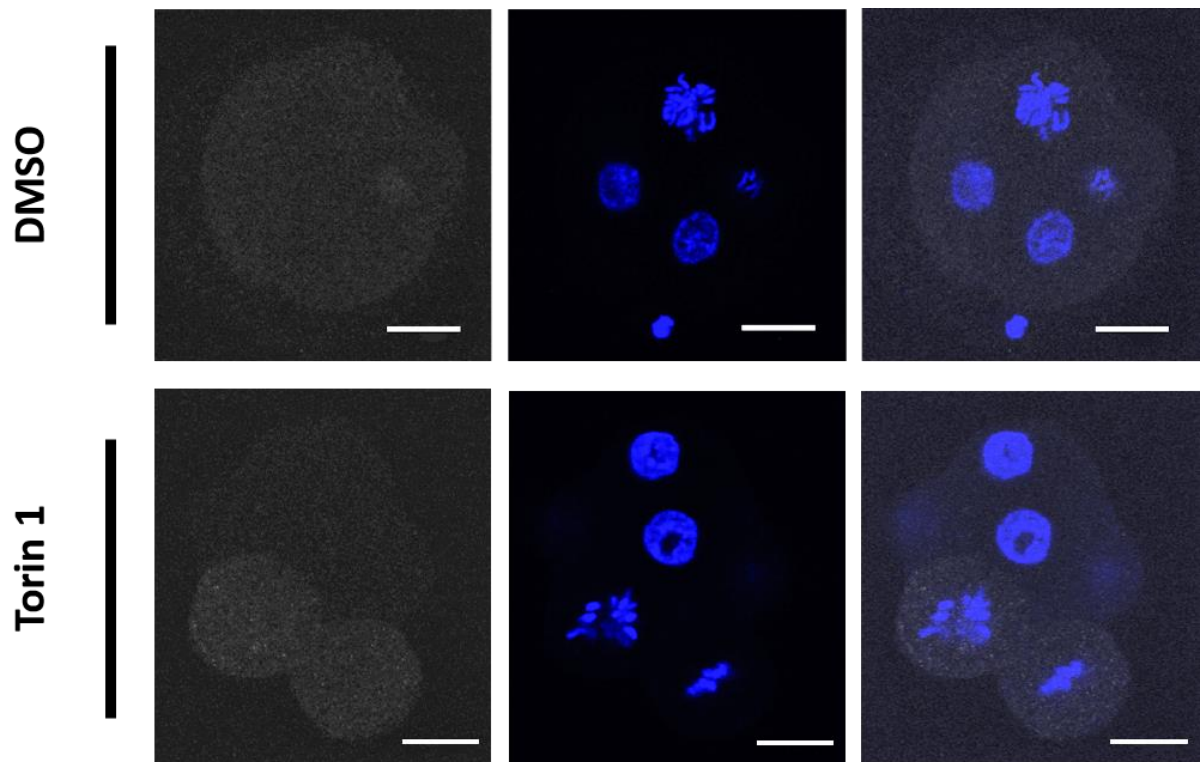
4.1.9 Fluorescenční barvení protilátkou anti-Phospho-4E-BP1 (Thr37/46) (236B4)

Poslední použitou protilátkou proti fosforylovanému 4E-BP1 byla anti-Phospho-4E-BP1 (Thr37/46) (236B4). Jedná se o protilátku specifickou pro stejné místo

jako protilátka v kapitole 4.1.1. Nejdříve byla ředěna v BSA v poměru 1:200, ale při této koncentraci bylo barvení velice slabé. Byla proto vyzkoušena koncentrace 1:100, při které bylo barvení stále slabé, ale detekovatelné. Jako sekundární protilátka byla použita oslí protilátka proti králičím IgG Alexa Fluor 647 (ředěná 1:500). Příklady fluorescenčních barvení jsou na obrázcích 15 a 16.



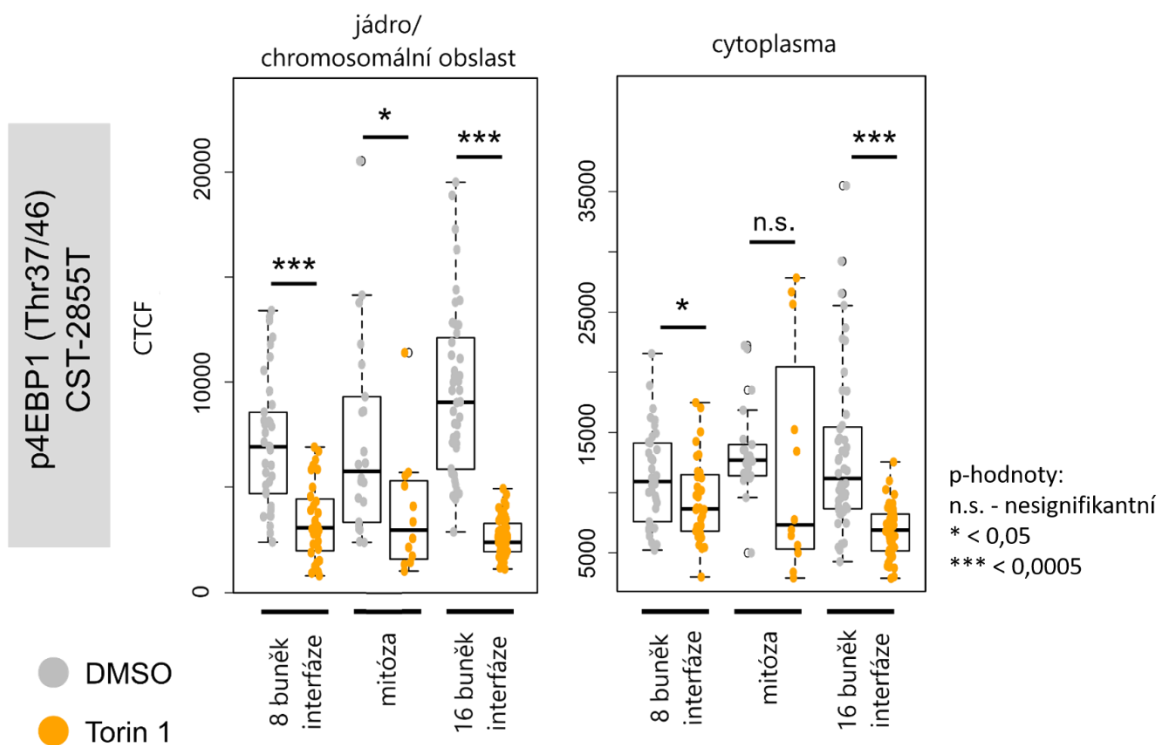
Obr. 15: Fluorescenční barvení protilátkou anti-Phospho-4E-BP1 (Thr37/46) (236B4), ředěnou v poměru 1:200. Jako sekundární protilátka byla použita oslí protilátka proti králičím IgG Alexa Fluor 647 (ředěná 1:500). Bíle je znázorněn p4E-BP1, modře je znázorněna jaderná DNA (Vectashield). Barvení p4E-BP1 bylo téměř nedetekovatelné, v důsledku čehož nebylo možné provést kvantifikaci. Velikost měřítka je 20 μ m.



Obr. 16: Fluorescenční barvení protilátkou anti-Phospho-4E-BP1 (Thr37/46) (236B4), ředěnou v poměru 1:100. Jako sekundární protilátka byla použita oslí protilátka proti králičím IgG Alexa Fluor 647 (ředěná 1:500). Bíle je znázorněn p4E-BP1, modře je znázorněna jaderná DNA (Vectashield). Barvení p4E-BP1 bylo velice slabé, ale v inhibovaném embryu je patrné barvení dvou dělicích se buněk. Velikost měřítka je 20 μ m.

4.1.10 Analýza Intenzity fluorescence při použití protilátky anti-Phospho-4E-BP1 (Thr37/46) (236B4)

Jako u předcházejících experimentů byla analýza fluorescence prováděna zvlášť v cytoplasmě a zvlášť v buněčném jádře u buněk v interfázi, případně v oblasti chromosomů u dělicích se buněk. Byly porovnávány buňky inhibovaných a kontrolních embryí ve stádiu osmi buněk, během mitotického dělení a ve stádiu šestnácti buněk (viz obrázek 17). V chromosomální oblasti byla během mitózy intenzita fluorescence u inhibovaných embryí signifikantně nižší než u neinhibovaných embryí, a stejně tomu bylo i v interfázních jádrech 8buněčného a 16buněčného stádia. V cytoplasmě byla u inhibovaných embryí signifikantně nižší intenzita fluorescence v 8buněčném a 16buněčném embryonálním stádiu, rozdíl v průběhu mitotického dělení signifikantní nebyl. U tohoto barvení jsme potvrdili snížení intenzity fluorescence po inhibici mTOR dráhy, nepotvrdili jsme ale nárůst intenzity fluorescence během mitózy. Kvůli nízké intenzitě fluorescence této protilátky usuzujeme, že měření intenzity fluorescence může být přesnější při použití protilátky z kapitoly 4.1.2.

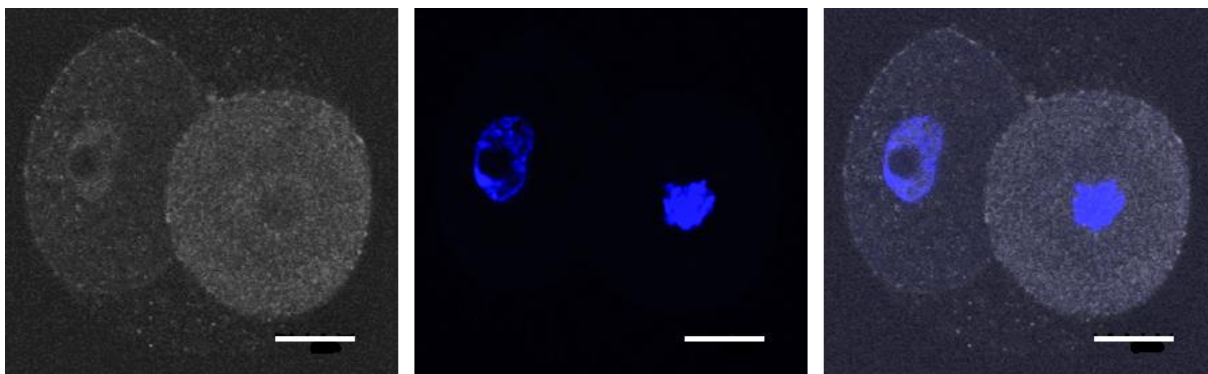


Obr. 17: Rozdíly v intenzitě fluorescenčního barvení fosforylované formy proteinu 4E-BP1 při použití protilátky anti-Phospho-4E-BP1 (Thr37/46) (236B4). Porovnávána byla inhibovaná a neinhibovaná embrya ve stádiu osmi buněk, během mitotického dělení, a rovněž ve stádiu šestnácti buněk. V chromosomální oblasti byla během mitózy intenzita fluorescence u inhibovaných embryí signifikantně nižší než u neinhibovaných embryí. Signifikantně nižší intenzita fluorescence byla rovněž v interfázních jádrech 8buněčných a 16buněčných inhibovaných embryí. V cytoplasmě byla u inhibovaných embryí signifikantně nižší intenzita fluorescence v 8buněčném a 16buněčném embryonálním stádiu, rozdíl v průběhu mitotického dělení signifikantní nebyl. Intenzita fluorescence je v jednotkách CTCF (corrected total cell fluorescence).

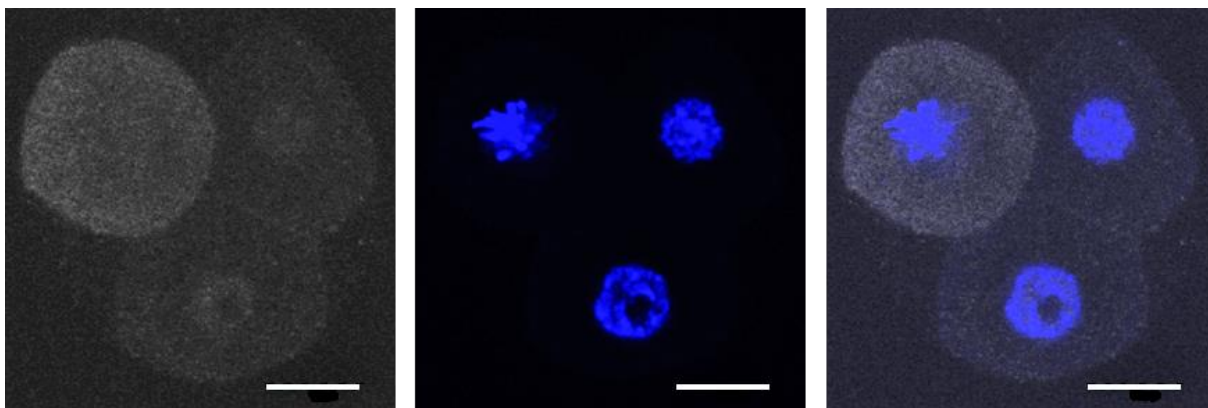
4.2 Fluorescenční barvení fosforylované formy proteinu 4E-BP1 v dalších buněčných děleních

S ohledem na zjištění, že mTOR regulovaná translace je aktivní během buněčného dělení z 8 na 16 buněk nás zajímalo, zda je aktivní také během dalších mitotických dělení, ke kterým v preimplantačním myším embryu dochází. Konkrétně nás zajímala dělení ze 2 buněk na 4, ze 4 na 8, z 16 na 32 a z 32 na 64. Postupem popsáním v kapitole 3.1 byla získána 2buněčná embrya, která byla následně kultivována do započetí požadovaného mitotického dělení. V čase, který byl považován za vhodný k zachycení co největšího počtu dělicích se buněk byla embrya fixována a fluorescenčně barvena dle postupu popsání v kapitole 3.3. K barvení byly použity dvě protilátky proti fosforylovanému 4E-BP1, které se ukázaly být funkční během předchozích experimentů. Jmenovitě se jednalo o anti-Phospho-4E-BP1 (Ser65) a anti-Phospho-4E-BP1 (Thr70) a byly ředěny v BSA v poměru 1:50. Jako sekundární protilátka byla ve všech případech použita oslí protilátka proti králíčím IgG Alexa Fluor 647.

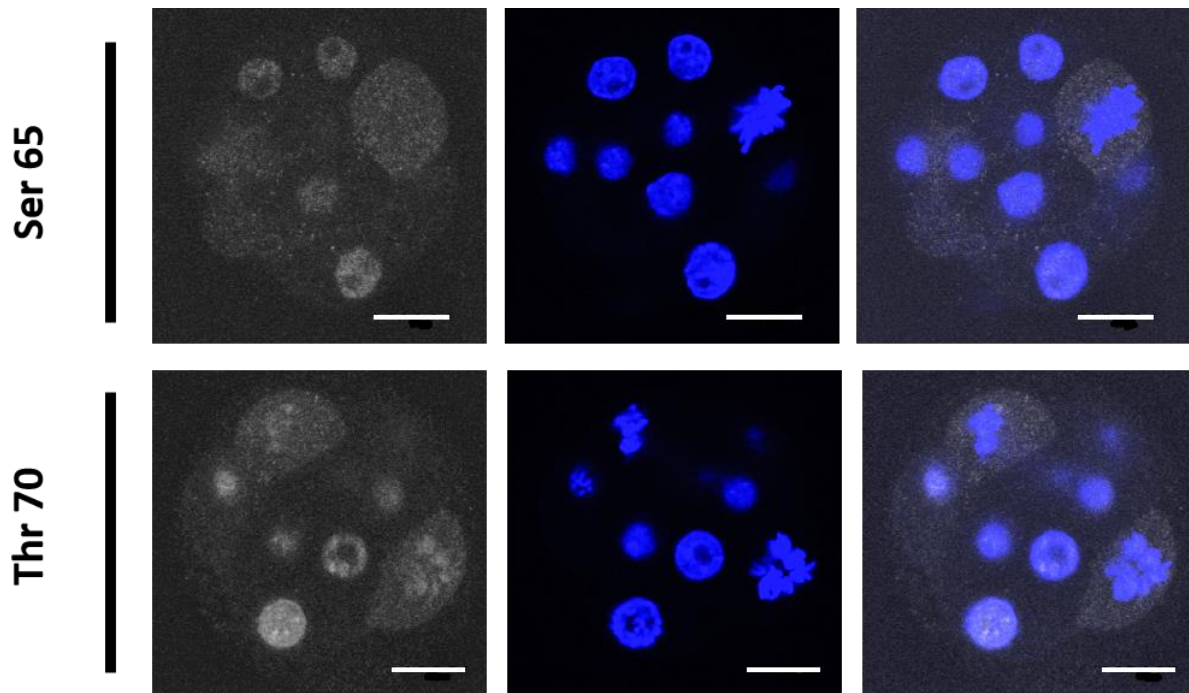
Fluorescenční barvení během všech výše uvedených buněčných dělení vykazala stejný trend, jaký byl pozorován během dělení z 8 na 16 buněk. V dělicích se buňkách byl patrný výraznější fluorescenční signál než v buňkách interfázních (obrázky 18 – 21), což znamená, že mTOR signální dráha není aktivní pouze v průběhu dělení z 8 na 16 buněk, ale také v dalších buněčných děleních v myších preimplantačních embryích.



