

Jihočeská univerzita v Českých Budějovicích

Přírodovědecká fakulta

**Charakterizace role genu *Fbxw16* v myším
preimplantačním embryonálním vývoji**

Bakalářská práce

Eliška Bláhová

Školitelka: Mgr. Lenka Gahurová, PhD

České Budějovice 2022

Bláhová, E., 2022: Charakterizace role genu *Fbxw16* v myším preimplantačním embryonálním vývoji. [Characterization of the role of *Fbxw16* gene in mouse preimplantation embryonic development. Bc. Thesis, in Czech.] –31 p., Faculty of Science, University of South Bohemia, České Budějovice, Czech Republic.

Annotation

In this bachelor thesis I study with the function of the unknown mouse gene *Fbxw16* encoding F-box proteins that are part of the ubiquitin-ligase complex. Due to the proteolytic degradation of proteins with the maternal effect, this gene affects the entire preimplantation embryonic development of mice.

Prohlášení

Prohlašuji, že svoji bakalářskou práci jsem vypracovala samostatně pouze s použitím pramenů a literatury uvedených v seznamu citované literatury.

V Českých Budějovicích dne 13. 4. 2022

.....

Eliška Bláhová

Poděkování

V první řadě bych chtěla poděkovat mojí vedoucí práce Mgr. Lence Gahurové, Phd. za podnětné rady, odbornou pomoc, trpělivost a ochotu, kterou mi poskytovala při zpracovávání mé bakalářské práce a za čas, který mi věnovala. Poděkování patří i mé rodině a přátelům, kteří mi byli oporou po psychické stránce.

Obsah

1. Úvod.....	1
1.1. Oocyt jako nevyhnutelná prerekvizita embryonálního vývoje	1
1.2. Preimplantační embryonální vývoj myši	2
1.3. Gen <i>Fbxw16</i>	5
1.3.1. F-box proteiny	5
1.3.2. Ubikvitin-ligázový komplex.....	6
1.3.3. Proces ubikvitinace.....	7
2. Cíle práce.....	9
3. Materiál a metody.....	10
3.1. Genotypizace myši B16	10
3.1.1. Extrakce DNA	10
3.1.2. Analýza genotypu.....	10
3.2. Křížení	12
3.3. Kultivace embryí.....	12
3.3.1. Superovulace samic	12
3.3.2. Pitva.....	13
3.3.3. Fixace	14
3.3.4. Vizualizace embryí.....	15
4. Výsledky.....	16
4.1. Optimalizace podmínek	16
4.1.1. Genotypizace mláďat původního parentálního křížení	19
4.2. Ověření embryonální letality delece genu <i>Fbxw16</i>	20
4.2.1. Počty narozených mláďat dle varianty křížení	20
4.2.2. Genotypy narozených mláďat dle varianty křížení	21
4.3. Vliv genu <i>Fbxw16</i> na fenotypy embryí	22
4.3.1. Fenotypy embryí in vitro kultivací do E1,5.....	22
4.3.2. Fenotypy embryí in vitro kultivací do E3,5.....	23
5. Diskuze.....	25
6. Závěr.....	27
7. Seznam použité literatury.....	28

1. Úvod

1.1. Oocyt jako nevyhnutelná prerekvizita embryonálního vývoje

Reprodukční systém savců je komplikovaný biologický mechanismus zahrnující mnoha podstatných událostí jako jsou např. gametogeneze, fertilizace či aktivace zygotického genomu (ZGA), jejichž hlavní funkcí je zprostředkovat správný vývoj nového jedince. Klíčovou roli zde hraje především vysoce specializovaná buňka savčího oocyty (Zhang et al., 2009). Tato zdánlivě morfologicky jednoduchá buňka navzdory své funkční komplexnosti již během svého vývoje v sobě akumuluje důležité proteiny (zvané jako proteiny s mateřským efektem, kódované geny s mateřským efektem) a transkripty (mateřské mRNA) (Mtango et al., 2008), které jsou následně využity k aktivaci zygotického genomu (ZGA), čímž je ovlivněn celý embryonální vývoj (Li et al., 2010). U savců bylo identifikováno několik genů/proteinů s mateřským efektem, které byly popsány v roce 2000 (Christians et al., 2000; Tong et al., 2000). Mezi nejdůležitější patří například protein MATER, jehož transkripty jsou hojně exprimovány v oocytech. Bylo zjištěno, že výskyt tohoto mateřského proteinu u myši je nezbytný pro embryonální vývoj po 2-buněčném stádium, z čehož vyplývá, že absence tohoto proteinu by měla za následek zástavu vývoje ve fázi 2-buněčného embrya, což je zlomový moment, kdy dochází k aktivaci ZGA u myši (Tong et al., 2000). Stejnou funkci má také subkortikální mateřský komplex (SCMC), který se skládá ze 4 mateřsky kódovaných proteinů a jehož je právě MATER nedílnou součástí (Li et al., 2008). SCMC se tvoří během oogeneze a má tudíž významný vliv pro první embryonální štěpení do 2-buněčné fáze raného embryonálního vývoje, jelikož embrya postrádající tento proteinový komplex jsou předurčena k buněčné smrti (Zheng & Dean, 2009). Z toho vyplývá, že oocyt je po oplodnění transkripčně neaktivní, ale translačně aktivní a ke genové expresi dochází až v procesu ZGA. Proto se oocyt během přeměny na embryo opírá pouze o mRNA/proteiny s mateřským efektem, které následně ovlivňují především celý preimplantační vývoj (Li et al., 2008).

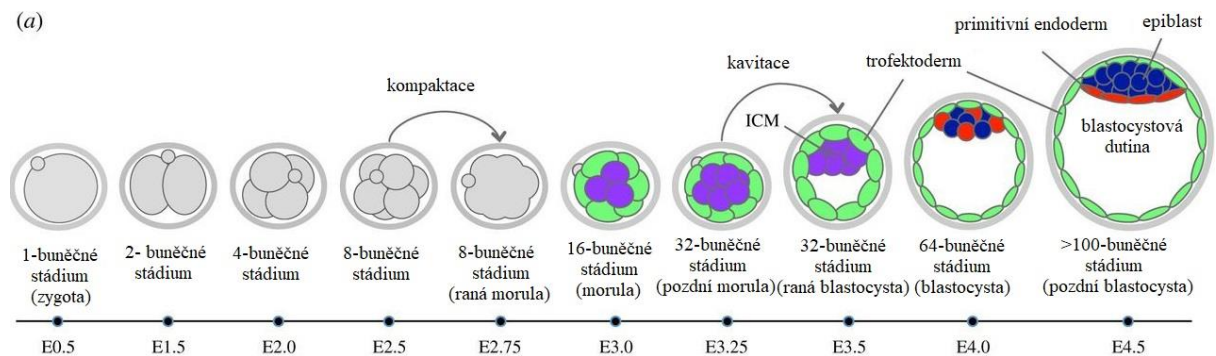
Pro úspěšný přechod z oocyty na embryo jsou potřebné tři procesy: odstranit mateřské mRNA/proteiny specifické pro oocyty, nahradit mateřské transkripty (geny exprimované v oocytech i embryích) expresí nových embryonálních transkriptů, a nakonec přeprogramovat genovou expresi na embryonální program, tj. aktivovat expresi genů specifických pro embrya (Zeng & Schultz, 2003). Jak už jsem zmiňovala výše, stejně jako důležitost výskytu proteinů/genů s mateřským efektem akumulovaných v oocytech, je i nezbytné tyto faktory regulovat. Většina mateřských mRNA jsou proto degradovány již během meiotického zrání (poslední fáze oogeneze), tedy přibližně 12 h před ovulací samice. Bohužel kompletní

mechanismus této degradace není zatím úplně znám (Paynton et al., 1988; Li et al., 2010). Oproti tomu proteiny s mateřským efektem přetrvávají funkční až do preimplantačního období (Zheng & Dean, 2009), kde jsou proteolyticky degradovány především pomocí procesu ubikvitinace (popsán podrobně v samostatné kapitole), a některé pomocí makroautofágie, kde jsou dané proteiny obklopeny vzniklým autofagozomem (dvoumembránovým vezikulem) a po následném splynutí s lysozomy jsou proteiny degradovány (Xie & Klionsky, 2007). Pokud by ale nedošlo k jejich odstranění, následkem by bylo narušení či opoždění ZGA a zároveň i celého plnohodnotného embryonálního vývoje (Higuchi et al., 2018). Po samotné degradaci mateřských faktorů je zapotřebí tuto ztrátu v oocyту nahradit, k čemuž dochází po oplození. Syntéza nových transkriptů je závislá na aktivaci zygotického genomu. Po průniku spermie do oocyту se musí spojit obě haploidní gamety a dát vzniku jedinému složitému diploidnímu zygotickému genomu, který je potřeba ve správný okamžik aktivovat (Mtango et al., 2008). Aktivace zygotického genomu je doprovázena komplexní sérií událostí, které probíhají postupně a dají se rozdělit na dvě časově odlišné vlny. K menší ale prvotní zygotické genové expresi u myši dochází již v pozdním 1-buněčném stádiu, ale hlavní vlna genové transkripce, tedy syntéza největšího množství nových transkriptů, je až v pozdním 2-buněčném stádiu po prvním buněčném dělení, kdy dojde k plné aktivaci embryonálního genomu (kompletnímu přechodu z matky na embryo), který má největší odpovědnost za vývoj embrya po 2-buněčném stádium. Vlny genových expresí jsou striktně koordinovány, například pomocí změn v jaderné struktuře či remodelací chromatinu, což zajišťuje specifickou transkripce (Latham & Schultz, 2001).

1.2. Preimplantační embryonální vývoj myši

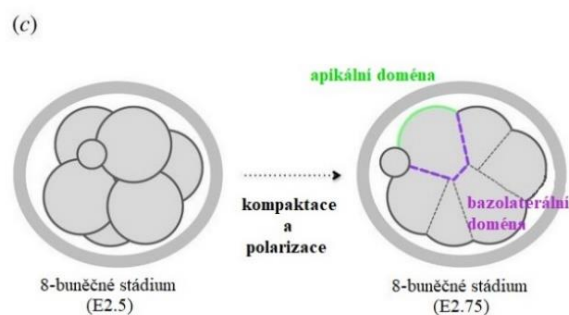
Právě preimplantační myší embryo je ideálním modelem pro zkoumání mechanismu přeměny jedné buňky na složité struktury (skládající se z několika buněčných linií), před samotnou implantací embrya do dělohy samice. Díky samoorganizaci, odolnosti vůči chybám a schopnosti samoopravy, tak ze sebe činí samostatný systém, který je možné izolovat již po jeho oplodnění a stále bude schopné se vyvíjet bez přítomnosti mateřských tkání (White et al., 2018). Důležité je také zmínit, že myší embryo v raném stádiu je tzv. totipotentní, tedy že jednotlivé buňky embrya (blastomery) se dokáží vyvinout v jakoukoliv buněčnou linii, až do 8-buněčného stádia. Poté se blastomery stávají pluripotentními (jejich vývoj je předurčen v danou buněčnou linii), v závislosti na výchozí pozici buněk v embryu (Chazaud & Yamanaka, 2016).

