

**Jihočeská univerzita v Českých Budějovicích
Přírodovědecká fakulta**

Role genu *Socs3* v preimplantačním vývoji myších embryí

Bakalářská práce

Jana Tománková

Školitelka: Mgr. Lenka Gahurová, Ph.D.

České Budějovice 2020

Tománková, J., 2020: Role genu Socs3 v preimplantačním vývoji myších embryí. [The role of the Socs3 gene in preimplantation development of mouse embryos. Bc. Thesis, in Czech.] – 68 p., Faculty of Science, University of South Bohemia, České Budějovice, Czech Republic.

Anotace

The Socs3 gene is important for the postimplantation development of mouse embryos, but not much is known about its effect on preimplantation development. The aim of this study was to determine the effect of Socs3 gene in preimplantation development of mouse embryos, specifically on proliferation at E3.5 timepoint, at the time of segregation of cell lineages trophoctoderm and inner cell mass.

Prohlášení

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

Prohlašuji, že v souladu s § 47b zákona č. 111/1998 Sb. v platném znění souhlasím se zveřejněním své bakalářské práce, a to v nezkrácené podobě elektronickou cestou ve veřejně přístupné části databáze STAG provozované Jihočeskou univerzitou v Českých Budějovicích na jejích internetových stránkách, a to se zachováním mého autorského práva k odevzdanému textu této kvalifikační práce. Souhlasím dále s tím, aby toutéž elektronickou cestou byly v souladu s uvedeným ustanovením zákona č. 111/1998 Sb. zveřejněny posudky školitele a oponentů práce i záznam o průběhu a výsledku obhajoby kvalifikační práce. Rovněž souhlasím s porovnáním textu mé kvalifikační práce s databází kvalifikačních prací Theses.cz provozovanou Národním registrem vysokoškolských kvalifikačních prací a systémem na odhalování plagiátů.

V Českých Budějovicích, 22. 05. 2020

.....

Jana Tománková

Poděkování

První člověk, kterému bych chtěla poděkovat, je doc. Alexander W. Bruce, Ph.D., který mi umožnil pracovat na mé bakalářské práci v laboratoři, kterou vede.

Rovněž bych chtěla poděkovat všem pracovníkům a ostatním studentům laboratoře za velmi milé přijetí, ochotu mi s čímkoli poradit a pomoci, a za podporu, kterou mi poskytli.

Mé největší poděkování ale patří mé školitelce Mgr. Lence Gahurové, Ph.D. za to, že mě s nadšením přijala jako svoji studentku a naučila mě spoustu nových věcí, za trpělivost, kterou se mnou vždy měla a za neuvěřitelné množství času, které mi věnovala.

Obsah

1. Úvod.....	1
1.1 Preimplantační vývoj myších embryí.....	1
1.1.1 Rozhodnutí mezi osudem trofoektodermu a vnitřní masy buněk.....	4
1.1.2 Počáteční vývoj trofoektodermu a vnitřní masy buněk.....	6
1.1.3 Segregace vnitřní masy buněk na epiblast a primitivní endoderm.....	8
1.2 Signální dráha JAK/STAT	9
1.2.1 STAT3 a jeho vliv na vývoj embrya	9
1.3 SOCS3.....	11
1.3.1 Role Socs3 a Stat3 v in vitro kultivovaných embryonálních kmenových buňkách	12
1.3.2 Role Socs3 v embryonálním vývoji	13
1.3.3 Potenciální role Socs3 v preimplantačních embryích	14
2. Cíle práce	16
3. Materiály a metody	17
3.1 Genotypizace myší linie B16 Socs3 fl/fl.....	17
3.2 Kultivace embryí a jejich imunofluorescenční barvení	18
3.2.1 Získávání embryí a jejich kultivace v klasických podmínkách.....	18
3.2.2 Kultivace embryí s inhibítozem	19
3.2.3 Fixace a barvení.....	20
3.2.4 Konfokální mikroskopie.....	23
3.3 Příprava mRNA konstruktů a jejich mikroinjikování	23
3.3.1 Izolace a štěpení plasmidu.....	23
3.3.2 Fenol-chloroformová extrakce	24
3.3.3 In vitro transkripce	24
3.3.4 Mikroinjikování.....	26
3.4 Příprava CRISPR-Cas9 gRNA.....	27
3.4.1 Izolace a štěpení plasmidu.....	27
3.4.2 Příprava sgRNA insertu pro ligační reakci.....	27
3.4.3 Ligace a bakteriální transformace	28
3.4.4 In vitro transkripce	30
3.5 Analýza RNA-seq datasetů	31
4. Výsledky	33
4.1 Transkripční profil Socs3 a s ním asociovaných genů s použitím RNA-seq dat.....	33
4.2 Imunofluorescenční barvení proteinu SOCS3 během preimplantačního vývoje.....	38
4.3 Imunofluorescenční barvení pSTAT3 během preimplantačního vývoje	43

4.4	Downregulace Socs3 přes inhibici pSTAT3	47
4.5	Delece Socs3 pomocí mikroinjekcí Cre mRNA u myší linie Socs3 fl/fl	52
4.6	Příprava sgRNA na delecí Socs3 pomocí CRISPR/Cas9 systému.....	56
4.7	Příprava HA-tagované Socs3 mRNA pro overexpresi Socs3 genu.....	59
5.	Diskuse	61
6.	Seznam literatury.....	64

1. Úvod

1.1 Preimplantační vývoj myších embryí

Myší preimplantační vývoj začíná v okamžiku, kdy spermie oplodní zralý oocyt, který byl během ovulace vypuštěn do vejcovodu a končí implantací embrya do děložní sliznice. Celý proces trvá přibližně 4,5 dne a dochází při něm k několika, po sobě následujícím mitotickým dělením, k segregaci třech buněčných linií a k vytvoření útvaru nazývaného blastocysta. Souběžně s těmito ději putuje embryo skrze vejcovod do dělohy, kde nakonec, za předpokladu, že všechny procesy proběhnou tak, jak mají, dochází k implantaci.

Ve vaječnicích dospělé myši samice jsou uchovávány primární oocyty, obalené glykoproteinovým obalem nazývaným *zona pellucida*, které ale zatím nejsou připraveny na oplodnění. Je to proto, že jejich meióza byla ještě před narozením samice pozastavena a od té doby se nacházejí v profázi prvního meiotického dělení (White et al., 2018). Působením hormonálních cyklů dochází pravidelně, vždy jen u několika vybraných primárních oocytů, ke znovunastartování a dokončení prvního meiotického dělení. Tehdy vzniká první pólóvé tělísko a sekundární oocyt. Bezprostředně poté následuje druhé meiotické dělení, při kterém sekundární oocyt zůstává v metafázi II. Nyní už můžeme mluvit o zralém oocytu, který je připraven na oplodnění (White et al., 2018).

K samotnému oplodnění ale může dojít pouze za předpokladu, že proběhne ovulace, během které bude oocyt nasát do vejcovodu. V čase, kdy nastane, začínáme měřit embryonální dny (E). Ovulace nastává v E0 (Cockburn & Rossant, 2010), zralý oocyt je během ní nasát do vejcovodu a v jeho ampulární části se setkává se spermii. Pokud se některé ze spermií podaří oocyt oplodnit, dochází k dokončení druhého meiotického dělení, oddělení druhého pólóvého tělíska (White et al., 2018), a přibližně v E0.5 vzniká zygota (Cockburn & Rossant, 2010).

Ve stádiu zygoty řídí většinu probíhajících dějů mateřské faktory, které byly zděděny od matky a uloženy v oocytu ve formě mRNA nebo proteinů (Schultz, 2002). Malé množství genů je transkribováno a translatováno již v této fázi v rámci tzv. minoritní aktivace zygotického genomu (Abe et al., 2018). Po rozdělení zygoty v E1.0 na dvoubuněčné embryo (Cockburn & Rossant, 2010), dochází k procesu zvaném majoritní aktivace zygotického genomu, kdy začíná transkripce většiny embryonální RNA (Schultz, 1993). Následně začíná embryo ve velké míře translatovat vlastní RNA, vliv mateřských faktorů se postupně snižuje, až nakonec úplně vymizí (Schultz, 2002). Většina maternální mRNA vymizí

už ve dvoubuněčném embryu, ale maternální proteiny mohou fungovat během celého preimplantačního vývoje (Li et al., 2013; Schultz, 1993).

Stádia čtyř buněk dosáhne embryo v E1.5 – E2.0. Nedlouho poté, v E2.5, probíhá třetí série dělení buněk a embryo se nachází ve své osmibuněčné fázi. Je to poslední vývojová fáze, kdy se od sebe jednotlivé blastomery nijak neliší a jsou schopny vytvářet jakoukoli buněčnou linii. Na začátku 8-buněčného stádia blastomery svým tvarem připomínají kuličky. Díky tomuto tvaru nemohou ležet těsně na sobě a lze tedy jednoduše určit, kde končí jedna buňka a začíná druhá. Během 8-buněčného stádia probíhá v blastomerách proces tzv. zhutnění. Při něm ztrácí blastomery svůj kulatý tvar a stávají se na pohled placatějšími. Dochází tak k podstatnému zvětšení kontaktních ploch mezi buňkami, na kterých mezi buňkami vznikají tzv. adherentní spoje a je poté velmi obtížné na první pohled odlišit hranice jednotlivých buněk (Chazaud & Yamanaka, 2016). Paralelně se zhutněním probíhá proces polarizace, kdy dochází k asymetrickému rozdělení proteinových komplexů podél apikálně-bazolaterální osy blastomer. Tímto způsobem se na membráně blastomer na vnější straně embrya, bez kontaktu s jinými blastomerami, tvoří apikální doména, zatímco na membráně v kontaktu s jinými blastomerami, bazolaterální doména. Tyto domény jsou navzájem odděleny nově vytvořenými tzv. těsnými spoji (Mihajlović & Bruce, 2017).

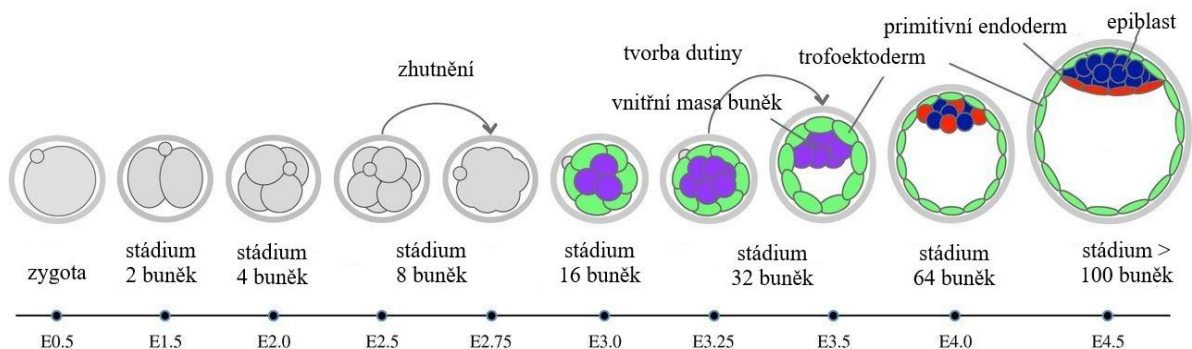
Další série dělení má za výsledek první mezibuněčnou asymetrii. Blastomery 8-buněčného embrya se mohou dělit dvěma různými způsoby, symetricky nebo asymetricky. Pokud se buňka rozhodne rozdělit symetricky, apikální membrána se rozdělí mezi obě dceřiné buňky a vznikají dvě polarizované blastomery, přičemž se obě nacházejí na povrchu embrya. V případě asymetrického dělení celou apikální doménu získá jenom jedna dceřiná buňka a druhá má jenom bazolaterální membránu. Vzniká tak jedna polarizovaná blastomera na povrchu embrya a jedna nepolarizovaná blastomera kompletně uvnitř embrya (Chazaud & Yamanaka, 2016).

Tímto dělením získává embryo 16 buněk (E3.0), které následně vytváří útvar, nazývaný se morula. V důsledku asymetrického dělení embryo obsahuje dva typy buněk, vnější na povrchu embrya s apikální i bazolaterální doménou, a vnitřní uvnitř embrya pouze s bazolaterální membránou. Na základě této rozdílné polohy se od sebe začínají tyto dva typy buněk odlišovat. Jeden z hlavních rozdílů je odlišné působení Hippo signální dráhy (bude podrobněji popsáno v kapitole 1.1.1), které má za následek začátek rozdílné exprese diferenciačních faktorů. Vnější buňky tak začínají směřovat k diferenciaci, zatímco ve vnitřních buňkách diferenciační faktory nejsou aktivní (Sasaki, 2017).

Následuje další kolo asymetrického a symetrického mitotického dělení, díky kterému se embryo v E3.5 dostává do fáze 32 buněk. Zde pokračuje rozrůžňování vnitřních buněk od vnějších aktivitou Hippo signální dráhy a vytvářejí se mezi nimi podstatné rozdíly. Ty spočívají hlavně v aktivitě různých transkripčních faktorů, které ve vnitřních a vnějších buňkách působí. Ve vnějších polárních buňkách Hippo kaskáda není aktivní, a to vede k aktivitě transkripčních faktorů potřebných pro diferenciaci trofoektodermu a extraembryonální linie, ze které se vyvine placenta (její embryonální část). Ve vnitřních nepolárních buňkách Hippo dráha aktivní je, proto trofoektodermální transkripční faktory aktivní nejsou, a naopak jsou aktivní pluripotentní faktory. Vnitřní buňky tak formují pluripotentní tzv. vnitřní masu buněk, nazývanou také embryoblast, ze které mohou vzniknout všechny buněčné linie kromě trofoektodermu. Segregace trofoektodermu a vnitřní masy buněk se nazývá tzv. první rozhodnutí buněčného osudu (Cockburn & Rossant, 2010).

Dalším vývojovým krokem je vytvoření blastocysty. Jejím hlavním morfologickým znakem je vytvoření blastocystové dutiny, která se plní vodou transportovanou přes trofoektoderm pomocí Na^+/H^+ pump a Na^+/K^+ ATPáz (Cockburn & Rossant, 2010). Výsledná blastocysta má na povrchu jednobuněčnou vrstvu trofoektodermálních buněk a uvnitř, na jedné straně trofoektodermu se nachází v hloučku všechny vnitřní buňky embryoblastu (Nishioka et al., 2008). Ten se mezi E4.0-E4.5 segreguje na dvě buněčné linie. První z nich se nazývá epiblast, druhá primitivní endoderm (Chazaud & Yamanaka, 2016). Primitivní endoderm je další extraembryonální diferencující se linie, ze které vznikne např. žloutkový vak (Chazaud et al., 2006), zatímco epiblast zůstává pluripotentní a vznikne z něho samotné embryo (Lokken & Ralston, 2016). Po segregaci těchto dvou buněčných linií se buňky primitivního endodermu uspořádají do jednobuněčné vrstvy, oddělující buňky epiblastu od blastocystové dutiny. Segregace epiblastu a primitivního endodermu se označuje jako tzv. druhé rozhodnutí buněčného osudu (Cockburn & Rossant, 2010).

Preimplantační vývoj končí okolo E4.5. Tehdy se blastocysta nachází ve své pozdní fázi. Aby se mohla úspěšně implantovat do děložní sliznice, musí se nejdříve zbavit *zony pellucidy*, čehož dosáhne tzv. vyloupnutím nebo vylíhnutím (Graham & Zernicka-Goetz, 2016). Přesný proces, jakým dochází k opuštění *zony pellucidy* zatím nebyl uspokojivě definován, ale pravděpodobně v něm hraje nezanedbatelnou roli trofoektoderm (White et al., 2018).



Obr. 1: Preimplantační vývoj myšního embrya v čase (Mihajlović & Bruce, 2017).

1.1.1 Rozhodnutí mezi osudem trofoektodermu a vnitřní masy buněk

Na začátku preimplantačního vývoje jsou všechny buňky embrya naprosto totožné a mají potenciál se diferencovat na jakýkoliv buněčný typ. Takovéto buňky jsou označovány jako totipotentní (Graham & Zernicka-Goetz, 2016) a tento stav trvá přibližně do 8-buněčného embrya. Ve stádiu 16 buněk se jednotlivé blastocysty začínají segregovat na trofoektoderm a vnitřní masu buněk, přičemž je tato segregace završena v 32-buněčném embryu. Tímto způsobem vznikají první dvě embryonální buněčné linie (Sasaki, 2017).

Toto rozruznění je řízeno složitými procesy, z nichž některé stále čekají na své plné objasnění a nejspíše v něm hraje roli mnoho faktorů (Chazaud & Yamanaka, 2016). I přes tento předpoklad byly navrženy dvě hlavní teorie, které se pokouší vysvětlit, jakým způsobem se buňky segregují na trofoektoderm a vnitřní masu buněk (Sasaki, 2017). Tyto dvě teorie se navzájem nevylučují, ale naopak se velice vhodně doplňují (Mihajlović & Bruce, 2017).

První z nich je tzv. poziční model, který navrhli Tarkowski a Wroblewska (Tarkowski & Wroblewska, 1967). Je založen na předpokladu, že hlavním faktorem, hrajícím roli v rozhodování buněk je poloha, kterou v embryu zaujímají. Jinými slovy, že o buněčném osudu rozhoduje to, zda jsou ve vnějším, nebo ve vnitřním umístění (Sasaki, 2017; Sasaki, 2010), a toto umístění potom určuje to, jak se budou dále vyvíjet (Mihajlović & Bruce, 2017).

Druhému modelu se říká model polarity a byl navržený Johnsonem (Johnson et al., 1981). Jak už lze odvodit z názvu, tak za nejdůležitější faktor, který určuje další vývoj, je v něm považována polarizace jednotlivých buněk. Ta záleží na poloze blastomer v embryu, ale také na tom, zda daná buňka vznikla asymetrickým, nebo symetrickým dělením (Sasaki, 2017; Sasaki, 2010).

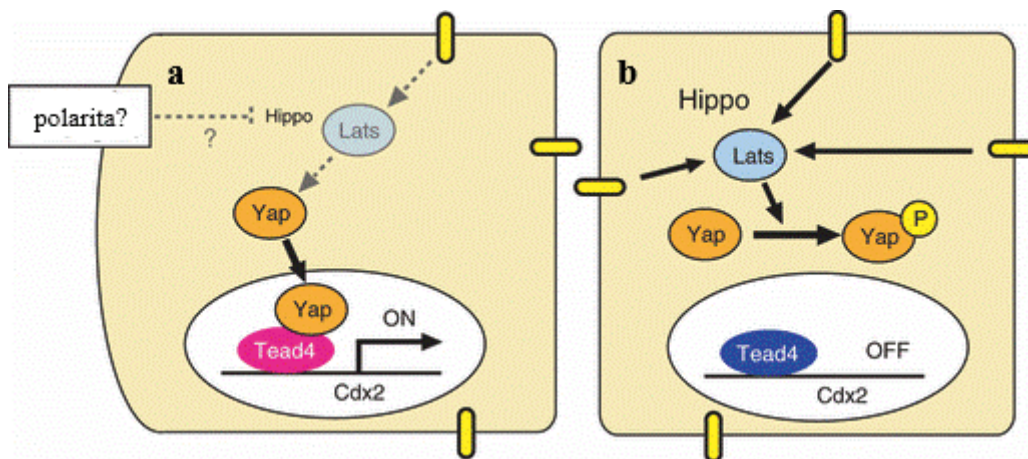
V souvislosti s počátkem diferenciací buněk na vnitřní masu buněk a trofoektoderm je třeba zmínit signalizační kaskádu Hippo, jejíž aktivita je s největší pravděpodobností řízena buněčnou polaritou (Hirate et al., 2013).

Embryonální buňky obsahují protein AMOT, který začíná být exprimován v 8-buněčném stádiu, bez rozdílu jeho hladiny exprese v jednotlivých blastomerech. Jeho množství a lokalizace se začíná výrazně lišit ve stádiu 16 buněk (Leung & Zernicka-Goetz, 2013), kdy je v nepolárních buňkách přítomen ve výrazně větším množství, a je lokalizován po celé cytoplazmatické membráně, zatímco v polárních buňkách je jenom v malém množství, a jeho lokalizace je omezena na apikální membránu (Anani et al., 2014).

V nepolárních buňkách se AMOT asociuje s LATS kinázami, které jsou lokalizovány v adherentních spojích bazolaterální membrány, a tím aktivuje signální kaskádu Hippo. LATS kinázy fosforylují YAP a ten je tak zadržen v cytoplazmě. Naopak u polárních buněk AMOT kvůli své lokalizaci v apikální doméně nemůže asociovat s bazolaterálními LATS kinázami (Leung & Zernicka-Goetz, 2013). Tím pádem v nich dráha Hippo zůstává neaktivní a YAP bez fosforylace může proniknout do jádra, kde ovlivňuje transkripci faktorů pro diferenciaci trofoektodermu (Hirate et al., 2013).

Zajímavé je, že se v této fázi nepolární buňky nemusí nutně nacházet ve vnitřní části embrya. Během dělení z 8 na 16 buněk se blastomery nemusí rozdělovat jenom symetricky nebo asymetricky, ale relativně časté je i šikmé dělení. Jedna dceřiná blastomera získá většinu apikální membrány a vznikne z ní klasická polární buňka, zatímco ta druhá získá jen malou část apikální domény, která nestačí k polarizaci buňky, a buňka je pak nepolární, i když je malou částí na povrchu embrya. Tyto buňky mají proto aktivní signální dráhu Hippo, nediferencují se na trofoektoderm a jsou vtlačeny dovnitř embrya (Anani et al., 2014).