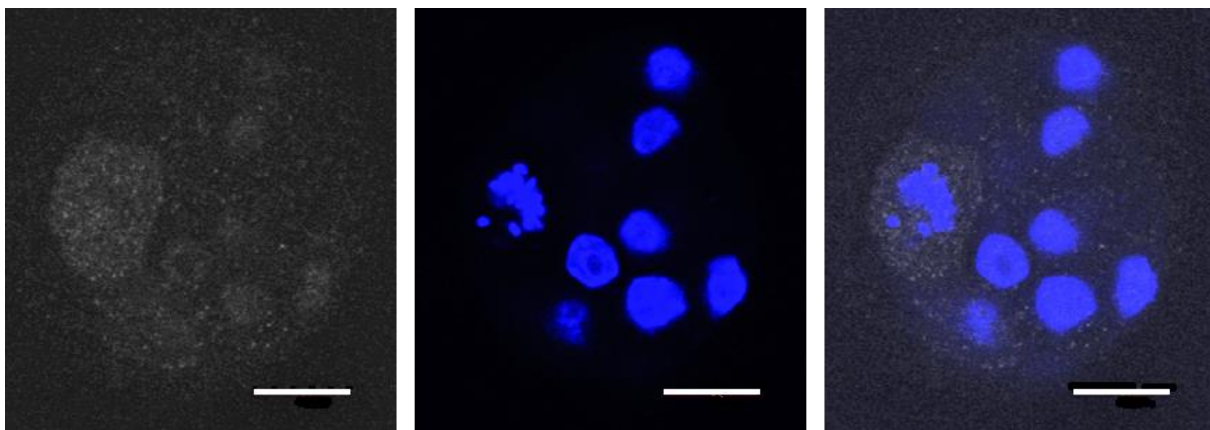
Obr. 18: Fosforylovaný 4E-BP1 během dělení z 2buněčného na 4buněčné stádium. Jako primární protilátka byla použita anti-Phospho-4E-BP1 (Ser65) (ředěná 1:50), jako sekundární oslí protilátka proti králíčím IgG Alexa Fluor 647 (ředěná 1:500). Obrázek ukazuje 2buněčné embryo s jednou dělicí se blastomerou (vpravo). Bíle je znázorněn p4E-BP1, modře jsou znázorněna buněčná jádra (Vectashield). Na obrázku je patrný silnější fluorescenční signál v dělicí se blastomeře, což poukazuje na aktivitu mTOR během buněčného dělení. Velikost měřítka je 20 μ m.



Obr. 19: Fosforylovaný 4E-BP1 během dělení ze 4buněčného na 8buněčné stádium. Jako primární protilátka byla použita anti-Phospho-4E-BP1 (Ser65) (ředěná 1:50), jako sekundární oslí protilátka proti králíčím IgG Alexa Fluor 647 (ředěná 1:500). Obrázek ukazuje 4buněčné embryo s jednou dělicí se blastomerou (vlevo nahoře). Bíle je znázorněn p4E-BP1, modře jsou znázorněna buněčná jádra (Vectashield). Na obrázku je patrný silnější fluorescenční signál v dělicí se blastomeře, což ukazuje na aktivitu mTOR během buněčného dělení. Velikost měřítka je 20 μ m.



Obr. 20: Fosforylovaný 4E-BP1 během dělení ze stádia 16 na stádium 32 buněk. Jako primární protilátka byly použity anti-Phospho-4E-BP1 (Ser65) (ředěná 1:50) a anti-Phospho-4E-BP1 (Thr70) (ředěná 1:50), jako sekundární protilátka byla použita oslí protilátka proti králíčím IgG Alexa Fluor 647 (ředěná 1:500). Obrázky ukazují embrya s minimálně jednou dělicí se blastomerou. Bíle je znázorněn p4E-BP1, modře jsou znázorněna buněčná jádra (Vectashield). Na obrázcích je patrný silnější fluorescenční signál v dělicích se blastomerách a rovněž v interfázních jádrech, což ukazuje na aktivitu mTOR během buněčného dělení. Velikost měřítka je 20 μ m.



Obr. 21: Fosforylovaný 4E-BP1 během dělení ze stádia 32 na stádium 64 buněk. Jako primární protilátka byla použita anti-Phospho-4E-BP1 (Ser65) (ředěná 1:50) a jako sekundární oslí protilátka proti králíčím IgG Alexa Fluor 647 (ředěná 1:500). Na obrázku je viditelná jedna dělicí se buňka. Bíle je znázorněn p4E-BP1, modře jsou znázorněna buněčná jádra (Vectashield). Fluorescenční signál je zde slabší, než tomu bylo u předešlých buněčných dělení, ale stále je patrné výraznější barvení p4E-BP1 v dělicí se blastomeře. Velikost měřítka je 20 μ m.

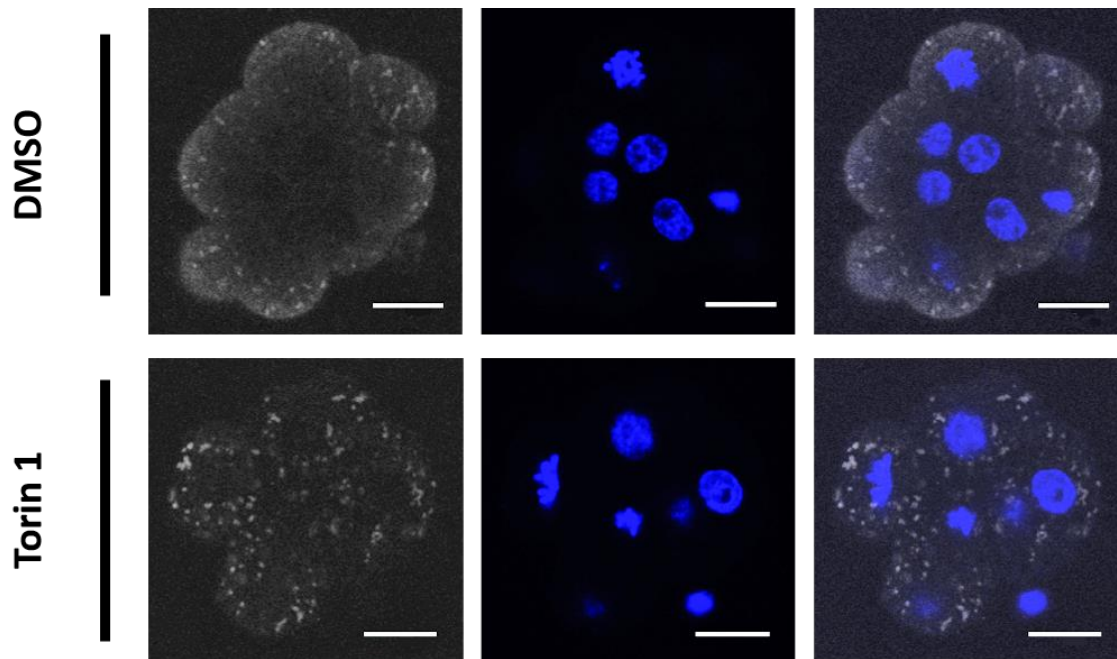
4.3 Fluorescenční barvení a analýzy intenzity fluorescence za použití protilátek anti-Phospho-S6 Ribosomal Protein (Ser235/236) (D57.2.2E), anti-eIF4G, anti-Phospho-eIF4G (Ser1108), anti-Phospho-eIF4E (Ser209) a anti-Phospho-mTOR (Ser2448)

Na základě výsledků prezentovaných v kapitole 4.1 jsme se rozhodli provést fluorescenční barvení také pro některé další proteiny, které jsou důležité pro translaci závislou na čepičce. Embrya byla získávána a kultivována stejným způsobem, jako v kapitole 4.1, poté byla během dělení z 8 na 16 buněk fixována a fluorescenčně barvena a následně bylo porovnáváno barvení mezi inhibovanými a neinhibovanými embryi a mezi dělicími se a nedělicími se buňkami.

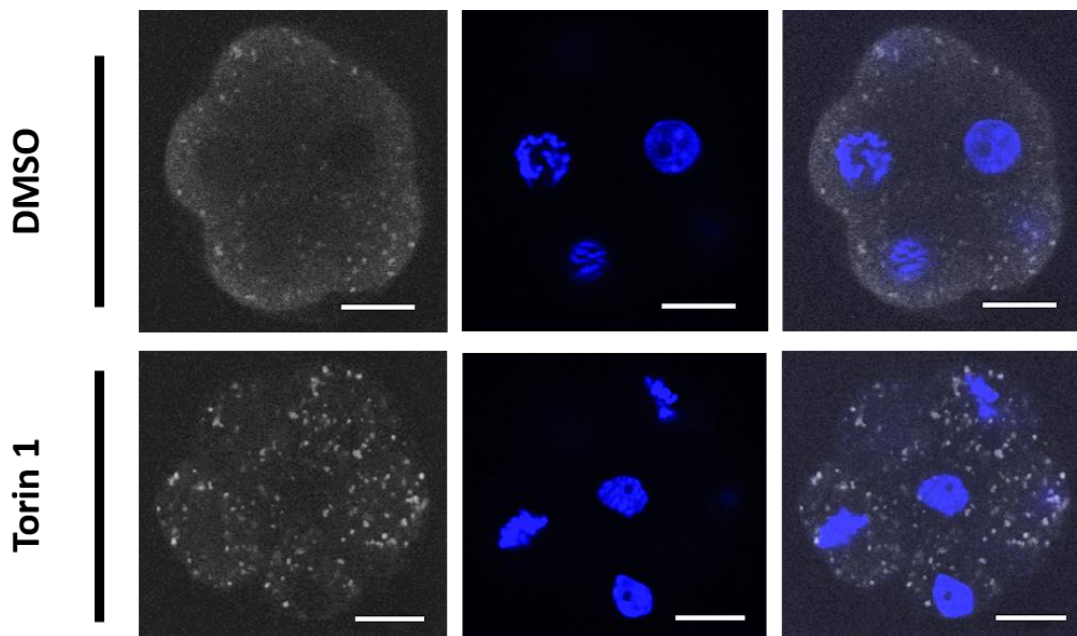
4.3.1 Fluorescenční barvení protilátkou anti-Phospho-S6 Ribosomal Protein (Ser235/236) (D57.2.2E)

Pro vizualizaci fosforylované formy proteinu S6 byla použita protilátka anti-Phospho-S6 Ribosomal Protein (Ser235/236) (D57.2.2E). Jedná se o protilátku značící fosforylovaný ribozomální protein S6, který je fosforylován S6 kinázou, jejíž aktivita je regulována mTOR signalizací. Fosforylace tohoto ribozomálního proteinu značí aktivní mTOR dráhu, a je potřebná pro fungující translaci. Zajímalo nás, zda uvidíme rozdíly mezi dělicími se a nedělicími se buňkami, a také snížení intenzity fluorescence po inhibici mTOR dráhy. Fluorescenční barvení bylo vyzkoušeno nejprve při protilátkovém ředění, které bylo doporučeno výrobcem, tedy 1:100. Jako sekundární protilátka byla použita oslí protilátka proti králíčímu IgG Alexa Fluor 647, ředěná 1:500. U obou skupin embryí bylo dle našeho očekávání pozorováno barvení cytoplasmy (obrázek 22). Neinhibovaná embrya byla výrazně barvena na povrchu a intenzita barvení směrem do jejich vnitřní části slábla. Tento jev mohl být způsoben buďto špatným pronikáním protilátky do vnitřku embryí, nebo nedostatečnou koncentrací protilátky. V inhibovaných embryích bylo oproti těm kontrolním patrně slabší barvení. Mezi dělicími se a nedělicími se buňkami nebyly patrné žádné rozdíly v intenzitě barvení.

Kvůli nerovnoměrnému protilátkovému barvení napříč neinhibovanými embryi bylo provedeno další kolo fluorescenčního barvení, při kterém byla použitá primární protilátka ředěná v BSA v poměru 1:50. Při této koncentraci bylo barvení výraznější (obrázek 23), ale postupně slábnutí intenzity barvení směrem do středu embryí bylo u některých embryí stále patrné.



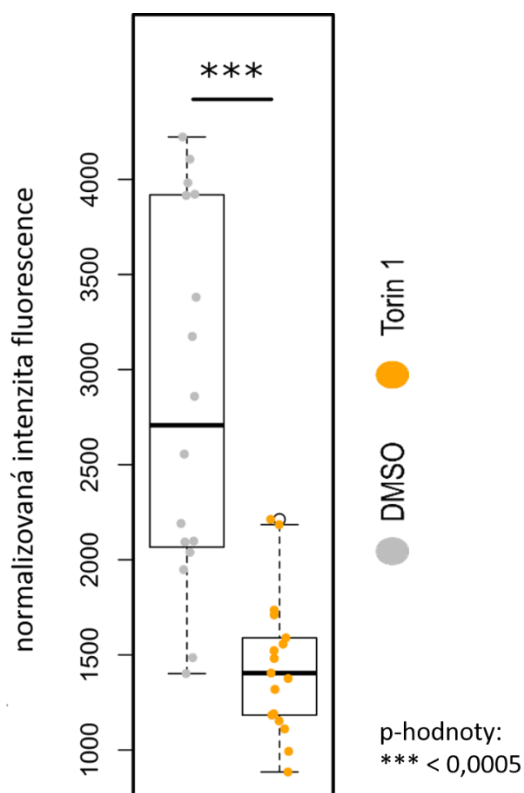
Obr. 22: Fluorescenční barvení protilátkou anti-Phospoho-S6 Ribosomal Protein (Ser235/236) (D57.2.2E), ředěnou v poměru 1:100. Jako sekundární protilátka byla použita oslí protilátka proti králičím IgG Alexa Fluor 647 (ředěná 1:500). Bíle je znázorněn pS6, modře je znázorněna jaderná DNA (Vectashield). V neinhibovaných embryích můžeme pozorovat silné barvení na povrchu embrya, jehož intenzita směrem ke středu slábne. V inhibovaných embryích je barvení méně výrazné. Mezi dělicími se a nedělicími se buňkami nebyla pozorována rozdílná intenzita barvení. Velikost měřítka je 20 μ m.



Obr. 23: Fluorescenční barvení protilátkou anti-Phospoho-S6 Ribosomal Protein (Ser235/236) (D57.2.2E), ředěnou v poměru 1:50. Jako sekundární protilátka byla použita oslí protilátka proti králičím IgG Alexa Fluor 647 (ředěná 1:500). Bíle je znázorněn pS6 ribosomal protein, modře je znázorněna jaderná DNA (Vectashield). V inhibovaných embryích je barvení méně výrazné. Mezi dělicími se a nedělicími se buňkami nebyla pozorována rozdílná intenzita barvení. Velikost měřítka je 20 μ m.

4.3.2 Analýza Intenzity fluorescence při použití protilátky anti-Phospho-S6 Ribosomal Protein (Ser235/236) (D57.2.2E)

Vzhledem k výsledkům barvení fosforylované formy proteinu S6 protilátkou anti-Phospho-S6 Ribosomal Protein (Ser235/236) (D57.2.2E) jsme se rozhodli provést analýzu intenzity tohoto barvení v programu Fiji a následně porovnat tuto kvantifikovanou intenzitu mezi inhibovanými a neinhibovanými embryi. Z obrázku 24 je patrné, že u inhibovaných embryí došlo k signifikantnímu poklesu fosforylovaného S6 (p -hodnota = $4,07 \times 10^{-5}$).

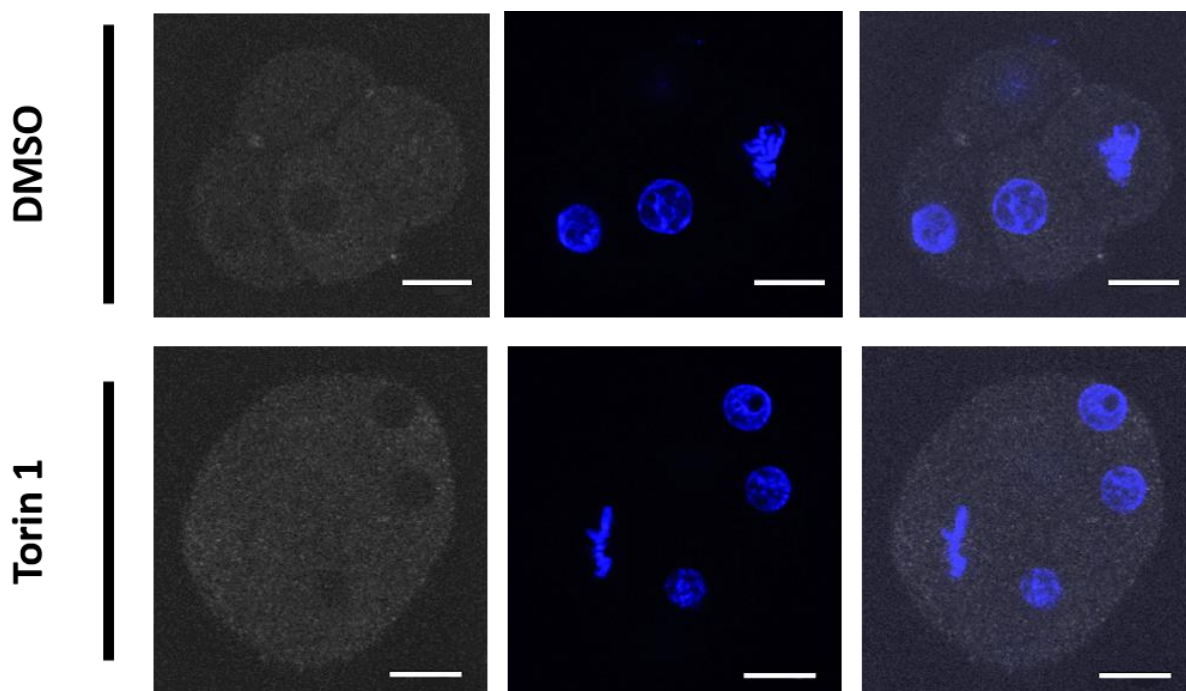


Obr. 24 Rozdíly v intenzitě fluorescenčního barvení fosforylované formy proteinu S6 při použití protilátky anti-Phospho-S6 Ribosomal Protein (Ser235/236) (D57.2.2E). Porovnávána byla inhibovaná a neinhibovaná embrya. Z grafu lze vyčíst, že v inhibovaných embryích došlo k signifikantnímu poklesu intenzity fluorescence. Intenzita fluorescence je v jednotkách CTCF (corrected total cell fluorescence).