Preimplantační embryonální vývoj (Obr. 1) je tedy období, začínající procesem zvaným fertilizací (oplození), kdy dojde k narušení ochranného proteinového obalu oocyty (tzv. *zona pellucida*) spermií, která pronikne dovnitř oocyty, tím dojde ke splynutí obou gamet a vzniku zygoty (1-buněčného stádia). Následují tři kola asynchronního buněčného štěpení, které dávají vzniknout 8-buněčnému embryu (Mihajlović & Bruce, 2017).



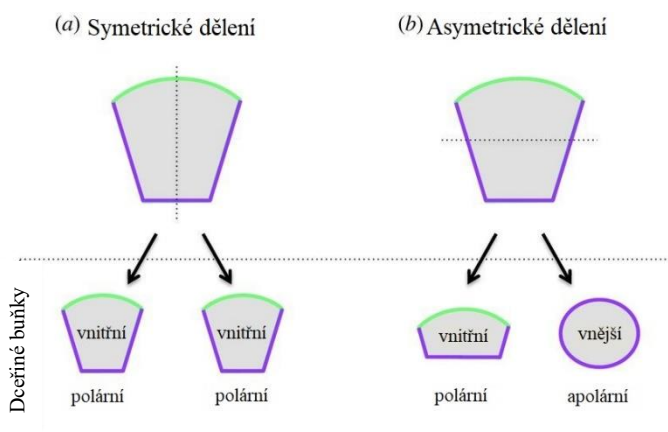
Obrázek 1: Schématické zobrazení celého preimplantačního vývoje myšského embrya po oplození až do fáze před implantací do dělohy samice (upraveno podle Mihajlović & Bruce, 2017).

V tomto momentu nastává první zlomový proces zvaný **zhutnění** (nebo-li kompaktace) (Obr. 2), ke kterému dochází zhruba 2,5 dne po oplození (Leung et al., 2016), kdy blastomery poprvé změňují svojí morfologii výrazným zploštěním, a tím dojde k těsnějšímu kontaktu buněk. (White et al., 2016). Zároveň je již obtížné od sebe vizuálně odlišit jednotlivé buňky, jelikož dochází ke vzniku adhézních spojů na mezibuněčných hranicích (Mihajlović & Bruce, 2017). Společně se zhutněním probíhá druhý zásadní proces **polarizace** (Obr. 2), čím se reorganizují buněčné membrány a organely jednotlivých blastomer a rozdělí se na jejich apikální doménu (směřující ven z embrya) a bazolaterální doménu (směřující dovnitř embrya) (Leung et al., 2016), a tím vznikne apikálně-bazolaterální osa buněčné polarizace (Mihajlović & Bruce, 2017).



Obrázek 2: Proces zhutnění a polarizace buněk v 8-buněčné fázi preimplantačního embryonálního vývoje. Vyznačení vzniklé bazolaterální domény (vnitřní fialová část) a apikální domény (vnější zelená část) (upraveno podle Mihajlović & Bruce, 2017).

Výsledkem vzniku těchto domén na jednotlivých blastomerech je indukování dalšího buněčného dělení kolem osy buněčné polarity, a to dvojího typu (Obr. 3). Symetrické dělení, které dá vzniku dvěma vnějším buňkám a asymetrické dělení, kde jedna buňka bude vnější a druhá vnitřní (Leung et al., 2016).



Obrázek 3: Symetrické a asymetrické dělení blastomer (8-buněčné stádium) podle osy polarity a jejich vzniklé dceřiné buňky. Ze symetrického dělení (a) vzniknou dvě identické polární buňky, které budou směřovat ven z buňky. Z asymetrického dělení (b) vznikne jedna buňka polární opět směřující ven z buňky a druhá apolární směřující dovnitř buňky (upraveno podle Mihajlović & Bruce, 2017).

Zhutnění a polarizace jsou tedy hlavními procesy během přeměny z 8-buněčného stadia do 16-buněčného stádia, zvaný jako morula, kde dochází k výrazné prostorové segregaci buněk. Tím se zakládají dvě samostatné buněčné linie, a to početnější vnější (polární) buňky, které generují tvorbu **trofektodermu** (TE), který dá vznik placentě, a vnitřní (apolární) buňky vytvářející pluripotentní **vnitřní buněčnou hmotu** (ICM) (Mihajlović & Bruce, 2017).

Kavitace je další důležitý proces doprovázející přeměnu moruly na konečnou fázi preimplantačního embryonálního vývoje, tzv. blastocystu (Mihajlović & Bruce, 2017). Ve 32-buněčném stádiu se uvnitř embrya začne tvořit dutina naplněná vodou, která bude zatlačovat ICM jedním směrem, tím se dutina zvětšuje a společně s ní i velikost celého embrya (Leung et al., 2016). Následuje další dělení do 64-buněčného stádia, ve kterém buňky ICM diferencují a dávají vzniku novým buněčným liniím, buňkám **primitivního ektodermu**, které budou tvořit základ pro extraembryonální membrány, a buňkám **epiblastu**, důležitým pro vývoj vlastního embrya (White et al., 2018). Nakonec prostřednictvím buněčného třídění dojde k prostorové segregaci diferencovaného ICM, tak že primitivní ektoderm bude orientován směrem k blastocystové dutině a epiblast směrem k TE, který minimalizuje ještě zbylé mezibuněčné prostory, aby byla vytvořena dokonalá bariéra mezi vnějším a vnitřním prostředím embrya po odstranění *zony pellucidy*. Po celkem 7 buněčných děleních (celkem 4,5 dne od oplodnění) je proces preimplantačního vývoje u konce a embryo je připraveno

k zanoření do děložní sliznice, kdy nastává postimplantační embryonální vývoj (Mihajlović & Bruce, 2017).

1.3. Gen *Fbxw16*

Hlavní otázkou této bakalářské práce je zjistit funkci neznámého myšního genu *Fbxw16* a jeho vliv na preimplantační vývoj embrya. Jedná se o gen kódující tzv. F-box proteiny, které jsou součástí ubikvitin-ligázového komplexu (Kipreos & Pagano, 2000). Ale o těchto dvou důležitých jednotkách budu mluvit podrobněji v samostatných kapitolách. Gen *Fbxw16* se nachází na 9 chromozomu, a k jeho expresi dochází především v primárních oocytech (UniProtKB databáze, Q497Z0, aktualizace 2021). Bylo zjištěno, že až 99 % všech myších genů jsou homologními geny člověka (geny odvozené z jednoho společného genu) (Lander, 2011). U člověka se nachází gen *Fbxw12*, který jako jediný nemá pouze jeden homolog u myši, ale má jich celkem 7. A právě jeden z nich je myší gen *Fbxw16*. Předpokládá se tedy, že s největší pravděpodobností byla funkce lidského genu rozdělena mezi jednotlivé homology, díky jejich společné příbuznosti (Jin et al., 2004).

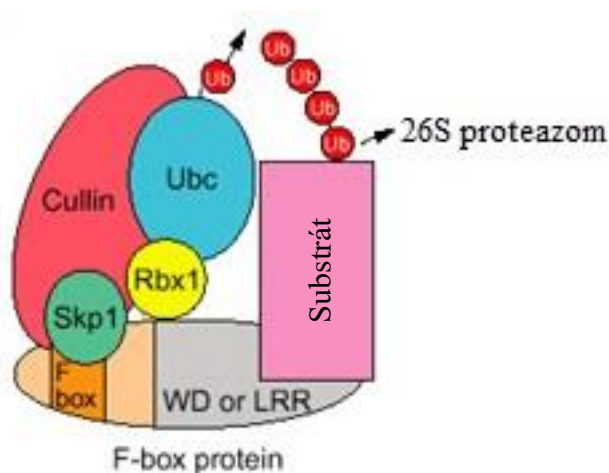
1.3.1. F-box proteiny

F-box proteinová rodina je skupina strukturních proteinů skládajících se přibližně z 50 aminokyselin (Kipreos & Pagano, 2000). Hrají důležitou roli v procesu zvaný **ubikvitinace** (enzymatická posttranslační modifikace), což je hlavní funkce ubikvitin-ligázového komplexu (SCF), kde jsou nedílnou součástí (Weake & Workman, 2010). Zajišťují zde interakce typu protein-protein, které jsou využity k rozpoznání a specifickému navázání substrátu, jehož cesta je předurčena k cílené degradaci zprostředkovanou samotným ubikvitinem (Kipreos & Pagano, 2000).

F-box protein je složen ze 2 základních motivů. Obsahuje samotnou F-box doménu (napojující se na modulární jádro SCF) a WD-40 repetici nebo repetici bohatou na leucin (LRR), která přes karboxy-terminální oblast váže dané fosforylované substráty (Kipreos & Pagano, 2000). Samotných F-box proteinů je velké množství (u savců identifikováno zatím celkem 47 různých F-box proteinů) (Jin et al., 2004), a právě díky této variabilitě proteinových podjednotek v komplexu SCF je zajištěna jejich substrátová specifita (Craig & Tyers, 1999). A náš zkoumaný gen *Fbxw16* konkrétně kóduje F-box protein 16, který obsahuje WD-40 repetici (UniProtKB databáze, Q497Z0, aktualizace 2021).

1.3.2. Ubikvitin-ligázový komplex

Ubikvitin-ligázový komplex (SCF/enzym E3/ubikvitin ligáza) je nejkompexnější složkou v procesu ubikvitinace, která zahrnuje hned několik důležitých podjednotek. Struktura komplexu (Obr. 4) je rozdělena na základě funkčnosti daných skupin. Modulární jádro, obsahující cullin (CUL1) a prstencový box protein (RBX1), které slouží k navázání ubikvitin-konjugujícího enzymu (E2) a následného přesunu samotného ubikvitinu na konkrétní substrát, a modul specifičnosti, kde SKP1 je jakýmsi mostem mezi F-box proteinem specificky vázající substrát s modulárním jádrem SCF (Jin et al., 2004).



Obrázek 4: Jednotlivé podjednotky skládající ubikvitin-ligázový komplex. F-box protein vázající substrát přes speciální WD/LRR doménu, Cullin spojující Skp1 s F-boxem a Rbx1 s ubikvitinem (Ubc) a jednotlivé molekuly ubikvitinu tvořící polyubikvitinový řetězec na substrátu určený k degradaci 26S proteazomem (upraveno podle Kipreos & Pagano, 2000).