Experimentálně bylo zjištěno, že pokud nebude v nepolárních blastomerech protein AMOT přítomen, bude v těchto buňkách docházet k expresi genů typických pro vznik a vývoj trofoektodermu. Pluripotence, kterou by za normálních okolností udržovaly, bude ztracena (Leung & Zernicka-Goetz, 2013).



Obr. 2: Znáznornění vlivu Hippo signalizace na Yap a následnou aktivaci exprese Tead4. Obrázek a znázornňuje vnější buňku, na obrázku b je zobrazena buňka vnitřní (Sasaki, 2010).

1.1.2 Počáteční vývoj trofoektodermu a vnitřní masy buněk

Před nastartováním procesu oddělování prvních dvou buněčných linií, kterými jsou vnitřní masa buněk a trofoektoderm, jsou všechny buňky embrya, s výjimkou své polarizace shodné, a exprimují se v nich stejné transkripční faktory. Mezi ty nejdůležitější patří *Tead4*, *Cdx2*, *Oct4* a *Nanog* (Nishioka et al., 2008).

Na začátku ovlivnění dalšího vývoje vnějších buněk směrem k trofoektodermu pravděpodobně stojí již zmíněná signalizační kaskáda Hippo, která způsobuje rozdíly v přítomnosti LATS kináz a transkripčního koaktivátoru YAP mezi vnitřními a vnějšími buňkami embrya (Leung & Zernicka-Goetz, 2013).

YAP začíná být hojně exprimován ve stádiu 8 buněk a v dalších fázích vývoje postupně získává na důležitosti. Ve fázi 16 buněk se jeho přítomnost mezi vnějšími a vnitřními buňkami začíná lišit (Nishioka et al, 2009).

Tento jev je způsoben kinázami LATS1 a LATS2, které mají za úkol YAP fosforylovat. Z toho vyplývá, že pokud jsou aktivní, je YAP fosforylován. Tato fosforylace potom způsobuje, že se nemůže dostat z cytoplazmy do jádra. Ve vnějších buňkách se jeho hladina zvyšuje a je přítomen hlavně v buněčných jádrech. Co se týče vnitřních buněk, je tomu právě naopak. Jeho přítomnost v jádrech se postupně snižuje až na nulu, stále je ho ale možné detekovat v cytoplazmě (Nishioka et al, 2009).

YAP má roli kofaktoru transkripčního faktoru TEAD4. Expres *Tead4* je detekována od 4-buněčného embrya v poměrně vysoké hladině, až do stádia blastocysty. Tehdy jeho exprese začíná mírně klesat, stále je ale přítomna ve všech buňkách embrya, nezávisle na jejich poloze, nebo na jejich polarizaci (Nishioka et al., 2008).

Pokud je YAP přítomen v jádře, jak je tomu ve vnějších buňkách, dochází k aktivaci TEAD4 (Nishioka et al, 2009), ten následně podněcuje expresi dalších transkripčních faktorů *Cdx2* a *Eomes*, specifických pro linii trofoektodermu (Nishioka et al., 2008), a potlačuje expresi pluripotentního transkripčního faktoru *Sox2* (Wicklow et al., 2014).

Vnitřní buňky disponují fosforylovaným YAP, což způsobuje neaktivitu TEAD4 (Nishioka et al, 2009). Tato neaktivita má za následek vymizení exprese *Cdx2* (Nishioka et al., 2008) a přetrvání exprese *Sox2* (Wicklow et al., 2014). Nepřítomnost CDX2 způsobuje zastavení exprese *Eomes* (Nishioka et el., 2008), ale hlavně udržení exprese *Oct3*, *Oct4* a *Nanog*, které jsou nezbytně nutné pro tvorbu a vývoj vnitřní masy buněk (Strumpf et al., 2005). SOX2 je později nutný pro udržení pluripotence a rozruznění vnitřní masy buněk na epiblast a primitivní endoderm (Wicklow et al., 2014).

Ve vnějších buňkách nedochází k fosforylaci YAP, ten zůstává v jádře, ponechává aktivním TEAD4 a ten následně tlumí expresi *Sox2*. Souběžně s tím udržuje expresi *Cdx2*, čímž je potlačena exprese *Oct3*, *Oct4* (Nishioka et al., 2008) a *Nanog* (Strumpf et al., 2005).

TEAD4 je esenciální pro vznik trofoektodermu a tím také umožňuje vytvoření blastocystové dutiny, což bylo experimentálně dokázáno pomocí mutantních embryí, s vypnutým příslušným genem. Tato embrya jsou ze začátku schopna normálního vývoje, který se zdá být srovnatelný s kontrolními embryi. Dochází u nich k běžnému buněčnému dělení, a ve standardním čase dochází k vytvoření moruly. Na rozdíl od normálních embryí se u nich ale přestávají exprimovat transkripční faktory *Cdx2* a *Eomes* (Nishioka et al., 2008).

Následkem toho se v mutantních embryích nesegreguje trofoektodermální linie a všechny buňky se vyvíjejí jako buňky vnitřní masy buněk. Kvůli tomu není možný vznik blastocystové dutiny a tím pádem ani samotné blastocysty. Místo toho setrvávají mutantní embrya ve shluku buněk, typickém pro morulu, nadále u nich dochází k buněčnému dělení, a nedlouho poté také k jejich odumření (Nishioka et al., 2008).

Podobný experiment byl proveden i na genu pro *Cdx2*, díky kterému bylo potvrzeno, že je tento gen nezbytně nutný pro udržení blastocystové dutiny a tím pádem i samotné blastocysty. Mutantní embrya, postrádající tento transkripční faktor se vyvíjejí běžným způsobem až do blastocystového stádia. Tehdy se u nich sice začíná utvářet blastocystová dutina, ale embryo ji není schopno dlouho udržet a rozvíjet. Nakonec dochází k tomu, že se blastocysta hroutí, a samotné embryo, ještě před tím, než by dospělo do stádia implantace, odumírá (Strumpf et al., 2005).

1.1.3 Segregace vnitřní masy buněk na epiblast a primitivní endoderm

Krátce poté, co proběhne rozrůznění trofoektodermu a vnitřní masy buněk, dochází k druhé fázi segregace. Při ní se vnitřní masa buněk rozděluje na další dvě buněčné linie, kterými jsou epiblast a primitivní endoderm. Epiblast umožňuje vznik samotného embrya (Lokken & Ralston, 2016) a pluripotentních embryonálních kmenových buněk (Wicklow et al., 2014). Z primitivního endodermu se později stávají extraembryonální tkáně (Chazaud et al., 2006).

Proces rozhodnutí, zda z konkrétní buňky bude buňka epiblastu nebo primitivního endodermu, není zatím zcela objasněn. Rozhodující roli v něm ale s největší pravděpodobností hrají transkripční faktory NANOG a GATA6. V buňce je vždy exprimován pouze jeden z nich. V případě, kdy v buňce dochází k exprimování *Nanog*, se vytváří epiblast. Opačná situace nastává, když je přítomen GATA6. Tehdy se blastomera diferencuje na buňku primitivního endodermu (Chazaud et al., 2006).

Exprese *Nanog* a *Gata6* začíná již ve stádiu 8 buněk. Tehdy jsou v každé z blastomer přítomny oba tyto transkripční faktory (Plusa et al., 2008). Rozdíl se začínají objevovat v blastocystovém stádiu a v E3.75-E4.0 je již v každé z buněk exprimován pouze *Nanog*, nebo pouze *Gata6*. Výzkumy naznačují, že rozhodnutí, který z transkripčních faktorů bude exprimován, je náhodné (Chazaud et al., 2006).

O dalším osudu jednotlivých buněk je v této chvíli již rozhodnuto a začíná relokalizace blastomer na správnou pozici. Přesunem buněk budoucího primitivního endodermu dochází k zaujímání správného vnějšího umístění v rámci vnitřní buněčné masy a budoucí epiblast je díky tomu uzavírán do vnitřní pozice. Primitivní endoderm vytváří jednobuněčnou vrstvu oddělující epiblast od blastocystové dutiny. Blastomery, přijímající osud primitivního endodermu, které nezaujaly vnější pozici jsou následně donuceny ke spuštění apoptózy (Plusa et al., 2008).

Jak už bylo zmíněno, stěžejním transkripčním faktorem pro vznik a vývoj epiblastu je transkripční faktor NANOG. Dalším proteinem, který zde má velký vliv, je SOX2. Ten se zpočátku nachází ve všech buňkách vnitřní masy buněk, ale v E3.75 už je přítomen pouze spolu s NANOG a slouží ke spuštění a udržení exprese jiných faktorů, typických pro epiblast (Wicklow et al., 2014). Mezi ně patří například *Oct4* a *Fgf4* (Avilion et al., 2003).

Vedle transkripčního faktoru GATA6, který ovlivňuje vznik primitivního endodermu, je pro jeho pozdější vývoj důležitý také GATA4. *Gata4* začíná být, na rozdíl od *Gata6* exprimován až v pozdějším stádiu vývoje této buněčné linie a nemá tedy vliv na její vznik

(Plusa et al., 2008). V kontrastu s linií epiblastu zde dochází k potlačení exprese *Sox2* a místo něj je zde exprimován *Sox17* (Wicklow et al., 2014).

1.2 Signální dráha JAK/STAT

Kromě specializovaných buněk, které v embryu plní různé funkce a podílejí se na tvorbě tkání, je v něm zachovávan i malý počet buněk bez specializace, které mohou v případě potřeby přijímat libovolné vlastnosti a podílet se tím na tvorbě mnoha různých buněčných linií. Říká se jim embryonální kmenové buňky a pro embryo je životně důležité, aby v něm byly zachovány. Toho se v první řadě dosahuje klasickým buněčným dělením (Morgani & Brickman, 2015), které ale samo o sobě nestačí. K tomu, aby tyto buňky nepřijaly žádnou diferenciaci slouží různé mechanismy a jedním z nich je signální dráha JAK / STAT (Do et al., 2013).

Signální dráha JAK / STAT se skládá z Janus kináz (JAK), což jsou tyrosin kinázy, sloužící k přenosu signálů po cestě JAK-STAT a transkripčního aktivátoru STAT (Leonard, 2001). V myším preimplantačním vývoji slouží JAK / STAT mimo jiné k správnému vývoji linií vznikajících z vnitřní masy buněk (Do et al., 2013).

Spuštění celé signální dráhy je závislé na JAK kinázách, u kterých musí dojít k aktivaci. To se děje receptorovou cestou, za pomoci leukemického inhibičního faktoru LIF nebo interleukínu 6 (IL-6), který se specificky váže na speciální receptorový komplex, vyskytující se v embryonálních buňkách. Pokud k této vazbě dojde, jsou JAK kinázy aktivovány (Morgani & Brickman, 2015).

Aktivní kinázy JAK následně způsobují fosforylaci STAT, díky které dochází ke tvorbě pSTAT. Takováto úprava umožňuje pokračování signální dráhy tím, že může být pSTAT přemístěn do buněčného jádra a v něm následně ovlivňovat expresi některých genů (Morgani & Brickman, 2015).

1.2.1 STAT3 a jeho vliv na vývoj embrya

Jedním z transkripčních aktivátorů STAT je STAT3. Transkripční faktor STAT3 je v raném embryonálním vývoji obecně považován za nepostradatelného pro správný vývoj vnitřní masy buněk a pluripotenci v preimplantačních embryích i v *in vitro* kultuře embryonálních kmenových buněk (Do et al., 2013).

Fosforylaci STAT3 umožňují kinázy JAK. K jejich aktivaci ale může docházet dvěma, mírně odlišnými způsoby. Obě tyto varianty zahrnují receptorový komplex, skládající se z receptoru LIFR a glykoproteinu 130, označovaného také jako GP130. Na tento receptorový komplex se ale mohou vázat dvě různé molekuly (Do et al., 2013). Jednou z nich je leukemický inhibiční faktor, zkráceně LIF, jehož vazba na receptor způsobuje aktivaci kinázy JAK2. Tato kombinace je typická pro stádium od 4 buněk a přestává se objevovat v době, kdy se vytváří blastocysta (Do et al., 2013). Druhou molekulou, která po vytvoření blastocysty aktivuje JAK kinázy, je IL-6. Ta na rozdíl od LIF neaktivuje kinázu JAK2, ale kinázu JAK1 (Do et al., 2013).

Podle některých výzkumů je transkripční faktor STAT3 v embryu přítomen již ve velmi brzkých stádiích, během nichž se ale vyskytuje pouze v cytoplazmě, a až ve fázi 4 buněk začíná docházet k jeho fosforylaci na pSTAT3 a přesunu do buněčného jádra (Do et al., 2013). Jiné studie ale uvádí, že může být ve své fosforylované formě detekován v jádře některých blastomer již ve stádiu 2 buněk (Morgani & Brickman, 2015). Protože se jedná o transkripční faktor, svoji funkci vykonává po přesunu do jádra.

První experimenty, zkoumající vliv transkripčního faktoru STAT3 na preimplantační vývoj myších embryí chtěly zjistit, jakým způsobem se embrya vyvíjí, pokud v nich není *Stat3* exprimován. Autoři vytvořili embrya s embryonálně deletovaným *Stat3*, ve kterých se ale nachází maternální STAT3, zděděný oocytem od matky. Tato embrya se zpočátku vyvíjejí naprosto běžným způsobem. Dochází u nich k běžnému buněčnému dělení, ke vzniku trofoektodermu a vnitřní masy buněk, dokonce i k implantaci do děložní sliznice. V E6.0 ale začínají vykazovat výrazné abnormality, mezi které patří celková menší velikost embryí oproti kontrolám a skutečnost, že nevytváří mezoderm. Nedlouho poté, okolo E7.5 začínají degradovat a odumírají (Takeda et al., 1997).

Tyto výsledky se liší od pozdějších experimentů s embryi bez maternálního i embryonálního STAT3, které podstupují obvyklý vývoj, srovnatelný s normálními embryi pouze do E3.5. Následně je u nich narušen vývoj vnitřní masy buněk a také je narušena segregace jejich buněčných linií, epiblastu a primitivního endodermu. Vývoj trofoektodermu STAT3 pravděpodobně neovlivňuje. Embrya odumírají před E5.5. (Do et al., 2013).

Mezi nejdůležitější transkripční faktory, jejichž exprese je ovlivňována touto cestou, patří například *Oct4*, *Nanog* (Do et al., 2013) a *Gata6* (Morgani & Brickman, 2015). Mají významnou funkci ve vzniku a vývoji vnitřní masy buněk a segregaci jejich buněčných linií (Strumpf et al., 2005; Chazaud et al., 2006). Na expresi všech těchto transkripčních faktorů má STAT3 vliv až do E4.5, poté je pSTAT3 detekován primárně v buňkách primitivního

endodermu, zatímco v buňkách epiblastu exprimujících *Nanog* vymizí (Morgani & Brickman, 2015). Z toho vyplývá, že přestává ve větší míře ovlivňovat vývoj epiblastu, který udržuje pluripotenci, a místo toho zůstává aktivní hlavně v buněčné linii primitivního endodermu (Morgani & Brickman, 2015).

1.3 SOCS3

Gen *Socs3* patří do genové rodiny supresorů cytokinových signálních proteinů (SOCS) (Forrai et al., 2006). Jedná se o genovou rodinu, zahrnující geny *Socs1* až *Socs7* a *CIS* (Hansen et al., 1999). Mají roli při úpravě aktivity cytokinů a různých růstových faktorů (Cooney, 2002). Všechny proteiny, patřící do této genové rodiny si jsou navzájem hodně podobné, obsahují centrální doménu SH2 a dvě různé terminální oblasti, C a N. Terminální oblast C se někdy také nazývá *Socs box*, a na rozdíl od hodně proměnlivé N terminální oblasti to je velmi konzervovaná část proteinu (Hilton et al., 1998).

Socs3 je exprimován jak v buňkách samotného embrya, tak v buňkách, ze kterých se později vytváří placenta (Takahashi et al., 2003). V pozdějších stádiích vývoje je exprimován v mnoha různých tkáních a buněčných liniích (Cooney, 2002), kde zprostředkovává různé funkce.

Protein SOCS3 krátce po svém vytvoření podstupuje proces fosforylace (Cacalano et al., 2001) v oblasti svého *Socs boxu*. Fosforylací se stává méně stabilním a je snadněji degradovatelný (Haan et al., 2003).

Mezi nejdůležitější vlastnosti SOCS3 patří schopnost ovlivňovat signální dráhu LIF a Il-6. Jeho působením zpravidla dochází k potlačení aktivity této dráhy a v důsledku toho následně k regulaci signalizace JAK/STAT. Proces utlumení signální dráhy JAK/STAT je závislý na již zmíněném GP130 (Forrai et al., 2006), který je součástí receptorového komplexu, určeného pro navázání LIF (Do et al., 2013). SOCS3 se váže na GP130 (Nicholson et al., 2000) a touto cestou poté reguluje signalizační dráhou LIF (Forrai et al., 2006), tím pádem i nepřímo ovlivňuje aktivaci JAK kináz, fosforylaci STAT3 a jeho přesun do buněčného jádra (Morgani & Brickman, 2015).

SOCS3 a STAT3 se vzájemně regulují pomocí negativní zpětné vazby. SOCS3 negativně reguluje dráhu JAK/STAT a tím fosforylaci STAT3, zatímco pSTAT3 indukuje expresi genu *Socs3* (Schmitz et al., 2000). Kromě toho experimenty s *in vitro* kultivovanými embryonálními kmenovými buňkami ukázaly, že exprese *Socs3* je negativně regulovaná

transkripčním faktorem NANOG, což nepřímo vede ke zvyšování množství pSTAT3 v jádře. (Stuart et al., 2014).

Exprese *Socs3* může být také regulována hladinou cAMP v buňce. Pokud dojde v buněčných jádrech ke zvýšení hladiny cAMP, zareaguje buňka zvýšením produkce proteinu EPAC, díky němuž následně dojde k aktivaci RAP1 (Sands et al., 2006) a transkripčních faktorů C/EBP, vážících se k promotoru *Socs3* (Yarwood et al., 2008). Aktivita této signální dráhy vede k nastartování exprese genu *Socs3*, který poté způsobuje potlačení průběhu dráhy JAK/STAT za pomoci IL-6 (Sands et al., 2006).

Stejná signalizační kaskáda může proběhnout i v případě, že cAMP není v buněčném jádře přítomen ve větším množství, ale dochází k zvýšení tvorby EPAC. Ten je schopen spustit všechny potřebné děje pro úspěšné dokončení signalizace a je v tomto procesu naprosto nezbytný (Yarwood et al., 2008).

Z výsledků a pozorování různých studií lze vyvodit, že reakce na zvýšenou hladinu jaderného cAMP není ve všech buněčných liniích stejná, ale může se mírně lišit dle typu buňky, ve které tento jev nastane. Společným znakem přesto obvykle zůstává započetí exprese *Socs3* (Sands et al., 2006).

1.3.1 Role *Socs3* a *Stat3* v *in vitro* kultivovaných embryonálních kmenových buňkách

V embryonálních kmenových buňkách dochází pomocí SOCS3 k potlačení LIF signalizace a dráhy JAK/STAT, což umožňuje udržování samoobnovy a pluripotence těchto buněk (Forrai et al., 2006). Za pomoci experimentu, provedeného na embryonálních kmenových buňkách s deletovaným genem *Socs3* bylo zjištěno, že jeho nepřítomnost v této buněčné linii výrazně snižuje její schopnost samoobnovování a podstatně zvyšuje náchylnost těchto buněk k diferenciaci na primitivní endoderm (Forrai et al., 2006). Naopak, když byl *Socs3* deletován u *in vitro* kultivovaných neurálních prekursorových buněk, tato buněčná linie vykazovala větší schopnost samoobnovy než ta, ve které byl *Socs3* normálně exprimován (Emery et al., 2006). Pokud je naopak *Socs3* v embryonálních kmenových buňkách exprimován nadměrně, má to za následek snížení LIF aktivity, která má zřejmě samoobnovující vlastnosti a celý tento proces vede k větší míře diferenciaci těchto buněk (Li et al., 2005).

Také byl zkoumán vliv samotného *Stat3* na proces udržení pluripotence v embryonálních kmenových buňkách, za použití buďto jeho delece, což zapříčinilo downregulaci *Socs3*, nebo naopak jeho nadměrné exprese, která měla za následek upregulaci

Socs3. Výsledkem bylo zjištění, že STAT3 v této buněčné linii významně napomáhá nejen při procesu udržení pluripotence, ale také při řízení její případné diferenciaci (Wong et al., 2018).

Tyto výsledky společně ukazují, že správná hladina a vzájemná regulace SOCS3 a pSTAT3 je nezbytná pro regulaci pluripotence a samoobnovy kmenových buněk.