4.3.3 Fluorescenční barvení protilátkou anti-eIF4G

Dále byla použita primární protilátka anti-eIF4G pro vizualizaci translačního iniciačního faktoru eIF4G. Ředěna byla v poměru 1:100 a jako sekundární protilátka k ní byla použita oslí protilátka proti králičím IgG Alexa Fluor 647, která byla ředěna 1:500. Barvení nepřineslo předpokládané výsledky, jelikož bylo velice slabé a nebyly v něm patrné žádné rozdíly v intenzitě barvení mezi dělicími se a nedělicími se buňkami, ani mezi kontrolními

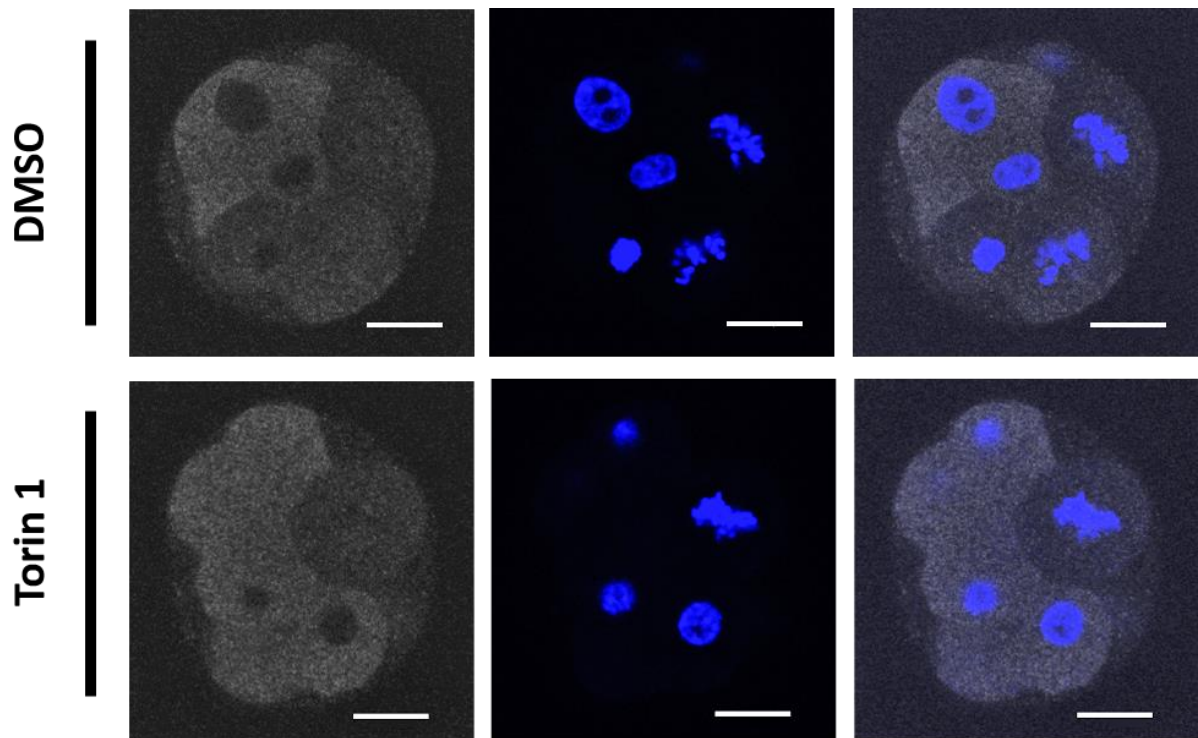
a inhibovanými embryi (obrázek 25). To nás vedlo k závěru, že daná protilátka barvila nespecificky, a proto nebyla nekvantifikována.



Obr. 25: Fluorescenční barvení protilátkou anti-eIF4G, ředěnou v poměru 1:100. Jako sekundární protilátka byla použita oslí protilátka proti králičím IgG Alexa Fluor 647 (ředěná 1:500). Bíle je znázorněn eIF4G, modře je znázorněna jaderná DNA (Vectashield). Protilátkové barvení je velice slabé a nejsou na něm patrné žádné větší rozdíly mezi dělicími se a nedělicími se buňkami. Velikost měřítka je 20 μ m.

4.3.4 Fluorescenční barvení protilátkou anti-Phospho-eIF4G (Ser1108)

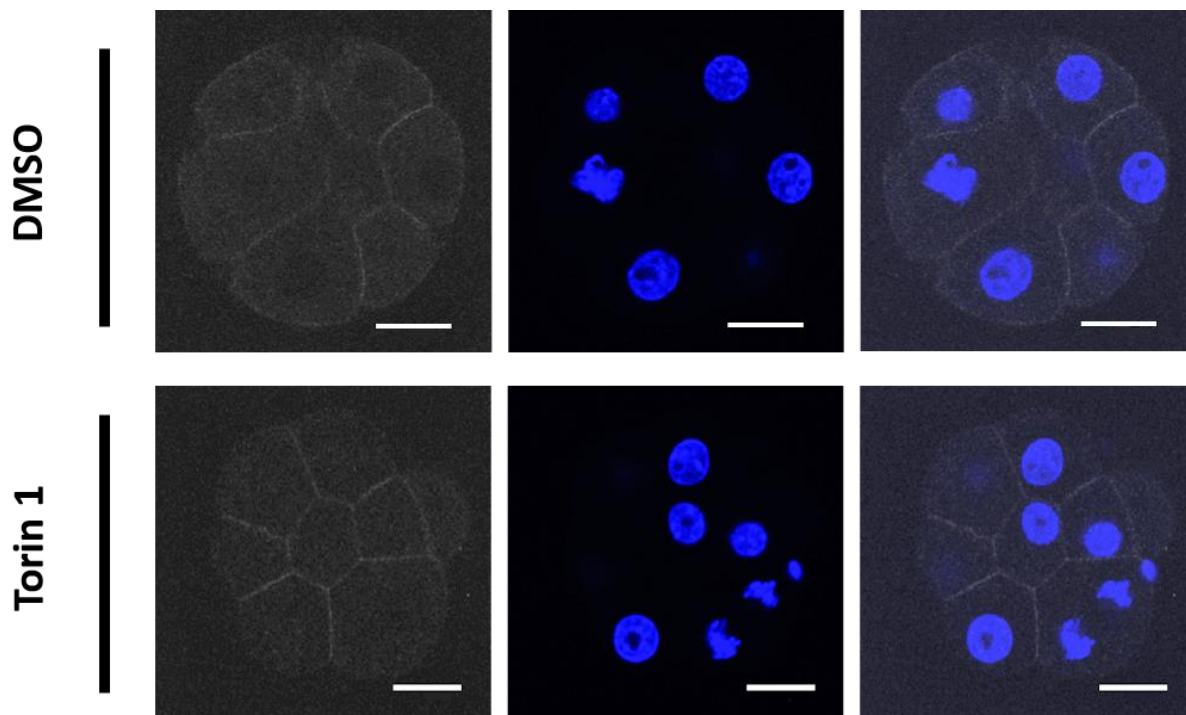
Pro vizualizaci fosforylované formy iniciačního faktoru eIF4G byla použita protilátka anti-Phospho-eIF4G (Ser1108), ředěná v poměru 1:100. Tato protilátka je specifická pro eIF4G protein fosforylovaný na aminokyselině S1108. Jako sekundární protilátka byla použita oslí protilátka proti králičím IgG Alexa Fluor 647, ředěná 1:500. Stejně jako u protilátek značících p4E-BP1 jsme chtěli zjistit, zda budeme pozorovat změny intenzity fluorescence během buněčného dělení. V nedělicích se buňkách bylo patrné výrazné cytoplasmatické barvení, v dělicích se buňkách bylo barvení výrazně slabší (obrázek 26). Mezi inhibovanými a neinhibovanými embryi nebyly pozorovány výrazné rozdíly v intenzitě barvení.



Obr. 26: Fluorescenční barvení protilátkou anti-Phospho-eIF4G (Ser1108), ředěnou v poměru 1:100. Jako sekundární protilátka byla použita oslí protilátka proti králičím IgG Alexa Fluor 647 (ředěná 1:500). Bíle je znázorněn fosforylovaný eIF4G, modře je znázorněna jaderná DNA (Vectashield). V nedělicích se buňkách je patrné výraznější barvení než v dělicích se buňkách. Velikost měřítka je 20 μ m.

4.3.5 Fluorescenční barvení protilátkou anti-Phospho-mTOR (Ser2448) (D9C2)

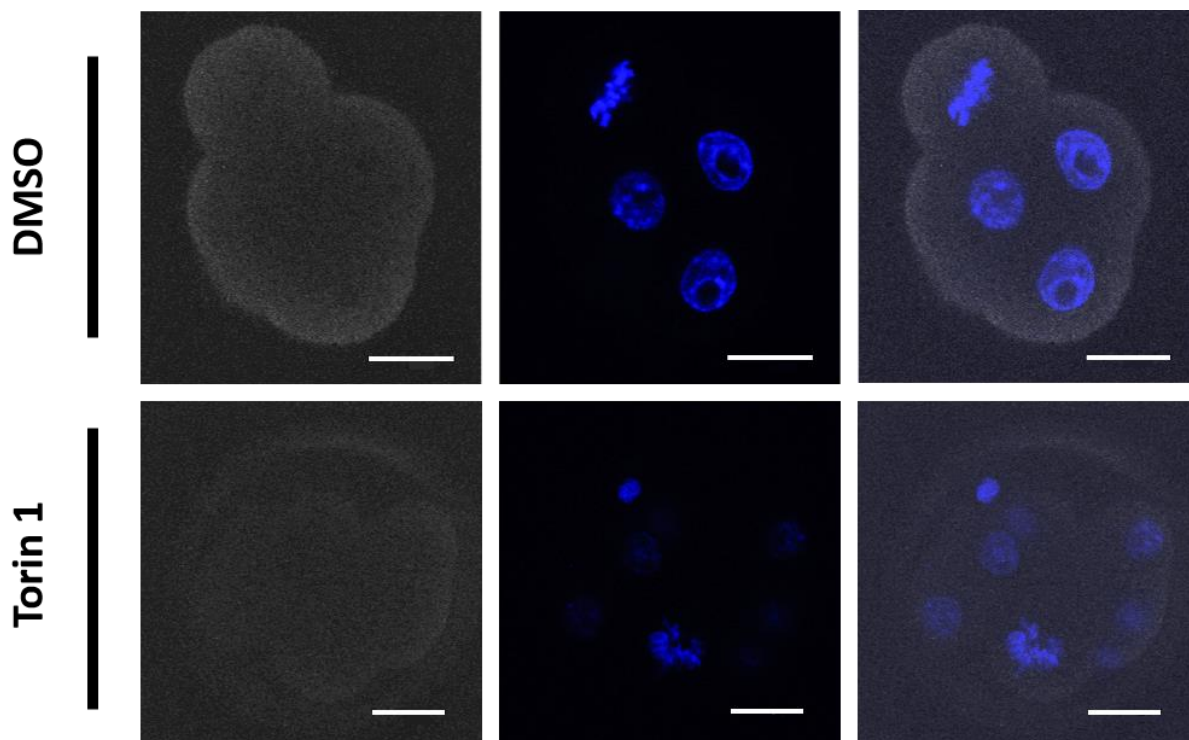
Jednou z posledních protilátek, použitých ke znázornění rozdílů mezi inhibovanými a neinhibovanými embryi a dělicími se a nedělicími se buňkami byla anti-Phospho-mTOR (Ser2448) (D9C2). Chtěli jsme zjistit, jestli dochází ke změnám fosforylace mTOR proteinu během dělení z 8 na 16 buněk. K barvení bylo použito ředění v poměru 1:50, které bylo doporučeno výrobcem a jako sekundární protilátka byla použita oslí protilátka proti králičím IgG Alexa Fluor 647, ředěná 1:500. Výsledné barvení bohužel nevykazovalo žádné nápadné rozdíly mezi inhibovanými a neinhibovanými embryi, ani mezi dělicími se a nedělicími se buňkami (obrázek 27), proto nebyla intenzita fluorescence kvantifikována. Ve všech barvených embryích bylo patrné membránové barvení. To je pravděpodobně nespecifické, protože není známo, že by se fosforylovaný mTOR lokalizoval do blízkosti buněčných membrán.



Obr. 27: Fluorescenční barvení protilátkou anti-Phospho-mTOR (Ser2448) (D9C2), ředěnou v poměru 1:50. Jako sekundární protilátka byla použita oslí protilátka proti králičím IgG Alexa Fluor 647 (ředěná 1:500). Bíle je znázorněn pmTOR, modře je znázorněna jaderná DNA (Vectashield). Barvení je patrné na cytoplasmatických membránách a jeho intenzita se neliší mezi dělicími se a nedělicími se buňkami, ani mezi inhibovanými a neinhibovanými embryi. Velikost měřítko je 20 μ m.

4.3.6 Fluorescenční barvení protilátkou anti-Phospho-eIF4E (Ser209)

Jako poslední protilátka, použitá ke znázornění rozdílů mezi inhibovanými a neinhibovanými embryi a dělicími se a nedělicími se buňkami byla protilátka proti fosforylované formě proteinu translačního iniciačního faktoru eIF4E. Chtěli jsme zjistit, zda dochází ke změnám množství tohoto proteinu během buněčného cyklu. K barvení bylo použito ředění v poměru 1:100 a jako sekundární protilátka byla použita oslí protilátka proti myším IgG Alexa Fluor 647, ředěná 1:500. Výsledné barvení bylo bohužel slabé, ale vykazovalo rozdílnou intenzitu mezi inhibovanými a neinhibovanými embryi, přičemž v těch neinhibovaných bylo výraznější (obrázek 28). Mezi dělicími se a nedělicími se buňkami nebyl v intenzitě barvení pozorován žádný výrazný rozdíl. Oproti protilátkám proti eIF4G a S6 nebyly patrné žádné rozdíly ani mezi barvením cytoplasmy a buněčných jader, z čehož jsme usoudili, že by se mohlo jednat o nespecifické barvení.



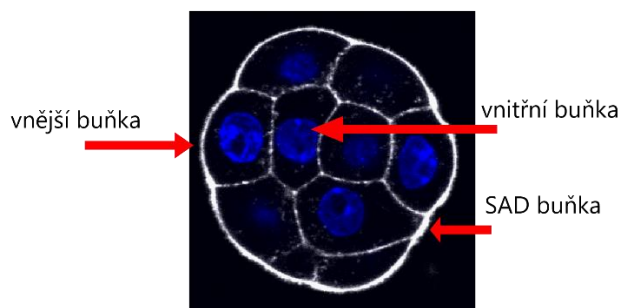
Obr. 28: Fluorescenční barvení protilátkou anti-Phospho-eIF4E (Ser209), ředěnou v poměru 1:100. Jako sekundární protilátka byla použita oslí protilátka proti myším IgG Alexa Fluor 647 (ředěná 1:500). Bíle je znázorněn protein eIF4E, modře je znázorněna jaderná DNA (Vectashield). V neinhibovaných embryích je patrné velice slabé barvení a v inhibovaných téměř není patrné. Velikost měřítka je 20 μ m.

4.3.7 Negativní kontrola

Vzhledem k tomu, že všechny použité protilátky vykazovaly velice slabé barvení, jsme chtěli vyloučit, že se jedná o nespecifický signál, vyprodukovaný nespecifickým nasedáním sekundární protilátky. Z toho důvodu bylo provedeno kontrolní barvení, ke kterému byla použita pouze sekundární oslí protilátka proti králičím IgG Alexa Fluor 647 (ta byla použita pro všechny experimenty, s výjimkou jednoho). Embrya pro tuto kontrolu byla získána a kultivována stejným způsobem, jako embrya experimentální, rovněž byla zahrnuta kultivace v médiu s Torinem 1/DMSO. Embrya byla následně fixována a barvena během dělení z 8 na 16 buněk, jako tomu bylo u experimentálních skupin. Jediným rozdílem bylo, že při barvení nebyla použita primární protilátka. Při skenování na konfokálním mikroskopu nebyl patrný žádný signál. Díky tomu bylo vyvráceno, že by fluorescenční signál, patrný v experimentálních skupinách, byl způsoben nespecifickým vázáním sekundární protilátky.

4.4 Inhibice mTOR-regulované translace a vliv této inhibice na počet vnitřních buněk v 16buněčných embryích

Buňky v raných preimplantačních embryích jsou standardně rozlišovány na vnější a vnitřní, podle toho, jestli mají nebo nemají apikální doménu, která je v kontaktu s vnějším prostředím embrya (Graham & Zernicka-Goetz, 2016). Některé mají pouze malou apikální doménu a nepatří proto ani do jedné z těchto skupin. Takovéto buňky jsou označovány jako SAD (small apical domain). Názorná ukázka jednotlivých typů buněk na základě jejich pozice v embryu je na obrázku 29.



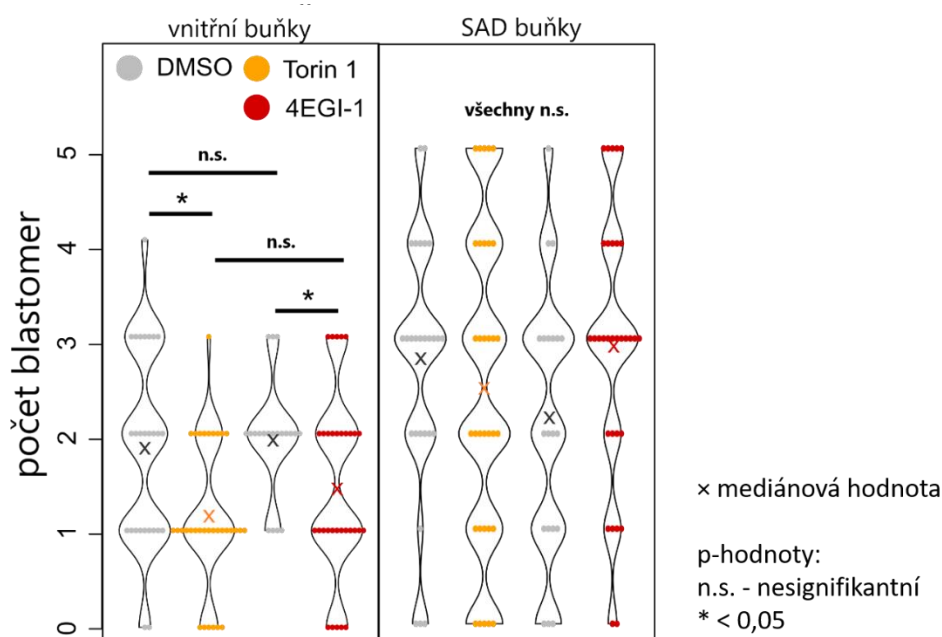
Obr. 29: Znárodnění rozdílů mezi vnitřními, vnějšími a SAD buňkami v raném preimplantačním myším embryu.