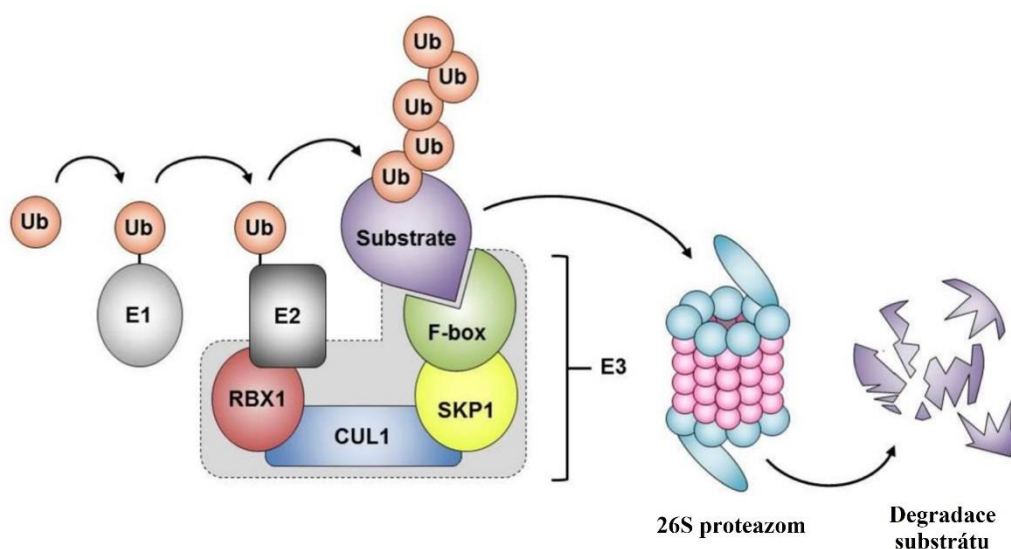
Výběr daného substrátu, nebo-li kompletní regulační mechanismus cílené intracelulární proteolytické degradace bílkovin, je důležitým faktorem ovlivňující různé buněčné procesy. Úloha SCF komplexu hraje důležitou roli již v procesu gametogeneze, kde je vývoj pohlavních buněk ovlivněn z velké části mateřskými proteiny a chyba jejich regulace SFC komplexem může vést k zastavení dělení zárodečných buněk a jejich následnému odumírání. Však nejdůležitější roli hraje SFC komplex po oplodnění, kde jsou jeho substrátem mateřské proteiny vzniklé z mateřské mRNA řídící vývoj oocyty až do 2-buněčného stádia. SCF komplex spouští proces degradace právě těchto mateřských proteinů, čímž se zygotický genom aktivuje (ve fázi 2 buněk), který řídí poté téměř veškeré aspekty správného embryonálního vývoje. Z toho vyplývá, že mateřské proteiny spojené s SCF komplexem určené k degradaci se hojně vyskytují v oplodněných myších oocytech (Xie et al., 2019), a tím pádem exprese určitých genů (např. *Fbxw16* gen) kódující F-box proteiny v komplexu ovlivňují celý preimplantační embryonální vývoj.

1.3.3. Proces ubikvitinace

Ubikvitinace je významný biochemický proces ovlivňující širokou škálu biologických procesů (např. proliferace buněk, transkripce, buněčný cyklus) ve všech eukaryotických buňkách (Xie et al., 2019). Tato posttranslační modifikace využívá molekuly ubikvitinu (Ub) spojujících se následně do dlouhých řetězců, které slouží jako signální molekuly k označení daných proteinů. Takto označený protein je rozpoznán a degradován 26S proteazomem, čímž dochází k jejich kontrole a eliminaci (van Wijk et al., 2019).

Jak ale organismus/buňka pozná, na které proteiny se má Ub navázat a jaké je možné využití nevratné proteolýzy? Těchto spouštěčů je hned několik. Asi nejzákladnější je rozpoznávání a selektivní vyřazování poškozených nebo špatně strukturovaných proteinů. Mechanismus ubikvitinace zde tedy hraje hlavní roli v kontrole kvality většiny proteinů. Po jejich průchodu centrálním jádrem proteazomu jsou proteiny degradovány na malé peptidy, které jsou dále rozštěpeny na jednotlivé aminokyseliny, které mohou být distribuovány do cytoplazmy jako zdroj aminokyselin k pozdějšímu metabolickému využití (glukoneogeneze, výroba energie, syntéza nových bílkovin) nebo jsou využity k prezentaci antigenu při obraně imunitního systému, což jsou další možnosti využití ubikvitinace. A v neposlední řadě degradací proteinů, které fungují například jako transkripční faktory, je možné regulovat genovou expresi (Lecker et al., 2006).

Celý kaskádovitý proces ubikvitinace (Obr. 5) zahrnuje přítomnost 3 důležitých enzymů: enzym aktivující Ub (E1), enzym konjugující Ub (E2) a ubikvitin ligázu (E3), které katalyzují několik chemických reakcí popsané v následujících krocích (Nguyen et al., 2017).



Obrázek 5: Schéma celého procesu degradace specificky vázaného substrátu pomocí molekuly ubikvitinu (upraveno podle Thompson et al., 2021).

Volný Ub je nejprve potřeba aktivovat, a to navázáním na E1. K tomuto procesu je potřeba energie ve formě adenosintrifosfátu (ATP), který zprostředkuje vznik thiodiesterové vazby a tím umožní napojení C-koncovou karboxylovou skupinou Ub na cysteinovou skupinu E1. Na komplex s aktivovaným Ub (Ub+E1) se následně připojí E2, který katalyzuje transesterifikační reakci, ve které dojde k navázání Ub na aktivní místo E2 a následného odpojení E1. Tím vznikne nový komplex (Ub+E2), který se nakonec spojí s E3 (SCF) přes Rbx1 protein. SCF komplex (E3), konkrétně tedy F-box proteinová podjednotka určující specifickou výběru, naváže vhodný substrát. E2 následně pomocí peptidové vazby spojí karboxylovou skupinu Ub ke zbytku lysinu obsaženého v cílovém proteinu. Proces přidávání Ub na protein je několikrát opakován a modifikován za vzniku polyubikvinového řetězce (Callis, 2014). Polyubikvitinovaný protein je v posledním kroku proteolyticky degradován pomocí 26S proteazomu, jehož funkce je také závislá na spotřebě ATP. 26S proteazom je složitý makromolekulární komplex (2,5 MDa) skládající se z několika podjednotek uspořádaných do 2 hlavních částí: 20S válcovitého jádra a dvou 19S kruhových regulačních oblastí, nacházejících se na obou koncích proteazomového jádra (Thompson et al., 2021). Aby došlo k degradaci proteinu je ubikvitinový řetězec nejprve rozpoznán a navázán pomocí ubikvitinových receptorů, které se nachází na povrchu regulační oblasti, kde dochází k deubikvitinaci. Následně pomocí ATPázy je protein denaturován a translokován do jádra. Zde je nakonec pomocí enzymatických peptidáz protein rozštěpen na malé molekuly peptidů, opouštějící 26S proteazom společně s jednotlivými molekulami Ub, které mohou být využity v novém procesu ubikvitinace (Pack et al., 2014).

2. Cíle práce

Hlavní cíle mé bakalářské práce jsou:

- Optimalizovat protokol pro genotypizaci původní a deletované alely genu *Fbxw16*.
- Potvrdit, že delece genu *Fbxw16* je embryonálně letální.
- Zjistit, ve kterém stádiu embryogeneze dochází k zastavení vývoje embryí s deletovaným genem *Fbxw16*.

3. Materiál a metody

3.1. Genotypizace myši Bl6

3.1.1. Extrakce DNA

Mláďatům jsem pomocí vydezinfikovaných zahřátých nůžek (200–250 °C) odstříhla vždy 3-5 mm konce ocasu, které jsem vložila do předem popsaných prázdných 1,5 ml mikrozkušavek uložených v ledovém boxu. Poté jsem ke každému odebranému vzorku přidala 700 µl STE pufru (1 M NaCl, 200 mM Tris-HCl, 100 mM EDTA) a 15 µl proteinázy K (Sigma Aldrich-Merck, roztok 10 mg/ml), aby došlo k odstranění kontaminací a také rychlé degradaci bílkovin a přítomných nukleáz, které by mohly následně degradovat extrahovanou DNA. Zkušavky jsem vložila do termobloku (Thermo-shaker TS 100, Biosan) za stálého třepání 900 rpm při teplotě 55 °C na 2 h. Po uplynutí daného času jsem na termobloku zvýšila teplotu na 70 °C pro inaktivaci proteinázy K, vypnula třepání a nechala tam vzorky ještě 5 min. Nakonec následovalo ještě 5 min na ledu.

V dalším kroku jsem vzorky vložila do předem vychlazené centrifugy (Centrifuge 5415 R, Eppendorf), nastavenou s teplotou 4 °C a 16 000 rfc, aby došlo k oddělení pelety od supernatantu, který jsem poté přepipetovala ke 700 µl 100 % isopropanolu do nové 1,5 ml mikrozkušavky, a tím došlo k precipitaci (sražení) DNA. Následovala další centrifugace, tentokrát pouze na 5 min za stejného nastavení teploty i otáček. Vzniklou peletu s DNA jsem promyla pomocí 500 µl 70 % ethanolu a naposledy centrifugovala. Výslednou peletu jsem vysušila a rozpustila v HPLC vodě dle velikosti dané pelety (v rozmezí 100–250 µl) v termobloku při teplotě 65 °C po dobu 5 min. Po řádném zvortexování (Combi-spin PCV-2400, Grand-bio) byly vzorky extrahované DNA připravené k dalšímu užití.

3.1.2. Analýza genotypu

Analýza genotypu narozených mláďat se skládala ze 2 částí: amplifikace DNA pomocí PCR a vizualizace amplifikované DNA pomocí gelové elektroforézy. Nejprve jsem si do 1,5 ml mikrozkušavky připravila reakční směs (Tab. I) pro první reakci, která obsahovala primery F1+R1, a do druhé mikrozkušavky pro reakci s primery F2+R3. Podrobně vypsané sekvence těchto primerů jsou zapsány v tabulce II.

Tabulka I: Složení reakční směsi.

Název složky	Množství (μl)
AMPIGENE Taq Mix (Enzo Life Science)	25
Primer F1/F2	2
Primer R1/R3	2
HPLC voda	20

Tabulka II: Sekvence primerů obsažené v reakční směsi.