1.3.2 Role *Socs3* v embryonálním vývoji

Jak už bylo zmíněno, *Socs3* je exprimován jak v buňkách samotného embrya, tak v buňkách, ze kterých se později vytváří placenta. Embryonální delece *Socs3* je letální mezi E11 a E13. Myší embrya podstupují běžný vývoj do E10.5, srovnatelný s kontrolními embryi bez jakýchkoliv anatomických abnormalit. Letalita je způsobena závažnými defekty placenty, ve kterých se nevyvine dostatečné cévní zásobení embrya (Roberts et al., 2001).

Nejnápadněji se deficit SOCS3 v buňkách vyvíjející se placenty projevuje u tzv. velkých buněk. Pokud proteiny SOCS3 nekontrolují placentální vývoj a fosforylaci STAT3, dochází k příliš vysoké produkci tohoto typu buněk a ostatní buněčné linie, jako např. spongiofoblast, se vyvíjí nedostatečně (Takahashi et al., 2003; Roberts et al., 2001).

Vývoj placenty u embryí postrádajících SOCS3 lze do jisté míry zachránit, pokud se do ní dodají trofoblastové kmenové buňky. V takovém případě dojde k částečnému napravení vzniklých placentálních defektů, zejména pak v narušené labyrintové vrstvě a embryo bude pokračovat v prenatalním vývoji (Takahashi et al., 2006).

Druhou možností, jak předejít vzniku nefunkční placenty, zapříčiněným deletovaným *Socs3*, je inhibice aktivity kinázy JAK1. Za těchto podmínek dojde k na první pohled normálnímu vývoji embrya, ale také ke vzniku plně funkční placenty, bez jakýchkoliv zjevných defektů, a embrya jsou schopna přežít celý prenatalní vývoj (Takahashi et al., 2008).

Fakt, že SOCS3 negativně reguluje LIF signalizaci se projevuje i v embryonálním vývoji. Nepřítomnost SOCS3 v embryu způsobuje sama o sobě letalitu plodu, a v případě, že se k nedostatku tohoto proteinu navíc těhotným samicím podává LIF, celý proces se značně urychluje. LIF způsobí výrazné zvýšení fosforylace STAT3 na pSTAT3, a to vede k předčasnému zahájení diferenciaci trofoblastových velkých buněk a jejich zvýšenému množství. Embrya vystavená takovýmto podmínkám umírají ještě dříve než jenom s delecí genu *Socs3* (Takahashi et al., 2008).

Embrya, u kterých byl deletován *Socs3* a zároveň *Lif*, vykazují zcela normálně vyvinutou, plně funkční placentu, a nedochází u nich ani k prenatalní letalitě. Vzhledem k četné úmrtnosti těchto myších mláďat krátce po narození lze ale předpokládat, že byl jejich

vývoj nějakým způsobem narušen a u jedinců, kteří se dožili několik týdnů až měsíců se vyvinulo silné zánětlivé onemocnění (Robb et al., 2005).

Naopak samotný nedostatek kinázy JAK1 v embryu způsobuje vadnou placentu s přesně opačným problémem (Takahashi et al., 2008), než který byl pozorován u embryí s deficitním SOCS3 (Takahashi et al., 2003). To znamená, že v ní dochází k potlačení buněčné linie velkých buněk trofoblastu a naopak k nadměrnému výskytu ostatních typů buněk. Tento placentální defekt nestačí k odumření embrya v období prenatalního vývoje, dochází k němu ale krátce po narození (Takahashi et al., 2008).

Z těchto pozorování je patrné, že za poruchy vývoje placenty u embryí s deletovaným *Socs3* může následná abnormální signalizace LIF, a ne přímo deficit tohoto proteinu. Pokud je SOCS3 přítomen, upravuje LIF signalizaci a dochází k normálnímu vývoji placenty. V případě, že je *Socs3* deletován, nemůže probíhat regulace LIF signalizace a placenta je nefunkční (Robb et al., 2005).

1.3.3 Potenciální role *Socs3* v preimplantačních embryích

Nebylo zjištěno, že by delece *Socs3* způsobovala u preimplantačních embryí nějaké zásadní defekty, vzhledem k nedostatku provedených experimentů je ale možné, že u nich dochází ke vzniku mírných abnormalit, které nejsou zcela zásadní pro vývoj (Roberts et al., 2001). Například bylo zjištěno, že u embryonálních kmenových buněk má SOCS3 vliv na pluripotenci a diferenciaci (Forrai et al., 2006; Li et al., 2005) a proto je možné, že SOCS3 má podobné funkce i v preimplantačních embryích, kde by mohl například ovlivňovat segregaci epiblastu a primitivního endodermu, nebo pluripotenci vnitřní masy buněk.

Zajímavé je, že již v E3.5 začíná být *Socs3* rozdílně exprimován a jeho hladiny jsou podstatně vyšší ve vnitřní mase buněk než v buňkách trofoektodermu (Wang et al., 2018). Poté, co experimentálně dojde k downregulaci *Tead4* ve vnějších buňkách pomocí RNAi, opětovně v nich stoupne exprese *Socs3*, a to více než desetinásobně (Gahurová L., nepublikovaná data z laboratoře). Pokud je *Socs3* v této fázi downregulován pomocí siRNA, dojde u embryí ke zvýšení celkového počtu buněk oproti kontrolám, bez vychýlení poměru mezi buněčnými liniemi trofoektodermu a vnitřní masy buněk (Thamodaran V., nepublikovaná data z laboratoře).

Cílem práce bylo zkoumat vliv SOCS3 na embrya v E3.5, neboli v období segregace prvních dvou buněčných linií, kterými jsou vnitřní masa buněk a trofoektoderm. V budoucnu

by bylo zajímavé zaměřit se i na jeho vliv v období druhého rozhodnutí o buněčném osudu, kdy dochází k segregaci na epiblast a primitivní endoderm.

2. Cíle práce

- Vytvoření transkripčního profilu Socs3 a s ním asociovaných genů s použitím RNA-seq dat
- Imunofluorescenční barvení SOCS3 a pSTAT3 během preimplantačního vývoje
- Downregulace Socs3 přes inhibici pSTAT3
- Delece Socs3 pomocí mikroinjekcí Cre mRNA a analýza fenotypu
- Příprava genově specifické sgRNA k delecí Socs3 genu
- Příprava Socs3 mRNA pro overexpresi genu Socs3

3. Materiály a metody

3.1 Genotypizace myší linie Bl6 Socs3 fl/fl

Samci Bl6 Socs3 wild-type/flox (wt/fl) byli kříženi se samicemi Bl6 Socs3 wt/fl a jejich mláďata byla genotypizována. Mláďatům ve věku 20-25 dní byl odstřižen konec ocasu o délce 3-5 mm a byl umístěn do prázdné 1,5 ml zkumavky. Následovala extrakce DNA. K odebraným vzorkům ocasů bylo přidáno 700 μ l STE pufru (ve složení 1 M NaCl, 200 mM Tris-HCl, 100 mM EDTA), 15 μ l proteinázy K (Sigma Aldrich-Merck, roztok 10 mg/ml) a byly ponechány 2 hodiny v blokové lázni s třepačkou při 900 rpm a teplotě 55 °C. Poté byla proteináza K inaktivována po dobu 5 minut za teploty 70 °C. Vzorky byly následně 5 minut chlazeny na ledu a 10 minut centrifugovány při 16 000 rcf a teplotě 4 °C. Supernatant byl odebrán do nové 1,5 ml zkumavky, promíchán se 700 μ l 100% isopropanolu a vzniklá směs byla 5 minut centrifugována při 16 000 rcf v teplotě 4 °C. Vzniklý pelet, obsahující vyizolovanou genomovou DNA, byl promyt 500 μ l 70 % ethanolu, vysušen, rozpuštěn v závislosti na jeho velikosti v 50 – 250 μ l HPLC vody, na dobu 5 minut vystaven teplotě 65 °C a důkladně zvortexován.

Následně byla připravena reakční směs na PCR s využitím Apigene Taq Mix (Enzo Life Sciences), podle poměrů uvedených v tabulce 1. 4 μ l reakční směsi byly smíchány s 1 μ l vzorku DNA, získaného výše uvedeným postupem, a byl proveden program PCR, popsáný v tabulce 2. Produkty PCR byly vyhodnoceny gelovou elektroforézou za použití 1% agarózového gelu.

Tab. 1: Složení reakční směsi PCR reakce pro myší genotypizaci.

Složka	Množství	Sekvence
2x Ampigene Taq mix	25 μ l	
Primer F	2 μ l of 10 μ M	CGGGCAGGGGAAGAGACTGT
Primer R	2 μ l of 10 μ M	GGAGCCAGCGTGGATCTGC
HPLC voda	21 μ l	

Tab. 2: Program PCR reakce, popsané v tabulce 1.

PCR program	Teplota	Čas	Počet cyklů
Denaturace	95 °C	1 minuta	1
Denaturace	95 °C	15 sekund	38
Nasedání	60 °C	15 sekund	38
Elongace	72 °C	1 minuta	38
Závěrečná elongace	72 °C	8 minut	1
Chlazení	4 °C	∞	1

3.2 Kultivace embryí a jejich imunofluorescenční barvení

3.2.1 Získávání embryí a jejich kultivace v klasických podmínkách

Myší samice F1 wt nebo Socs3 fl/fl, ve stáří 9 týdnů byly nejdříve superovulovány injekčním podáním 7.5 IU hormonu PMSG (pregnant mare serum gonadotrophin extract; Sigma Aldrich – Merck). Po uplynutí 47 hodin byly superovulovány injekčním podáním 7.5 IU hormonu HCG (human chorionic gonadotrophic hormone; SigmaAldrich – Merck) a umístěny k myšímu samci F1 wt nebo mTmG (pro samice F1 wt) nebo Socs3 fl/fl (pro samice Socs3 fl/fl). Přibližně 42 hodin po podání hormonu HCG byly samice zabity cervikální dislokací a byly z nich vyjmuty vejcovody, které byly okamžitě vloženy do média M2, jehož složení je popsáno v tabulce 3. Pod optickým zvětšením byla z vejcovodů vyjmuta 2-buněčná embrya, promyta v médiu M2 a následně v médiu KSOM (Embryo-Max; Millipore). V něm byla uložena do inkubátoru, do atmosféry s 5% obsahem CO₂ a teplotou 37°C na dobu potřebnou pro daný experiment.

Tab. 3: Složení média M2

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

3.2.2 Kultivace embryí s inhibitorem

Ke zkoumání vlivu inhibitorů na vývoj embryí byly použity inhibitory STAT3, Cryptotanshinone a C188-9 (Selleckchem). Inhibitory byly ředěny v DMSO (dimethylsulfoxid; Sigma) a tato směs byla následně přidána do média KSOM, ve kterém byla embrya kultivována. Získaná embrya byla vždy rozdělena na dvě skupiny. První skupina embryí se vyvíjela v KSOM, do kterého byl přidán inhibitor, naředěný v DMSO. Druhá skupina byla kontrolní a vyvíjela se v KSOM, do kterého byl přidán čistý DMSO. Kultivace probíhala jako u samotného KSOM, v inkubátoru s atmosférou s 5% obsahem CO₂ a teplotou 37 °C po dobu trvání experimentu. Použité inhibitory, jejich koncentrace a časový úsek, ve kterém byla embrya v inhibitoru kultivována jsou zapsány v tabulce 4.

Tab. 4: Přehled použitých inhibitorů, jejich ředění v DMSO a období, ve kterém v nich byla kultivována embrya.

Inhibitor	Koncentrace inhibitoru v DMSO	Poměr KSOM:DMSO	Výsledná koncentrace inhibitoru	Časový úsek
Cryptotanshinone	10 mM	1000:1	10 μ M	E2.5 – E3.5
Cryptotanshinone	10 mM	1000:1	10 μ M	E1.5 – E3.5
Cryptotanshinone	10 mM	500:1	20 μ M	E1.5 – E3.5
Cryptotanshinone	10 mM	500:1	20 μ M	E2.5 – E3.5
C188-9	5 mM	500:1	10 μ M	E2.5 – E3.5
C188-9	5 mM	500:1	10 μ M	E1.5 – E3.5
C188-9	5 mM	250:1	20 μ M	E1.5 – E3.5

3.2.3 Fixace a barvení

Po dvoudenní kultivaci v inkubátoru byla embrya za pokojové teploty pomocí promývání v kapkách AT (kyselina Tyrode's; Sigma) zbavena *zony pellucidy* a následně byla promyta v kapkách M2. Fixace se prováděla bezprostředně poté, v 96-jamkových destičkách, za použití 4% PFA (paraformaldehyd; Santa Cruz Biotechnology) přehřátého na 37 °C, do kterého byla embrya na 20 minut umístěna. Následně byla promyta ve třech jamkách PBST (fosfátem pufovaný fyziologický roztok s 0.15% Tween 20) a 20 minut v něm ponechána. Z něj byla přendána na 20 minut do 0.5% tritonu-X100 (Sigma-Aldrich) v PBS (fosfátem pufovaný fyziologický roztok), opětovně promyta ve třech jamkách PBST a na 20 minut v něm odložena. Poté byla embrya přenesena do 3% BSA (sérum hovězího albuminu; Sigma-Aldrich) v PBST a umístěna na 30 minut do 4 °C. Následovalo barvení v primární protilátce, ve které byla embrya za teploty 4 °C ponechána přes noc.

Následující den byla embrya vyjmuta z primární protilátky, promyta přes tři kapky PBST a ponechána v něm po dobu 20 minut. Následně byla uložena na 30 minut do 3% BSA při teplotě 4 °C a poté 1 hodinu ve 4 °C barvena sekundární protilátkou. Po vyjmutí ze sekundární protilátky byla embrya promyta přes 3 kapky PBST a 20 minut v něm zanechána. Poté byla přenesena do Vectashieldu (Vector) a inkubována při pokojové teplotě 15 minut, následně při teplotě -21 °C až do skenování konfokálním mikroskopem. Barvení primárními a sekundárními protilátkami i jejich ředění je popsáno v tabulce 5. U protilátky

proti Soc3 od firmy Abcam a protilátky proti pSTAT od firmy Cell Signalling byly použity dvě různé šarže.

Tab. 5: Přehled použitých primárních i sekundárních protilátek a jejich ředění v BSA.

Primární protilátka	Poměr BSA:primární protilátce	Sekundární protilátka	Poměr BSA:sekundární protilátce
Králičí anti-SOCS3 (Abcam, ab16030, stará šarže)	100:1	Oslí protilátka proti králičímu IgG Alexa Fluor 555 (Invitrogen, 21572)	500:1
Králičí anti-SOCS3 (ProteinTech, 14025-1-AP)	75:1	Oslí protilátka proti králičímu IgG Alexa Fluor 555 (Invitrogen, 21572)	500:1
Myší anti-pSTAT3 (Cell Signalling, 4113)	100:1	Oslí protilátka proti myšimu IgG Alexa Fluor 647 (Abcam, ab150107)	500:1
Králičí anti-pSTAT3 (Cell Signalling, 9131, první šarže)	100:1	Oslí protilátka proti králičímu IgG Alexa Fluor 555 (Invitrogen, 21572)	500:1
Králičí anti-pSTAT3 (Cell Signalling, 9131, druhá šarže)	100:1	Oslí protilátka proti králičímu IgG Alexa Fluor 555 (Invitrogen, 21572)	500:1
Králičí anti-SOCS3 (Abcam, ab16030, nová šarže)	100:1	Oslí protilátka proti králičímu IgG Alexa Fluor 647 (Abcam, ab150075)	500:1

Králičí anti-SOCS3 (Abcam, ab16030, nová šarže)	200:1	Oslí protilátka proti králičímu IgG Alexa Fluor 647 (Abcam, ab150075)	500:1
Králičí anti-pSTAT3 (Abcam, ab76315)	100:1	Oslí protilátka proti králičímu IgG Alexa Fluor 647 (Abcam, ab150075)	500:1
Králičí anti-pSTAT3 (Abcam, ab76315)	200:1	Oslí protilátka proti králičímu IgG Alexa Fluor 647 (Abcam, ab150075)	500:1

Embrya, kultivovaná v inhibitech byla barvena králičí primární protilátkou proti SOCS3 (Abcam, ab16030, stará šarže), ředěnou v BSA v poměru 1:100. Jako sekundární protilátka byla použita oslí protilátka proti králičímu IgG Alexa Fluor 555 (Invitrogen, 21572), ředěná v BSA 1:500, nebo oslí protilátka proti králičímu IgG Alexa Fluor 647 (Abcam, ab150075), ředěná v BSA 1:500.

Pro barvení embryí králičími primárními protilátkami proti SOCS3 (Abcam, ab16030, nová šarže) a proti pSTAT3 (Abcam, ab76315) byl vyzkoušen také způsob fixace, který se mírně lišil od výše uvedeného. První změna proběhla na začátku fixace, kdy byla embrya fixována po dobu 10 minut v 8% PFA, jehož složení je zapsáno v tabulce 6. Další změnou byla doba permeabilizace embryí v tritonu, která byla zkrácena z 20 na 5 minut. Poslední změnou bylo neumístění embryí do BSA před barvením sekundární protilátkou.

Tab. 6: Složení 8% PFA, použitého k fixaci embryí barvených králičími primárními protilátkami proti SOCS3 (Abcam, ab16030, nová šarže) a proti pSTAT3 (Abcam, ab76315).

Složka	Množství
16% PFA (Sigma Aldrich – Merck)	500 µl
25 mM Inhibitor fosfatázy fluorid sodný (ThermoFisher Scientific)	50 µl
2 mM orthovanadát sodný (Sigma Aldrich – Merck)	20 µl
HPLC voda	430 µl

Mikroinjikovaná embrya byla barvena kozí primární protilátkou proti HA-tagu (Abcam, ab9134), naředěnou v BSA v poměru 1:200. Jako sekundární protilátka byla využita oslí protilátka proti kozímu IgG Alexa Fluor 555 (Invitrogen, A21432), ředěná v BSA v poměru 1:500.

3.2.4 Konfokální mikroskopie

Zafixovaná a nabarvená embrya byla přesunuta z Vectashieldu na krycí sklíčko vlepené do kultivační misky s otvorem, do kapky PBST. Na něm byla umístěna do konfokálního mikroskopu Olympus FLUOVIEW FV10i a pomocí laserů, vhodných pro danou sekundární protilátku oskenována.

3.3 Příprava mRNA konstruktů a jejich mikroinjikování

3.3.1 Izolace a štěpení plasmidu

Kompetentní buňky DH5 α s plasmidy pRN3P:Socs3-HAN a pRN3P:Cre-HAN rostly tekutém LB médiu (Invitrogen) s přidaným ampicilinem v poměru 1000:1 při teplotě 37 °C a třepání 180 rpm po dobu 18 hodin a následně z nich byly za použití kitu pro izolaci plasmidů (QIAprep Spin Miniprep Kit; QIAGEN), vyizolovány plasmidy podle instrukcí výrobce. Koncentrace získaných plasmidů byla změřena na nanodropu (ACTGene, UVS-99).

Následně byly plasmidy štěpeny enzymem SfiI (NEB). Reakce probíhaly po dobu 6 hodin za teploty 50 °C a jejich složení je popsáno v tabulce 7. Pro kontrolu, zda byly plasmidy správně naštěpeny, byla použita gelová elektroforéza za využití 1% agarózového gelu.

Tab. 7: Složení reakcí pro štěpení plasmidů pRN3P:SOCS3-HAN a pRN3P:Cre-HAN enzymem Sfi I.

Složka	Množství
10x CutSmart buffer	5 μ l
Plasmid	2 μ g
HPLC voda	Doplněno do 50 μ l
Enzym SfiI	2 μ l

3.3.2 Fenol-chloroformová extrakce

Naštěpené plasmidy z bakteriálních kolonií pRN3P:SOCS3-HAN a pRN3P:Cre-HAN byly přečištěny fenol-chloroformem (Sigma Aldrich – Merck, pH 8,0). Objem štěpných reakcí (50 μ l) byl doplněn HPLC vodou do 300 μ l. K tomuto objemu bylo přidáno 300 μ l fenol chloroformu, směs byla protřepána a následně centrifugována 5 minut při 4 °C a 16 000 rcf. Centrifugací došlo k oddělení vrstev. Díky tomu bylo možné odebrat vodnou fázi, do které byl poté přimíchán chloroform v poměru 1:1. Směs byla protřepána a centrifugována 5 minut při 4 °C a 16 000 rcf, čímž opět došlo k oddělení vrstev. Znovu byla odebrána vodná fáze, ke které byl přidán 3M NaAc a 100% ethanol. Poměr vodné fáze ku NaAc byl 10:1, ethanol byl přidán v poměru 3 díly ethanolu na 1 díl vodné fáze. Vzniklá směs byla vystavena teplotě -21 °C po dobu 18 hodin.

Po uplynutí této doby byly směsi centrifugovány 30 minut při 4 °C a 16 000 rcf. Vzniklé pelety byly promyty 500 μ l 70% ethanolu a centrifugovány 10 minut při 4 °C a 16 000 rcf. Promytí a centrifugace byly ještě jednou opakovány a následně byly promyté pelety rozpuštěny v 8 μ l HPLC vody. Koncentrace produktů byla změřena na nanodropu.