Na základě předchozích experimentů provedených v naší laboratoři s použitím inhibitoru mTOR dráhy Torin 1 nás zajímalo, zda je pozorovaný fenotyp nižšího počtu vnitřních buněk u 16buněčných embryí způsobený vlivem mTOR signalizace na regulaci translace. Používali jsme dva různé inhibitory: 4EGI-1 a Torin 1, jejichž účinek jsme následně porovnávali jak mezi sebou, tak i oproti kontrolním embryím. Torin 1 inhibuje mTORC1 i mTORC2 komplexy, přičemž jeho inhibice mTORC1 komplexu znemožňuje fosforylaci 4E-BP1 proteinu mTOR proteinem, ale v buňce stále zůstává určité množství volného eIF4E, takže translace není zcela potlačena (Liu et al., 2010). mTORC1 a mTORC2 ale zároveň regulují i jiné buněčné funkce kromě translace, a proto fenotyp pozorovaný po inhibici Torinem 1 nemusí být jenom následek inhibované translace. Inhibitor 4EGI-1 zabraňuje asociaci translačních faktorů eIF4E s eIF4G, což znamená, že by měl mít na iniciaci translace větší dopady, než Torin 1 (Moerke et al., 2007). Inhibice probíhala během dělení z 8 na 16 buněk a chtěli jsme zjistit, zda bude vést inhibice inhibitorem 4EGI-1 k podobnému fenotypu, jako inhibice Torinem 1. Zároveň jsme předpokládali, že u embryí inhibovaných pomocí 4EGI-1 budeme pozorovat větší dopad na jejich vývoj než u embryí inhibovaných Torinem 1. Postupem popsáným v kapitole 3.1 byla získána myší embrya ve stádiu dvou buněk a následně byla inkubována do stádia osmi buněk v E2,5 + 4h v médiu KSOM (rovněž popsáno v kapitole

3.1). Po dosažení tohoto stádia byla embrya přenesena do KSOM média s inhibítorem 4EGI-1/Torin 1 nebo do KSOM média se stejným objemem DMSO pro kontrolní embrya. Následně byla kultivována do 16buněčného stádia v E3,0 + 5h (popsáno v kapitole 3.2). Poté byla embrya barvena Oregon Green 488 Phalloidinem (popsáno v kapitole 3.4) pro imunofluorescenční zbarvení membrán a skenována na konfokálním mikroskopu (popsáno v kapitole 3.6).

Inhibice inhibítorem 4EGI-1 vedla k výraznému opoždění embryonálního vývoje. V neinhibované skupině obsahovala embrya průměrně 19,74 buněk, přičemž medián byl 19, zatímco inhibovaná embrya obsahovala průměrně 14,76 buněk, s mediánem byl 16. V důsledku toho nebylo možné porovnat počty vnitřních a SAD buněk v požadovaném stádiu. Inhibiční okno bylo proto zkráceno na období od E2,5 + 6h do E2,5 + 11h, na konci kterého byla embrya opět umístěna do KSOM bez inhibítora a dále kultivována až do E3,0 + 5h. V takto inhibovaných embryích nebyl jejich vývoj v porovnání s kontrolními embryi výrazně opožděn. Neinhibovaná embrya obsahovala průměrně 18,8 buněk, medián byl 16 buněk. Inhibovaná embrya obsahovala v průměru 17,2 buněk, přičemž medián byl, stejně jako u neinhibované skupiny, 16 buněk.

Zjistili jsme, že v embryích inhibovaných Torinem 1 i 4EGI-1 došlo k signifikantnímu poklesu vnitřních buněk oproti neinhibovaným embryím (p-hodnota = 0,0003 pro Torin 1 a p-hodnota = 0,049 pro 4E-GI1), ale nebyl zde signifikantní rozdíl mezi Torin 1 a 4EGI-1 inhibítorem (p-hodnota = 0,679). Počet SAD buněk se mezi inhibitory 4EGI-1 a Torin 1, ani mezi inhibovanými a neinhibovanými embryi signifikantně nezměnil (viz obrázek 30).



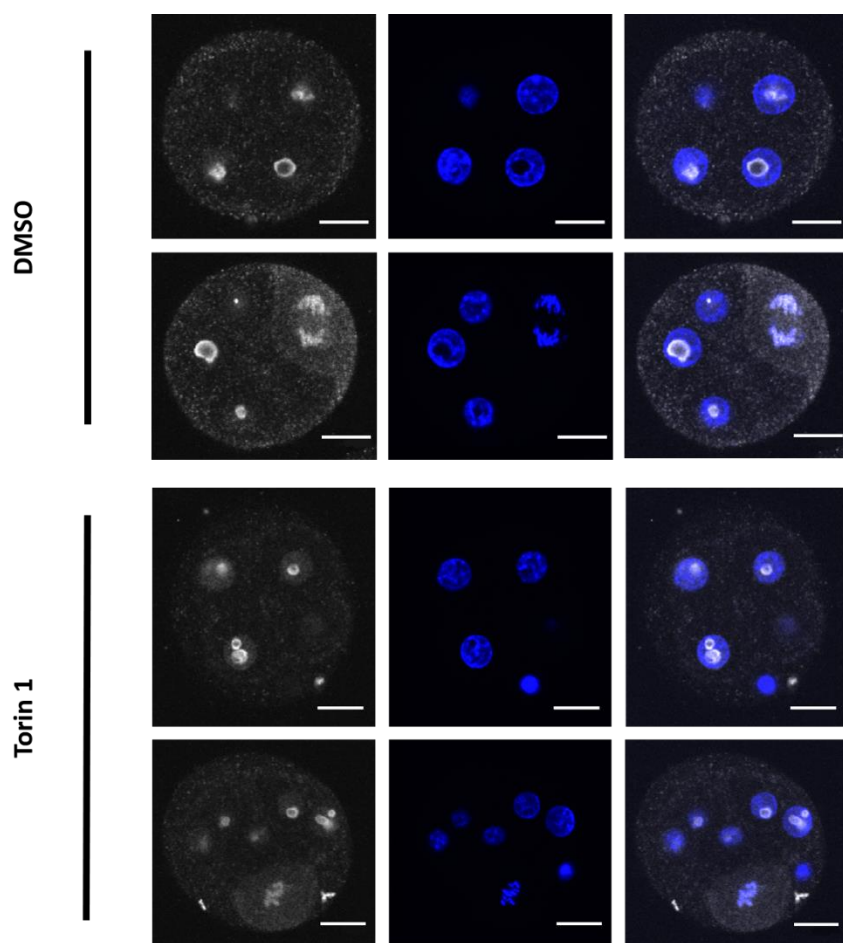
Obr. 30: Graf znázorňující počty vnitřních a SAD buněk v kontrolních embryích a v embryích inhibovaných inhibitory 4EGI-1 a Torin 1. U embryí inhibovaných Torinem 1 došlo k signifikantnímu poklesu vnitřních buněk oproti kontrolám, podobný rozdíl je patrný také mezi kontrolními embryi a embryi inhibovanými 4EGI-1 inhibitorem. Počet SAD buněk se mezi jednotlivými skupinami signifikantně nezměnil. Křížek znázorňuje mediánovou hodnotu.

4.5 Fluorescenční barvení a analýzy intenzity fluorescenčního barvení za použití protilátky anti-DDX21

DDX21 je protein, jehož mRNA obsahuje na svém 5' netranslatovaném regionu polypyrimidinový motiv a proto je možné, že jeho translace je regulována mTOR signalizační dráhou. Předěšlé experimenty provedené v naší laboratoři ukázaly, že v 16buněčných embryích s experimentálně sníženou expresí *Ddx21* je méně vnitřních buněk, co kopíruje fenotyp způsobený inhibicí mTOR signalizace Torinem 1. Hmotnostní spektrometrie v embryích dělicích se z 8 na 16 buněk dále ukázala, že v embryích s inhibovanou mTOR signální dráhou se množství proteinu DDX21 v porovnání s neinhibovanými embryi snižuje (Gahurova et al., manuskript v přípravě). Pro potvrzení tohoto zjištění jsme se rozhodli provést fluorescenční barvení tohoto proteinu během buněčného dělení z 8 na 16 buněk a porovnat rozdíly v intenzitě fluorescence mezi inhibovanými a neinhibovanými embryi a mezi dělicími se a nedělicími se buňkami.

Postupem popsaným v kapitole 3.1 byla získána myší embrya ve stádiu dvou buněk, která následně byla inkubována do stádia osmi buněk v E2,5 + 4h v médiu KSOM (rovněž popsáno v kapitole 3.1). Po dosažení tohoto stádia byla embrya přenesena do KSOM média s inhibitorem Torin 1 nebo do KSOM média se stejným objemem DMSO pro kontrolní embrya. Následně byla kultivována do období dělení z 8buněčného na 16buněčné stádium v E2,5 + 9h (popsáno v kapitole 3.2). Poté byla embrya fluorescenčně barvena (popsáno v kapitole 3.3) a skenována na konfokálním mikroskopu (popsáno v kapitole 3.6).

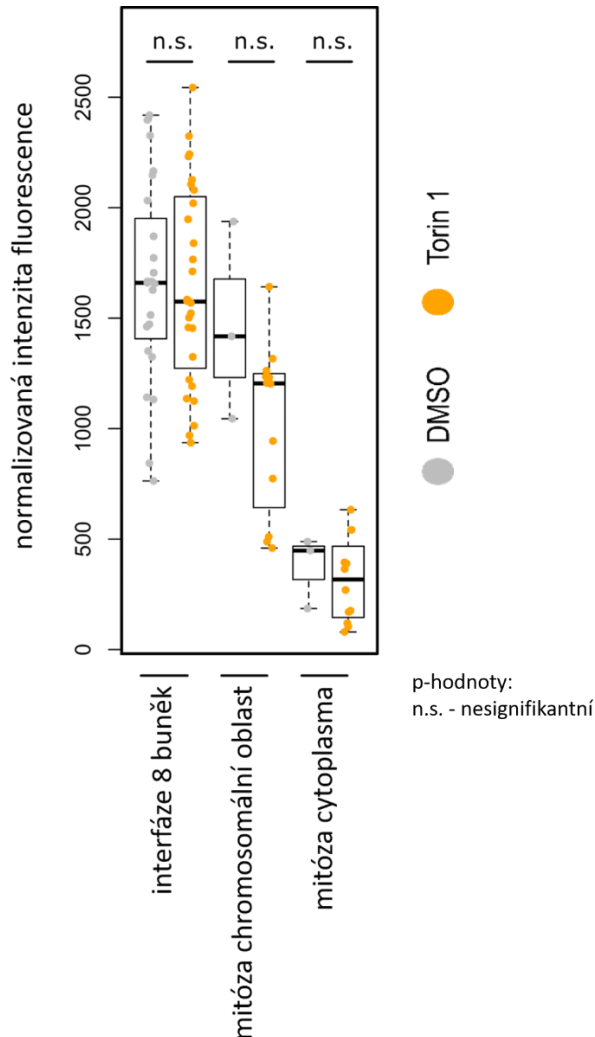
K barvení byla použita primární protilátka anti-DDX21 (ředěná v poměru 1:100) v kombinaci se sekundární oslí protilátkou proti králíčím IgG Alexa Fluor 647 (ředěnou v poměru 1:500). Potvrdili jsme předchozí výsledky naší laboratoře, že DDX21 se nachází v jádérku interfázních buněk, a během mitózy v oblasti chromozomů a do menší míry v cytoplasmě (Bora et al., 2021; Bora – nepublikovaná data). Výsledkem při analýze pouhým okem bylo, že inhibovaná embrya vykazovala slabší fluorescenční barvení než kontrolní embrya a nedělicí se buňky vykazovaly slabší fluorescenční barvení než dělicí se buňky (viz obrázek 31).



Obr. 31: Fluorescenční barvení protilátkou anti-DDX21, ředěnou v poměru 1:100. Jako sekundární protilátka byla použita oslí protilátka proti králičím IgG Alexa Fluor 647 (ředěná 1:500). Bíle je znázorněn protein DDX21, modře je znázorněna jaderná DNA (Vectashield). V neinhibovaných embryích je patrné výraznější barvení než v inhibovaných embryích a v dělicích se buňkách je patrné výraznější barvení než v nedělicích se buňkách. Velikost měřítka je 20 μ m.

Dalším krokem byla kvantifikace fluorescenčního barvení, která byla prováděna zvlášť v interfázních buňkách 8buněčného stádia, v oblasti chromosomů u dělicích se buněk a v cytoplasmě dělicích se buněk, přičemž byla mezi sebou porovnávána inhibovaná a neinhibovaná embrya. Přestože jsme volným okem pozorovali rozdíly mezi kontrolními a inhibovanými embryi, kvantifikace ukázala, že v intenzitě fluorescence u jader 8buněčných embryí není rozdíl (p-hodnota = 0,932), a že rozdíly intenzity fluorescence nejsou signifikantní ani v chromosomální oblasti dělicích se buněk (viz obrázek 32), což může být způsobeno nízkým počtem dělicích se buněk zejména u kontrolních embryí (p-hodnota = 0,22 pro chromosomální oblast a p-hodnota = 0,625 pro cytoplasmu dělicích se buněk). I když

rozdíl není statisticky signifikantní, je možné, že po inhibici mTOR dráhy dochází ke snížení množství DDX21 proteinu během dělení z 8 na 16 buněk, což by mohlo znamenat, že translace tohoto proteinu je regulována mTOR signální dráhou.



Obr. 32: Rozdíly v intenzitě fluorescenčního barvení proteinu DDX21 při použití protilátky anti-DDX21 (ředěné v poměru 1:100) v kombinaci se sekundární oslí protilátkou proti králíčím IgG Alexa Fluor 647 (ředěnou 1:500). Porovnáváno bylo barvení v interfázních buňkách 8buněčného stádia, v oblasti chromosomů u dělících se buněk a v cytoplasmě dělících se buněk, přičemž byla intenzita fluorescence porovnávána mezi inhibovanými a neinhibovanými embryi. Ani v jedné ze tří zmiňovaných skupin nebyly změny fluorescence statisticky signifikantní. Intenzita fluorescence je v jednotkách normalizované CTCF (corrected total cell fluorescence) na velikost měřené plochy.

4.6 Inhibice mTOR-regulované translace a vliv této inhibice na počet vnitřních buněk a chování některých vnějších buněk ve stádiu 32 buněk

Na základě výsledků prezentovaných v kapitole 4.4, kdy jsme po inhibici Torinem 1 pozorovali snížení počtu vnitřních buněk v 16buněčných embryích, jsme se rozhodli pro pozorování tohoto trendu i v další fázi vývoje, konkrétně ve stádiu 32 buněk. Předpokládali

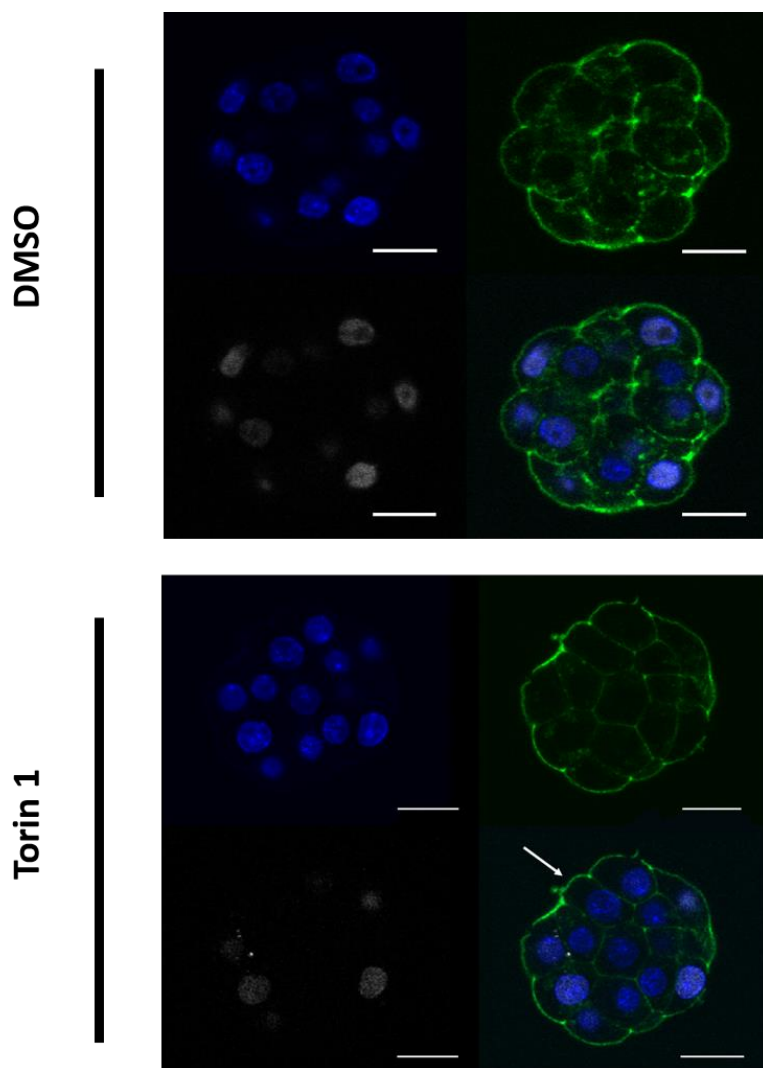
jsme, že i v tomto vývojovém stupni budou inhibovaná embrya obsahovat více vnějších buněk a zajímalo nás, zda se všechny tyto vnější buňky chovají jako vnější i z hlediska genové exprese.

Embrya byla získána a kultivována podle postupu popsaneho v kapitole 3.1 a od E2,5 + 4h byla kultivována v Torinu 1/DMSO podle postupu popsaneho v kapitole 3.2. V E3,5 (stádium 32 buněk) byla embrya fixována a fluorescenčně barvena tak, jak je popsáno v kapitole 3.3 a některá dále podle postupu popsaneho v kapitole 3.5.