Název složky	Sekvence
Primer F1	CCCAGAAGGCACAAGTTAGC
Primer F2	AGGCCCTGTACAGTTGGCTA
Primer R1	CATGGCACAGTGTTTGTGTG
Primer R3	CCAGTGACCAGCCTGTAGTG

Reakční směsi jsem rozpipetovala do 0,2 ml mikrozkušavek po 4 μl. Nakonec jsem do každé 0,2 ml mikrozkušavky přidala 1 μl daného DNA vzorku, který jsem předem rozředila v poměru 1:49 v HPLC vodě. U obou reakcí byla vždy ještě jedna mikrozkušavka bez DNA vzorku, místo kterého byl 1 μl HPLC vody, což sloužilo jako negativní kontrola. Všechny zkumavky jsem řádně zvortexovala a poté vložila do PCR cykleru (Thermocycler T3000, Biometra) přibližně na 2,5 h, kde došlo k amplifikaci DNA. Nastavení PCR je uvedeno v následující tabulce III.

Tabulka III: Nastavené kroky reakčních fází během PCR.

Název fáze	Teplota (°C)	Čas (s)	Počet cyklů
Denaturace	95	1 min	1
Denaturace	95	15 s	1
Nasednutí primerů	60	15 s	1
Elongace	72	2 min	34
Elongace	72	8 min	1
Chlazení	4	x	1

Do vzniklých vzorků jsem přidala 1 µl barviva 6x DNA Gel Loading Dye (Thermo Fisher Scientific) a řádně zortexovala. Poté jsem si připravila 8 µl 100 bp velikostního markeru (VWR) do nové mikrozkuřavky. PCR vzorky pro obě reakce společně s velikostním markerem a negativní kontrolou jsem vložila do předem připraveného 0,86 % agarózového gelu, který obsahoval 70 ml 1x TAE (40 mM Tris-acetate, 1 mM EDTA, pH 8,3), v něm rozpuštěných 0,6 g agaru (Carl Roth) a 0,5 µl ethidium bromidu (p-lab) a následně spustila elektroforézu při 100 V. K vizualizaci vzorků na gelu byl použit přístroj Azure Biosystems 280.

3.2. Křížení

Po zjištění genotypu všech narozených mláďat se experiment posunul do fáze, kde jsem sledovala počty narozených mláďat a jejich genotypy dle daných 4 různých variant rodičovských křížení (Tab. IV). Od každé varianty křížení byly 2 klece pro získání dostatečného počtu dat. Počty mláďat dle typu křížení jsem průběžně zaznamenávala a následně statisticky vyhodnotila (pomocí testu dobré shody v programu Statistica 12, StatSoft), zda očekávaný genotypový štěpný poměr bude odpovídat skutečně získaným datům. Genotypy mláďat jsem zjistila stejnou metodou popsanou v předchozí kapitole.

Tabulka IV: Varianty rodičovských křížení dle typu jejich genotypu.

Křížení	Genotyp samce	Genotyp samice
1	wt/wt	wt/wt
2	wt/wt	wt/del
3	wt/del	wt/wt
4	wt/del	wt/del

3.3. Kultivace embryí

V poslední fázi experimentu jsem pracovala se samotnými embryi vzniklých pouze z 1 a 4 varianty křížení, abych mohla porovnat jejich preimplantační vývoj v závislosti vlivu genu *Fbxw16*.

3.3.1. Superovulace samic

Samici wt/wt nebo wt/del (po dovršení pohlavní zralosti – nejdříve po 7 týdnech) jsem nejprve pomocí injekční stříkačky podala intraperitoneálně (do břišní dutiny) 7,5 IU hormonu PMSG (pregnant mare serum gonadotrophin extract; Sigma Aldrich – Merck), aby došlo k vyvolání růstu a zrání folikulů mimo jejich normální estrální cyklus. Po 47 hodinách jsem samicím

podala stejnou metodou další hormon hCG (human chorionic gonadotrophic hormone; SigmaAldrich – Merck), který má u samic vyvolat ovulaci, tedy vypuštění oocytů do oviduktu. Po injekování druhého hormonu jsem samice připustila k samcům stejného genotypu a nechala v samostatné kleci po dobu přibližně 42 hodin, aby došlo k jejich oplodnění.

3.3.2. Pitva

Po injekci hCG (40-48 hodin) jsem samice usmrtila metodou cervikální dislokace. Myš jsem následně položila nohama vzhůru a oblast břicha jsem očistila 70 % ethanolem, aby nedošlo ke kontaminaci a zároveň k navlhčení chlupů pro snazší manipulaci. Po naříznutí kůže ve spodní části břicha jsem z otevřené břišní dutiny odhrnula orgány trávicí soustavy, abych se lépe dostala k vaječníkům, vejcovodům a děloze. Pomocí zahnuté pinzety jsem si přidržela oblast vejcovodu a poté jej odřízla společně s milimetrovým začátkem vaječníku a dělohy, aby nedošlo ke ztrátě embryí narušením vejcovodu. Oba vejcovody jsem ihned po vyjmutí vložila do předem připraveného 700 μ l M2 média (Tab. V) v 1,5 ml mikrozkrumavce. Pod stereomikroskopem na nahřáté pracovní desce (37,5 °C) jsem v kapce M2 média odstranila od vejcovodů přebytečné tkáně a následně vejcovod nastříhala, aby došlo k vyplavení embryí. Pomocí skleněné Pasteurovi pipety jsem odebrala 2-buněčná embrya a promyla přes několik kapek M2 média zalité v 2,5 ml minerálního oleje (FUJIFILM Irvine Scientific) předeřátého v inkubátoru při 37 °C. Stejný postup promytí jsem následně opakovala v předem připravených kapkách KSOM média (Embryo-Max; Millipore) s přidanými neesenciálními aminokyselinami Gibco MEM Non-Essential Amino Acids Solution (100x) (Thermo Fisher Scientific) a esenciálními aminokyselinami Gibco MEM Amino Acids Solution (50x) (Thermo Fisher Scientific) v koncentraci 0,5x. Kapky média byly zality ve stejném množství minerálního oleje a opět předeřátého v inkubátoru s obsahem 5 % CO₂ při 37 °C, kde se embrya inkubovaly po dobu přibližně 42 hodin do stádia E3,5.

Tabulka V: Složení média M2.

Zásobní roztok	Ředění	Složka zásobního roztoku	Množství složky zásobního roztoku (g/100 ml)	Objem zásobního roztoku (ml)
A	10x	NaCl	5,534	10,0
		KCl	0,356	
		KH ₂ PO ₄	0,162	
		MgSO ₄ x 7H ₂ O	0,293	
		Na-laktát 60 % sirup	3,2 (ml)	
		glukóza	1,000	
		penicilin	0,060	
		streptomycin	0,050	
B	10x	NaHCO ₃	2,101	1,6
		fenol red	0,010	
C	100x	Na pyruvát	3,600	1,0
D	100x	CaCl ₂ x 2H ₂ O	2,520	1,0
E	10x	HEPES	5,958	8,4
F	-	BSA	-	400 (mg)
G	-	H ₂ O	-	78,0

3.3.3. Fixace

Po uplynutí inkubace následovala fixace embryí společně s imunofluorescenčním barvením, a to vše za pokojové teploty. Embrya jsem nejprve promyla přes kapky AT média (kyselina Tyrode's; Sigma), dokud nedošlo k odstranění *zony pellucidy* a poté následovalo promytí opět přes kapky M2 média. K samotné fixaci jsem použila 96-jamkovou destičku, do jejichž jamek jsem postupně po uplynulých časech přesouvala embrya a vždy následně promyla ve třech jamkách 0,15 % PBST. Detaily jednotlivých kroků včetně objemů a inkubačních dob jsou uvedeny v tabulce VI. Embrya jsem fixovala ve 4 % PFA, permeabilizovala v 0,5 % tritonu a imunofluorescenčně barvila pomocí protilátek green phalloidin, který barví aktinová vlákna a DAPI barvicího DNA obsaženého v roztoku Vectashield.

Tabulka VI: Složení roztoků v jednotlivých jamkách fixační destičky.

Pořadí jamky	Název složky	Objem (μl)	Doba (min)
1	1% agar (Carl Roth) v 1x TAE	100	20
	4 % PFA (paraformaldehyd, Santa Cruz Biotechnology)	77	
	minerální olej (FUJIFILM Irvine Scientific)	67	
2-4	PBST (fosfátem pufrovaný fyziologický roztok s 0,15 % Tween 20)	200	20
5	0,5 % triton (X100, Sigma-Aldrich)	70	20
6-8	PBST	200	20
9	oregon green 488 phalloidin (Invitrogen Thermo Fisher Scientific)	10	30
	minerální olej	100	
10-12	PBST	200	20
-	Vectashield (Vector)	10	20

3.3.4. Vizualizace embryí

Po imunofluorescenčním barvení jsem naposledy přesunula embrya do předem připravených kapek PBST na podložním sklíčku, která jsem následně vložila do konfokálního mikroskopu (FV10i Confocal Laser Scanning Microscope, Olympus). Pomocí aplikace Olympus FLUOVIEW FV10i a upravení parametrů pro aktuální skenování jsem mohla pozorovat obarvená vyvinutá embrya a porovnat stádium vývoje wt/wt a wt/del embryí.

4. Výsledky

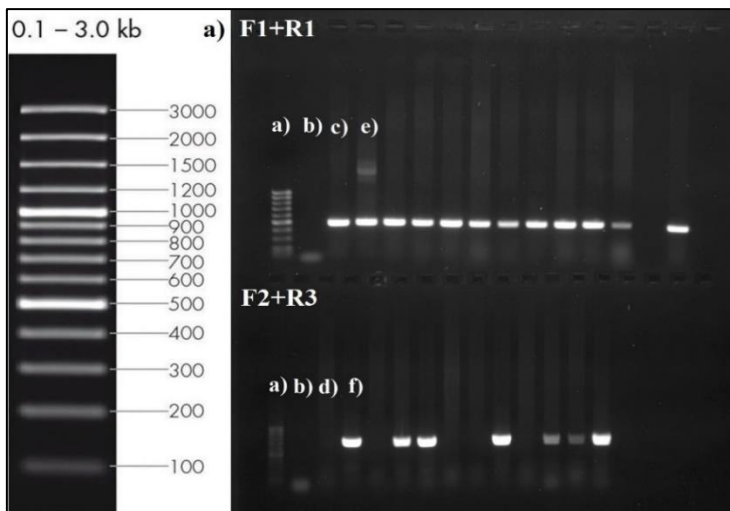
Pro tento projekt jsem dostala předem připravené myši C57BL/6NJ z Českého centra pro fenogenomiku v Praze v rámci BIOCEVu/Ústavu molekulární genetiky AVČR. Jednalo se o 3 heterozygotní samce s deletovaným genem *Fbxw16* (wt/del) a 3 homozygotní samice bez deletovaného genu *Fbxw16* (wt/wt). „Wt“ označuje normální přirozenou alelu (anglicky wild-type) a „del“ alelu s deletovaným genem *Fbxw16*. V Českém centru pro fenogenomiku měli za cíl produkovat myši s deletovanými geny uplatňujícími se v procesu ubikvitinace, ale u *Fbxw16* zjistili, že nedostávají žádná postimplantační embrya s homozygotně deletovaným genem *Fbxw16*. Proto nás kontaktovali, abychom zjistil, jak *Fbxw16* ovlivňuje preimplantační embryonální vývoj. Aby bylo možné zkoumat funkci genu *Fbxw16*, bylo potřeba si nejprve myši namnožit, a to křížením vždy jedné samice a samce, čímž mi vznikly celkem 3 původní rodičovské klece, ze kterých byly mláďata 21 dní po narození rozděleny na základě datumu narození a jejich pohlaví, a následně je bylo třeba genotypovat.