3.3.3 In vitro transkripce

Naštěpené a fenol-chloroformem pročištěné plasmidy pRN3P:SOCS3-HAN a pRN3P:Cre-HAN byly přepsány do RNA, reakcí popsanou v tabulce 8, za použití mMMessage mMachine T3 Transcription Kit (Invitrogen). RNA, vytvořená z pRN3P:SOCS3-HAN byla dále upravena dosyntetizováním polyA konce za teploty 37 °C. Reakce probíhala 1 hodinu, pro její sestavení byl použit Poly(A) Tailing Kit (Invitrogen), a její složení je popsáno v tabulce 9.

Tab. 8: Složení reakce in vitro transkripce s použitím mMessage mMachin T3 Transcription Kit.

Složka	Množství
Naštěpený plasmid	2 µg (6 µl)
10x T3 buffer	2 µl
T3 RNA polymeráza (enzyme mix)	2 µl
2x NTP-cap mix	10 µl
37 °C, 4 hodiny	
Dnase I	1 µl
37 °C, 20 minut	

Tab. 9: Složení reakce využitě k polyA-tailingu RNA z pRN3P mSOCS3-HAN (HA tag) za použití Poly(A) Tailing Kit.

Složka	Množství
RNA	20 µl
Nuclease free voda	36 µl
5x E-PAP buffer	20 µl
25mM MnCl ₂	10 µl
10mM ATP	10 µl
Enzym E-PAP	4 µl

Konstrukty mRNA z pRN3P:SOCS3-HAN byly přečištěny fenol-chloroformem (Sigma Aldrich – Merck; pH 4,5), podle postupu popsaného v 3.3.2 a jejich koncentrace byla změřena na nanodropu. Následně byla pomocí gelové elektroforézy zkontrolována jejich kvalita. RNA, použitá pro tuto elektroforézu byla nejdříve denaturována glyoxalovou reakcí. Při ní reagovalo v blokové lázni za teploty 55 °C po dobu 1 hodiny 10 µl glyoxalového mixu (složení popsáno v tabulce 10) s 1 µl přečištěné RNA. Ladder reagoval v množství 5 µl s 10 µl glyoxalového mixu. Pro samotnou elektroforézu byl následně použit 1% agarózový gel, jehož základem byl 1x BPTE.

RNA z pRN3P:Cre-HAN byla přečištěna kitem RNA Clean and Concentrator-5 (Zymo) podle instrukcí výrobce, její koncentrace byla změřena na nanodropu a kvalita zkontrolována gelovou elektroforézou za použití 1% agarózového gelu.

Tab. 10: Složení glyoxalového mixu

Složka	Množství
DMSO	6 ml
Deionizovaný glyoxal (Sigma Aldrich – Merck)	2 ml
10x BPTE elektroforézový pufr	1.2 ml
80% glycerol ve vodě	0.6 ml
EtBr (10 mg/ml ve vodě)	0.2 ml

Tab. 11: Složení 10x BPTE elektroforézového pufru

Složka	Množství
PIPES	100 mM
Bis-Tris	300 mM
EDTA pH 8.0	10 mM

3.3.4 Mikroinjikování

Embrya, vypitvaná z vejcovodů byla rozdělena do dvou skupin, promyta v médiu M2, a ponechána v něm. Jedna skupina embryí byla později mikroinjikována, druhá sloužila jako kontrola. Pro mikroinjikaci byly ze skleněných kapilár připraveny nad kahanem holdery a přístrojem Micropipette Maker model PC-10 (Narishige) jehly. Mikroinjikátor byl složen z mikroskopu (OLYMPUS IX71), mikroinjekčního stroje FemtoJet (Eppendorf), generátoru záporné kapacity (RS Components Ltd) a regulátoru napětí (WPI).

Nastavení mikroinjikačního aparátu i samotná mikroinjikace byly z důvodu náročnosti této techniky provedeny mou školitelkou Lenkou Gahurovou. K mikroinjikaci byla využita již připravená Cre-HA mRNA, která byla pro tento účel naředěna nuclease free vodou v poměru 1:20 (koncentrace 100 ng/μl) a jako injekční marker sloužila Gap43-GFP mRNA v koncentraci 60 ng/μl připravena v minulosti v laboratoři. Na mikroskop bylo umístěno sklíčko s kapkou média M2, do které byla umisťována embrya. Ta byla pevně uchycena holderem a následně byla do jedné z blastomer vstříknuta připravená RNA.

Po dokončení mikroinjikací byla embrya promyta, uložena v médiu KSOM, a umístěna do inkubátoru. Jejich další vývoj a následná fixace a barvení, byly popsány v 3.2.3.

3.4 Příprava CRISPR-Cas9 gRNA

3.4.1 Izolace a štěpení plasmidu

Způsobem, popsaným v 3.3.1 byl z kompetentních buněk vyizolován plasmid pX330-U6-Chimeric_BB-CBh-hSpCas9 (Addgene, 42230), jehož koncentrace byla následně změřena na nanodropu. Poté byla sestavena reakce, sloužící k jeho naštěpení enzymem BbsI HF (NEB), popsaná v tabulce 12, která probíhala v blokované lázni za teploty 37 °C po dobu 60 minut. Naštěpený plasmid byl zkontrolován pomocí gelové elektroforézy za použití 1% agarózového gelu a pročištěn pomocí QIAquick PCR Purification Kit (QIAGEN) podle instrukcí výrobce. Koncentrace takto pročištěného plasmidu byla opět změřena na nanodropu.

Tab. 12: Složení reakce pro štěpení plasmidu pX330-U6-Chimeric_BB-CBh-hSpCas9 restriktivním enzymem.

Složka	Množství
Cut Smart buffer	5 µl
Plasmid	1.5 µg
HPLC voda	Doplněno do 50 µl
Enzym BbsI HF	2 µl

3.4.2 Příprava sgRNA insertu pro ligační reakci

Insert pro sgRNA, použitý do ligační reakce byl připraven z oligo, dodaných firmou Sigma-Aldrich, jejichž sekvence jsou zapsány v tabulce 13. K jeho přípravě byla sestavena reakce, popsaná v tabulce 14. Sestavená reakce byla vystavena teplotě 95 °C po dobu 5 minut v blokované lázni a následnému samovolnému vychladnutí do teploty 28 °C. Koncentrace vytvořeného insertu byla změřena na nanodropu.

Tab. 13: Sekvence oligo, dodaných firmou Sigma-Aldrich.

Název oliga	Sekvence
Socs3_sgRNA_s	CACCCACAGCAAGTTTCCCGCCGC
Socs3_sgRNA_a	AAACGCGGCGGGAAACTTGCTGTG

Tab. 14: Reakce sestavená za účelem vytvoření insertu pro ligační reakci.

Složka	Množství
Socs3_sgRNA_s	1.2 μ l
Socs3_sgRNA_a	1.2 μ l
HPLC voda	47.6 μ l

3.4.3 Ligace a bakteriální transformace

Byla sestavena ligační reakce s použitím T4 DNA Ligázy (Roche Diagnostics), při níž došlo k vlození insertu do naštěpeného plasmidu (vektoru), a jejíž složení je popsáno v tabulce 15. Rovněž byla sestavena kontrolní reakce bez insertu, popsaná v tabulce 16. Obě reakce byly pozvolna zchlazeny za použití vodní lázně až na teplotu 4 °C, při níž následně probíhaly po dobu 6 hodin.

Tab. 15: Složení ligační reakce.

Složka	Množství
10x buffer	2 μ l
Vector	75 η g
Insert	80 η g
HPLC voda	Doplněno do 20 μ l
T4 DNA Ligáza	1 μ l

Tab. 16: Složení kontrolní ligační reakce.

Složka	Množství
10x buffer	2 μ l
Vector	75 η g
HPLC voda	Doplněno do 20 μ l
T4 DNA Ligáza	1 μ l

Po proběhnutí ligační reakce byla provedena bakteriální transformace, při které byly plasmidy s vloženým insertem vpraveny do již připravených kompetentních buněk DH5 α . 8 μ l produktu ligační reakce bylo přidáno ke 40 μ l kompetentních buněk DH5 α , to samé bylo provedeno i s kontrolní ligační reakcí. Směs byla ponechána 30 minut na ledě, poté byla vystavena po dobu 90 sekund teplotě 42 °C a následně byla znovu umístěna na led, tentokrát

na 10 minut. Po uplynutí této doby bylo ke směsi přidáno 350 µl LB média (Invitrogen), vzniklý roztok byl umístěn na heat block do 37 °C a 1 400 rpm a byl takto ponechán 30 minut. Kompetentní buňky byly následně rozetřeny na Petriho misky s tuhým agarovým LB médiem (Invitrogen) s ampicilínem, umístěny do inkubátoru do teploty 37 °C a ponechány růst po dobu 19 hodin. Vyrostlé bakteriální kolonie byly rozetřeny na novou Petriho misku, ponechány v inkubátoru vyrůst a poté skladovány při teplotě 4 °C.

Zda došlo v plasmidu k vložení požadovaného úseku DNA, neseného insertem, bylo předběžně zjišťováno pomocí PCR a gelové elektroforézy. DNA jednotlivých bakteriálních kolonií byla naamplifikována pomocí PCR reakce s DreamTaq PCR Master Mix (ThermoFisher Scientific), popsané v tabulkách 17 a 18, a následně puštěna na 1.5% agarózový gel. Z pozitivních bakteriálních kolonií byly pomocí QIAprep Spin Miniprep Kit (QIAGEN) vyizolovány plasmidy podle instrukcí výrobce. Ty byly následně odeslány na sekvenování, díky kterému bylo zjištěno, zda plasmid skutečně obsahuje vložený insert.

Tab. 17: Složení PCR reakce určené ke zjištění, jestli byl insert vložen do plasmidu po bakteriální transformaci.

Složka	Množství	Sekvence
2X DreamTaq PCR Master Mix	22.5 µl	
F primer	2.25 µl	GCATATACGATAACAAGGCTGTTAGA
R primer	2.25 µl	CCGTAAGTTATGTAACGGGTACCTC
HPLC voda	9 µl	

Tab. 18: Program PCR reakce, popsané v tabulce 17.

PCR program	Teplota	Čas	Počet cyklů
Denaturace	96 °C	2 minuty	1
Denaturace	96 °C	30 sekund	30
Nasedání	55 °C	40 sekund	30
Elongace	72 °C	1 minuta	30
Závěrečná elongace	72 °C	10 minut	1
Chlazení	4 °C	∞	1

3.4.4 In vitro transkripce

DNA z plasmidů, do kterých byl úspěšně vložen insert byla amplifikována PCR reakcí s využitím Phusion High Fidelity PCR Mastermix with HF buffer (NEB). Složení a program PCR reakce jsou popsány v tabulkách 19 a 20. Amplifikované úseky byly následně přečištěny za využití QIAquick PCR Purification Kit (QIAGEN) a jejich koncentrace byla změřena na nanodropu.

Tab. 19: Složení PCR reakce určené pro amplifikaci úseku DNA, nacházejícího se v plasmidu.

Složka	Množství	Sekvence
2x Mastermix	25 μ l	
DMSO	2 μ l	
Primer F	2 μ l	AAAAGCACCGACTCGGTGC
Primer R	2 μ l	TAATACGACTCACTATAGGGC ACAGCAAGTTTCCCGCCGC
HPLC voda	18 μ l	

Tab. 20: Program PCR reakce, popsané v tabulce 19.

PCR program	Teplota	Čas	Počet cyklů
Denaturace	98 °C	1 minuta	1
Denaturace	98 °C	30 sekund	30
Nasedání	65 °C	30 sekund	30
Elongace	72 °C	1 minuta	30
Závěrečná elongace	72 °C	8 minut	1
Chlazení	4 °C	∞	1

Amplifikované úseky ve formě DNA následně posloužily jako templát pro in vitro transkripci (IVT), při které došlo k přepsání do kódu RNA. K sestavení této reakce, která je popsána v tabulce 21, byl využit MEGAscript T7 Transcription Kit (Invitrogen).

Tab. 21: Složení reakce, použité pro in vitro transkripci.

Složka	Množství
Templát DNA	5 μ l
ATP	2 μ l
CTP	2 μ l
GTP	2 μ l
UTP	2 μ l
10x T7 buffer	2 μ l
T7 enzyme mix	2 μ l
Nuclease free voda	3 μ l
37 °C, 5 hodin	
DNase	1 μ l
37 °C, 30 minut	

RNA, vytvořená výše popsanou reakcí, byla přečištěna pomocí komerčního kitu RNA Clean and Concentrator-5 (Zymo) podle instrukcí výrobce. Následně byla její kvalita zkontrolována gelovou elektroforézou za použití 1% agarózového gelu, její koncentrace byla změřena na nanodropu a nakonec byla uložena v -80 °C.

3.5 Analýza RNA-seq datasetů

RNA-seq datasety z preimplantačních a postimplantačních embryí s kódy GSE98150 (Wang et al., 2018), GSE71434 (Zhang et al., 2016) a GSE75957 (Andergassen et al., 2017) byly v minulosti v laboratoři staženy z European Nucleotide Archive (<https://www.ebi.ac.uk>), adaptéry a báze nízké kvality byly odstraněny programem TrimGalore! v0.4.1 (www.bioinformatics.babraham.ac.uk/projects/trim_galore/) a namapovány na myší genom GRCm38 programem Hisat2 v2.0.5 (Kim et al., 2015; Kim et al., 2019; Pertea et al., 2016). V programu SeqMonk v1.44.0 byla pro namapované datasety s použitím RNA-seq quantitation pipeline vypočítána exprese genů v jednotkách FPKM (fragment per kilobase per million) – počet paired-end readů na jeden kb genu na jeden milion readů v datasetu. V programu Microsoft Excel 2016 byl pak vybrán gen *Socs3* a 29 genů, jejichž proteinové produkty interagují se SOCS3 na základě databáze STRING (<https://string-db.org/>). Pro ně byly vypočteny průměry pro replikáty jednoho vzorku. Pro gen *Socs3* byly také dopočítány směrodatné odchylky. Boxploty byly vytvořeny v programu Microsoft Excel 2016.

Pro vytvoření heatmapy byla expresní data log transformována se základem 2 (\log_2), a protože některé hodnoty byly 0, a z těch nelze udělat \log_2 , tak ke všem hodnotám bylo připočítáno 0,001. Z těchto \log_2 hodnot byly vypočteny průměry pro každý gen a tyto průměrné hodnoty byly odečteny od každé původní \log_2 hodnoty pro daný gen. Tak byly získány hodnoty relativní exprese. Z dat relativní exprese byly vytvořeny heatmapy (bez použití genů s expresí nižší než 0,1 FPKM ve všech datasetech) v programu R Studio v3.6.2 s použitím následovného ukázkového kódu:

```
install.packages("gplots")
```

```
library (gplots)
```

```
data <- read.delim ("for_heatmap.txt_Zhang")
```

```
rnames <- data[,1]
```

```
mat_data <- data.matrix(data[,2:ncol(data)])
```

```
rownames(mat_data) <- rnames
```

```
hr <- hclust(as.dist(1-cor(t(mat_data), method="pearson")), method="complete")
```

```
colorRampPalette(c("blue","yellow")) -> colour.gradient
```

```
heatmap.2(mat_data, col=colour.gradient, breaks=seq(from=-8,to=8, by=0.001),  
Rowv=as.dendrogram(hr), Colv=FALSE, scale="none", dendrogram="none", key=T,  
keysize=1, density.info="none", hclust=function(x) hclust(x,method="complete"),  
distfun=function(x) as.dist((1-cor(t(x)))/2), trace="none",cexCol=1.2)
```

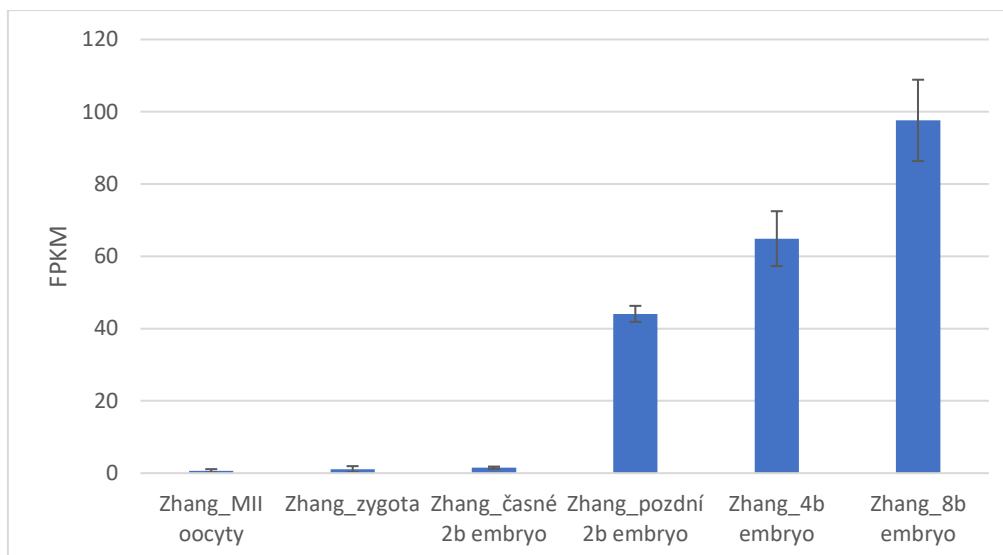
4. Výsledky

4.1 Transkripční profil *Socs3* a s ním asociovaných genů s použitím RNA-seq dat

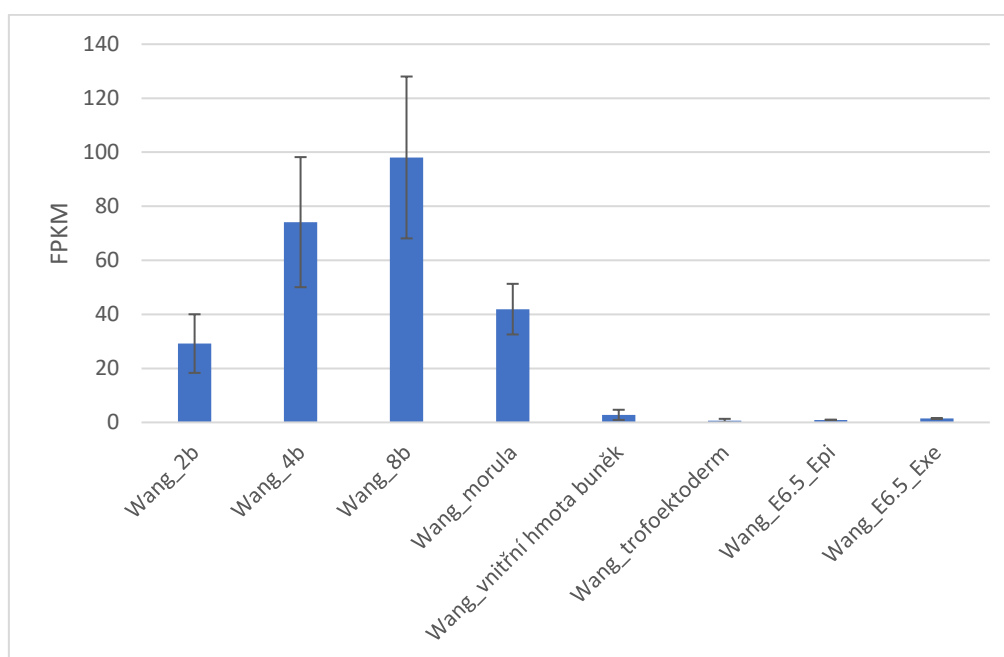
Publikovaná data ukázala, že delece genu *Socs3* je letální kvůli poruchám ve vývoji placenty a samotné embryo nejeví žádné abnormality (Roberts et al., 2001). Oproti tomu RNA-seq data z E3.5 ukázala, že *Socs3* je exprimován ve vnitřní masě buněk, zatímco jeho exprese v linii trofoektodermu je téměř nulová (Wang et al., 2018). Zajímalo nás proto, jaký je transkripční profil *Socs3* v embryonálním vývoji v jednotlivých buněčných liniích, zejména jestli a kdy začíná být exprimován v trofoektodermální linii, ze které vzniká placenta. Dále jsme chtěli zjistit, jaká je exprese genů kódujících 29 proteinů interagujících se SOCS3 podle databáze STRING.

Genovou expresi jsme analyzovali v publikovaných RNA-seq datech z jednotlivých stádií preimplantačního (Zhang et al., 2016; Wang et al., 2018) a postimplantačního (Wang et al., 2018; Andergassen et al., 2017) embryonálního vývoje.