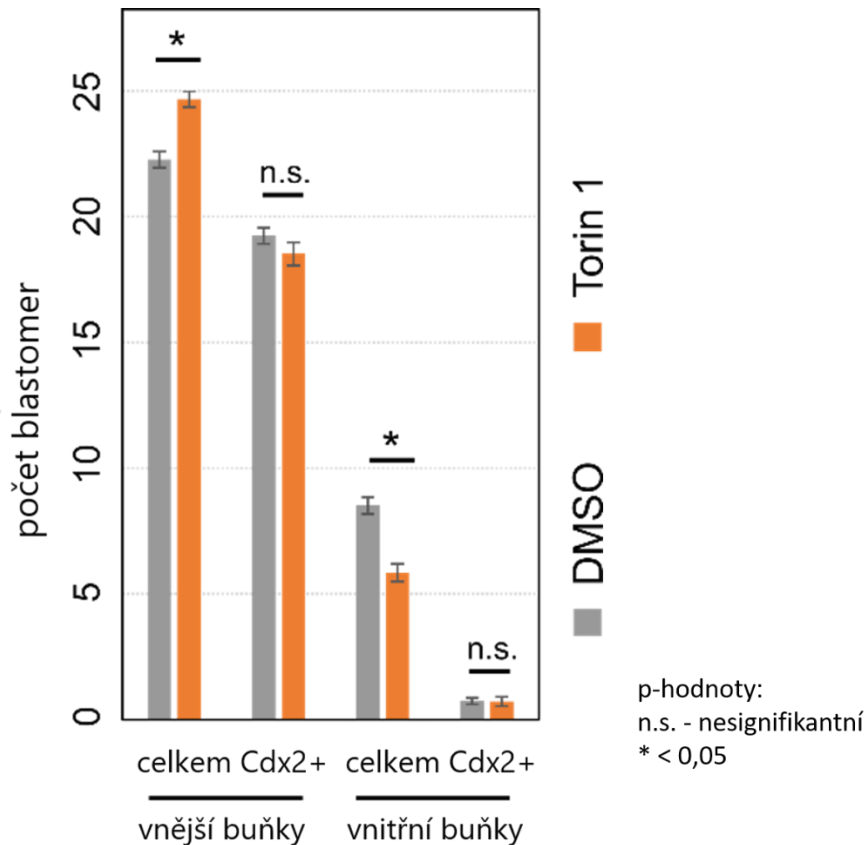
4.6.1 Fluorescenční barvení protilátkou anti-CDX2 v kombinaci s Oregon Green 488 phalloidinem

Pro první experiment byla použita protilátka anti-CDX2, ředěná v BSA v poměru 1:200, jako sekundární protilátka byla použita oslí protilátka proti myším IgG Alexa Fluor 647 (ředěná v poměru 1:500) a nakonec byla embrya barvena Oregon Green 488 phalloidinem, který byl ředěn v PBST v poměru 1:50. Jak bylo popsáno v kapitole 1.1.2, exprese *Cdx2* je typická pro vnější (polární) buňky a CDX2 protein by měl být lokalizován v jejich jádrech. Je to transkripční faktor, který následně ovlivňuje expresi mnohých genů a tím i diferenciaci této buněčné linie na buňky trofoektodermu (Nishioka et al., 2008; Strumpf et al., 2005; Zernicka-Goetz et al., 2009). Díky barvení Oregon Green 488 phalloidinem, který barví cytoplasmatické membrány bylo možné určit, které buňky jsou vnitřní a které vnější.

Vzhledem k tomu, že inhibice Torinem 1 v takto dlouhém vývojovém okně vedla k opoždění vývoje v porovnání s kontrolními embryi, bylo nejprve nutné spočítat buňky v jednotlivých embryích. Pro další analýzu byla vybrána pouze embrya, která obsahovala od 28 do 32 buněk, přičemž průměrný počet buněk analyzovaných embryí byl u obou skupin stejný. V nich byly následně počítány vnitřní buňky, vnější buňky a vnější buňky s jaderným CDX2. V inhibovaných embryích bylo podle očekávání méně vnitřních buněk (v průměru 8,5 buněk u kontrolních embryí a 5,3 buněk u inhibovaných embryí, p-hodnota =0,0051), a proto více vnějších buněk (v průměru 22,3 buněk u kontrolních embryí a 24,7 buněk u inhibovaných embryí, p-hodnota =0,0078), ale nedošlo k nárůstu vnějších buněk s jaderným CDX2 (19,2 buněk u kontrolních embryí a 18,5 buněk u inhibovaných embryí, p-hodnota =0,654) (obrázky 33 a 34). Z toho vyplývá, že embrya inhibovaná Torinem 1 obsahovala oproti kontrolním embryím více vnějších buněk, z nichž část nevykazovala genovou expresi, která je pro vnější buňky specifická. Ukázka takové vnější buňky bez exprese *Cdx2* je na obrázku 33. Počet buněk exprimujících *Cdx2*, u kterých se dá očekávat, že mají expresní profil diferencujících buněk trofoektodermu, se mezi kontrolními a inhibovanými embryi nelišil.



Obr. 33: Ukázka fluorescenčního barvení za použití protilátek anti-CDX2 a Oregon Green 488 phalloidin v embryu ve stádiu 32 buněk, inhibovaném Torinem 1 od E2,5 + 4h. Primární protilátka anti-CDX2 byla ředěna v poměru 1:200, sekundární oslí protilátka proti myším IgG Alexa Fluor 647 v poměru 1:500 a Oregon Green 488 phalloidin byl ředěn v PBST v poměru 1:50. Bíle je znázorněn CDX2, zeleně je znázorněno barvení Oregon Green 488 phalloidinem a modře jsou znázorněna buněčná jádra (Vectashield). V neinhibovaném embryu je patrné fluorescenční barvení CDX2 ve všech jádrech vnějších buněk. V inhibovaném embryu šipka ukazuje na vnější buňku bez fluorescenčního barvení CDX2 proteinu. Velikost měřítka je 20 μ m.



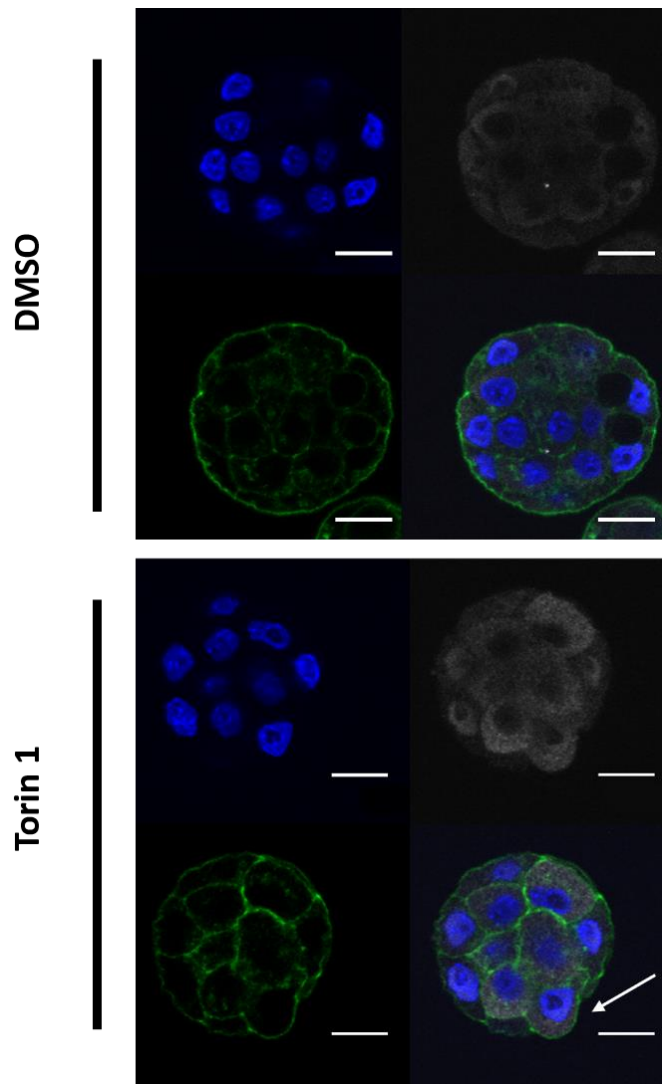
Obr. 34: Graf znázorňující počty vnitřních buněk, vnějších buněk a vnějších buněk s jaderným CDX2 v inhibovaných a neinhibovaných embryích. K analýze byla použita pouze embrya obsahující 28 – 32 buněk, přičemž průměrný počet buněk analyzovaných embryí byl u obou skupin stejný. Z grafu je patrné, že inhibovaná embrya obsahují oproti kontrolním více vnějších buněk, ale počet vnějších buněk exprimujících *Cdx2* se mezi těmito skupinami nezměnil. Z toho vyplývá, že inhibovaná embrya obsahují nadbytečné vnější buňky, které se ale chovají jako buňky vnitřní. Vousky označují standardní chybu průměru.

4.6.2 Fluorescenční barvení protilátkou anti-YAP1 v kombinaci s Oregon Green 488 phalloidinem

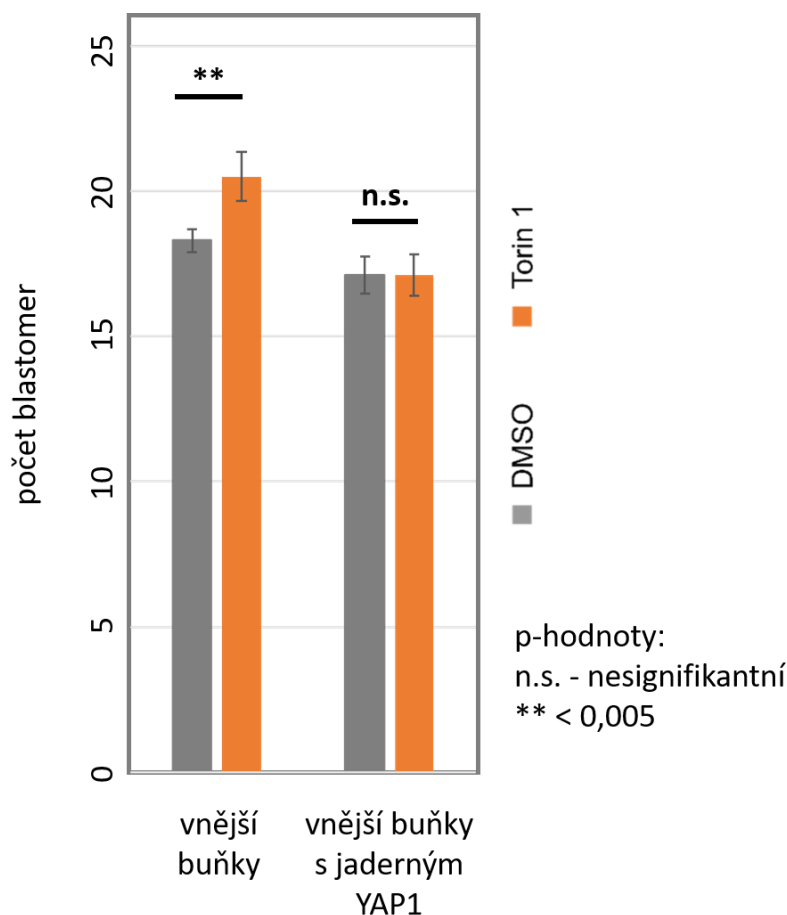
Jako další primární protilátka byla použita anti-YAP1, ředěná v BSA v poměru 1:100, jako sekundární protilátka byla použita oslí protilátka proti myším IgG Alexa Fluor 647 (ředěná v poměru 1:500) a nakonec byla embrya barvena Oregon Green 488 phalloidinem, který byl ředěn v PBST v poměru 1:50. Jak bylo popsáno v kapitole 1.1.2, protein YAP1 se ve vnitřních buňkách nachází výhradně v cytoplasmě a ve vnějších buňkách je ve větší míře lokalizován v buněčném jádře, kde slouží jako koaktivátor transkripčního faktoru TEAD4, a tím se podílí na regulaci exprese buněčné linie trofoektodermu (Nishioka et al., 2009). Díky barvení Oregon Green 488 phalloidinem bylo možné určit, které buňky jsou vnitřní a které vnější.

Výsledky získané z tohoto fluorescenčního barvení byly podobné těm, které byly získány z barvení protilátkou proti CDX2. V některých vnějších buňkách v inhibovaných embryích bylo patrné cytoplasmatické barvení (viz obrázek 35), z čehož vyplývá, že dané buňky mají s velkou pravděpodobností transkripční profil vnitřních buněk, ze kterých vznikne vnitřní buněčná masa, a ne transkripční profil diferencujícího trofoektodermu.

Pro další analýzu byla vybrána pouze embrya, která obsahovala od 28 do 32 buněk, přičemž průměrný počet buněk analyzovaných embryí byl u obou skupin stejný. V nich byl následně počítán celkový počet vnějších buněk a počet vnějších buněk s jaderným YAP1. V inhibovaných embryích bylo podle očekávání více vnějších buněk (v průměru 20,5 oproti 18,3 v kontrolních embryích) (p-hodnota = 0,00438), ale počet vnějších buněk s jadernou lokalizací YAP1 se nezměnil (v inhibovaných i neinhibovaných embryích se vyskytoval průměrně u 17,1 embryí) (p-hodnota = 0,9681) (obrázky 35 a 36). Z toho vyplývá, že embrya inhibovaná Torinem 1 obsahovala oproti kontrolním embryím více vnějších buněk, z nichž část nevykazovala genovou expresi, která je pro vnější buňky specifická.



Obr. 35: Ukázka fluorescenčního barvení za použití protilátek anti-YAP1 a Oregon Green 488 phalloidin v embryu ve stádiu 32 buněk, inhibovaném Torinem 1 od E2,5 + 4h. Primární protilátka anti-YAP1 byla ředěna v poměru 1:100, sekundární oslí protilátka proti myším IgG Alexa Fluor 647 v poměru 1:500 a Oregon Green 488 phalloidin byl ředěn v PBST v poměru 1:50. Bíle je znázorněn YAP1, zeleně je znázorněno barvení Oregon Green 488 phalloidinem a modře jsou znázorněna buněčná jádra (Vectashield). Na obrázku je patrné barvení proteinu YAP1 v cytoplasmě vnitřních buněk a v jádrech vnějších buněk. Šipka ukazuje na vnější buňku, v níž je patrné cytoplasmatické barvení YAP1. Velikost měřítka je 20 μ m.

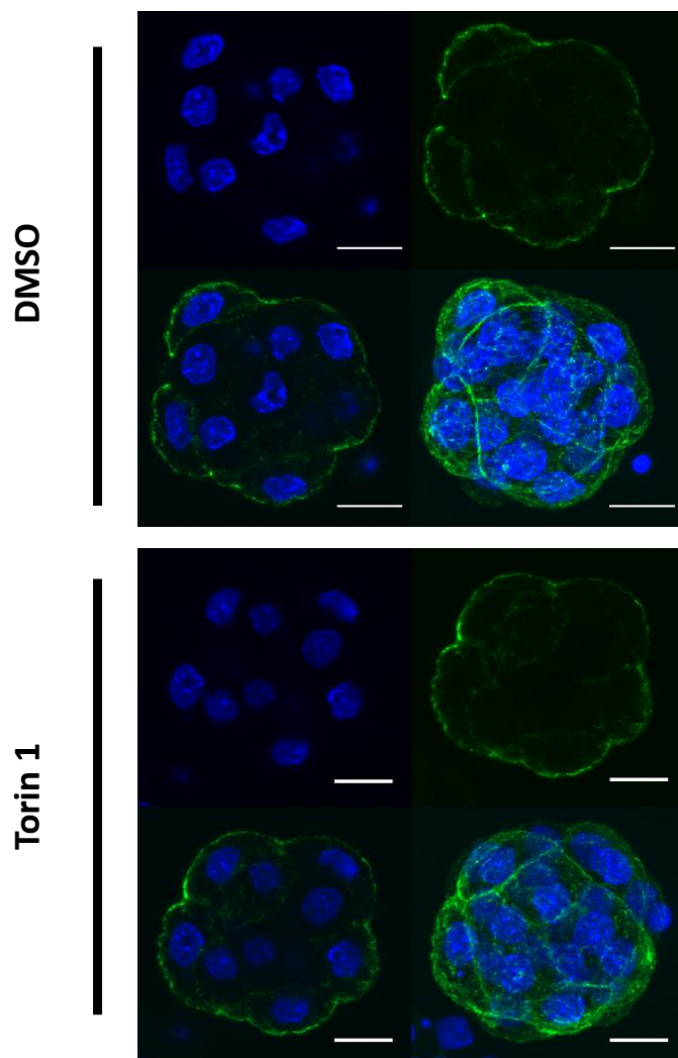


Obr. 36: Graf znázorňující počty vnějších buněk a vnějších buněk s jaderným YAP1 v inhibovaných a neinhibovaných embryích. K analýze byla použita pouze embrya obsahující 28 – 32 buněk, přičemž průměrný počet buněk analyzovaných embryí byl u obou skupin stejný. Z grafu je patrné, že inhibovaná embrya obsahují oproti kontrolním více vnějších buněk, ale počet vnějších buněk s jadernou lokalizací YAP1 se mezi těmito skupinami nezměnil. Z toho vyplývá, že inhibovaná embrya obsahují nadbytečné vnější buňky, které se ale chovají jako buňky vnitřní. Vousky označují standardní chybu průměru.

4.6.3 Fluorescenční barvení protilátkou anti-Cytokeratin 8

Na základě výsledků popsaných v kapitolách 4.6.1 a 4.6.2 bylo navrženo několik dalších experimentů s cílem zjistit, zda část vnějších buněk v inhibovaných embryích postrádá i jiné znaky typické pro vnější buňky, než jen přítomnost jaderného CDX2 proteinu a jaderné lokalizace YAP1. Zajímalo nás, zda je v těchto netypických vnějších buňkách narušena funkce apikální domény. Vzhledem k tomu, že keratiny jsou ukotvovány v apikální doméně (Lim et al., 2020), bylo pro tento účel vyzkoušeno barvení primární protilátkou anti-Cytokeratin 8 (ředěnou v poměru 1:100) v kombinaci se sekundární oslí protilátkou proti krysí Alexa Fluor 488 (ředěnou v poměru 1:500). Ve výsledném barvení ale mezi inhibovanými a neinhibovanými embryi nebyl pozorován žádný zjevný rozdíl (obrázek 37), a při podrobnější analýze inhibovaných embryí jsme nezaznamenali žádné vnější buňky s nižším množstvím

nebo s žádným cytokeratinem 8. Z toho vyplývá, že u vnějších buněk bez exprese *Cdx2* a s cytoplazmatickou lokalizací YAP1 pravděpodobně nedochází ke změnám v cytokeratinové matrix a apikální doméně.