4.1. Optimalizace podmínek

Nejdříve bylo nutné ale optimalizovat podmínky PCR reakce, abych měla jistotu, že dokážeme správně určovat genotypy mláďat. Dle hypotézy vycházející z Mendelových zákonů dědičnosti o segregaci alel, měly být výsledné genotypy mláďat z původního parentálního křížení (wt/wt x wt/del) v genotypovém štěpném poměru 1:1 (wt/wt:wt/del). DNA byla extrahována ze vzorků myších ocasů, následovala PCR reakce, kde se amplifikují různě dlouhé fragmenty u oblasti genu *Fbxw16* podle genotypu jedince (Tab. VII), a pak byla délka fragmentů vizualizována pomocí gelové elektroforézy. Ale po první gelové elektroforéze daných 12 DNA vzorků (Obr. 6) jsem detekovala fragmenty, které neodpovídaly správnosti výsledků na základě velikosti alel dle typu reakce (tab. VII) v závislosti na délkách fragmentů velikostního markeru (Obr. 6).

Tabulka VII: PCR reakce dle typů obsažených primerů a velikosti fragmentů daných alel vizualizovaných na agarózovém gelu.

Typ reakce	Velikost fragmentu wt alely (bp)	Velikost fragmentu del alely (bp)
F1 + R1	1647	480
F2 + R3	699	-



Obrázek 6: Výsledné genotypy mládřat před optimalizací podmínek reakce. Obrázek zobrazuje velikostní marker (a), negativní kontrolu (b), příklad výsledného genotypu *del/del* (c+d a, příklad výsledného genotypu *wt/del* (e+f).

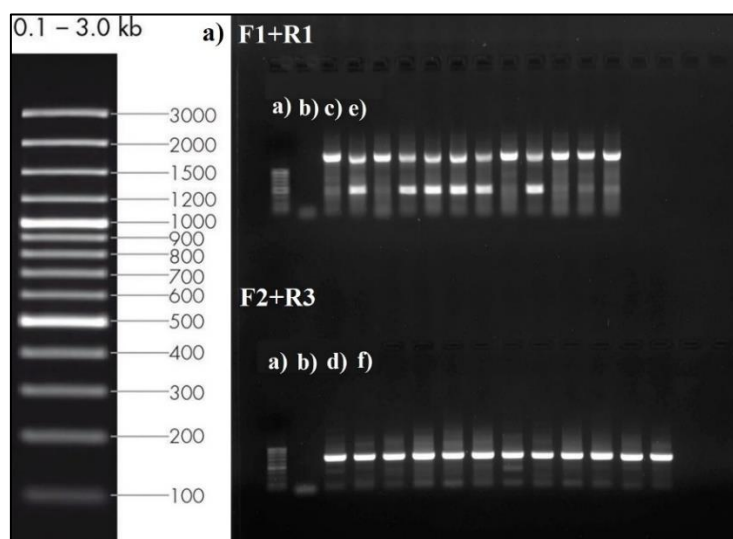
V reakci F1+R1 je možné detekovat oba typy alel (kolonka e), ale ve druhé reakci F2+R3 je vidět pouze *wt* alelu. Tato reakce sloužila jako kontrolní, pro případ nedostatečné amplifikace této alely v první reakci z důvodu preferencí amplifikace kratšího fragmentu. Z obrázku je patrné, že výsledné genotypy mládřat jsou *wt/del* nebo *del/del*, což vyvracelo původní hypotézu.

Bylo proto potřeba upravit podmínky obou reakcí, jelikož na gelu nebyla *wt* alela dostatečně detekována a měla by se naopak vyskytovat v každém DNA vzorku z daného parentálního křížení. Veškeré změny provedené v průběhu experimentu jsou zaznamenány v tabulce VIII.

Finální podoba optimalizace podmínek je taková, že teplota PCR fáze, kde dochází k nasedání primerů byla změněna na 60 °C, počet PCR cyklů byl snížen na 34 a 1 µl daného DNA vzorku byl vždy předem rozředěn ve 49 µl HPLC vody před přidáním do reakční PCR směsi. Změna podmínek nakonec vedla ke správné vizualizaci genotypů daných mládřat na agarózovém gelu (Obr. 7).

Tabulka VIII: Optimalizace podmínek pro správný průběh genotypizace myších mláďat.

Podmínka	Vyzkoušené hodnoty
Teplota PCR fáze: nasedání primerů	57 °C
	55 °C
	52 °C
	60 °C
Počet PCR cyklů	37
	34
Zředění DNA vzorku HPLC vodou	0 μl
	4 μl
	19 μl
	99 μl
	299 μl
	49 μl

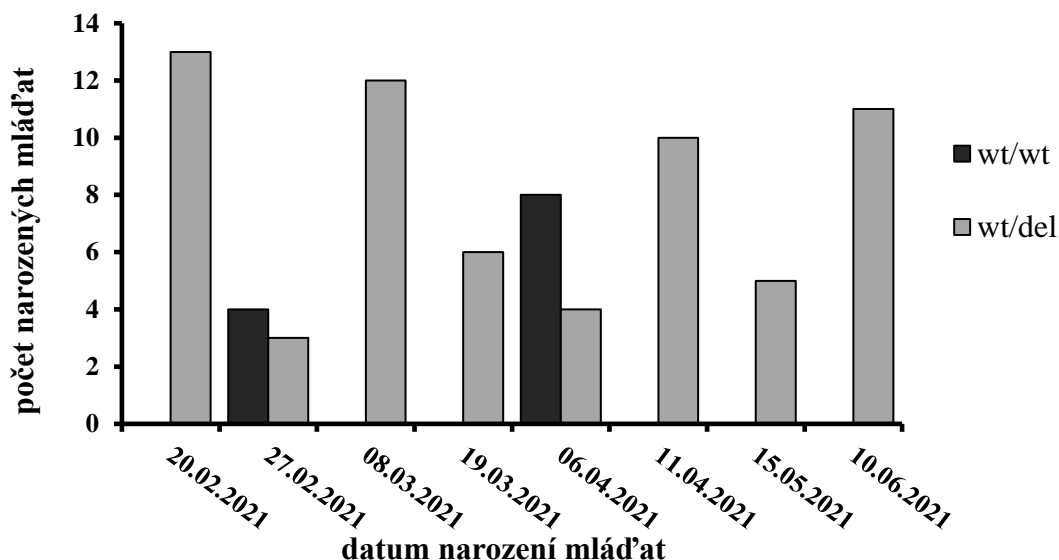


Obrázek 7: Výsledné genotypy mláďat po optimalizaci podmínek reakce. Obrázek zobrazuje velikostní marker (a), negativní kontrolu (b), příklad výsledného genotypu wt/wt (c+d) a příklad výsledného genotypu wt/del (e+f).

Výsledek optimalizace podmínek zobrazen na obrázku 7 ukazuje, že byly detekované správné genotypy mláďat, tedy wt/wt a wt/del. Z obrázku také vyplývá, že genotyp del/del na obrázku 6 byl pouze výsledkem nefungující reakce.

4.1.1. Genotypizace mlád'at původního parentálního křížení

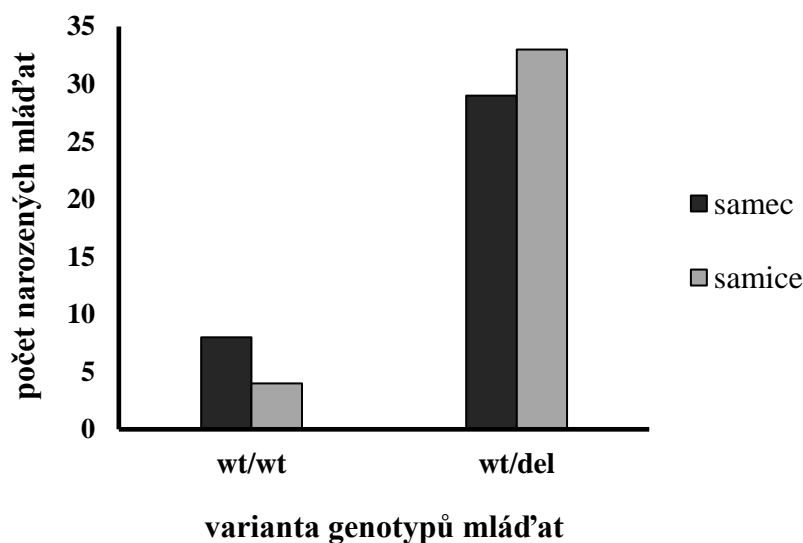
Po optimalizaci podmínek a správného průběhu genotypizace jsem zjistila genotypy všech narozených mlád'at dle původního parentálního křížení wt/wt x wt/del (Obr. 8).



Obrázek 8: Výsledné genotypy narozených mlád'at dle daného vrhu. Graf znázorňuje převahu genotypu wt/del.

Z grafu (Obr. 8) vyplývá, že očekávaný genotypový štěpný poměr 1:1 (wt/wt a wt/del) odpovídá pouze ve dvou případech (27. 02. 2021 a 06. 04. 2021), zatímco zbylé vrhy mají 100% výskyt pouze jednoho genotypu wt/del.

V další části jsem sledovala, s jakým genotypem se mlád'ata preferenčně rodí vzhledem k pohlaví. Tyto data jsem vynesla do grafu (Obr. 9).