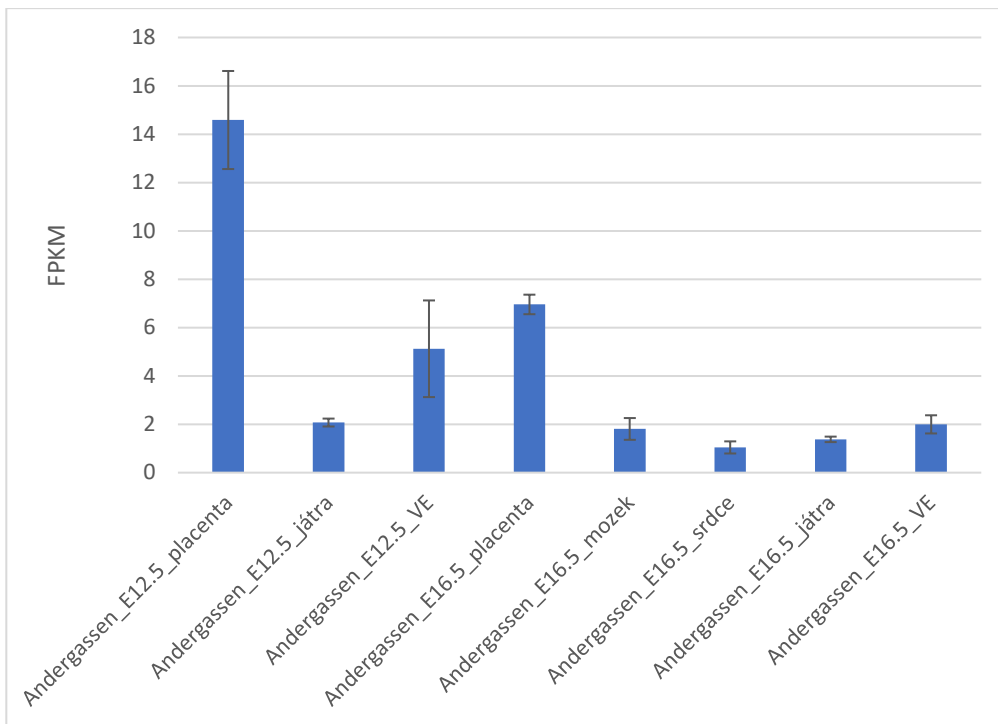
Na základě dat, vygenerovaných z RNA-seq datasetů byly sestaveny grafy (obrázky 3, 4 a 5), zobrazující míru exprese genu *Socs3* v jednotlivých fázích embryonálního vývoje. Z nich lze vyčíst, že gen *Socs3* je ve velmi malém množství přítomen již v oocytech, ve větším množství pak začíná být exprimován v pozdním dvoubuněčném stádiu, kdy nastává tzv. majoritní aktivace zygotického genomu a geny embrya tudíž začínají být exprimovány (Schultz, 1993; Schultz, 2002). Míra jeho exprese vzrůstá až do stádia osmi buněk, ve kterém je nejvyšší (Zhang et al., 2016). S vytvořením moruly začíná výrazně klesat, a to pokračuje i po vzniku prvních dvou buněčných linií (trofoektodermu a vnitřní masy buněk), i když exprese ve vnitřní hmotě buněk je výrazně vyšší než v trofoektodermu (2.79 vs 0.68 FPKM). Nízká exprese přetrvává i po implantaci embrya (E6.5), i když v linii vedoucí ke vzniku placenty (extraembryonální ektoderm) začíná být *Socs3* znovu exprimován (Wang et al., 2018). Nárůst jeho exprese je opětovně zaznamenán později v postimplantačním vývoji v E12.5 v placentálních buňkách, je také exprimován v další extraembryonální tkáni viscerální endoderm, a do menší míry i v somatických buňkách samotného embrya (Andergassen et al., 2017).



Obr. 3: Graf, zobrazující míru exprese genu *Socs3* od oocyty do stádia 8-buněčného embrya (Zhang et al., 2016). 2b znamená dvoubuněčné, 4b čtyřbuněčné a 8b osmibuněčné. Graf ukazuje průměrnou hodnotu exprese při jednotlivých vývojových stádiích a směrodatné odchylky.



Obr. 4: Graf, znázorňující míru exprese genu *Socs3* od stádia 2 buněk (2b), až do E6.5. (Wang et al., 2018). Zkratka Epi znamená epiblast, Exe znamená extraembryonální ektoderm. Graf ukazuje průměrnou hodnotu exprese při jednotlivých vývojových stádiích a směrodatné odchylky.



Obr. 5: Graf, zobrazující míru exprese genu *Socs3* od E12.5 do E16.5 v různých tkáních myšího embrya (Andergassen et al., 2017). VE znamená viscerální endoderm. Graf ukazuje průměrnou hodnotu exprese při jednotlivých vývojových stádiích a směrodatné odchylky.

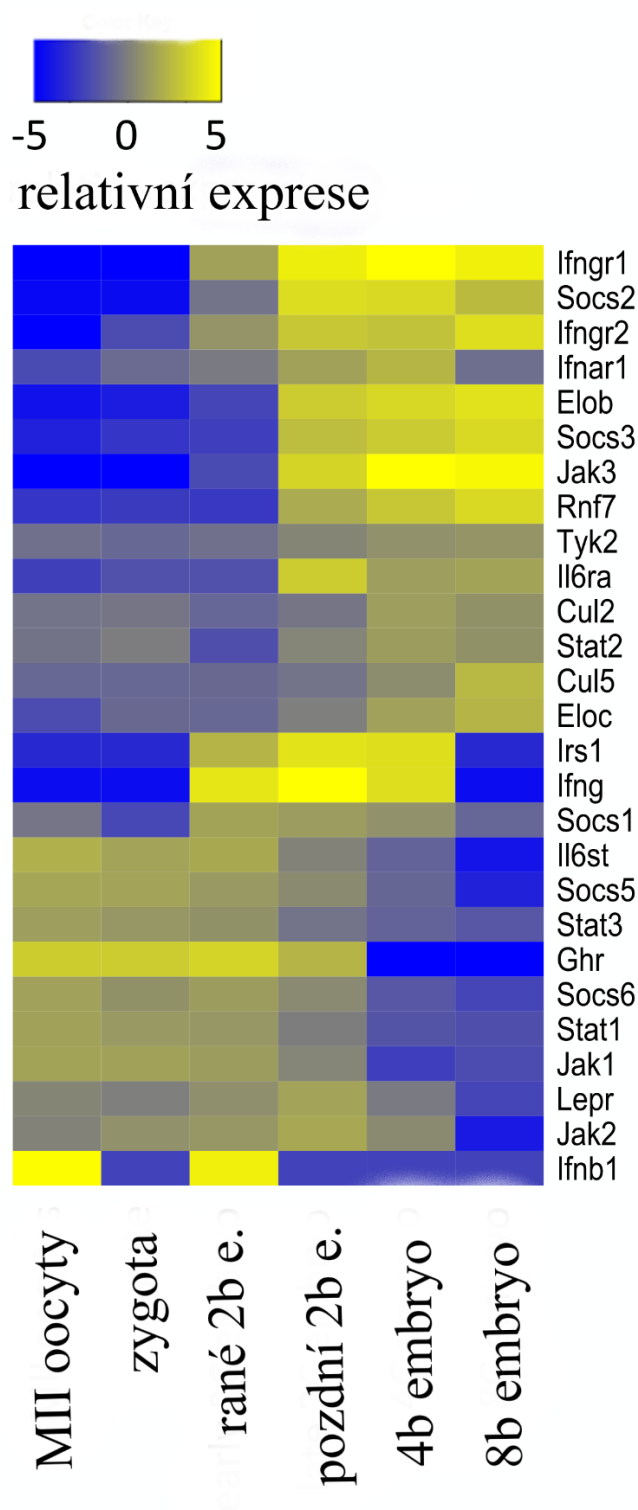
Data relativní exprese posloužila k vytvoření heatmap (obrázky 6, 7 a 8). Z nich lze vyčíst, které geny jsou v daném časovém úseku a v dané tkáni exprimovány v podobných hladinách.

Na obrázku 6 je patrné postupné zvyšování exprese genu *Socs3* od oocyty do fáze 8-buněčného embrya. Obdobný trend vykazují i geny *Ifngr1*, *Ifngr2*, *Elob*, *Jak3*, *Rnf7* a *Socs2*. Opačného průběhu si můžeme povšimnout u genů *Il6st*, *Socs5*, *Ghr*, *Socs6*, *Stat1*, *Jak1* a *Lepr*, jejichž exprese se do 8-buněčného stádia postupně snižuje.

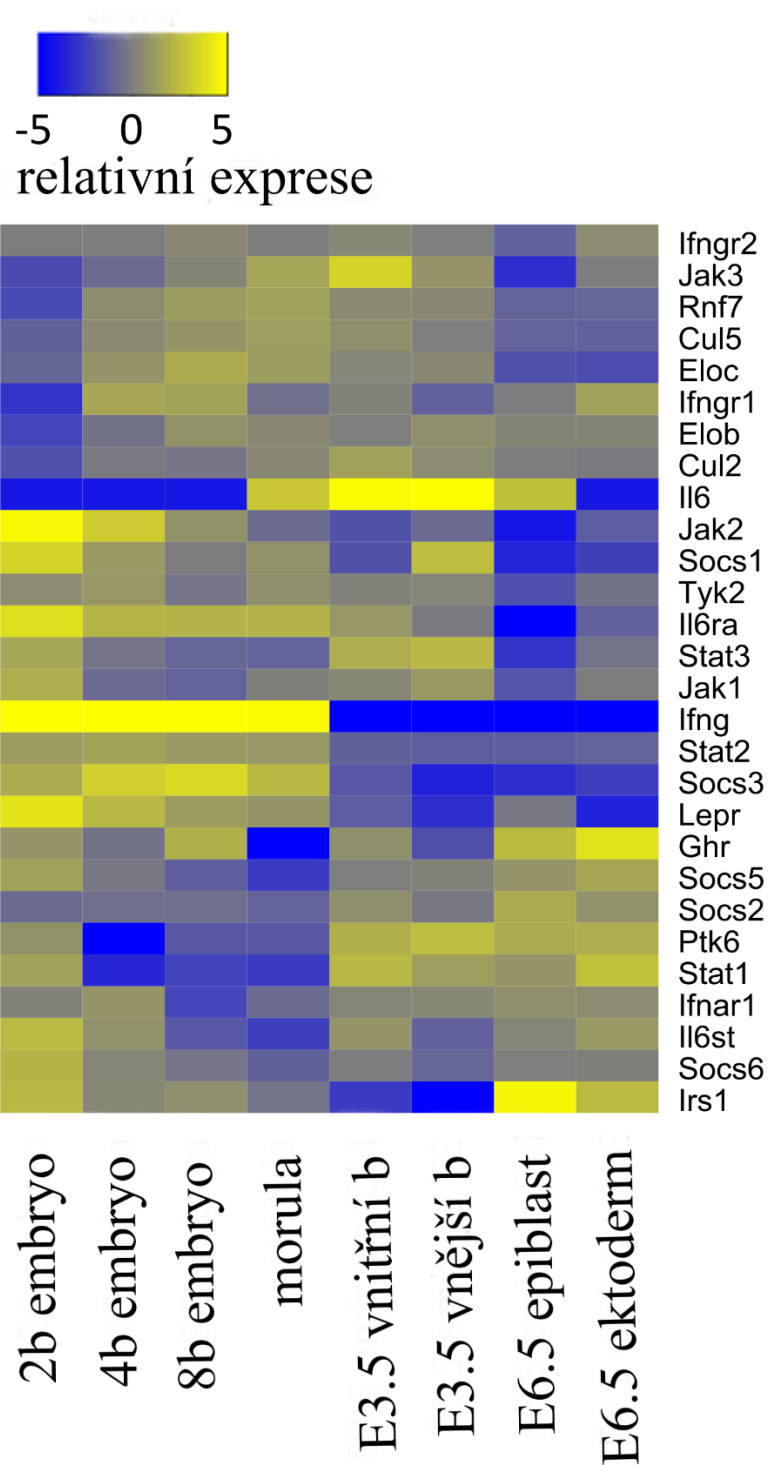
Heatmapa na obrázku 7 znázorňuje vývoj genové exprese od fáze 2 buněk, až do E6.5, ve které jsou již rozruzněné linie epiblastu a extraembryonálního ektodermu. Růst exprese a její následný pokles, začínající ve stádiu moruly, je kromě *Socs3* patrný pouze u genů *Lepr*, *Jak2* a *Il6ra*. Opačný vývoj podstupují geny *Socs2*, *Socs5* a *Stat1*. Obě heatmapy, zobrazující preimplantační vývoj ukazují, že v tomto období exprese *Socs3* nekoreluje s expresí *Stat3*.

Obrázek 8 znázorňuje expresi genů v různých embryonálních tkáních od E12.5 do E16.5. Jak již bylo zmíněno, *Socs3* je exprimován hlavně v buňkách placenty, v ostatních tkáních je exprimován zpravidla v nízkých hladinách. Podobně jsou exprimovány i geny *Jak1*,

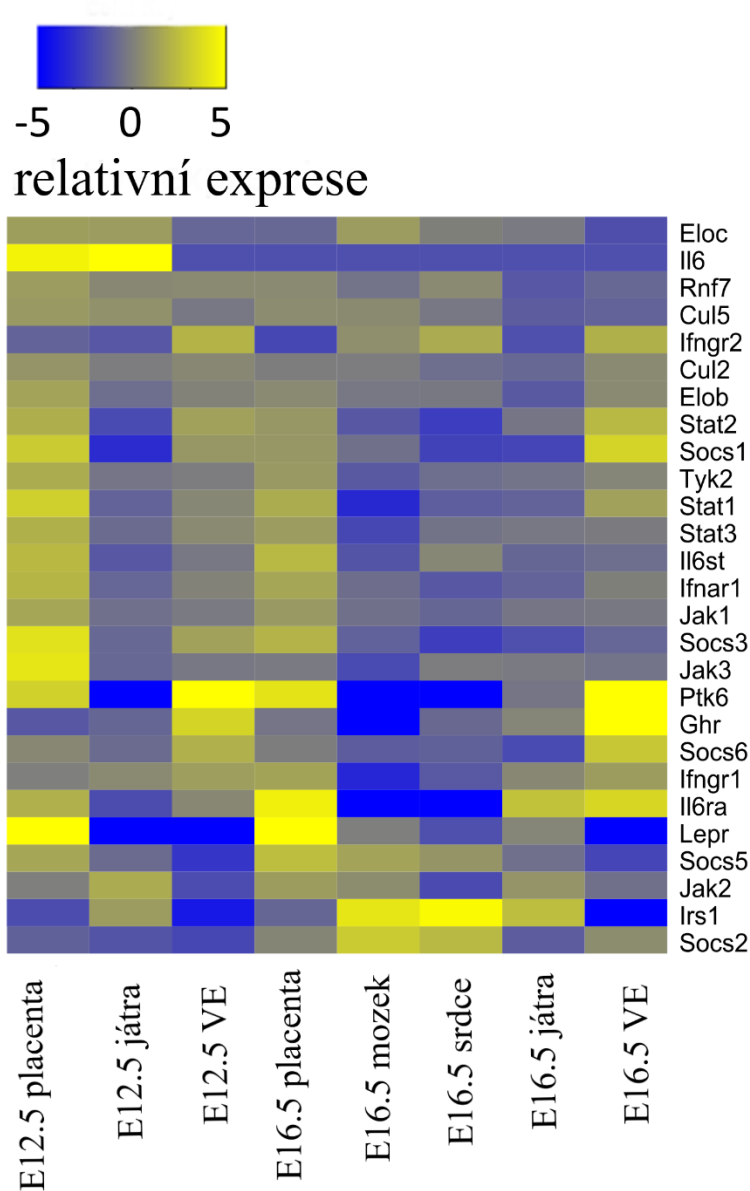
Ifnar1, *Il6st*, *Stat3* a *Tyk2*, geny *Stat1*, *Stat2* a *Socs2* se liší svou zvýšenou expresí v E16.5 ve viscerálním endodermu.



Obr. 6: Heatmapa, zobrazující míru exprese jednotlivých genů od oocyty do stádia 8-buněčného embrya (Zhang et al., 2016).



Obr. 7: Heatmapa, zobrazující míru exprese genů v preimplantačním embryu od stádia dvou buněk až do E6.5 (Wang et al., 2018).



Obr. 8: Heatmapa, zobrazující expresi genů v embryu od E12.5 do E16.5 (Andergassen et al., 2017).

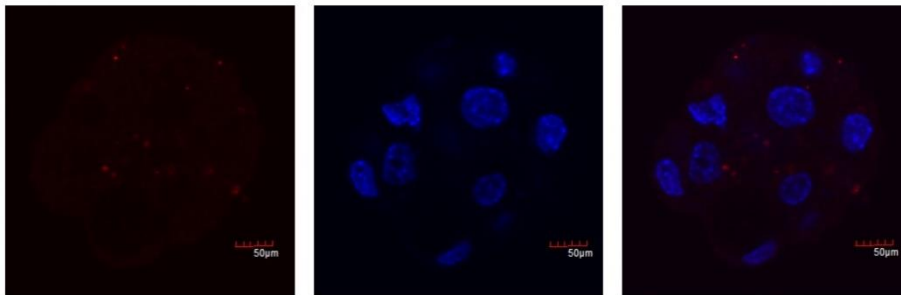
4.2 Imunofluorescenční barvení proteinu SOCS3 během preimplantačního vývoje

Na základě RNA-seq dat jsme viděli, že *Socs3* je výrazně exprimován během preimplantačního vývoje do stádia moruly a pak rozdílně exprimován ve vnitřní mase buněk a trofoektodermu. Chtěli jsme otestovat, která protilátka bude nejvhodnější k jeho imunofluorescenčnímu barvení a následně analyzovat profil množství SOCS3 proteinu během preimplantačního vývoje, zejména v stádiu E3.5, kde nás zajímalo, jestli rozdíl v expresi mezi

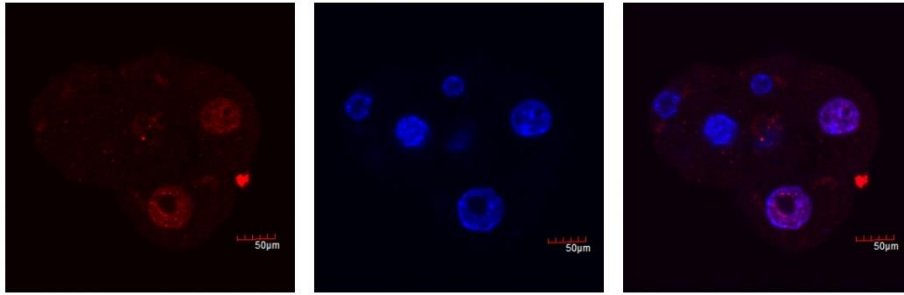
buněčnými liniemi bude detekovatelný i na úrovni proteinů. Embrya byla fixována v E3.5, fluorescenčně barvena protilátkami proti SOCS3 a následně skenována za použití konfokálního mikroskopu. Na základě internetových stránek výrobců jsme očekávali barvení cytoplasmy, ačkoli potenciální zbarvení jádra jsme nemohli úplně vyloučit. Také jsme očekávali rozdílnou intenzitu zbarvení mezi vnitřními a vnějšími buňkami embryí.

Testovali jsme dvě různé protilátky proti SOCS3 (od firmy Abcam a od firmy ProteinTech), přičemž u protilátky od firmy Abcam jsme testovali starší a novější šarži a u novější šarže jsme testovali dvě různé koncentrace.

Ve většině embryí, barvených králičí primární protilátkou anti-SOCS3 od firmy Abcam, stará šarže, ředěnou v BSA v poměru 1:100, a sekundární oslí protilátkou proti králičímu IgG Alexa Fluor 555, ředěnou v BSA v poměru 1:500, jsme pozorovali mírné zbarvení cytoplazmy bez barvení v jádrech, neviděli jsme ale žádný rozdíl mezi barvením u vnitřních a vnějších buněk a proto není jasné, jestli barvení je, nebo není specifické pro SOCS3 (obrázek 9). Přibližně v jedné třetině embryí, zejména u těch, které ještě neměly 32 buněk, ale k barvení jader došlo (obrázek 10).

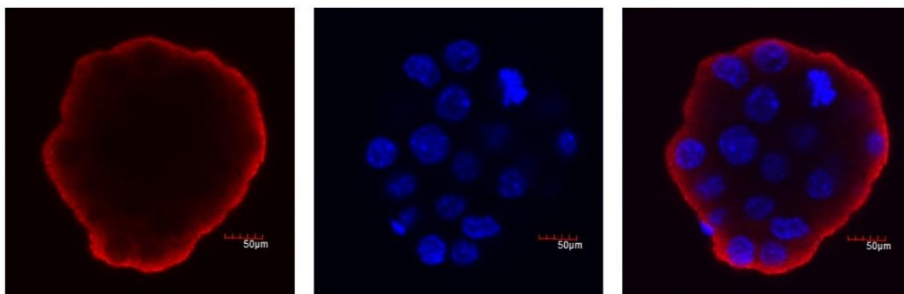


Obr. 9: Cytoplasmatické barvení protilátkou proti SOCS3 od firmy Abcam, stará šarže. Na prvním obrázku je patrné barvení cytoplasmy (červená), druhý obrázek zobrazuje buněčná jádra (DAPI, modrá), třetí obrázek zobrazuje překryv. Jedná se o reprezentativní zbarvení, pozorované u 6 z 11 skenovaných embryí.



Obr. 10: Barvení SOCS3 protilátkou některých buněčných jader (červená). První obrázek zobrazuje červený kanál (anti-SOCS3 protilátka), druhý modrý (DAPI), třetí je překryv. Jedná se o reprezentativní zbarvení, pozorované u 5 z 11 skenovaných embryí.