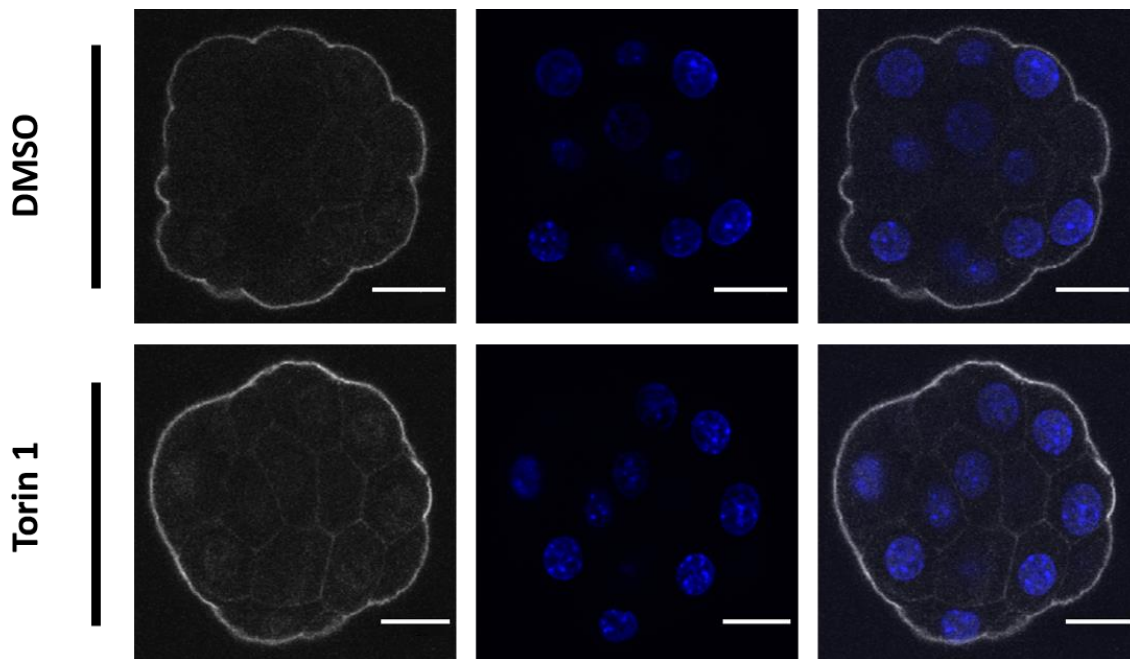


Obr. 37: Ukázka fluorescenčního barvení za použití primární protilátky anti-Cytokeratin 8 (ředěné v poměru 1:100) v kombinaci se sekundární oslí protilátkou proti krysí Alexa Fluor 488 (ředěnou v poměru 1:500) v embryích ve stádiu 32 buněk, kultivovaných v Torinu 1/DMSO od E2,5 + 4h. Zeleně je znázorněn keratin a modře jsou znázorněna buněčná jádra (Vectashield). Barvení keratinem je výrazné ve vnějších buňkách, přičemž v inhibovaných embryích nebyly pozorovány buňky s defektním barvením. Velikost měřítka je 20 μ m.

4.6.4 Fluorescenční barvení protilátkou anti-(sc-216) PKC ζ (C-20)

Protože barvení primární protilátkou anti-Cytokeratin 8 nepřineslo zajímavé výsledky, rozhodli jsme se vyzkoušet barvení apikálních domén pomocí primární protilátky anti-(sc-216) PKC ζ (C-20) a zjistit tak, zda některé z vnějších buněk v inhibovaných embryích nevykazují známky ztráty polaroty. Primární protilátka byla ředěna v poměru 1:200

a byla použita v kombinaci se sekundární oslí protilátkou proti králičí Alexa Fluor 555, která byla ředěna v poměru 1:500. Ve výsledném barvení ale mezi inhibovanými a neinhibovanými embryi nebyl pozorován žádný rozdíl (obrázek 38), a při podrobnější analýze inhibovaných embryi jsme nezaznamenali žádné vnější buňky bez PKC ζ barvení. Proto usuzujeme, že u vnějších buněk bez exprese *Cdx2* a s cytoplazmatickou lokalizací YAP1 pravděpodobně nedochází ke změnám v apikální doméně.



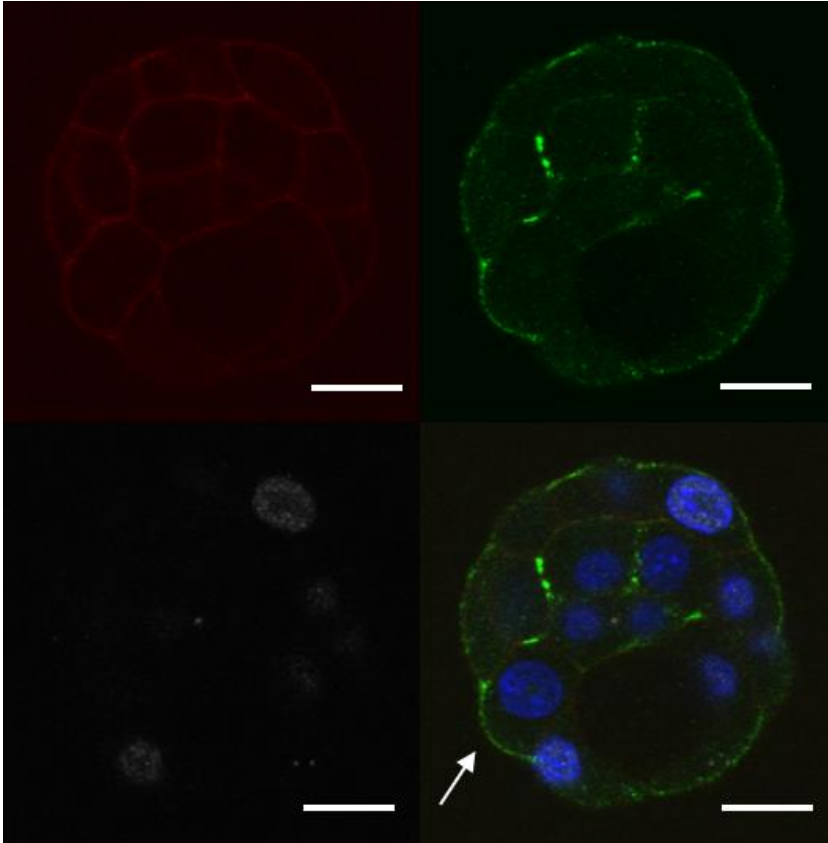
Obr. 38: Ukázka fluorescenčního barvení za použití primární protilátky anti-(sc-216) PKC ζ (C-20) (ředěné v poměru 1:200) v kombinaci se sekundární oslí protilátkou proti králičí Alexa Fluor 555 (ředěnou v poměru 1:500) v embryích ve stádiu 32 buněk, kultivovaných v Torinu 1/DMSO od E2,5 + 4h. Bíle je znázorněn protein PKC a modře jsou znázorněna buněčná jádra (Vectashield). Mezi barvením inhibovaných a neinhibovaných embryi nebyly pozorovány výrazné rozdíly. Velikost měřítka je 20 μ m.

4.6.5 Fluorescenční barvení protilátkou anti-AMOT v kombinaci s anti-CDX2, a anti-AMOT v kombinaci s anti-YAP1

Nakonec byly vyzkoušeny dvě kombinace protilátkového barvení ve spojení s fluorescencí vykazovanou v embryích vzniklých křížením námi používaných samic a samců F1 transgenních mT/mG hybridů (viz kapitola 3.1). V první sérii barvení byla použita kombinace primárních protilátek anti-AMOT a anti-CDX2 v kombinaci se sekundární oslí protilátkou proti králičí Alexa Fluor 488 a se sekundární oslí protilátkou proti myším IgG Alexa Fluor 647. Ve druhé sérii barvení byly kombinovány protilátky anti-AMOT a anti-YAP1, rovněž v kombinaci se sekundární oslí protilátkou proti králičí Alexa Fluor 488 a se sekundární oslí protilátkou proti myším IgG Alexa Fluor 647.

Tímto barvením jsme opět cílili na buněčnou polaritu, konkrétně na to, jak buněčná polarita může ovlivnit genovou expresi. Protein AMOT je ve vnějších buňkách lokalizován pouze na apikální membráně a u vnitřních buněk je přítomen na všech buněčných membránách (Hirate et al., 2013; Sasaki, 2017). Chtěli jsme tedy zjistit, zda ve vnějších buňkách bez exprese Cdx2/bez jaderné lokalizace proteinu YAP1 bude protein AMOT lokalizován pouze v apikální části domény, nebo v celé buněčné membráně. Pokud by jeho lokalizace byla i mimo apikální membránu, mohl by přispívat k aktivaci Hippo signální dráhy i u těchto vnějších buněk (Hippo dráha je normálně aktivní jenom u vnitřních buněk), které by tak získaly transkripční profil buněk vnitřních (Hirate & Sasaki, 2014).

Výsledkem bylo, že jsme u vnějších buněk bez exprese Cdx2/bez jaderné lokalizace proteinu YAP1 pozorovali přítomnost proteinu AMOT pouze v apikální doméně. Na obrázku 39 je příklad embrya barveného protilátkami anti-AMOT a anti-CDX2. Data pro barvení AMOT + CDX2, ani pro AMOT + YAP1 proto nebyla kvantifikována. Nemůžeme ale vyloučit možnost, že kvantifikace by ukázala mírně zvýšenou intenzitu fluorescence v laterálních doménách vnějších buněk bez CDX2 anebo jaderného YAP1, proto v budoucnu tyto data budeme kvantifikovat.



Obr. 39: Ukázka fluorescenčního barvení za použití protilátek anti-AMOT a anti-CDX2 v kombinaci se sekundární oslí protilátkou proti králičí Alexa Fluor 488 a se sekundární oslí protilátkou proti myším IgG Alexa Fluor 647 v embryu ve stádiu 32 buněk, inhibovaném Torinem 1 od E2,5 + 4h. Primární protilátka anti-AMOT byla ředěna v poměru 1:100, anti-CDX2 byla ředěna v poměru 1:200 a obě sekundární protilátky byly ředěné v poměru 1:500. Bíle je znázorněn CDX2, zeleně je znázorněn AMOT, modře jsou znázorněna buněčná jádra (Vectashield) a červeně je znázorněna tdTomato fluorescence buněčných membrán. Šipka ukazuje na vnější buňku bez exprese Cdx2, ve které je patrná lokalizace AMOT pouze na apikální doméně. Velikost měřítka je 20 μ m.

5. Diskuse

Navzdory tomu, že existence mTOR signální dráhy a princip jejího fungování byl znám již v minulém století, byla tato signální dráha zkoumána hlavně v souvislosti s nádorovými onemocněními, Diabetem 2. typu a různými typy neurodegenerativních onemocnění, například Alzheimerovou chorobou (Dann et al., 2007; Fasolo & Sessa, 2008; Guertin & Sabatini, 2007; Perluigi et al., 2021; Zoncu et al., 2010). Byly rovněž publikovány výzkumy ohledně její úlohy v myším embryonálním vývoji a imunitním systému (Bulut-Karslioglu et al., 2016; Gangloff et al., 2004; Shor et al., 2009), ale nikdo zatím nezkoumal, jakým způsobem mTOR regulovaná translace ovlivňuje preimplantační vývoj myších embryí.

Prvním cílem této diplomové práce bylo zjistit, zda je mTOR signální dráha aktivní během buněčného dělení z 8 na 16 buněk, jestli mTOR-regulovaná translace hraje roli při vzniku prvních vnitřních buněk preimplantačních embryí v 16buněčném stádiu a jak ovlivňuje segregaci trofoektodermu a vnitřní buněčné masy. Jelikož aktivita komplexu mTORC1 umožňuje fosforylaci proteinu 4E-BP1 (Gingras et al., 1999; Ma & Blenis, 2009; Zoncu et al., 2010), rozhodli jsme se porovnat intenzitu fluorescenčního signálu fosforylovaného a nefosforylovaného 4E-BP1 proteinu mezi dělicími se a nedělicími se buňkami a mezi embryi kultivovanými za standardních podmínek a embryi s inhibovanou mTOR dráhou prostřednictvím kultivace v médiu s Torinem 1.

Výsledné fluorescenční barvení bylo specifické a přineslo uspokojivé výsledky, zejména pak barvení protilátkou anti-Phospho-4E-BP1 (Thr37/46), ale u většiny ostatních použitých protilátek bylo relativně slabé, a to jak u inhibovaných, tak i u neinhibovaných embryí. Tento jev by mohl být do určité míry způsoben relativním stářím použitých protilátek a jistou roli by mohla hrát také nízká koncentrace barveného proteinu v jednotlivých buňkách embrya. Je škoda, že námi použité protilátky nevykázaly silnější barvení. Bylo by zajímavé vyzkoušet protilátky proti stejným proteinům od jiného výrobce a výsledná barvení porovnat.

Navzdory tomuto problému bylo, v souladu s našimi očekáváními, u embryí inhibovaných Torinem 1 detekováno výrazně slabší barvení fosforylovaných forem 4E-BP1 proteinu než u embryí neinhibovaných. Vzhledem k tomu, že inhibitor Torin 1 potlačuje fosforylaci 4E-BP1 proteinu (Thoreen et al., 2012) to ale nebyl nijak překvapivý výsledek, a znamená to, že imunofluorescenční barvení bylo u těchto protilátek specifické. Následná analýza intenzity fluorescenčního barvení ukázala, že množství celkového 4E-BP1 v buňkách je stabilní a dochází pouze ke změnám v množství fosforylované formy tohoto proteinu,

přičemž největší nárůst nastává na začátku mitotického dělení, když se rozpadá jaderná membrána, a během dalších mitotických fází dochází k poklesu, který pokračuje až do ustálení v interfázních buňkách.

Zajímavé výsledky byly rovněž získány fluorescenčním barvením ribosomálního proteinu S6, kdy v inhibovaných embryích došlo oproti kontrolním k signifikantnímu poklesu intenzity fluorescence. Ostatní použité protilátky už bohužel žádné zajímavé výsledky nepřinesly, což mohlo být způsobeno tím, že barvily nespecificky, nebo jejich stářím. Vliv by mohl mít rovněž námi použitý fixační a barvicí protokol, který by v budoucnu bylo možné modifikovat a zjistit, zda nepřinese v pozměněné formě lepší výsledky. Rovněž by bylo zajímavé vyzkoušet namísto fluorescenčního barvení například western blotovou techniku.

Lze konstatovat, že byla podpořena naše hypotéza ohledně aktivity mTOR signalizační dráhy a její regulace translace během buněčného dělení z 8 na 16 buněk. Tu jsme také následně potvrdili imunofluorescenčním barvením proteinu DDX21, jehož mRNA má ve svém 5' netranslatovaném regionu polypyrimidinový motiv. Kvantifikace intenzity fluorescence potvrdila, že pravděpodobně dochází ke snížení množství DDX21 proteinu během dělení z 8 na 16 buněk po inhibici mTOR dráhy, i když nebyla statisticky signifikantní, pravděpodobně kvůli nízkému počtu dělicích se buněk u kontrolních embryí. To naznačuje, že translace tohoto proteinu je regulována mTOR signální dráhou.

Na základě těchto výsledků bylo zkoumáno, zda je mTOR dráha aktivní také během dalších buněčných dělení, jmenovitě během dělení ze 2 buněk na 4, ze 4 buněk na 8, z 16 na 32 a ze 32 na 64. U všech těchto buněčných dělení byla pozorována vyšší intenzita barvení fosforylovaného 4E-BP1 v dělicích se buňkách oproti interfázním, což potvrzuje aktivitu mTOR dráhy během výše vyjmenovaných buněčných dělení. Předchozí výsledky naší laboratoře ale ukazují, že během dřívějších dělení (ze 2 buněk na 4 a ze 4 buněk na 8) nemá mTOR-regulovaná translace žádný zjevný efekt, protože kultivace embryí v médiu s Torinem 1 od 2buněčného do 16buněčného stádia vede ke stejnému fenotypu (méně vnitřních buněk) jako kultivace s Torinem 1 od 8buněčného do 16buněčného stádia (Gahurova et al., manuskript v přípravě).

Dále jsme se zabývali vlivem inhibice mTOR signální dráhy na počet vnitřních a SAD buněk v 16buněčných embryích. Předchozí experimenty provedené v naší laboratoři ukázaly, že inhibice Torinem 1 od E2,5 + 4h do E3,0 + 0/3/5h vede u 16buněčných embryí k poklesu počtu vnitřních a SAD buněk (Gahurova et al., manuskript v přípravě). Abychom ověřili, že tento jev nebyl způsoben jinou aktivitou mTOR dráhy, kterou by Torin 1 mohl ovlivňovat, rozhodli jsme se provést tentýž experiment za použití inhibitoru 4EGI-1. Inhibitor 4EGI-1 byl

zvolen proto, že zabraňuje asociaci eIF4E s eIF4G, čímž inhibuje translaci bez ovlivnění mTOR signalizace (Moerke et al., 2007). 4EGI-1 měl ale na vývoj embryí větší vliv než Torin 1 a způsobil výrazné opoždění inhibovaných embryí oproti kontrolám, čímž bylo znemožněno vyhodnocení experimentů. Z tohoto důvodu bylo navrženo kratší inhibiční okno (od E2,5 + 6h do E2,5 + 11h), které nemělo na vývoj embryí tak negativní dopad a vyhodnocení experimentů umožnilo.

Vzhledem k tomu, že jsme chtěli vliv obou výše zmíněných inhibitorů porovnat, bylo třeba zopakovat inhibici ve stejném vývojovém okně i s inhibitorem Torin 1. Oba inhibitory způsobily u 16buněčných embryí signifikantní pokles počtu vnitřních buněk, ale ne SAD buněk. Bylo tedy prokázáno, že k poklesu počtu vnitřních buněk u 16buněčných embryí dochází v důsledku inhibice translace závislé na čepičce, a nikoli v důsledku jiných buněčných procesů regulovaných mTOR signalizací.