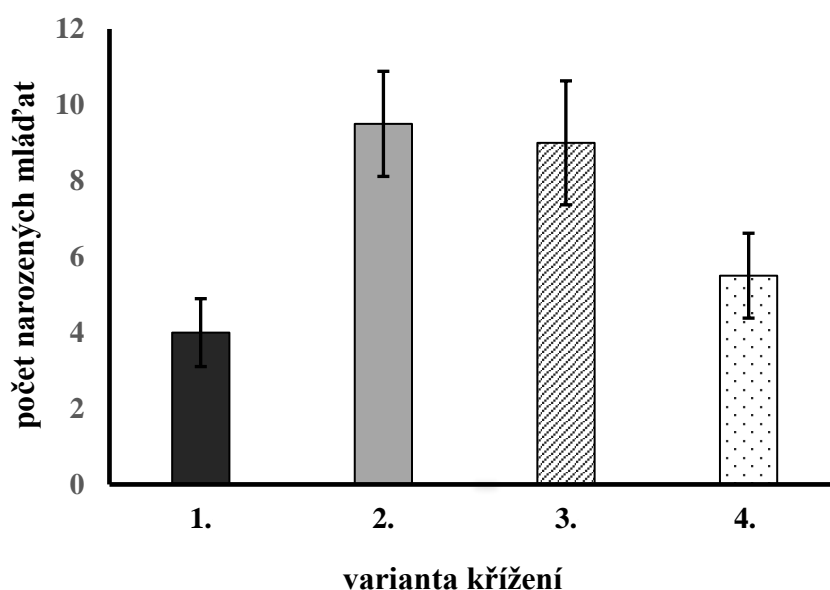
Obrázek 9: Celkový počet narozených mlád'at na základě jejich genotypu a pohlaví. Graf ukazuje převahu samčího pohlaví genotypu wt/del, a převahu samičího pohlaví genotypu wt/wt.

Obrázek 9 vypovídá tom, že není možné potvrdit preferenčnost genotypu na určité pohlaví v rámci daného genotypu, jelikož rozdíl v procentuálním zastoupení obou pohlaví dle varianty genotypu je na stejné hodnotě 6 %.

4.2. Ověření embryonální letality delece genu *Fbxw16*

4.2.1. Počty narozených mlád'at dle varianty křížení

Následující experiment měl odhalit, kolik mlád'at se narodí v závislosti na různých variantách křížení, které jsou uvedeny v tabulce IV. Na základě faktu o Bl6 myších se průměrná velikost jednoho vrhu pohybuje obvykle v rozmezí 6-8 mlád'at (Biomedical research core facilities, Mouse breeding, 8. 4. 2022). Hypotéza je tedy taková, že nejvíce mlád'at se očekávalo z 1. křížení, kde se nevyskytuje žádná deletovaná alela genu *Fbxw16* a reprodukce by proto měla probíhat standardně. Počet mlád'at 2. a 3. křížení by se měl pohybovat na přibližně stejných hodnotách. A nejméně mlád'at (konkrétně o $\frac{1}{4}$ méně), by mělo mít 4. křížení z důvodu nerodících se mlád'at genotypu del/del. Zjištěná data o průměrných počtech mlád'at jsem vynesena do následujícího grafu (Obr. 10).



Obrázek 10: Průměrný počet narozených mlád'at dle varianty křížení. Graf zobrazuje nejvyšší průměrný počet narozených mlád'at na křížení *wt/wt x wt/wt* (1.) a nejvyšší počet narozených mlád'at na křížení *wt/wt x wt/del* (2.) a jejich směrodatné odchylky.

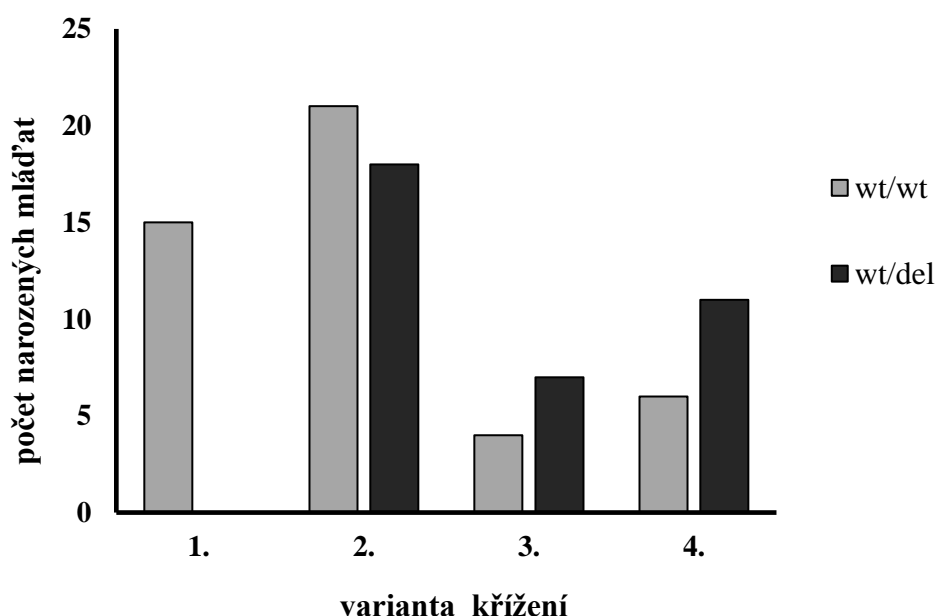
Z grafu vyplývá, že 4. křížení má opravdu o $\frac{1}{4}$ méně než 2. a 3. křížení, která zároveň odpovídají stejným výsledkům dle předpokladu. Oproti tomu 4. křížení nemá méně mlád'at než 1. křížení, které má zároveň výrazně nižší průměr narozených mlád'at než ostatní varianty křížení.

4.2.2. Genotypy narozených mláďat dle varianty křížení

Před genotypizací narozených mláďat všech variant křížení jsem stanovila očekávaný poměr vzniklých genotypů dle Mendelových zákonů dědičnosti v následující tabulce IX. U 4. křížení byl genotypový štěpný poměr upraven v souvislosti s nerodícími se mláďaty genotypu del/del z původního poměru 1:2:1 na výsledný poměr 1:2. Narozená mláďata byla následně genotypizována a zařazena dle příslušné varianty křížení (Obr. 11).

Tabulka IX: Očekávaný genotypový štěpný poměr narozených mláďat dle varianty křížení.

Varianta křížení	Genotypový štěpný poměr	
	Očekávaný poměr	Očekávaný genotyp
1	1:0	wt/wt
2	1:1	wt/wt : wt/del
3	1:1	wt/wt : wt/del
4	1:2	wt/wt : wt/del



Obrázek 11: Celkový počet narozených mláďat na základě jejich genotypu dle varianty křížení.

Výsledné genotypy narozených mláďat potvrdily předem stanovené předpoklady genotypových štěpných poměrů ve všech variantách křížení, na základě statistických hodnot signifikance vypočtených pomocí testu dobré shody (2. křížení $p=0,63$; 3. křížení $p=0,37$; 4. křížení $p=0,87$). Z obrázku 11 vyplývá, že delece genu *Fbxw16* (genotyp del/del) je embryonálně letální, protože ve 4. křížení nebyl zaznamenán žádný jedinec del/del.

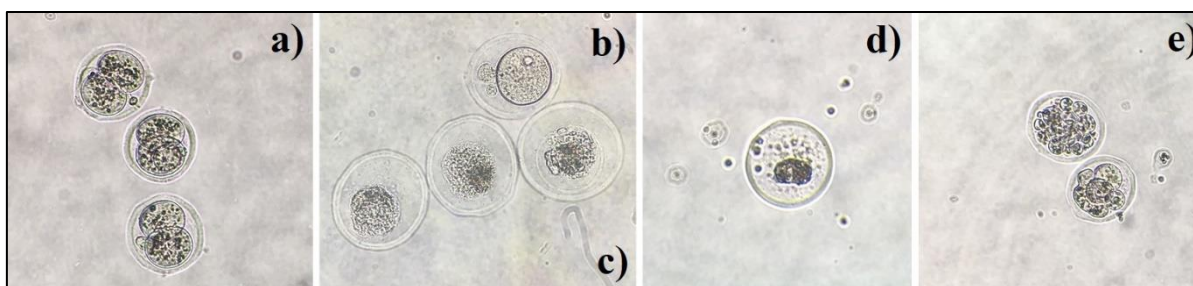
4.3. Vliv genu *Fbxw16* na fenotypy embryí

V poslední fázi projektu jsem sledovala vliv genu *Fbxw16* na samotné fenotypy embryí, které jsem odebrala samicím z 1. a 4. varianty křížení. Embrya jsem následně porovnávala dle standardního průběhu preimplantačního vývoje B16 myši, a to ve dvou časově odlišných fázích: E1,5 (pitva samic), zde by měla být embrya ve 2-buněčném stádiu a E3,5 (fixace embryí), kdy by se embrya měla nacházet v rozmezí 17-32 buněk. Na základě porovnání embryí z křížení wt/wt x wt/wt a wt/del x wt/del mohu sledovat, jestli a v jaké fázi vývoje dochází u křížení wt/del x wt/del k zastavení preimplantačního vývoje u přibližně ¼ embryí (očekávaný genotyp del/del).

4.3.1. Fenotypy embryí in vitro kultivací do E1,5

Odebraná embrya obou genotypů jsem nejprve charakterizovala na základě morfologie (Obr. 12) a zařadila do příslušných kategorií (2-buněčné stádium, živá buňka, odumírající buňka, mrtvá buňka a fragmentovaná buňka), jejich početní zastoupení jsem zaznamenala do tabulky X. Veškerá jednobuněčná stádía jsem označila obecným názvem (buňka) bez ohledu na to, zda je jednalo o oplodněný či neoploďněný oocyt z důvodu složitosti rozpoznání, zejména u odumírajících nebo mrtvých buněk.

Ze získaných dat ve fázi E1,5 preimplantačního vývoje jsem sledovala především četnost 2-buněčných embryí (udávající standardní průběh vývoje), abych zjistila, jestli se embrya del/del dokážou po oplození rozdělit do 2-buněčného stádía. Z tabulky X vyplývá, že u obou křížení se vyskytují samice s 2-buněčnými i bez 2-buněčných embryí, a také samice s očekávaným počtem 2-buněčných embryí, i samice s většinou buněk ve formě odumírajících, mrtvých i fragmentovaných buněk. Nemohu proto jednoznačně říct, že embrya s genotypem del/del by odumírali nebo se zastavili v 1-buněčném stádiu.