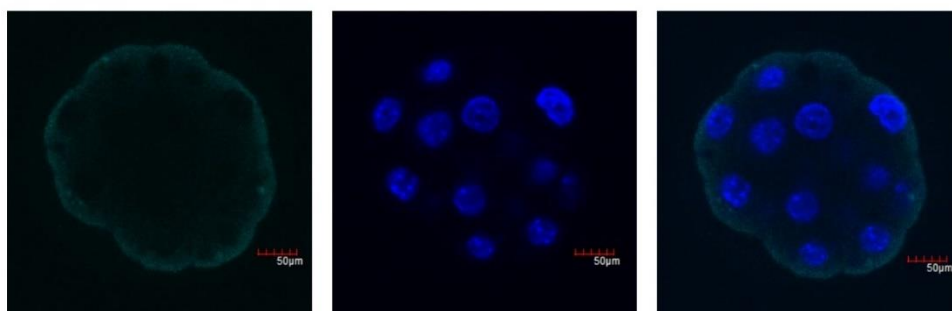
Při použití králičí primární protilátky anti-SOCS3 od firmy ProteinTech, ředěné v BSA v poměru 1:75, a sekundární oslí protilátky proti králičímu IgG Alexa Fluor 555, ředěné v BSA v poměru 1:500, docházelo k výraznému nespecifickému barvení povrchu embryí a méně výraznému barvení cytoplasmy (obrázek 11).



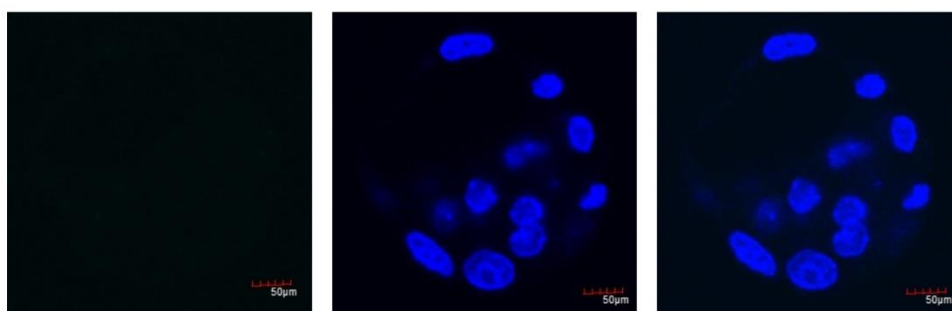
Obr. 11: Nespecifické barvení embryonálního povrchu a cytoplasmy protilátkou proti SOCS3 (červená, první obrázek). Buněčná jádra jsou znázorněna modrou (DAPI, druhý obrázek). Třetí obrázek zobrazuje překryv. Jedná se o reprezentativní zbarvení, pozorované u 3 ze 3 skenovaných embryí.

Nespecifické fluorescenční barvení probíhalo také za použití nově koupené králičí primární protilátky anti-SOCS3 od firmy Abcam, nová šarže, ředěné v BSA v poměru 1:100 (obrázek 12). Při poměru 1:200 v BSA barvení nebylo viditelné (obrázek 13). Jako sekundární protilátka byla použita oslí proti králičímu IgG Alexa Fluor 647, ředěná v BSA v poměru 1:500. Z důvodu nespecifického barvení těmito protilátkami byl na embryích vyzkoušen také upravený postup fixace a barvení (obrázek 14), popsáný v kapitole 3.2.3. Za použití tohoto

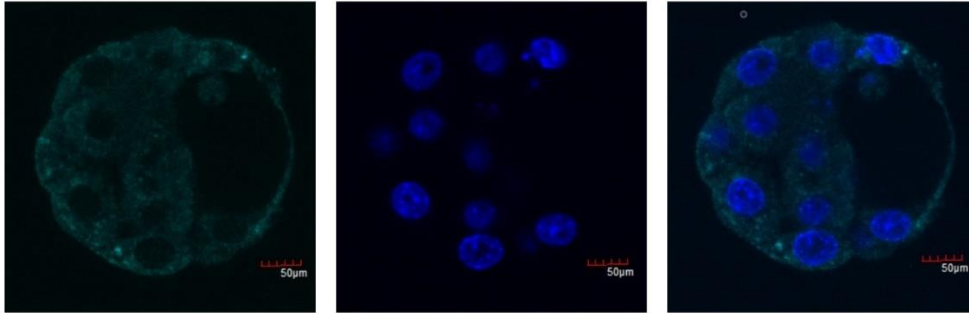
postupu došlo k výraznějšímu zbarvení cytoplazmy bez zbarvení SOCS3 v jádrech, ale nepozorovali jsme žádný rozdíl mezi zbarvením vnitřních a vnějších buněk.



Obr. 12: Nespecifické barvení embryonálního povrchu a cytoplazmy protilátkou proti SOCS3 na povrchu embrya a v cytoplasmě (modrozelená, první obrázek). Buněčná jádra jsou zobrazena modře (DAPI, druhý obrázek). Třetí obrázek zobrazuje překryv. Jedná se o reprezentativní zbarvení, pozorované u 12 ze 14 skenovaných embryí.

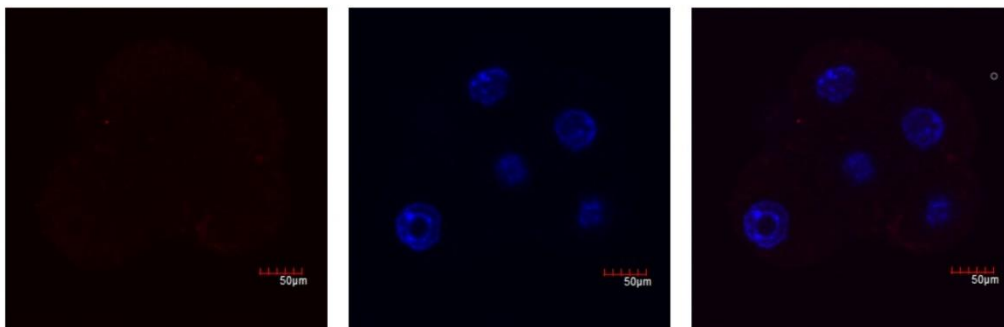


Obr. 13: Nedetekovatelné barvení protilátkou proti SOCS3 (první obrázek). Buněčná jádra jsou barvena modře (DAPI, druhý obrázek). Třetí obrázek zobrazuje překryv. Jedná se o reprezentativní zbarvení, pozorované u 8 z 8 skenovaných embryí.

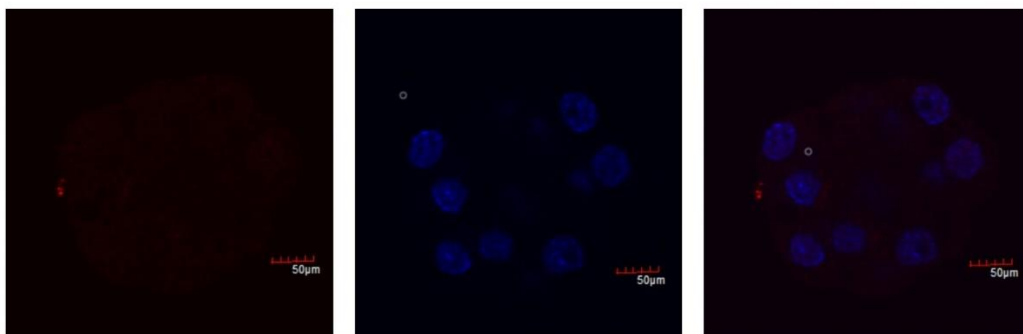


Obr. 14: Nespecifické barvení cytoplasmy protilátkou proti SOCS3 za použití upraveného postupu barvení (modrozelená, první obrázek). Buněčná jádra jsou zobrazena modře (DAPI, druhý obrázek). Třetí obrázek zobrazuje překryv. Jedná se o reprezentativní zbarvení, pozorované u 18 z 21 skenovaných embryí.

Protože jsme při barvení embryí s nižším počtem buněk (i když byly fixovány v E3.5) primární protilátkou anti-SOCS3 od firmy Abcam, stará šarže pozorovali zbarvení buněčných jader, které nebylo přítomné u embryí s vyšším počtem buněk, chtěli jsme ověřit, jestli tento fenomén budeme pozorovat i u vývojově mladších embryí. Proto jsme touto primární protilátkou, ředěnou v BSA v poměru 1:100, a sekundární oslí protilátkou proti králičímu IgG Alexa Fluor 555, ředěnou v BSA v poměru 1:500, barvili embrya ve stádiu 8 (obrázek 15) a 16 (obrázek 16) buněk. Oproti použití těchto protilátek v E3.5, zde k barvení jader nedocházelo vůbec.



Obr. 15: Nespecifické a nevýrazné barvení cytoplasmy protilátkou proti SOCS3 v 8-buněčném embryu (červená, první obrázek). Buněčná jádra byla barvena modře (DAPI, druhý obrázek). Třetí obrázek zobrazuje překryv. Jedná se o reprezentativní zbarvení, pozorované u 10 z 12 skenovaných embryí.



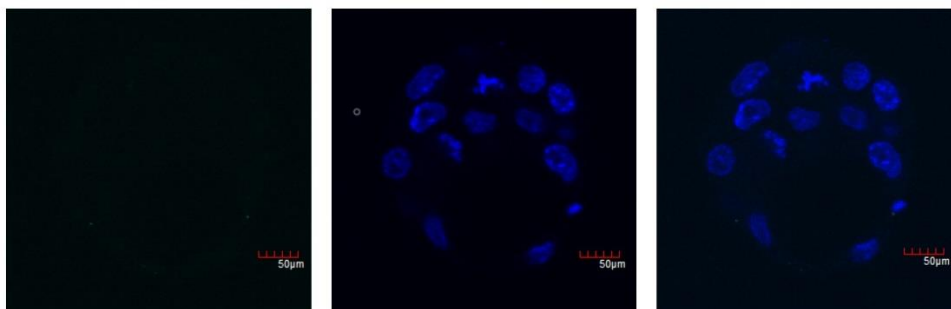
Obr. 16: Nespecifické barvení cytoplasmy protilátkou proti SOCS3 v 16-buněčném embryu (červená, první obrázek). Buněčná jádra jsou znázorněna modře (DAPI, druhý obrázek). Třetí obrázek zobrazuje překryv. Jedná se o reprezentativní zbarvení, pozorované u 6 z 6 skenovaných embryí.

Z dosažených výsledků není možné potvrdit, že jsme pozorovali specifické barvení SOCS3 v cytoplasmě či v jádrech s použitím protilátky od firmy Abcam staré nebo nové šarže. Z tohoto důvodu nebylo možné vytvořit proteinový profil Socs3 s použitím protilátek během preimplantačního vývoje. Nepozorovali jsme také žádný rozdíl mezi vnitřními a vnějšími buňkami E3.5 embryí.

4.3 Imunofluorescenční barvení pSTAT3 během preimplantačního vývoje

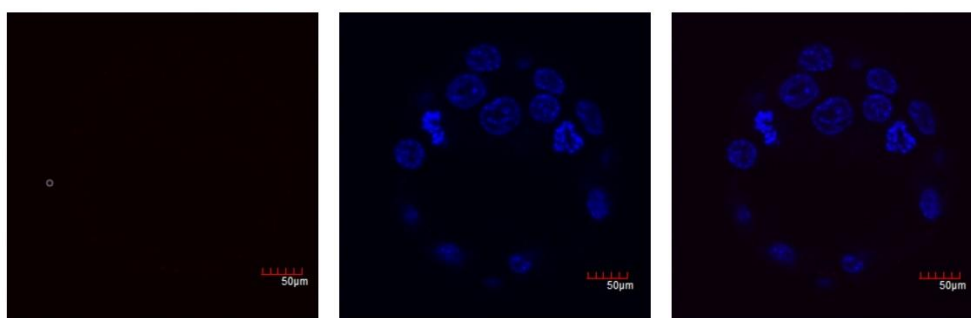
pSTAT3 je jedním z hlavních regulátorů exprese Socs3. Proto jsme chtěli otestovat, která protilátka je pro jeho imunofluorescenční barvení nejlepší, a následně sledovat, jestli jsou rozdíly v množství pSTAT v jednotlivých buněčných liniích preimplantačního embrya. Stejně jako u SOCS3 barvení byla použita embrya v E3.5. Testovali jsme dvě různé protilátky proti pSTAT3 od firmy Cell Signalling a jednu protilátku od firmy Abcam. U jedné z protilátek od firmy Cell Signalling jsme testovali první a druhou šarži a u protilátky od firmy Abcam jsme testovali dvě různé koncentrace. Na základě publikovaných výsledků imunofluorescenčního barvení pSTAT3 jsme očekávali zbarvení jádra buněk (Do et al., 2013; Morgani & Brickman, 2015).

Prvními vyzkoušenými protilátkami byla primární myší anti-pSTAT3 od firmy Cell Signalling, ředěná v BSA v poměru 1:100, a sekundární oslí protilátka proti myšimu IgG Alexa Fluor 647, ředěná v BSA v poměru 1:500 (obrázek 17). Barvení těmito protilátkami probíhalo nespecificky a velice slabě.



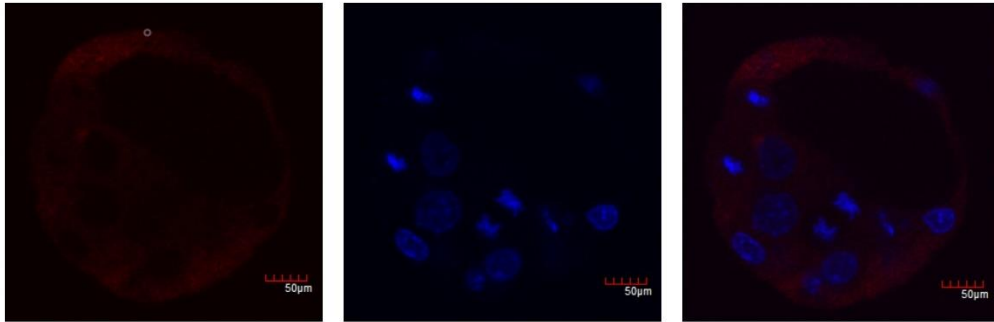
Obr. 17: Nespecifické a slabé barvení cytoplasmu protilátkou proti pSTAT3 (modrozelená, první obrázek). Buněčná jádra jsou zobrazena modře (DAPI, druhý obrázek). Na třetím obrázku je zobrazen překryv. Jedná se o reprezentativní zbarvení, pozorované u 8 z 9 skenovaných embryí.

Fluorescenční barvení primární králičí protilátkou anti-pSTAT3 od firmy Cell Signalling, první šarže, ředěnou v BSA v poměru 1:100, a sekundární oslí protilátkou proti králičímu IgG Alexa Fluor 555, ředěnou v BSA v poměru 1:500 (obrázek 18) vůbec neproběhlo.



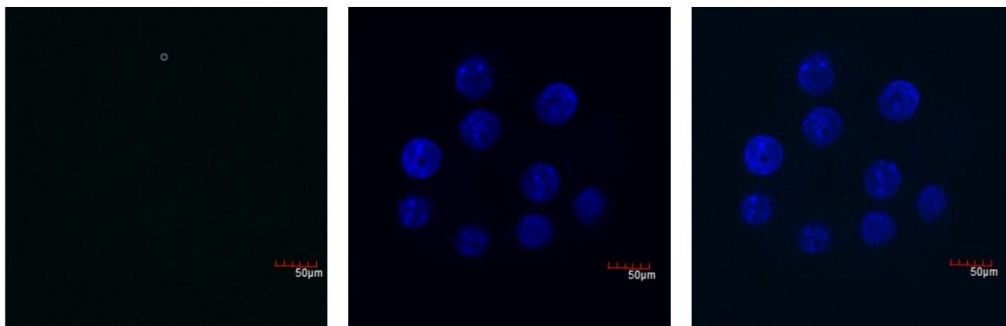
Obr. 18: Absence barvení protilátkou proti pSTAT3 (první obrázek). Buněčná jádra jsou barvena modře (DAPI, druhý obrázek). Třetí obrázek znázorňuje překryv. Jedná se o reprezentativní zbarvení, pozorované u 10 z 10 skenovaných embryí.

Výraznější, ale také nespecifické barvení pSTAT3 v cytoplazmě se objevilo při použití druhé šarže králičí primární protilátky anti-pSTAT3 od firmy Cell Signalling, ředěné v BSA v poměru 1:100, a sekundární oslí protilátky proti králičímu IgG Alexa Fluor 555, ředěné v BSA v poměru 1:500 (obrázek 19).

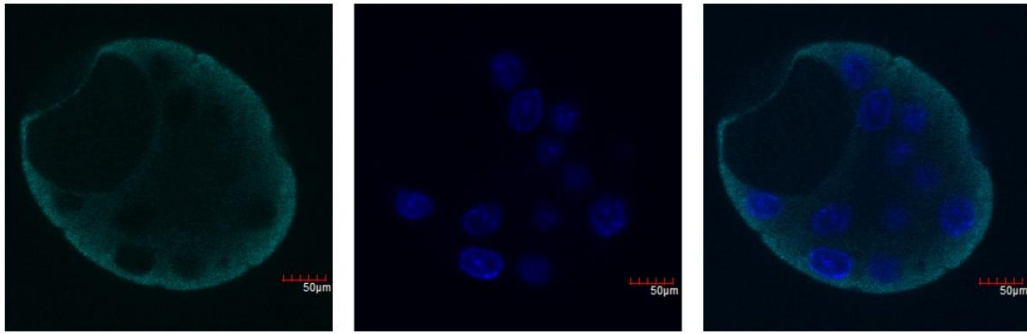


Obr. 19: Nespecifické barvení cytoplasmy protilátkou proti pSTAT3 (červená, první obrázek). Buněčná jádra jsou znázorněna modře (DAPI, druhý obrázek). Na třetím obrázku je překryv. Jedná se o reprezentativní zbarvení, pozorované u 4 ze 4 skenovaných embryí.

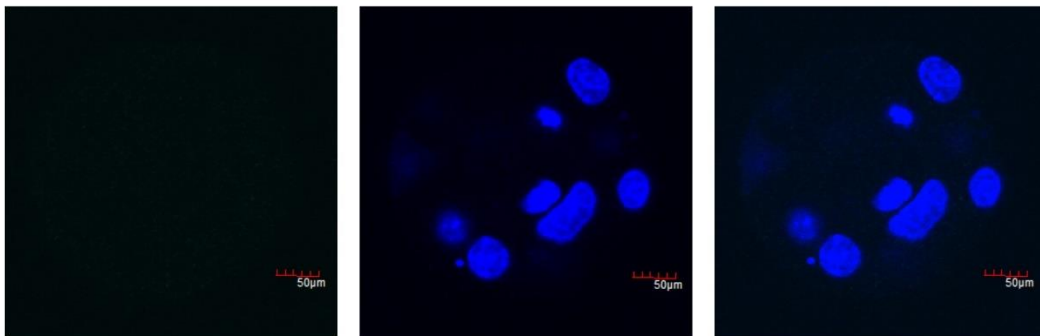
Poslední vyzkoušenou pSTAT3 protilátkou byla nově koupená primární králičí protilátka anti-pSTAT3 od firmy Abcam, ředěná v BSA v poměru 1:100 (obrázek 20) a v poměru 1:200 (obrázek 21). Jako sekundární protilátka byla použita oslí proti králičímu IgG Alexa Fluor 647, ředěná v BSA v poměru 1:500. Protože i za použití těchto protilátek probíhalo barvení pouze nespecificky, byl vyzkoušen i odlišný protokol fixace a barvení embryí, popsany v kapitole 3.2.3 (obrázek 22 pro ředění primární protilátky v BSA 1:100 a obrázek 23 pro ředění 1:200), ale nedosáhli jsme zlepšení specifity barvení.



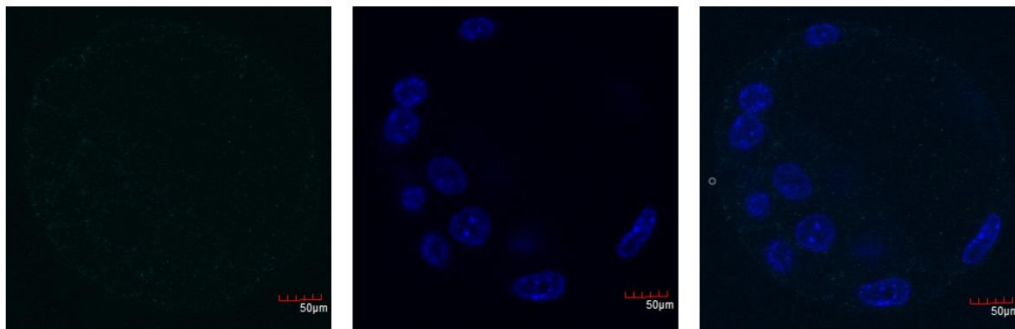
Obr. 20: Nespecifické a slabé barvení cytoplasmy protilátkou proti pSTAT3 (modrozelená, první obrázek). Buněčná jádra jsou barvena modře (DAPI, druhý obrázek). Třetí obrázek zobrazuje překryv. Jedná se o reprezentativní zbarvení, pozorované u 8 z 9 skenovaných embryí.



Obr. 21: Nespecifické barvení cytoplasmy protilátkou proti pSTAT3 (modrozelená, první obrázek). Buněčná jádra jsou znázorněna modře (DAPI, druhý obrázek). Na třetím obrázku je překryv. Jedná se o reprezentativní zbarvení, pozorované u 9 z 9 skenovaných embryí.