S ohledem na výše zmíněné výsledky nás zajímalo, zda bude tento trend pokračovat také při prodloužení inhibice Torinem 1 do stádia 32 buněk a rovněž jsme chtěli zjistit, zda v těchto embryích nedochází k pokusům o kompenzování sníženého počtu vnitřních buněk. Embrya inhibovaná takto dlouhou dobu vykazovala opoždění ve vývoji. To je v souladu s pozorováním, že delece genu mTOR způsobuje významné zpomalení vývoje myších embryí, nebo dokonce jeho úplné zastavení (Gangloff et al., 2004; Shor et al., 2009). Naštěstí ale nebyly rozdíly mezi inhibovanými a neinhibovanými embryi natolik výrazné, že by znemožňovaly vyhodnocení experimentu, a navíc jsme pro vyhodnocení použili pouze embrya s 28 až 32 buňkami, přičemž průměrný počet buněk analyzovaných embryí byl u obou skupin stejný. Ze získaných dat jasně vyplynulo, že v inhibovaných embryích došlo k nárůstu počtu vnějších buněk (stejně, jako tomu bylo u 16buněčných embryí), ale nedošlo ke změnám v počtu vnějších buněk, nesoucích pro ně typickou expresi *Cdx2* a jadernou lokalizaci YAP1. To znamená, že je v takovýchto vnějších buňkách aktivní Hippo signální dráha, jejíž aktivita je ale typická pro buňky vnitřní (přehled v Sasaki, 2017). Takovéto buňky budou s velkou pravděpodobností internalizovány, t.j. přesunuty do polohy vnitřní buňky. To by mohlo značit, že se embrya snaží kompenzovat nízký počet vnitřních buněk. To není příliš překvapivé, vzhledem k regulativnímu vývoji preimplantačních myších embryí, kdy jsou oddělené nebo přemístěné blastomery či skupiny blastomer schopny změnit svůj buněčný osud a zregenerovat chybějící část embrya (Bulut-Karslioglu et al., 2016).

Pro podporu této hypotézy jsme se rozhodli provést sérii dalších fluorescenčních barvení, která nám měla pomoci lépe charakterizovat proces kompenzace nízkého počtu vnitřních buněk.

Jako první nás zajímalo, zda je v těchto vnitřně se chovajících vnějších buňkách správně ustavena apikální doména. Je známo, že přítomnost apikální membrány je nezbytná pro diferenciaci buněk v trofoektoderm (Hirate et al., 2013; Nishioka et al., 2008; Nishioka et al., 2009; Sasaki, 2017; Strumpf et al., 2005). Vzhledem k tomu, že jedním ze znaků trofoektodermu je hustá keratinová síť, která je ukotvována v apikální doméně a kterou vnitřní buněčná hmota postrádá (Lim et al., 2020), bylo vyzkoušeno barvení protilátkou anti Cytokeratin 8. Žádné z inhibovaných embryí ve vnějších buňkách nevykazovalo poruchy keratinové sítě, což znamená, že apikální doména pravděpodobně nebyla narušena. Toto pozorování jsme se rozhodli podpořit barvením protilátkou anti-PKC zeta, která barví samotnou apikální doménu. Ani při tomto barvení nebyly v inhibovaných embryích pozorovány žádné abnormality. Zjistili jsme také, že ani u inhibovaných embryí celkově, ani selektivně u malého množství vnějších buněk inhibovaných embryí nedochází k poruchám ustanovení apikální membrány.

Pozorovali jsme ale, že vnější buňky bez CDX2 a jaderného YAP1 mají často menší apikální doménu než typické vnější buňky, které vykazují standardní genovou expresi. Je tedy možné, že by nepřítomnost genové exprese typické pro vnější buňky mohla být způsobena nedostatečnou velikostí apikální membrány. Pokud by nedostatečná velikost apikální membrány zabraňovala v udržení specifikovaného buněčného osudu diferenciaci buňky na trofoektoderm, byla by takováto buňka nucena k internalizaci a specifikaci v ICM. To jsme se snažili dokázat pomocí barvení protilátkou anti-AMOT. Komplex AMOT bývá ve vnějších buňkách soustředěný v blízkosti apikální domény, zatímco u vnitřních buněk je lokalizován v blízkosti všech membrán. Výsledky ale vyvrátili naši hypotézu, že by AMOT ve vnějších buňkách bez exprese CDX2 nebo bez jaderného YAP1 nebyl všechen vychytán v apikální doméně (kvůli její menší ploše) a byl lokalizován i do bazolaterálních membrán.

V rámci dalšího pokračování tohoto projektu bude důležité změřit velikost apikálních membrán ve vnějších buňkách inhibovaných embryí, které nevykazují genovou expresi typickou pro vnější buňky, porovnat jí s velikostí apikální membrány klasických vnějších buněk, a stanovit tak velikost apikální membrány potřebnou pro udržení buněčného osudu trofoektodermu. Dále bude zajímavé pozorovat další vývoj embryí s inhibovanou mTOR signální dráhou a zjistit, zda skutečně dojde k internalizaci námi pozorovaných vnějších buněk, vykazujících chování buněk vnitřních, nebo jestli u některých z nich dojde k diferenciaci v trofoektodermální linii. Rovněž bude zajímavé zjistit, zda mají embrya v období segregace PE a EPI stále nižší počet vnitřních buněk, a pokud ano, jak se s tím vyrovnávají.

V neposlední řadě by bylo zajímavé vytipovat nové geny s obsahem TOP nebo TOP-like motivu a sledovat změny v množství jejich exprese během inhibice mTOR signální dráhy. Rovněž by bylo vhodné vyzkoušet fluorescenční barvení (p)4E-BP1 a také ostatních proteinů, které jsou součástí mTORC1 komplexu, za použití protilátek vyráběných jinými firmami než těmi, jejichž protilátky byly použity k fluorescenčnímu barvení v této práci. Dále by mohlo být přínosné pokusit se optimalizovat fixační a barvicí postupy pro získání kvalitnějších výstupních dat, nebo provést detekci proteinů pomocí western blotové techniky.

Celá diplomová práce a výsledky v ní prezentované jsou součástí většího projektu naší laboratoře, který se zabývá tím, jak je ovlivňováno prostorové rozmístění blastomer v myších preimplantačních embryích prostřednictvím translace závislé na čepičce. Přípravovaný manuskript:

„Gahurova L., Tomankova J., Cerna P., Bora P., Kubickova M., Kovacicova K., Potesil D., Zdrahal Z., Anger M., Susor A., Bruce A.W.: Spatial positioning of preimplantation mouse embryo blastomeres is regulated by a cap-dependent translation at the 8- to 16-cell transition. Manuskript v přípravě „

je v plánu publikovat v první polovině roku 2023.

6. Seznam literatury

Ajduk, A., Shivhare, S. B., & Zernicka-Goetz, M. (2014). The basal position of nuclei is one pre-requisite for asymmetric cell divisions in the early mouse embryo. In *Developmental Biology*, 392(2), (pp. 133-140). Elsevier. <https://doi.org/10.1016/j.ydbio.2014.05.009>

Anani, S., Bhat, S., Honma-Yamanaka, N., Krawchuk, D., & Yamanaka, Y. (2014). Initiation of Hippo signaling is linked to polarity rather than to cell position in the pre-implantation mouse embryo. *Development*, 141(14), 2813-2824. <https://doi.org/10.1242/dev.107276>

Avilion, A. A., Nicolis, S. K., Pevny, L. H., Perez, L., Vivian, N., & Lovell-Badge, R. (2003). Multipotent cell lineages in early mouse development depend on SOX2 function. *Genes & Development*, 17(1), 126-140. <https://doi.org/10.1101/gad.224503>

Beretta, L., Gingras, A. C., Svitkin, Y. V., Hall, M. N., & Sonenberg, N. (1996). Rapamycin blocks the phosphorylation of 4E-BP1 and inhibits cap-dependent initiation of translation. In *The EMBO Journal*, 15(3), (pp. 658-664). <https://doi.org/10.1002/j.1460-2075.1996.tb00398.x>

Beugnet, A., Tee, A. R., Taylor, P. M., & Proud, C. G. (2003). Regulation of targets of mTOR (mammalian target of rapamycin) signalling by intracellular amino acid availability. In *Biochemical Journal*, 372(2), (pp. 555-566). <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC1223408/>

Bora, P., Gahurova, L., Hauserova, A., Stiborova, M., Collier, R., Potěšil, D., Zdráhal, Z., & Bruce, A. W. (2021). DDX21 is a p38-MAPK-sensitive nucleolar protein necessary for mouse preimplantation embryo development and cell-fate specification. In *Open Biology*, 11(7). <https://doi.org/10.1098/rsob.210092>

Bora, P., Gahurova, L., Mašek, T., Hauserova, A., Potěšil, D., Jansova, D., Susor, A., Zdráhal, Z., Ajduk, A., Pospíšek, M., & Bruce, A. W. (2020). P38-MAPK-mediated translation regulation during early blastocyst development is required for primitive endoderm differentiation in mice. In *Communications Biology*, 4(1). <https://doi.org/10.1038/s42003-021-02290-z>

Bulut-Karslioglu, A., Biechele, S., Jin, H., Macrae, T. A., Hejna, M., Gertsenstein, M., Song, J. S., & Ramalho-Santos, M. (2016). Inhibition of mTOR induces a paused pluripotent state. In *Nature*, 540(7631), (pp. 119-123). <https://doi.org/10.1038/nature20578>

Chazaud, C., & Yamanaka, Y. (2016). Lineage specification in the mouse preimplantation embryo. *Development*, 143(7), 1063-1074. <https://doi.org/10.1242/dev.128314>

Chazaud, C., Yamanaka, Y., Pawson, T., & Rossant, J. (2006). Early Lineage Segregation between Epiblast and Primitive Endoderm in Mouse Blastocysts through the Grb2-MAPK Pathway. *Developmental Cell*, 10(5), 615-624. <https://doi.org/10.1016/j.devcel.2006.02.020>

Cockburn, K., & Rossant, J. (2010). Making the blastocyst: lessons from the mouse. *Journal of Clinical Investigation*, 120(4), 995-1003. <https://doi.org/10.1172/JCI41229>

Coffman, K., Yang, B., Lu, J., Tetlow, A. L., Pelliccio, E., Lu, S., Guo, D. C., Tang, C., Dong, M. Q., & Tamanoi, F. (2014). Characterization of the Raptor/4E-BP1 Interaction by Chemical Cross-linking Coupled with Mass Spectrometry Analysis. In *Journal of Biological Chemistry*, 289(8), (pp. 4723-4734). <https://doi.org/10.1074/jbc.M113.482067>

- Dann, S. G., Selvaraj, A., & Thomas, G. (2007). mTOR Complex1–S6K1 signaling: at the crossroads of obesity, diabetes and cancer. In *Trends in Molecular Medicine*, 13(6), (pp. 252-259). <https://doi.org/10.1016/j.molmed.2007.04.002>
- Fasolo, A., & Sessa, C. (2008). mTOR inhibitors in the treatment of cancer. In *Expert Opinion on Investigational Drugs*, 17(11), (pp. 1717-1734). <https://doi.org/10.1517/13543784.17.11.1717>
- Fingar, D. C., Richardson, C. J., Tee, A. R., Cheatham, L., Tsou, C., & Blenis, J. (2004). mTOR Controls Cell Cycle Progression through Its Cell Growth Effectors S6K1 and 4E-BP1/Eukaryotic Translation Initiation Factor 4E. In *Molecular and Cellular Biology*, 24(1), (pp. 200-216). <https://doi.org/10.1128/MCB.24.1.200-216.2004>
- Fingar, D. C., Salama, S., Tsou, C., Harlow, E., & Blenis, J. (2002). Mammalian cell size is controlled by mTOR and its downstream targets S6K1 and 4EBP1/eIF4E. In *Genes & Development*, 16(12), (pp. 1472-1487). <http://genesdev.cshlp.org/content/16/12/1472.short>
- Fonseca, B. D., Jia, J. J., Hollensen, A. K., Pointet, R., Hoang, H. D., Niklaus, M. R., Pena, I. A., Lahr, R. M., Smith, E. M., Hearnden, J., Wang, X. D., Yang, A. D., Celucci, G., Graber, T. E., Dajadian, C., Yu, Y., Damgaard, C. K., Berman, A. J., & Alain, T. (2018). LARP1 is a major phosphorylation substrate of mTORC1. In *BioRxiv*. <https://doi.org/10.1101/491274>
- Fonseca, B. D., Smith, E. M., Yelle, N., Alain, T., Bushell, M., & Pause, A. (2014). The ever-evolving role of mTOR in translation. In *Seminars in Cell & Developmental Biology*, 36, (pp. 102-112). ELSEVIER. <https://doi.org/10.1016/j.semcd.2014.09.014>
- Fonseca, B. D., Zakaria, C., Jia, J. J., Graber, T. E., Svitkin, Y., Tahmasebi, S., Healy, D., Hoang, H. D., Jensen, J. M., Diao, I. T., Lussier, A., Dajadian, C., Padmanabhan, N., Wang, W., Matta Camacho, E., Hearnden, J., Smith, E. M., Tsukumo, Y., Yanagiya, A., et al. (2015). La-related Protein 1 (LARP1) Represses Terminal Oligopyrimidine (TOP) mRNA Translation Downstream of mTOR Complex 1 (mTORC1). In *Journal of Biological Chemistry*, 290(26), (pp. 15996-16020). <https://doi.org/10.1074/jbc.M114.621730>
- Fuentes, P., Pelletier, J., Martínez Herráez, C., Díez Obrero, V., Iannizzotto, F., Rubio, T., García Cajide, M., Menoyo, S., Moreno, V., Salazar, R., Tauler, A., & Gentilella, A. (2021). The 40S-LARP1 complex reprograms the cellular translome upon mTOR inhibition to preserve the protein synthetic capacity. In *Science advances*, 7(48). <https://www.science.org/doi/10.1126/sciadv.abg9275>
- Gahurova L., Tomankova J., Cerna P., Bora P., Kubickova M., Kovacicova K., Potesil D., Zdrahal Z., Anger M., Susor A., Bruce A.W.: Spatial positioning of preimplantation mouse embryo blastomeres is regulated by a cap-dependent translation at the 8- to 16-cell transition. *Manuskript v přípravě*.
- Gangloff, Y. G., Mueller, M., Dann, S. G., Svoboda, P., Sticker, M., Spetz, J. F., Um, S. H., Brown, E. J., Cereghini, S., Thomas, G., & Kozma, S. C. (2004). Disruption of the Mouse mTOR Gene Leads to Early Postimplantation Lethality and Prohibits Embryonic Stem Cell Development. In *Molecular and Cellular Biology*, 24(21), (pp. 9508–9516). <https://doi.org/10.1128/MCB.24.21.9508-9516.2004>
- Gingras, A. C., Gygi, S. P., Raught, B., Polakiewicz, R. D., Abraham, R. T., Hoekstra, M. F., Aebersold, R., & Sonenberg, N. (1999b). Regulation of 4E-BP1 phosphorylation: a novel two-step mechanism. In *Genes & Development*, 13(11), (pp. 1422-1437). <http://genesdev.cshlp.org/content/13/11/1422.short>

Gingras, A. C., Raught, B., Gygi, S. P., Niedzwiecka, A., Miron, M., Burley, S. K., Polakiewicz, R. D., Wyslouch Cieszyńska, A., Aebersold, R., & Sonenberg, N. (2001b). Hierarchical phosphorylation of the translation inhibitor 4E-BP1. In *Genes & Development*, 15(21), (pp. 2852-2864). <http://genesdev.cshlp.org/content/15/21/2852.short>

Gingras, A. C., Raught, B., & Sonenberg, N. (1999). eIF4 initiation factors: effectors of mRNA recruitment to ribosomes and regulators of translation. In *Annual review of biochemistry*, 68(1), (pp. 913–963). https://www.researchgate.net/profile/Nahum-Sonenberg/publication/12447323_Gingras_AC_Raught_B_Sonenberg_N_eIF4_initiation_factors_effectors_of_mRNA_recruitment_to_ribosomes_and_regulators_of_translation_Ann_Rev_Biochem_68_913-963/links/590c83e0458515978182dfb6/Gingras-AC-Raught-B-Sonenberg-N-eIF4-initiation-factors-effectors-of-mRNA-recruitment-to-ribosomes-and-regulators-of-translation-Ann-Rev-Biochem-68-913-963.pdf

Graham, S. J. L., & Zernicka-Goetz, M. (2016). The Acquisition of Cell Fate in Mouse Development: How Do Cells First Become Heterogeneous?. In *Essays on Developmental Biology, Part B*, (pp. 671-695). Elsevier. <https://doi.org/10.1016/bs.ctdb.2015.11.021>

Guertin, D. A., & Sabatini, D. M. (2007). Defining the Role of mTOR in Cancer. In *Cancer Cell*, 12(1), (pp. 9-22). <https://doi.org/10.1016/j.ccr.2007.05.008>

Guertin, D. A., Stevens, D. M., Thoreen, C. C., Burds, A. A., Kalaany, N. Y., Moffat, J., Brown, M., Fitzgerald, K. J., & Sabatini, D. M. (2006). Ablation in Mice of the mTORC Components raptor, rictor, or mLST8 Reveals that mTORC2 Is Required for Signaling to Akt-FOXO and PKCa, but Not S6K1. In *Developmental Cell*, 11(6), (pp. 859-871). <https://doi.org/10.1016/j.devcel.2006.10.007>

Hara, K., Maruki, Y., Long, X., Yoshino, K., Hara, T., Oshiro, N., Hidayat, S., Tokunaga, C., Avruch, J., & Yonezawa, K. (2002). Raptor, a Binding Partner of Target of Rapamycin (TOR), Mediates TOR Action. In *Cell*, 110(2), (pp. 177-189). [https://doi.org/10.1016/S0092-8674\(02\)00833-4](https://doi.org/10.1016/S0092-8674(02)00833-4)

Hay, N., & Sonenberg, N. (2004). Upstream and downstream of mTOR. In *Genes & Development*, 18(16), (pp. 1926-1945). <http://www.genesdev.org/cgi/doi/10.1101/gad.1212704>

Hirate, Y., Hirahara, S., Inoue, K., Suzuki, A., Alarcon, V. B., Akimoto, K., Hirai, T., Hara, T., Adachi, M., Chida, K., Ohno, S., Marikawa, Y., Nakao, K., Shimono, A., & Sasaki, H. (2013). Polarity-Dependent Distribution of Angiomin Localizes Hippo Signaling in Preimplantation Embryos. *Current Biology*, 23(13), 1181-1194. <https://doi.org/10.1016/j.cub.2013.05.014>