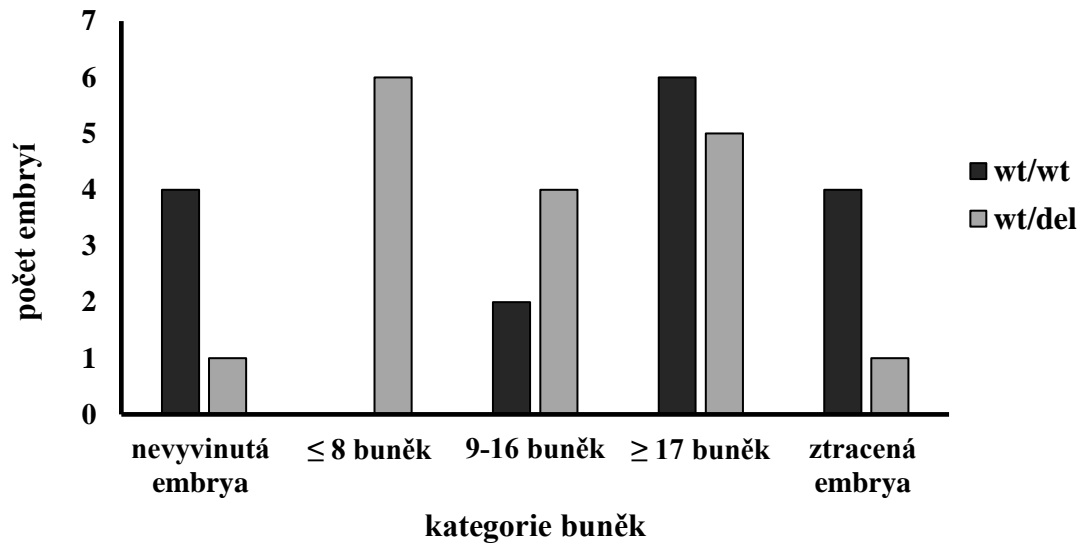
Obrázek 12: Přehled příkladů buněk jednotlivých kategorií se zvětšením 20x. Obrázek popisuje 2-buněčné stádium (a), živou buňku (b), odumírající buňku (c), mrtvou buňku (d) a fragmentované buňky (e).

Tabulka X: Počty získaných embryí genotypů wt/wt a wt/del v průběhu pitvy.

Křížení	Experiment	Samice	Kategorie buněk				
			2-buněčné stádium	Živá buňka	Odumírající buňka	Mrtvá buňka	Fragmentovaná buňka
wt/wt x wt/wt	1	1	-	20	-	-	-
		2	23	8	-	-	-
	2	3	12	1	-	-	3
		4	4	2	-	-	9
wt/del x wt/del	3	5	1	8	-	-	5
		6	-	1	-	-	3
	4	7	4	4	-	-	2
		8	-	15	-	-	2
	5	9	-	4	5	-	-
		10	-	3	7	1	5
		11	-	1	2	-	6
	6	12	3	5	-	1	2
		13	-	3	-	-	1
	7	14	26	1	3	-	-
		15	7	1	-	-	12
	8	16	-	16	7	-	2
		17	19	5	3	-	3

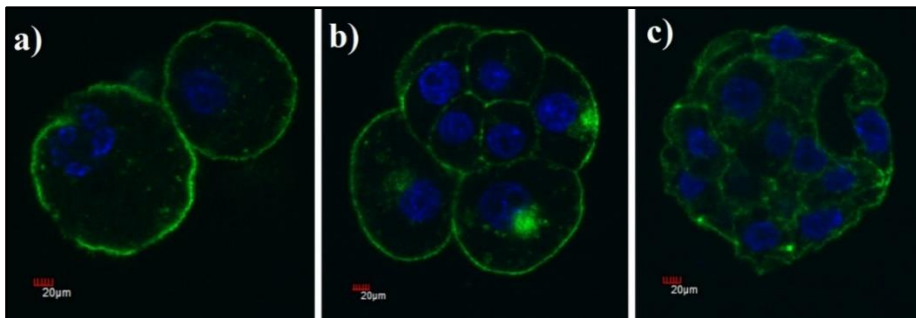
4.3.2. Fenotypy embryí in vitro kultivací do E3,5

Po uplynutí doby kultivace embryí se experiment posunul do stádia vývoje E3,5 (17–32 buněk), kde jsem sledovala, v jaké fázi počtu buněk se embrya nachází, a zda došlo u křížení wt/del x wt/del k zástavě nebo zpomalení vývoje ¼ embryí vlivem delece genu *Fbxw16*. Embrya byla rozdělena do několika kategorií (nevyvinutá embrya, ≤ 8 buněk, 9-16 buněk, ≥ 17 buněk a ztracená embrya) jejichž četnost výskytu je zobrazena na obrázku 13. Do kategorie nevyvinutých embryí spadají veškerá 2-buněčná embrya a poslední kategorie uvádí počty vyvinutých embryí (neznámého počtu buněk vyjma 2-buněčného stádia), které byly bohužel ztraceny v průběhu fixace. Příklady vizualizací jednotlivých kategorií jsou zobrazeny na obrázku 14 pro křížení wt/wt x wt/wt, a na obrázku 15 pro křížení wt/del x wt/del.

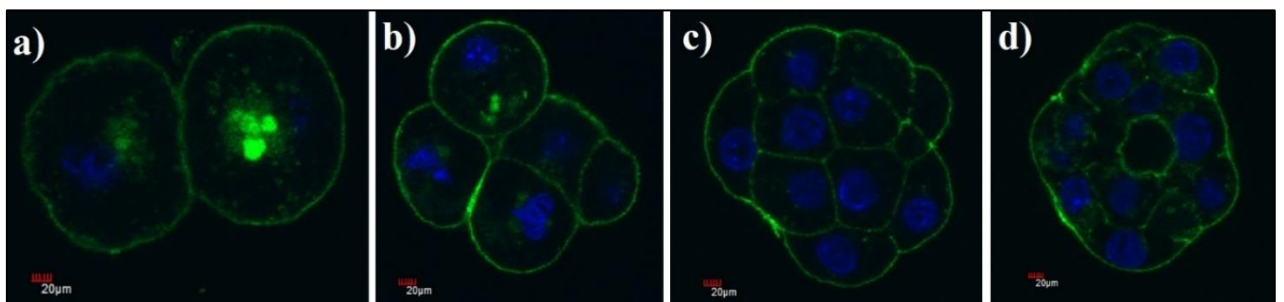


Obrázek 13: Průběh preimplantačního vývoje embryí wt/wt a wt/del po fixaci.

Ze získaných dat vyplývá, že opožděná vývojová stádia se nachází zejména u křížení wt/del x wt/del, což by mohlo naznačovat, že u embryí del/del nedochází ke zpomalení nebo zastavení vývoje během dělení ze 2 na 4 nebo 4 na 8 buněk. Nedokážeme ale jednoznačně odlišit fenotyp $\frac{1}{4}$ embryí tohoto křížení. U wt/wt x wt/wt křížení bylo více embryí zastaveno ve stádiu 2 buněk. Výsledky jsem nevyhodnocovala statisticky, protože se jednalo jenom o jeden experiment každého křížení.



Obrázek 14: Přehled příkladů buněk jednotlivých kategorií genotypu wt/wt. Obrázky popisují stádium 2 buněk (a), stádium 9-16 buněk (b) a stádium ≥ 17 buněk (c). Dapi (modrá) barví DNA, phalloidin (zelená) barví aktin a vizualizuje buněčné membrány.



Obrázek 15: Přehled příkladů buněk jednotlivých kategorií genotypu wt/del. Obrázky popisují stádium 2 buněk (a), stádium ≤ 8 buněk (b), stádium 9-16 buněk (c) a stádium ≥ 17 buněk (d). Dapi (modrá) barví DNA, phalloidin (zelená) barví aktin a vizualizuje buněčné membrány.

5. Diskuze

Tato bakalářská práce, zabývající se funkcí neznámého myšního genu *Fbxw16* a jeho vlivem na preimplantační vývoj, je první studií řešící tuto problematiku. Doposud nebyly zveřejněny žádné informace o tom, že je tento gen esenciální pro správný vývoj oocytů/embryí, jelikož je zde hojně exprimován. Publikovaná literatura pouze uvádí vliv ubikvitin-ligázového komplexu (SCF) na preimplantační embryonální vývoj, díky proteolytické degradaci proteinů s mateřským efektem (specificky vázané pomocí F-box proteinů na SCF), které jsou nezbytné pro správné fungování a řízení celé buňky do procesu přeměny z maternálního na embryonální program (Higuchi et al., 2018). Bylo také potvrzeno, že delece některých genů kódující F-box proteiny vykazují embryonální letalitu v různých stádiích vývoje. Příkladem je gen *Fbxw7*, jehož delece způsobuje letalitu v přibližně E10,5 (10,5 dne po narození). Vývoj embryí je opožděný a výsledný fenotyp vykazuje defekty cévní soustavy (Tetzlaff et al., 2004). Taký narušení genu *Fbxw8* vykazuje ze dvou třetin úmrtnost embryí *in utero*. Zbylá embrya se fenotypově projevují svojí odlišnou velikostí způsobenou zpomalením vývoje (Tsutsumi et al., 2008). Na základě těchto příkladů jsem chtěla poukázat na to, že žádná studie se nezabývá funkcí genu a jeho fenotypovým projevem na embrya v preimplantačním období, na druhou stranu studie vykazují opožděnost vývoje stejně jako náš zkoumaný gen *Fbxw16*.

K ověření embryonální letality delece genu *Fbxw16* byla stanovena hypotéza, na základě které se očekávalo, že 1. křížení (wt/wt x wt/wt) bude mít největší početní zastoupení narozených mláďat, nebo stejný jako u 2. a 3. křížení, jelikož by vývoj měl probíhat bez jakýchkoliv komplikací, což se nestalo. Usuzujeme, že důvodem získání takto nízkých dat bylo příbuzenské křížení mláďat stejného genotypu, které bylo způsobené nedostatkem vzniklých mláďat v průběhu předchozí genotypizace (Obr. 8) z bohužel neznámého důvodu.

Části projektu, zkoumající vliv genu na fenotyp embryí, vychází z hypotézy, že křížení wt/del x wt/del by mělo být v ¼ embryí (del/del) opožděná nebo zastavena ve vývoji z důvodu potvrzených údajů o nerodících se mláďat genotypu del/del. Z Českého centra pro fenogenomiku jsme měli informaci, že v děloze matky se ve stádiu E9,5 nenacházela žádná embrya, nebo jakékoliv jiné pozůstatky de/del embryí (Jan Procházka, osobní komunikace). Proto jsme nevěděli, zda k zástavě embryonálního vývoje dochází již během oplodnění (nevzniknou žádná embrya), nebo se jejich vývoj zastaví krátce po oplodnění ve stádiu zygoty či 2-buněčného embrya, nebo se embrya vyvíjejí dále, ale nedojdou do stádia životaschopných blastocyst schopné implantace, a nebo selže proces implantace. Ze získaných dat v průběhu E1,5 a E3,5 embryonálního vývoje se bohužel nedá jednoznačně potvrdit, v jakém bodě

vývoje k zástavě dochází, a to z důvodu nedostatečných počtů opakování a nekonzistentních výsledků pro obě varianty křížení. Z výsledků se dá pouze předpokládat, že dle křížení wt/del x wt/del, kde docházelo k častější detekci embryí v opožděných vývojových stádiích, než je standardní počet buněk v bodě E3,5, by se mohlo jednat právě o embrya del/del a jejich efekt genu *Fbxw16* na preimplantační vývoj mezi 2 až 8 buněčným stádiem. Předpokládáme, že delece genu *Fbxw16* narušuje kontrolovanou degradaci skupiny proteinů, která je nevyhnutelná pro správný průběh preimplantačního vývoje.