Obr. 22: Nespecifické a velmi slabé barvení cytoplasmy protilátkou proti pSTAT3 za použití upraveného postupu barvení (modrozelená, první obrázek). Buněčná jádra jsou barvena modře (DAPI, druhý obrázek). Třetí obrázek zobrazuje překryv. Jedná se o reprezentativní zbarvení, pozorované u 5 ze 6 skenovaných embryí.



Obr. 23: Nespecifické barvení cytoplasmy protilátkou proti pSTAT3 za použití upraveného postupu barvení (modrozelená, první obrázek). Buněčná jádra jsou znázorněna modře (DAPI, druhý obrázek). Třetí obrázek zobrazuje překryv. Jedná se o reprezentativní zbarvení, pozorované u 5 z 5 skenovaných embryí.

Při fluorescenčním barvení pSTAT3 protilátek všechny protilátky barvily embrya nespecificky (obrázky 17, 19, 20, 21, 22 a 23), nebo je nebarvily vůbec (obrázek 18). Nebylo proto možné analyzovat a porovnávat množství pSTAT3 u jednotlivých buněčných linií preimplantačních embryí.

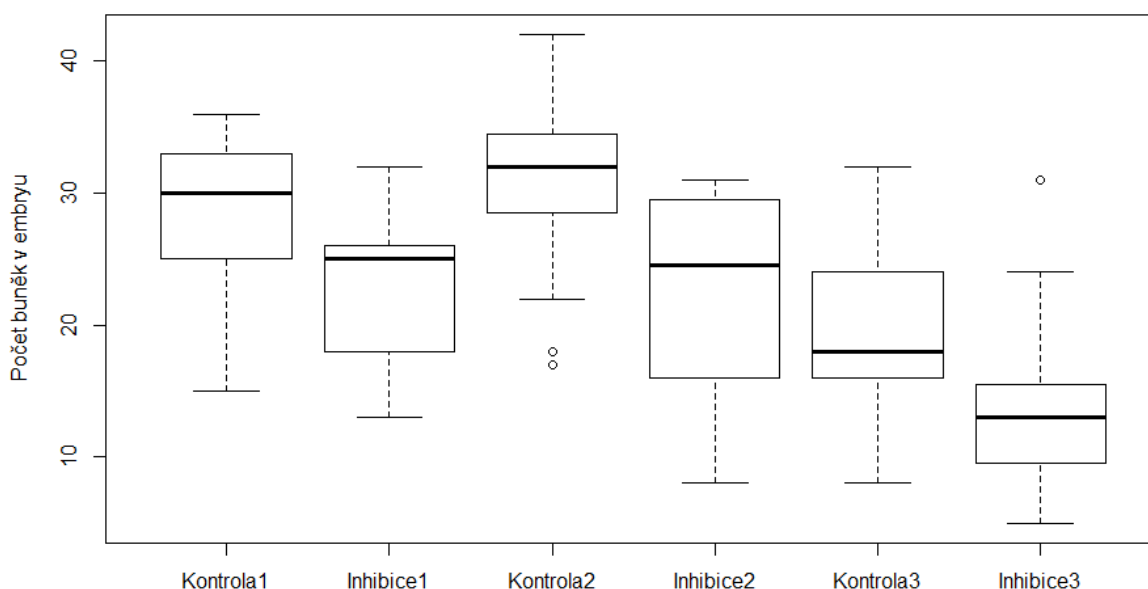
4.4 Downregulace Socs3 přes inhibici pSTAT3

Předchozí nepublikované výsledky v naší laboratoři ukázaly, že po downregulaci exprese Socs3 pomocí RNA interference došlo ke zvýšené proliferaci buněk v E3.5. Protože pSTAT3 stimuluje expresi Socs3, chtěli jsme zjistit, jestli chemická inhibice pSTAT3 sníží množství proteinu SOCS3 v buňkách, a jestli to bude mít efekt na počet buněk v embryích v E3.5. Embrya byla vždy rozdělena na dvě skupiny, z nichž jedna podstoupila vývoj v médiu s přidaným inhibítor, druhá pak sloužila jako kontrolní skupina. Tato embrya byla v E3.5 fixována, poté byla fluorescenčně barvena SOCS3 protilátkami a skenována konfokálním mikroskopem. Posléze byla porovnávána embrya, vyvíjející se v inhibitoru, s embryi tvořícími kontrolní skupinu.

Na experiment byly použity dva inhibitory a na každém z nich bylo provedeno několik sérií měření. Byly použity různé koncentrace inhibitorů v médiu a různé časové úseky, ve kterých se embrya v inhibitech vyvíjela. Každá série měření měla vlastní kontrolní embrya.

Prvním použitým inhibitorem byl C188-9. První skupina inhibovaných embryí se vyvíjela v médiu s přidaným inhibitorem v koncentraci 10 μM od E2.5 do E3.5, druhá skupina v koncentraci 10 μM od E1.5 do E3.5 a třetí skupina v koncentraci 20 μM od E1.5 do E3.5.

Embrya, patřící do první skupiny měla v průměru o 5 buněk méně než embrya kontrolní. U druhé skupiny zastavila třetina embryí svůj vývoj ve stádiu 2-4 buněk a zbylá embrya vykazovala v průměru o 8 buněk méně než kontroly. V poslední skupině došlo k zastavení vývoje ve fázi 2-4 buněk u poloviny embryí a zbylá měla v průměru o 6 buněk méně, než kontrolní embrya (obrázek 24).

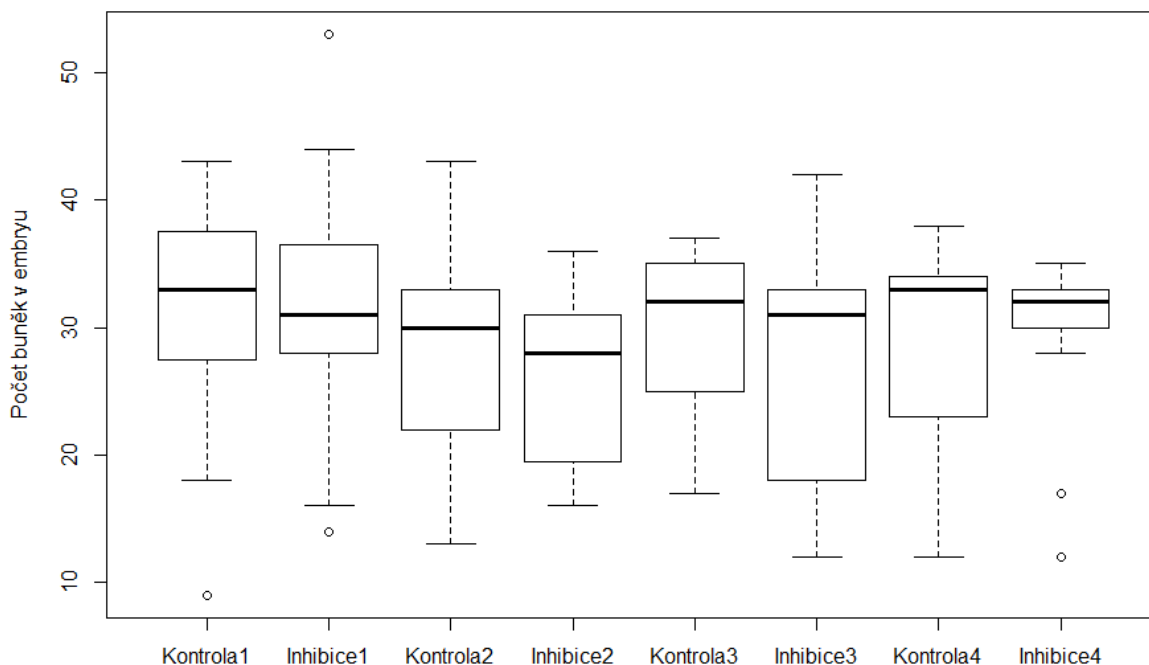


Obr. 24: Graf, znázorňující vliv inhibitoru C188-9 na celkový počet buněk v embryích ve třech, na sobě nezávislých měřeních. Jako první jsou vždy zobrazeny kontroly, vyvíjející se v běžném médiu. Na druhých místech jsou zobrazena experimentální embrya, vyvíjející se v médiu s přidaným inhibitorem.

Druhým použitým inhibitorem byl Cryptotanshinone. První skupina embryí se vyvíjela v médiu s přidaným inhibitorem v koncentraci 10 μM od E2.5 do E3.5, druhá skupina v koncentraci 10 μM od E1.5 do E3.5, třetí skupina v koncentraci 20 μM od E1.5 do E3.5 a čtvrtá skupina v koncentraci 20 μM od E2.5 do E3.5.

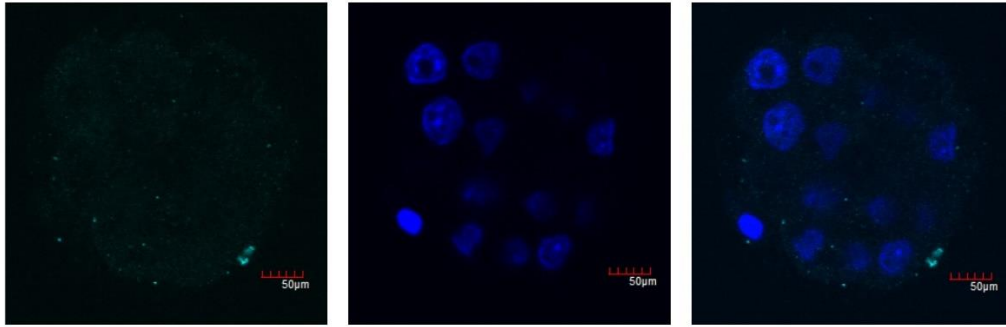
V první skupině se vliv inhibitoru na průměrný počet buněk nijak neprojevil, medián ale u inhibovaných embryí klesl z 33 na 31. Druhá skupina vykazovala u inhibovaných embryí

v průměru o 3 buňky méně než v kontrolách a medián klesl z 30 na 28. Ve třetí skupině došlo ke snížení průměrného počtu buněk o 3 a medián klesl z 32 na 31. U čtvrté skupiny nedošlo ke snížení průměrného celkového počtu buněk, medián ale klesl z 33 na 32 (obrázek 25).

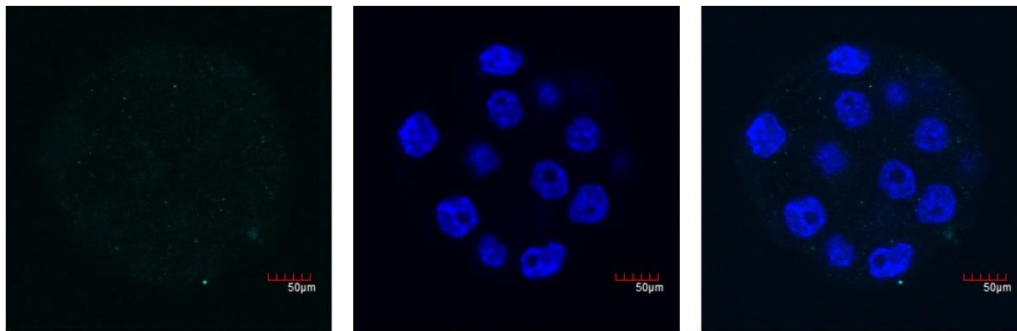


Obr. 25: Graf, znázorňující vliv inhibitoru Cryptotanshinone na celkový počet buněk v embryích ve čtyřech, na sobě nezávislých měřeních. Jako první jsou vždy zobrazeny kontroly, vyvíjející se v běžném médiu. Na druhých místech jsou zobrazena experimentální embrya, vyvíjející se v médiu s přidaným inhibitorem.

Následné fluorescenční barvení SOCS3 probíhalo u embryí inhibovaných inhibitorem C188-9 stejně v obou zmíněných koncentracích i intervalech, ve kterých byla embrya inhibována. K barvení byla použita primární protilátka králičí anti-SOCS3 od firmy Abcam, stará šarže, ředěná v BSA v poměru 1:100 a sekundární oslí protilátka proti králičímu IgG Alexa Fluor 647, ředěná v BSA v poměru 1:500. Fluorescenční barvení bylo cytoplasmatické i jaderné ve stejné intenzitě a nebyl patrný žádný rozdíl mezi inhibovanými embryi (obrázek 26) a kontrolami (obrázek 27).



Obr. 26: Fluorescenční barvení cytoplasmy i jader protilátkou proti SOCS3 v embryích inhibovaných inhibítozem C188-9 (modrozelená, první obrázek). Buněčná jádra jsou barvena modře (DAPI, druhý obrázek). Třetí obrázek zobrazuje překryv. Jedná se o reprezentativní zbarvení, pozorované u 45 z 55 skenovaných embryí.

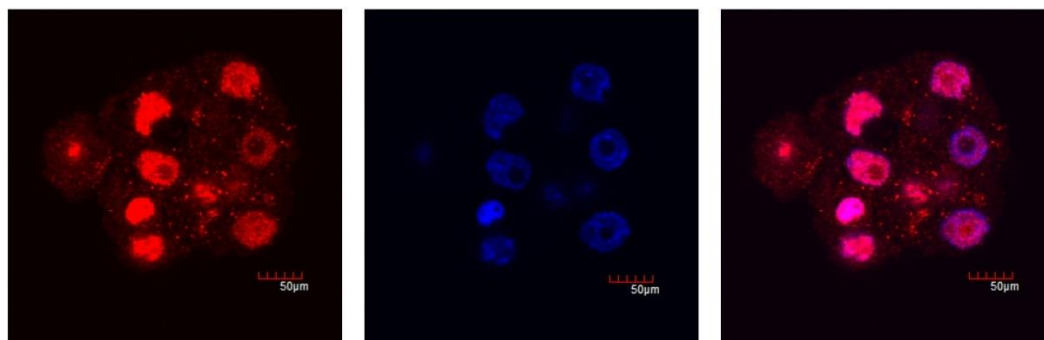


Obr. 27: Fluorescenční barvení cytoplasmy i jader protilátkou proti SOCS3 v kontrolních embryích (modrozelená, první obrázek). Buněčná jádra jsou znázorněna modře (DAPI, druhý obrázek). Na třetím obrázku je překryv. Jedná se o reprezentativní zbarvení, pozorované u 60 z 69 skenovaných embryí.

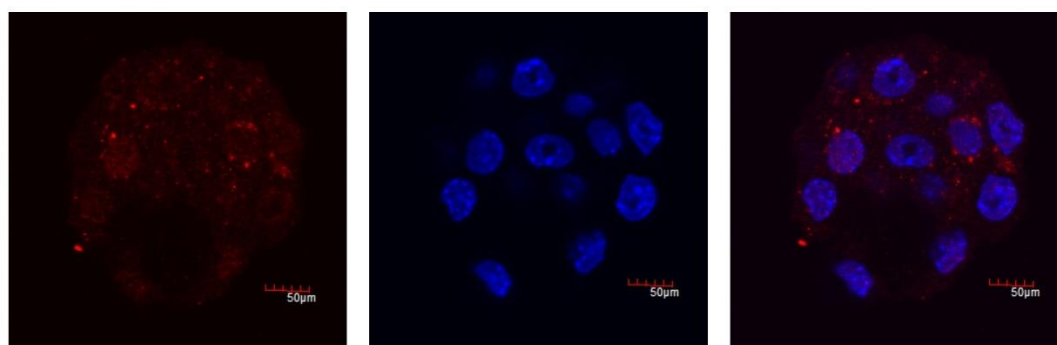
Pro fluorescenční barvení embryí, inhibovaných pomocí Cryptotanshinone, byla také použita primární protilátka králičí anti-SOCS3 od firmy Abcam, stará šarže, ředěná v BSA v poměru 1:100 a sekundární oslí protilátka proti králičímu IgG Alexa Fluor 555, ředěná v BSA v poměru 1:500. Koncentrace použitého inhibitoru, a interval, po který mu byla embrya vystavena neměl vliv na výsledek fluorescenčního barvení, záleželo ale na celkovém počtu buněk v embryu.

Při tomto barvení bylo ve většině embryí s malým počtem buněk (do 19), a to zejména u inhibovaných embryí, patrné barvení buněčných jader (obrázek 28), s rostoucím počtem buněk se toto barvení postupně vytrácelo (obrázek 29). V kontrolních embryích se specifické

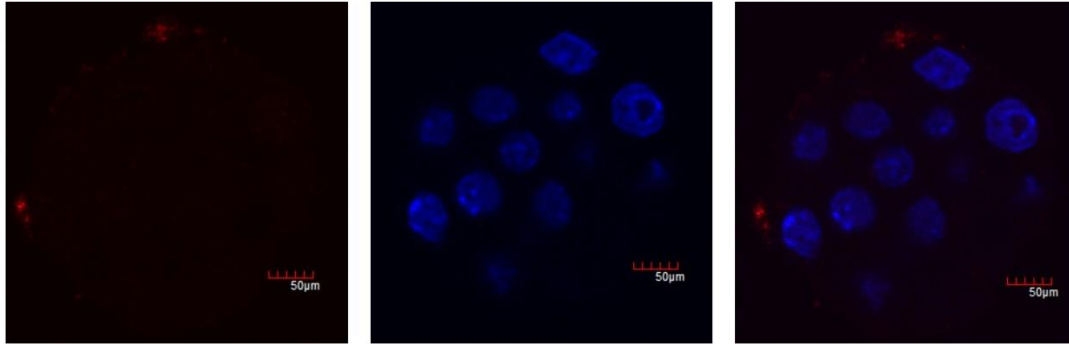
barvení jader vyskytovalo pouze výjimečně (obrázek 30). Po inhibici pSTAT jsme ani v tomto případě nepozorovali nižší intenzitu barvení SOCS3.



Obr. 28: Specifické fluorescenční barvení SOCS3 v jádrech inhibovaného embrya s nízkým počtem buněk (červená, první obrázek). Buněčná jádra jsou barvena modře (DAPI, druhý obrázek). Třetí obrázek znázorňuje překryv. Jedná se o reprezentativní zbarvení, pozorované u 13 z 57 skenovaných embryí.



Obr. 29: Specifické fluorescenční barvení SOCS3 v několika jádrech inhibovaného embrya s vyšším počtem buněk (červená, první obrázek). Buněčná jádra jsou barvena modře (DAPI, druhý obrázek). Třetí obrázek znázorňuje překryv. Jedná se o reprezentativní zbarvení, pozorované u 14 z 57 skenovaných embryí.



Obr. 30: Fluorescenční barvení SOCS3 v cytoplasmě kontrolního embrya (červená, první obrázek). Buněčná jádra jsou barvena modře (DAPI, druhý obrázek). Třetí obrázek znázorňuje překryv. Jedná se o reprezentativní zbarvení, pozorované u 40 ze 44 skenovaných embryí.

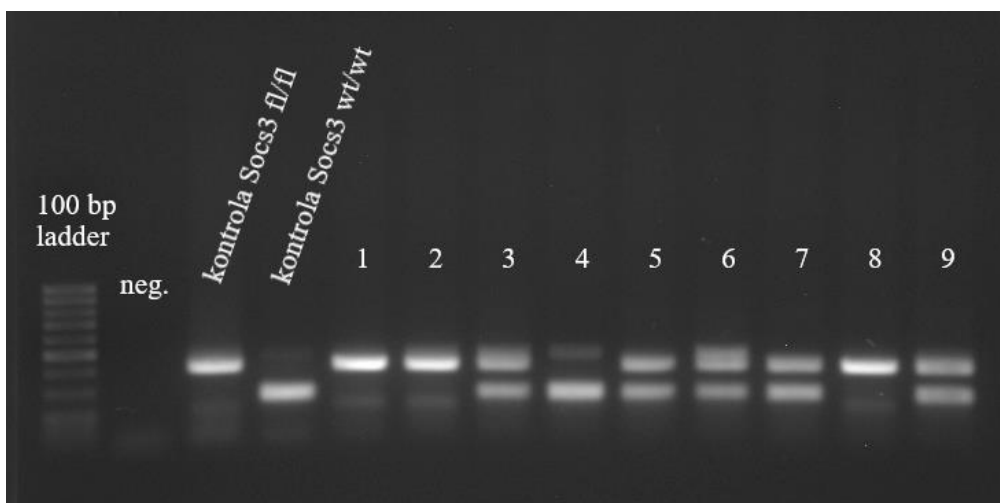
Výsledky ukazují, že inhibice pSTAT3 u preimplantačních embryí nevede ke zvýšení proliferace, naopak, má pravděpodobně negativní vliv na vývoj embryí a embrya se vyvíjejí pomaleji oproti kontrolám. Kvůli nevhodnosti protilátek jsme nebyli schopni potvrdit, zda vede inhibice pSTAT3 ke snížení množství proteinu SOCS3.

4.5 Delece *Socs3* pomocí mikroinjekcí Cre mRNA u myší linie *Socs3* fl/fl

Jedna z možností, jak downregulovat gen *Socs3* v myších embryích je využití Cre-Lox systému, kde byly do oblasti genu *Socs3* vloženy dvě tzv. flox (fl) sekvence, které jsou rozeznány rekombinázou CRE. Ta pomocí rekombinace vystřihne oblast mezi flox sekvencemi a dochází k deleci části genu *Socs3*, který se tak stává nefunkčním. Bez přítomnosti CRE je gen *Socs3* i s vloženými flox sekvencemi plně funkční.