Hirate, Y., & Sasaki, H. (2014). The role of angiomin phosphorylation in the Hippo pathway during preimplantation mouse development. In *Tissue Barriers*, 2(1). <https://doi.org/10.4161/tisb.28127>

Holz, M. K., Ballif, B. A., Gygi, S. P., & Blenis, J. (2005). mTOR and S6K1 Mediate Assembly of the Translation Preinitiation Complex through Dynamic Protein Interchange and Ordered Phosphorylation Events. In *Cell*, 123(4), (pp. 569-580). <https://doi.org/10.1016/j.cell.2005.10.024>

Jacinto, E., Loewith, R., Schmidt, A., Lin, S., Ruegg, M. A., Hall, A., & Hall, M. N. (2004). Mammalian TOR complex 2 controls the actin cytoskeleton and is rapamycin insensitive. In *Nature Cell Biology*, 6(11), (pp. 1122–1128). <https://doi.org/10.1038/ncb1183>

- Jansova, D., Koncicka, M., Tetkova, A., Cerna, R., Malik, R., del Llano, E., Kubelka, M., & Susor, A. (2017). Regulation of 4E-BP1 activity in the mammalian oocyte. In *Cell Cycle*, 16(10), (pp. 927-939). <https://doi.org/10.1080/15384101.2017.1295178>
- Jedrusik, A., Parfitt, D. -E., Guo, G., Skamagki, M., Grabarek, J. B., Johnson, M. H., Robson, P., & Zernicka-Goetz, M. (2008). Role of Cdx2 and cell polarity in cell allocation and specification of trophectoderm and inner cell mass in the mouse embryo. In *Genes & Development*, 22(19), (pp. 2692-2706). <http://www.genesdev.org/cgi/doi/10.1101/gad.486108>
- Johnson, M. H., & Ziomek, C. A. (1981). The foundation of two distinct cell lineages within the mouse morula. In *Cell*, 24(1), (pp. 71-80). [https://doi.org/10.1016/0092-8674\(81\)90502-X](https://doi.org/10.1016/0092-8674(81)90502-X)
- Kim, D. H., Sarbassov, D. D., Ali, S. M., King, J. E., Latek, R. R., Erdjument Bromage, H., Tempst, P., & Sabatini, D. M. (2002). MTOR Interacts with Raptor to Form a Nutrient-Sensitive Complex that Signals to the Cell Growth Machinery. In *Cell*, 110(2), (pp. 163-175). [https://doi.org/10.1016/S0092-8674\(02\)00808-5](https://doi.org/10.1016/S0092-8674(02)00808-5)
- Korotkevich, E., Niwayama, R., Courtois, A., Friese, S., Berger, N., Buchholz, F., & Hiiragi, T. (2017). The Apical Domain Is Required and Sufficient for the First Lineage Segregation in the Mouse Embryo. In *Developmental Cell*, 40(3), (pp. 235-247 .e7.). <https://doi.org/10.1016/j.devcel.2017.01.006>
- Lee, S. E., Sun, S. C., Choi, H. Y., Uhm, S. J., & Kim, N. H. (2012). mTOR Is Required for Asymmetric Division Through Small GTPases in Mouse Oocytes. In *Molecular Reproduction & Development*, 79(5), (pp. 356-366). <https://doi.org/10.1002/mrd.22035>
- Leung, C. Y., & Zernicka-Goetz, M. (2013). Angiomotin prevents pluripotent lineage differentiation in mouse embryos via Hippo pathway-dependent and -independent mechanisms. *Nature Communications*, 4(1). <https://doi.org/10.1038/ncomms3251>
- Lim, H. Y. G., Alvarez, Y. D., Gasnier, M., Wang, Y., Tetlak, P., Bissiere, S., Wang, H., Biro, M., & Plachta, N. (2020). Keratins are asymmetrically inherited fate determinants in the mammalian embryo. In *Nature*, 585(7825), (pp. 404–409). <https://doi.org/10.1038/s41586-020-2647-4>
- Liu, Q., Chang, J. W., Wang, J., Kang, S. A., Thoreen, C. C., Markhard, A., Hur, W., Zhang, J., Sim, T., Sabatini, D. M., & Gray, N. S. (2010). Discovery of 1-(4-(4-propionylpiperazin-1-yl)-3-(trifluoromethyl)phenyl)-9-(quinolin-3-yl)benzo[h][1,6]naphthyridin-2(1H)-one as a highly potent, selective Mammalian Target of Rapamycin (mTOR) inhibitor for the treatment of cancer. In *Journal of Medicinal Chemistry*, 53(19), (pp. 7146–7155). <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3893826/>
- Loewith, R., Jacinto, E., Wullschleger, S., Lorberg, A., Crespo, J. L., Bonenfant, D., Oppliger, W., Jenoe, P., & Hall, M. N. (2002). Two TOR Complexes, Only One of which Is Rapamycin Sensitive, Have Distinct Roles in Cell Growth Control. In *Molecular Cell*, 10(3), (pp. 457-468). [https://doi.org/10.1016/S1097-2765\(02\)00636-6](https://doi.org/10.1016/S1097-2765(02)00636-6)
- Ma, X. M., & Blenis, J. (2009). Molecular mechanisms of mTOR-mediated translational control. In *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, 10, (pp. 307–318). <https://doi.org/10.1038/nrm2672>

- Meilhac, S. M., Adams, R. J., Morris, S. A., Danckaert, A., Le Garrec, J. -F., & Zernicka-Goetz, M. (2009). Active cell movements coupled to positional induction are involved in lineage segregation in the mouse blastocyst. In *Developmental Biology*, 331(2), (pp. 210-221). Elsevier. <https://doi.org/10.1016/j.ydbio.2009.04.036>
- Mihajlović, A. I., & Bruce, A. W. (2017). The first cell-fate decision of mouse preimplantation embryo development: integrating cell position and polarity. *Open Biology*, 7(11). <https://doi.org/10.1098/rsob.170210>
- Moerke, N. J., Aktas, H., Chen, H., Cantel, S., Reibarkh, M. Y., Fahmy, A., Gross, J. D., Degtarev, A., Yuan, J., Chorev, M., Halperin, J. A., & Wagner, G. (2007). Small-Molecule Inhibition of the Interaction between the Translation Initiation Factors eIF4E and eIF4G. In *Cell*, 128(2), (pp. 257-267). <https://doi.org/10.1016/j.cell.2006.11.046>
- Morris, S. A., Teo, R. T. Y., Li, H., Robson, P., Glover, D. M., & Zernicka-Goetz, M. (2010). Origin and formation of the first two distinct cell types of the inner cell mass in the mouse embryo. In *PNAS*, 107(14), (pp. 6364-6369). <https://doi.org/10.1073/pnas.0915063107>
- Murakami, M., Ichisaka, T., Maeda, M., Oshiro, N., Hara, K., Edenhofer, F., Kiyama, H., Yonezawa, K., & Yamanaka, S. (2004). MTOR Is Essential for Growth and Proliferation in Early Mouse Embryos and Embryonic Stem Cells. In *Molecular and Cellular Biology*, 24(15), (pp. 6710–6718). <https://doi.org/10.1128/MCB.24.15.6710-6718.2004>
- Nishioka, N., Inoue, K., Ichi, Adachi, K., Kiyonari, H., Ota, M., Ralston, A., Yabuta, N., Hirahara, S., Stephenson, R. O., Ogonuki, N., Makita, R., Kurihara, H., Morin-Kensicki, E. M., Nojima, H., Rossant, J., Nakao, K., Niwa, H., & Sasaki, H. (2009). The Hippo Signaling Pathway Components Lats and Yap Pattern Tead4 Activity to Distinguish Mouse Trophectoderm from Inner Cell Mass. *Developmental Cell*, 16(3), 398-410. <https://doi.org/10.1016/j.devcel.2009.02.003>
- Nishioka, N., Yamamoto, S., Kiyonari, H., Sato, H., Sawada, A., Ota, M., Nakao, K., & Sasaki, H. (2008). Tead4 is required for specification of trophectoderm in pre-implantation mouse embryos. *Mechanisms of Development*, 125(3-4), 270-283. <https://doi.org/10.1016/j.mod.2007.11.002>
- Niwa, H., Toyooka, Y., Shimosato, D., Strumpf, D., Takahashi, K., Yagi, R., & Rossant, J. (2005). Interaction between Oct3/4 and Cdx2 Determines Trophectoderm Differentiation. In *Cell* 123(5), (pp. 917-929). <https://doi.org/10.1016/j.cell.2005.08.040>
- Pende, M., Um, S. H., Mieulet, V., Sticker, M., Goss, V. L., Mestan, J., Mueller, M., Fumagalli, S., Kozma, S. C., & Thomas, G. (2004). S6K1-/-/S6K2-/- Mice Exhibit Perinatal Lethality and Rapamycin-Sensitive 5'-Terminal Oligopyrimidine mRNA Translation and Reveal a Mitogen-Activated Protein Kinase-Dependent S6 Kinase Pathway. In *Molecular and Cellular Biology*, 24(8), (pp. 3112–3124). <https://doi.org/10.1128/MCB.24.8.3112-3124.2004>
- Perluigi, M., Di Domenico, F., Barone, E., & Butterfield, D. A. (2021). mTOR in Alzheimer disease and its earlier stages: Links to oxidative damage in the progression of this dementing disorder. In *Free Radical Biology and Medicine*, 169, (pp. 382-396). <https://doi.org/10.1016/j.freeradbiomed.2021.04.025>
- Plusa, B., Frankenberg, S., Chalmers, A., Hadjantonakis, A. -K., Moore, C. A., Papalopulu, N., Papaioannou, V. E., Glover, D. M., & Zernicka-Goetz, M. (2005). Downregulation of Par3 and aPKC function directs cells towards the ICM in the preimplantation mouse embryo. In *Journal of Cell Science*, 118(3), (pp. 505–515). <https://doi.org/10.1242/jcs.01666>

Plusa, B., Piliszek, A., Frankenberg, S., Artus, J., & Hadjantonakis, A. -K. (2008). Distinct sequential cell behaviours direct primitive endoderm formation in the mouse blastocyst. *Development*, 135(18), 3081-3091. <https://doi.org/10.1242/dev.021519>

Posfai, E., Petropoulos, S., Oliveira de Barros, F. R., Schell, J. P., Jurisica, I., Sandberg, R., Lanner, F., & Rossant, J. (2017). Position- and Hippo signaling-dependent plasticity during lineage segregation in the early mouse embryo. *ELIFE*, 1-24. <https://doi.org/10.7554/eLife.22906>

Qin, X., Jiang, B., & Zhang, Y. (2016). 4E-BP1, a multifactor regulated multifunctional protein. In *Cell Cycle*, 15(6), (pp. 781-786). <https://doi.org/10.1080/15384101.2016.1151581>

Samarage, C. R., White, M. D., Alvarez, Y. D., Fierro-González, J. C., Henon, Y., Jesudason, E. C., Bissiere, S., Fouras, A., & Plachta, N. (2015). Cortical Tension Allocates the First Inner Cells of the Mammalian Embryo. In *Developmental Cell*, 34(4), (pp. 435-447). <https://doi.org/10.1016/j.devcel.2015.07.004>

Sarbassov, D. D., Ali, S. M., Sengupta, S., Sheen, J. H., Hsu, P. P., Bagley, A. F., Markhard, A. L., & Sabatini, D. M. (2006). Prolonged Rapamycin Treatment Inhibits mTORC2 Assembly and Akt/PKB. In *Molecular Cell*, 22(2), (pp. 159-168). <https://doi.org/10.1016/j.molcel.2006.03.029>

Sasaki, H. (2010). Mechanisms of trophectoderm fate specification in preimplantation mouse development. *Development, Growth & Differentiation*, 52(3), 263-273. <https://doi.org/10.1111/j.1440-169X.2009.01158.x>

Sasaki, H. (2017). Roles and regulations of Hippo signaling during preimplantation mouse development. *Development, Growth & Differentiation*, 59(1), 12-20. <https://doi.org/10.1111/dgd.12335>

Schindelin, J., Arganda-Carreras, I., Frise, E., Kaynig, V., Longair, M., Pietzsch, T., Preibisch, S., Rueden, C., Saalfeld, S., Schmid, B., Tinevez, J. -Y., White, D. J., Hartenstein, V., Eliceiri, K., Tomancak, P., & Cardona, A. (2012). Fiji: an open-source platform for biological-image analysis. In *Nature Methods*, 9(7), (pp. 676–682). <https://doi.org/10.1038/nmeth.2019>

Severance, A. L., & Latham, K. E. (2017). PLK1 regulates spindle association of phosphorylated eukaryotic translation initiation factor 4E-binding protein and spindle function in mouse oocytes. In *American Journal of Physiology-Cell Physiology*, 313(5), (pp. C501-C515). <https://doi.org/10.1152/ajpcell.00075.2017>

Shima, H., Pende, M., Chen, Y., Fumagalli, S., Thomas, G., & Kozma, S. C. (1998). Disruption of the p70s6k/p85s6k gene reveals a small mouse phenotype and a new functional S6 kinase. In *The EMBO Journal*, 17(22), (pp. 6649-6659). <https://doi.org/10.1093/emboj/17.22.6649>

Shor, B., Cavender, D., & Harris, C. (2009). A kinase dead knock-in mutation in mTOR leads to early embryonic lethality and is dispensable for the immune system in heterozygous mice. In *BMC Immunology*, 10(1). <https://doi.org/10.1186/1471-2172-10-28>

Stephenson, R. O., Yamanaka, Y., & Rossant, J. (2010). Disorganized epithelial polarity and excess trophectoderm cell fate in preimplantation embryos lacking E-cadherin. In *Development*, 137(20), (pp. 3383–3391). <https://doi.org/10.1242/dev.050195>

Strumpf, D., Mao, C. -A., Yamanaka, Y., Ralston, A., Chawengsaksophak, K., Beck, F., & Rossant, J. (2005). Cdx2 is required for correct cell fate specification and differentiation of trophectoderm in the mouse blastocyst. *Development*, 132(9), 2093-2102.
<https://doi.org/10.1242/dev.01801>

Susor, A., Jansova, D., Cerna, R., Danylevska, A., Anger, M., Toralova, T., Malik, R., Supolikova, J., Cook, M. S., Oh, J. S., & Kubelka, M. (2015). Temporal and spatial regulation of translation in the mammalian oocyte via the mTOR–eIF4F pathway. In *Nature Communications*, 6(1). <https://doi.org/10.1038/ncomms7078>

Sutherland, A. E., Speed, T. P., & Calarco, P. G. (1990). Inner cell allocation in the mouse morula: The role of oriented division during fourth cleavage. In *Developmental Biology*, 137(1), (pp. 13-25). Elsevier. [https://doi.org/10.1016/0012-1606\(90\)90003-2](https://doi.org/10.1016/0012-1606(90)90003-2)

Suwińska, A., Czołowska, R., Ożdżeński, W., & Tarkowski, A. K. (2008). Blastomeres of the mouse embryo lose totipotency after the fifth cleavage division: Expression of Cdx2 and Oct4 and developmental potential of inner and outer blastomeres of 16- and 32-cell embryos. In *Developmental Biology*, 322(1), (pp. 133-144).
<https://doi.org/10.1016/j.ydbio.2008.07.019>

Tarkowski, A. K., & Wróblewska, J. (1967). Development of blastomeres of mouse eggs isolated at the 4- and 8-cell stage. In *Development*, 18(1), (pp. 155–180).
<https://doi.org/10.1242/dev.18.1.155>

Thoreen, C. C., Chantranupong, L., Keys, H. R., Wang, T., Gray, N. S., & Sabatini, D. M. (2012). A unifying model for mTORC1-mediated regulation of mRNA translation. In *Nature*, 485(7396), (pp. 109-113). <https://doi.org/10.1038/nature11083>

Vinot, S., Le, T., Ohno, S., Pawson, T., Maro, B., & Louvet-Vallée, S. (2005). Asymmetric distribution of PAR proteins in the mouse embryo begins at the 8-cell stage during compaction. In *Developmental Biology*, 282(2), (pp. 307-319). Elsevier.
<https://doi.org/10.1016/j.ydbio.2005.03.001>

Watanabe, T., Biggins, J. S., Tannan, N. B., & Srinivas1, S. (2014). Limited predictive value of blastomere angle of division in trophectoderm and inner cell mass specification. In *Development*, 141(11), (pp. 2279–2288). <https://doi.org/10.1242/dev.103267>

White, M. D., Zenker, J., Bissiere, S., & Plachta, N. (2018). Instructions for Assembling the Early Mammalian Embryo. *Developmental Cell*, 45(6), 667-679.
<https://doi.org/10.1016/j.devcel.2018.05.013>

Wicklow, E., Blij, S., Frum, T., Hirate, Y., Lang, R. A., Sasaki, H., & Ralston, A. (2014). HIPPO Pathway Members Restrict SOX2 to the Inner Cell Mass Where It Promotes ICM Fates in the Mouse Blastocyst. In *PLoS Genetics*, 10(10), e1004618
<https://doi.org/10.1371/journal.pgen.1004618>

Yamanaka, Y., Ralston, A., Stephenson, R. O., & Rossant, J. (2006). Cell and Molecular Regulation of the Mouse Blastocyst. In *Developmental Dynamics*, 235(9), (pp. 2301-2314).
<https://doi.org/10.1002/dvdy.20844>

Zamfirescu, R. C., Day, M. L., & Morris, M. B. (2021). MTORC1/2 signaling is downregulated by amino acid-free culture of mouse preimplantation embryos and is only partially restored by amino acid readdition. In *American Journal of Physiology-Cell Physiology*, 320(1), (pp. C30-C44). <https://doi.org/10.1152/ajpcell.00385.2020>

Zernicka-Goetz, M., Morris, S. A., & Bruce, A. W. (2009). Making a firm decision: multifaceted regulation of cell fate in the early mouse embryo. In *Nature Reviews Genetics*, 10(7), (pp. 467–477). <https://doi.org/10.1038/nrg2564>

Zoncu, R., Efeyan, A., & Sabatini, D. M. (2010). mTOR: from growth signal integration to cancer, diabetes and ageing. In *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, 12(1), (pp. 21–35). <https://doi.org/10.1038/nrm3025>