Pro příští opakování poslední části experimentu se musí použít k superovulaci pouze mladé samice na začátku jejich reprodukčního období, které vykazovaly větší reprodukční schopnost (Tab. X, experiment 7, 8) v počtu nalezených 2-buněčných embryí, než u samic staršího věku (Tab. X experiment 3,4,5). A v dalším kroku by bylo vhodné zařadit do experimentu metodu genotypizace jednotlivých embryí, pro přímé zjištění genotypu daných embryí získaných z křížení wt/del x wt/del a jejich následné porovnání s vizualizovaným fenotypem.

6. Závěr

Vliv genu *Fbxw16* na myši preimplantační embryonální vývoj nebylo možné jednoznačně určit. Dle získaných dat jsem zjistila, že:

- podmínky pro správný průběh genotypizace je podařilo úspěšně stanovit.
- očekávaný poměr mláďat 1:1 dle původního parentálního křížení (wt/wt x wt/del) se potvrdil pouze u 2 (samice zastupovali genotyp wt/wt jen z 5 %) z celkových 8 vrhů, bohužel z neznámých důvodů. Ostatní narozená mláďata byla genotypu wt/del.
- genotyp del/del je embryonálně letální (dle 4. křížení wt/del x wt/del).
- k zástavě vývoje u wt/del nedochází v 2-buněčném stádiu, ale později v průběhu preimplantačního vývoje.
- z vizualizace fenotypů embryí nemohu jednoznačně potvrdit, kde dochází u genotypu wt/del k zastavení vývoje, ale určitým projevem může být nejpomalejší vývoj embryí spadající do kategorie ≤ 8 buněk, kde měla tyto embrya nejpočetnější zastoupení.

7. Seznam použité literatury

Callis, J. (2014). The Ubiquitination Machinery of the Ubiquitin System. *The Arabidopsis Book*, 12. <https://doi.org/10.1199/tab.0174>

Craig, K. L., & Tyers, M. (1999). The F-box: a new motif for ubiquitin dependent proteolysis in cell cycle regulation and signal transduction. *Progress in Biophysics and Molecular Biology*, 72(3), 299-328. [https://doi.org/10.1016/S0079-6107\(99\)00010-3](https://doi.org/10.1016/S0079-6107(99)00010-3)

Higuchi, C., Shimizu, N., Shin, S. -W., Morita, K., Nagai, K., Anzai, M., Kato, H., Mitani, T., Yamagata, K., Hosoi, Y., Miyamoto, K., & Matsumoto, K. (2018). Ubiquitin-proteasome system modulates zygotic genome activation in early mouse embryos and influences full-term development. *Journal of Reproduction and Development*, 64(1), 65-74. <https://doi.org/10.1262/jrd.2017-127>

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

Christians, E., Davis, A. A., Thomas, S. D., & Benjamin, I. J. (2000). Maternal effect of Hsf1 on reproductive success. *Nature*, 407(6805), 693-694. <https://doi.org/10.1038/35037669>

Jin, J., Cardozo, T., Lovering, R. C., Elledge, S. J., Pagano, M., & Harper, J. W. (2004). Systematic analysis and nomenclature of mammalian F-box proteins. *Genes & Development*, 18(21), 2573-2580. <https://doi.org/10.1101/gad.1255304>

Kipreos, E. T., & Pagano, M. (2000). The F-box protein family. *Genome Biology*, 1(5). <https://doi.org/10.1186/gb-2000-1-5-reviews3002>

Lander, E. S. (2011). Initial impact of the sequencing of the human genome. *Nature*, 470(7333), 187-197. <https://doi.org/10.1038/nature09792>

Latham, K. E., & Schultz, R. M. (2001). Embryonic genome activation. *Frontiers in Bioscience*, 6(1), 748-759. <https://doi.org/10.2741/Latham>

Lecker, S. H., Goldberg, A. L., & Mitch, W. E. (2006). Protein Degradation by the Ubiquitin–Proteasome Pathway in Normal and Disease States. *Journal of the American Society of Nephrology*, 17(7), 1807-1819. <https://doi.org/10.1681/ASN.2006010083>

Leung, C. Y., Zhu, M., & Zernicka-Goetz, M. (2016). Polarity in Cell-Fate Acquisition in the Early Mouse Embryo. In *Mammalian Preimplantation Development* (pp. 203-234). Elsevier. <https://doi.org/10.1016/bs.ctdb.2016.04.008>

Li, L., Baibakov, B., & Dean, J. (2008). A Subcortical Maternal Complex Essential for Preimplantation Mouse Embryogenesis. *Developmental Cell*, 15(3), 416-425. <https://doi.org/10.1016/j.devcel.2008.07.010>

Li, L., Zheng, P., & Dean, J. (2010). Maternal control of early mouse development. *Development*, 137(6), 859-870. <https://doi.org/10.1242/dev.039487>

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>

Mouse breeding. *Biomedical research core facilities*. Citováno dne 8. 4. 2022 z <https://brcf.medicine.umich.edu/cores/transgenic-animal-model/training-education/breed/>

Mtango, N. R., Potireddy, S., & Latham, K. E. (2008). Chapter 7 Oocyte Quality and Maternal Control of Development. In *International Review of Cell and Molecular Biology* (pp. 223-290). Elsevier. [https://doi.org/10.1016/S1937-6448\(08\)00807-1](https://doi.org/10.1016/S1937-6448(08)00807-1)

Nguyen, H. C., Wang, W., & Xiong, Y. (2017). Cullin-RING E3 Ubiquitin Ligases: Bridges to Destruction. In J. R. Harris & J. Marles-Wright (Eds.), *Macromolecular Protein Complexes* (pp. 323-347). Springer International Publishing. https://doi.org/10.1007/978-3-319-46503-6_12

Pack, C. -G., Yukii, H., Toh-e, A., Kudo, T., Tsuchiya, H., Kaiho, A., Sakata, E., Murata, S., Yokosawa, H., Sako, Y., Baumeister, W., Tanaka, K., & Saeki, Y. (2014). Quantitative live-cell imaging reveals spatio-temporal dynamics and cytoplasmic assembly of the 26S proteasome. *Nature Communications*, 5(1). <https://doi.org/10.1038/ncomms4396>

Paynton, B. V., Rempel, R., & Bachvarova, R. (1988). Changes in state of adenylation and time course of degradation of maternal mRNAs during oocyte maturation and early embryonic development in the mouse. *Developmental Biology*, 129(2), 304-314.

[https://doi.org/10.1016/0012-1606\(88\)90377-6](https://doi.org/10.1016/0012-1606(88)90377-6)

Tetzlaff, M. T., Yu, W., Li, M., Zhang, P., Finegold, M., Mahon, K., Harper, J. W., Schwartz, R. J., & Elledge, S. J. (2004). Defective cardiovascular development and elevated cyclin E and Notch proteins in mice lacking the Fbw7 F-box protein. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 101(10), 3338-3345.

<https://doi.org/10.1073/pnas.0307875101>

Thompson, L. L., Rutherford, K. A., Lepage, C. C., & McManus, K. J. (2021). The SCF Complex Is Essential to Maintain Genome and Chromosome Stability. *International Journal of Molecular Sciences*, 22(16). <https://doi.org/10.3390/ijms22168544>

Tong, Z. -B., Gold, L., Pfeifer, K. E., Dorward, H., Lee, E., Bondy, C. A., Dean, J., & Nelson, L. M. (2000). Mater, a maternal effect gene required for early embryonic development in mice. *Nature Genetics*, 26(3), 267-268. <https://doi.org/10.1038/81547>

Tsutsumi, T., Kuwabara, H., Arai, T., Xiao, Y., & DeCaprio, J. A. (2008). Disruption of the Fbxw8 Gene Results in Pre- and Postnatal Growth Retardation in Mice. *Molecular and Cellular Biology*, 28(2), 743-751. <https://doi.org/10.1128/MCB.01665-07>

UniProtKB - Q497Z0 (Q497Z0_MOUSE). (2021). *UniProt*. Citováno dne 8. 3. 2022 z <https://www.uniprot.org/uniprot/Q497Z0>

van Wijk, S. J. L., Fulda, S., Dikic, I., & Heilemann, M. (2019). Visualizing ubiquitination in mammalian cells. *EMBO reports*, 20(2). <https://doi.org/10.15252/embr.201846520>

Weake, V. M., & Workman, J. L. (2010). Histone Ubiquitination. In *Handbook of Cell Signaling* (pp. 2449-2460). Elsevier. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-374145-5.00292-8>

White, M. D., Bissiere, S., Alvarez, Y. D., & Plachta, N. (2016). Mouse Embryo Compaction. In *Mammalian Preimplantation Development* (pp. 235-258). Elsevier. <https://doi.org/10.1016/bs.ctdb.2016.04.005>

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>

Xie, J., Jin, Y., & Wang, G. (2019). The role of SCF ubiquitin-ligase complex at the beginning of life. *Reproductive Biology and Endocrinology*, 17(1).

<https://doi.org/10.1186/s12958-019-0547-y>

Xie, Z., & Klionsky, D. J. (2007). Autophagosome formation: core machinery and adaptations. *Nature Cell Biology*, 9(10), 1102-1109. <https://doi.org/10.1038/ncb1007-1102>

Zeng, F., & Schultz, R. M. (2003). Gene Expression in Mouse Oocytes and Preimplantation Embryos: Use of Suppression Subtractive Hybridization to Identify Oocyte- and Embryo-Specific Genes1. *Biology of Reproduction*, 68(1), 31-39.

<https://doi.org/10.1095/biolreprod.102.007674>

Zheng, P., & Dean, J. (2009). Role of Filia, a maternal effect gene, in maintaining euploidy during cleavage-stage mouse embryogenesis. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 106(18), 7473-7478. <https://doi.org/10.1073/pnas.0900519106>

Zhang, P., Ni, X., Guo, Y., Guo, X., Wang, Y., Zhou, Z., Huo, R., & Sha, J. (2009). Proteomic-based identification of maternal proteins in mature mouse oocytes. *BMC Genomics*, 10(1). <https://doi.org/10.1186/1471-2164-10-348>