Po mikroinjekci se ze zkušeností v naší laboratoři nejlépe vyvíjejí F2 embrya, která vznikla zkřížením samice a samce F1, kteří jsou potomci křížení myších linií C57Bl6 a CBA/W. V laboratoři jsme měli myší linii CBA/W *Socs3* fl/fl, ale potřebovali jsme také linii C57Bl6 *Socs3* fl/fl. Za tímto účelem byli kříženi samci C57Bl6 *Socs3* wt/fl se samicemi C57Bl6 *Socs3* wt/fl a jejich mláďata byla genotypizována. DNA byla extrahována ze špičky ocasu, požadovaný region byl amplifikován pomocí PCR a za využití gelové elektroforézy bylo následně zjištěno, která z mláďat nesou alely *Socs3* wt (produkt délky 272 bp) nebo *Socs3* fl (produkt délky 420 bp). Na základě toho byl stanoven jejich genotyp jako *Socs3* wt/wt, *Socs3* wt/fl, a *Socs3* fl/fl. Na obrázku 31 je znázorněn výsledek jedné genotypizace,

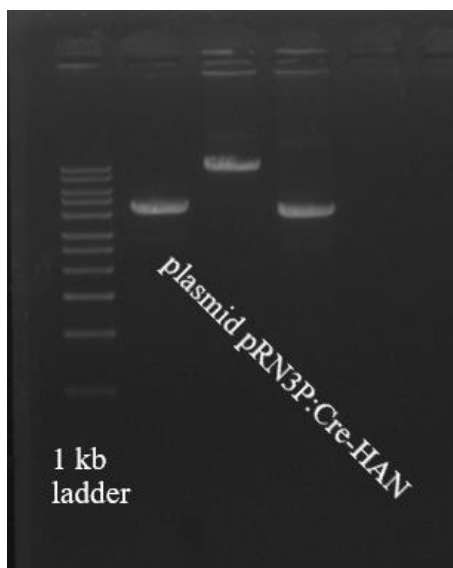
kde jedinci 1, 2 a 8 mají genotyp *Socs3* fl/fl, jedinci 3, 5, 6, 7 a 9 genotyp *Socs3* wt/fl a jedinec 4 genotyp *Socs3* wt/wt.



Obr. 31: Agarózový gel, zobrazující výsledky myšního genotypingu. Neg. je negativní kontrola s použitím vody místo DNA.

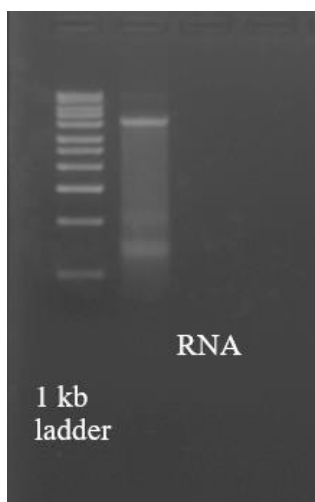
Mláďata, mající požadovaný genotyp *Socs3* fl/fl byla dále křížena mezi sebou, což vedlo k udržení požadovaného genotypu také u jejich potomstva a vzniku myší linie C57Bl6 *Socs3* fl/fl. Samice C57Bl6 *Socs3* fl/fl byly následně kříženy s již připravenými samci z linie CBA/W *Socs3* fl/fl. Takto vzniklí F1 jedinci pak byli znovu kříženi a jejich embrya byla použita pro mikroinjikování Cre mRNA.

Dále byla *in vitro* transkripční přípravena HA-tagovaná mRNA Cre z plasmidu pRN3P:Cre-HAN. Vyizolovaný plasmid byl enzymaticky naštěpen, na agarózovém gelu byla zkontrolována velikost plasmidu po štěpení (obrázek 32, přibližně 4600 bp), a následně byl přečištěn fenol-chloroformem.



Obr. 32: Agarózový gel, zobrazující plasmid pRN3P:Cre-HAN po enzymatickém štěpení.

Přečištěná plasmidová DNA byla přepsána do mRNA *in vitro* transkripcí. Pro potvrzení správného průběhu reakce byla přítomnost mRNA zkontrolována na agarózovém gelu (obrázek 33). Protože se jednalo o DNA gel s použitím 1x TAE (a ne RNA-denaturující gel s použitím 1x BPTE), dalo se očekávat, že RNA může být přítomna v různých konformacích, a proto může tvořit více bandů na gelu.



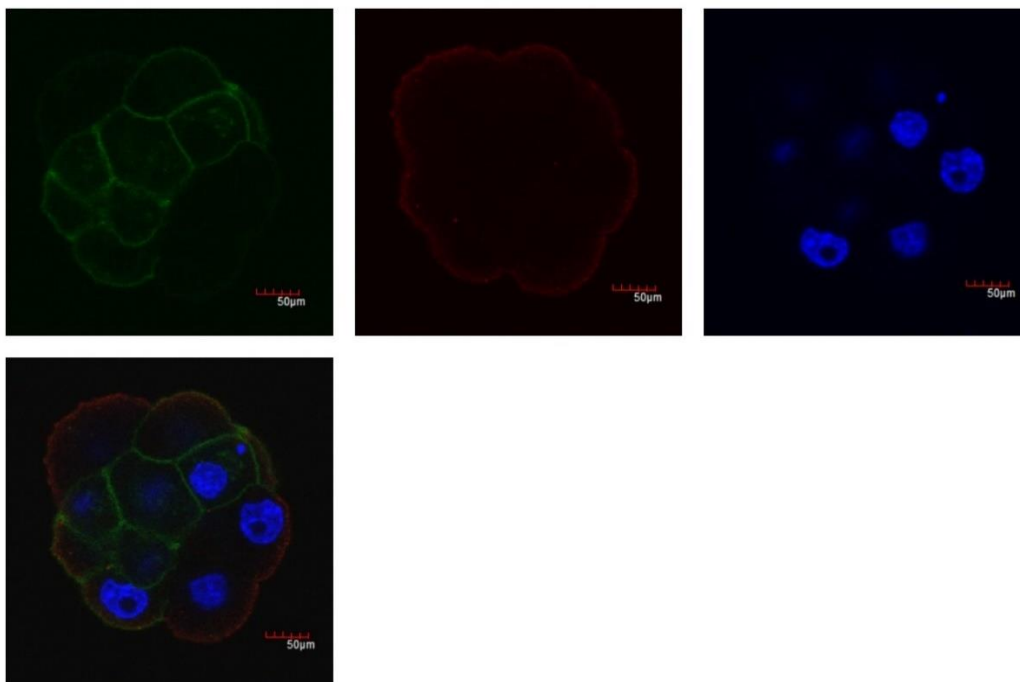
Obr. 33: Agarózový gel, zobrazující RNA, nasyntetizovanou podle DNA z plasmidu pRN3P:Cre-HAN.

Pro ověření funkčnosti připravené Cre mRNA jsme ji nejdříve mikroinjikovali do jedné blastomery u dvoubuněčných embryí získaných křížením myší linie F1 mTmG. U této linie je za normálních okolností na buněčných membránách lokalizován fluorescenční protein tdTomato, který svítí červenou fluorescencí. Pokud je ale v buňkách přítomna CRE

rekombináza, červená fluorescence je nahrazena zelenou fluorescencí EGFP lokalizovanou na membráně. Proto jsme očekávali, že pokud je Cre mRNA funkční, bude mít klon vzniklý z injikované blastomery zelené blastomery, zatímco klon z neinjikované blastomery je bude mít červené. Embrya byla v E3.5 fixována a skenována konfokálním mikroskopem. Přítomnost blastomer se zelenou membránou u injikovaného klonu potvrdila, že naše Cre mRNA je funkční (obrázek 34).

Následně jsme chtěli pomocí mikroinjekcí Cre mRNA deletovat gen *Socs3*. Ze samic F1 linie *Socs3* fl/fl, zkřížených s F1 samci *Socs3* fl/fl byla získána dvoubuněčná embrya a vždy do jedné z buněk byla mikroinjikována Cre mRNA. Ta následně způsobila rekombinaci rozpoznávacích míst fl/fl, díky čemuž došlo k delecí části genu *Socs3*. Spolu s Cre mRNA byl mikroinjikován injekční marker *Gap43-GFP* mRNA, který byl injikován i samostatně jako kontrolní mikroinjikace.

Embrya byla v E3.5 fixována, a skenována na konfokálním mikroskopu. Jako primární protilátka byla použita kozí anti-HA-tag, ředěná v BSA v poměru 1:200, jako sekundární protilátka sloužila oslí proti kozímu IgG Alexa Fluor, ředěná v BSA v poměru 1:500. Její barvení ale nefungovalo. Po spočtení buněk v jednotlivých embryích bylo zjištěno, že mikroinjikovaná embrya mají v průměru o 6 buněk méně než embrya kontrolní. Rovněž byl porovnán průměrný počet buněk mezi mikroinjikovanou a nemikroinjikovanou linií. Linie buněk, do které byl mikroinjikován RNA konstrukt měla v průměru o jednu buňku méně než buněčná linie bez tohoto zásahu.

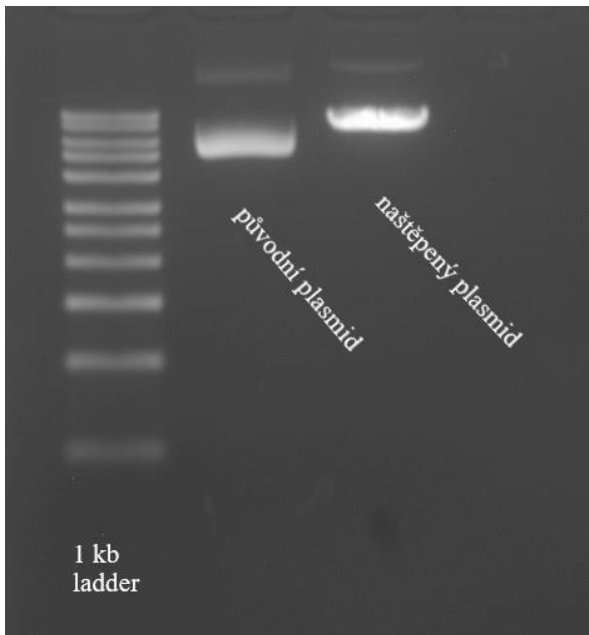


Obr. 34: Fluorescenční barvení buněčných membrán mikroinjikovaných embryí. První obrázek zobrazuje buňky, v nichž je přítomna Cre rekombináza (zelená). Na druhém obrázku jsou membrány buněk, do jejichž vývoje nebylo zasaženo mikroinjikací (červená). Buněčná jádra jsou znázorněna modře (DAPI, třetí obrázek). Čtvrtý obrázek zobrazuje překryv. Jedná se o reprezentativní zbarvení, pozorované u 9 z 9 skenovaných embryí.

4.6 Příprava sgRNA na delecí *Socs3* pomocí CRISPR/Cas9 systému

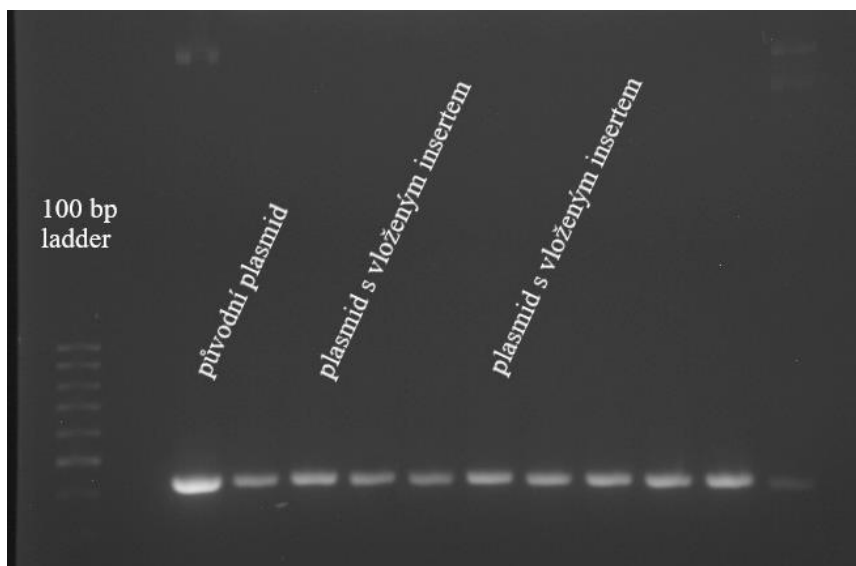
Jako další způsob delecce genu *Socs3* jsme se rozhodli využít CRISPR/Cas9 systém. CRISPR/Cas9 sestává z genově specifické sgRNA, která zacílí vybranou část vybraného genu a z Cas9 proteinu, štěpícího DNA v místě zacílení. Naším cílem bylo připravit sgRNA, specifickou pro gen *Socs3*, která bude moct být spolu s Cas9 mRNA mikroinjikována do embryí.

sgRNA se skládá ze dvou částí. První je 20 nukleotidů dlouhá zacílovací sekvence, která je homologní s genem, který chceme ovlivnit. Druhá je sekvence pro vazbu s Cas9. Ta je přítomna v plasmidu pX330-U6-Chimeric BB-CBh-hSpCas9 a bylo k ní třeba vložit *Socs3*-specifickou první sekvenci. Plasmid pX330-U6-Chimeric BB-CBh-hSpCas9, vyizolovaný z kompetentních buněk byl linearizován enzymatickou reakcí. Úspěšnost linearizace byla zkontrolována na agarózovém gelu, přičemž linearizovaný plasmid měl očekávanou velikost 8500 bp (obrázek 35).



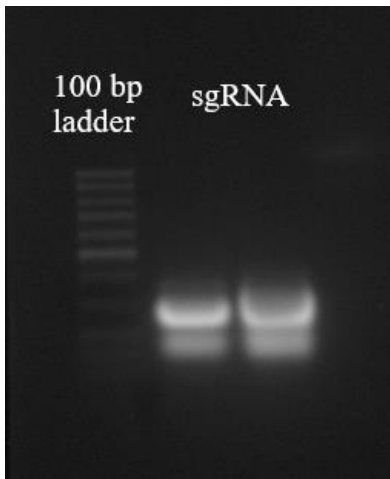
Obr. 35: Agarózový gel, zobrazující plasmid pX330-U6-Chimeric BB-CBh-hSpCas9 před a po enzymatickém štěpení.

Genově specifická část DNA pro sgRNA byla připravena hybridizací dvou 24 bp dlouhých oligo sekvencí. Po úspěšném rozštěpení plasmidu následovala ligační reakce. Během ní byl do naštěpeného plasmidu vložen připravený insert (hybridizovaná oligo sekvence) a takto upravený plasmid byl pomocí bakteriální transformace vložen do kompetentních buněk DH5 α . Z nich byl plasmid opětovně vyizolován a bylo třeba potvrdit, zda skutečně obsahuje požadovanou sekvenci, nesenou insertem. To bylo předběžně určeno pomocí PCR s primery v okolí místa vložení insertu a agarózového gelu (obr. 36). Kvůli malé délce insertu bylo velmi obtížné na agarózovém gelu určit, které PCR produkty jsou delší než produkt z původního plasmidu před vložení insertu. Přítomnost vložené sekvence byla následně potvrzena sekvenováním ve specializované firmě.



Obr. 36: Agarózový gel, zobrazující plasmid pX330-U6-Chimeric BB-CBh-hSpCas9 před a po ligační reakci.

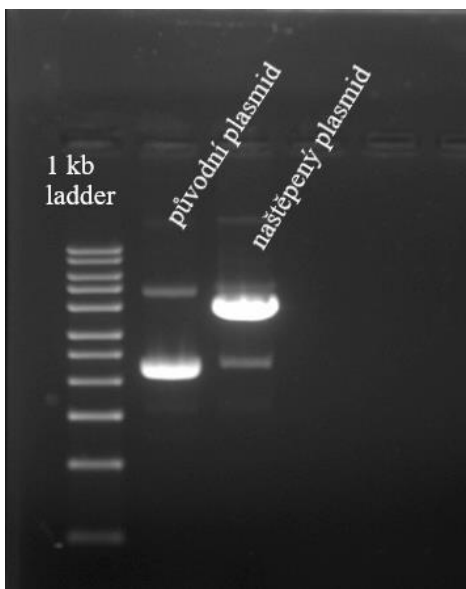
Po potvrzení, že byl do plasmidu skutečně vložen připravený insert, byla z plasmidu pomocí PCR reakce amplifikována část DNA, nesoucí celou sgRNA sekvenci, přičemž jeden z primerů obsahoval sekvenci rozeznávanou T7 polymerázou. Tato sekvence byla během PCR reakce přidána k amplifikovanému fragmentu DNA pro sgRNA. Vzniklá DNA byla následně *in vitro* transkribována do RNA, ta byla přečištěna, a její velikost byla zkontrolována gelovou elektroforézou (obrázek 37). Stejně jako v předchozí kapitole jsme využili DNA gel s použitím 1x TAE (a ne RNA-denaturující gel s použitím 1x BPTE), proto se dalo očekávat, že RNA může být přítomna v různých konformacích a proto tvořit více bandů na gelu. Usoudili jsme proto, že jsme úspěšně připravili *Socs3*-specifickou sgRNA, která bude společně s Cas9 mRNA mikroinjikována do embryí.



Obr. 37: Agarózový gel, zobrazující sgRNA, nasyntetizovanou podle DNA z plasmidu pX330-U6-Chimeric BB-CBh-hSpCas9 s vloženým insertem.

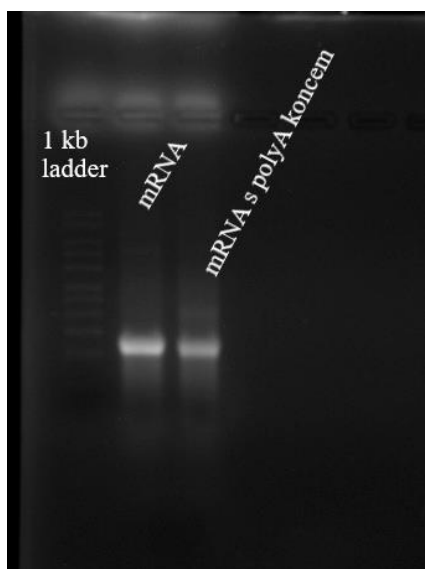
4.7 Příprava HA-tagované *Socs3* mRNA pro overexpresi *Socs3* genu

Naším posledním cílem bylo připravit HA-tagovanou *Socs3* mRNA, která bude po mikroinjikování do embryí sloužit pro overexpresi genu *Socs3* a jeho lokalizaci pomocí HA-tagu. Z kompetentních buněk Dh5 α byl vyizolován plasmid pRN3P:*Socs3*-HAN, nesoucí DNA pro HA-tagovanou *Socs3* mRNA a následně byl linearizován. Úspěšná linearizace plasmidu s délkou přibližně 4000 bp byla potvrzena pomocí gelové elektroforézy (obrázek 38).



Obr. 38: Agarózový gel, sloužící ke kontrole enzymatického štěpení plasmidu. Na obrázku je patrný výrazný rozdíl mezi původním a naštěpeným plasmidem.

Naštěpený plasmid byl přečištěn fenol-chloroformem a vzniklé produkty posloužily jako předloha pro in vitro transkripci, při které byla DNA plasmidu přepsána do mRNA. Poté k ní měl být za využití polyA-tailingu dosyntetizován polyA konec. Výsledná mRNA byla přečištěna fenol-chloroformem a z důvodu kontroly kvality, a také z důvodu vyvrácení její možné degradace byla zkontrolována gelovou elektroforézou (obrázek 39). Jak je ale patrné na obrázku 39, polyadenylační reakce se nezdařila, i když jinak mRNA působí intaktně a v pořádku. Protože byl použitý DNA ladder, nedá se použít pro přesné odečtení délky mRNA.



Obr. 39: Agarózový gel, zobrazující mRNA konstrukt, vzniklý in vitro transkripcí. Délky původní mRNA, a mRNA po syntéze polyA konce se téměř neliší. Z toho je patrné, že reakce neproběhla úspěšně.

Takto připravená *Socs3* mRNA bude v pozdějších experimentech mikroinjikována do myších embryí za účelem zjištění fenotypu po overexpresi genu *Socs3* a potenciálně lokalizace SOCS3 pomocí imunofluorescenčního barvení HA tagu.

5. Diskuse

Cílem této bakalářské práce bylo zjistit, zda má gen *Socs3* nějakou funkci v časném preimplantačním vývoji myších embryí. Role tohoto genu byla zatím zkoumána hlavně v kontextu celého prenatalního vývoje myšího embrya, a důležitost genu *Socs3* v pozdějších fázích embryonálního vývoje již byla potvrzena mnoha výzkumy. Podle publikovaných dat má *Socs3* vliv hlavně na vývoj fetální části placenty (Roberts et al., 2001; Takahashi et al., 2008; Robb et al., 2005). Dosud ale nebylo objasněno, jestli a případně jakou roli hraje v průběhu preimplantačního vývoje.

Hypotéza o možném vlivu *SOCS3* na preimplantační vývoj je podporována naší analýzou publikovaných RNA-seq dat (Zhang et al., 2016; Wang et al., 2018), která ukázala, že je gen *Socs3* hojně exprimován od stádia dvoubuněčného embrya až do doby prvního rozhodnutí o buněčném osudu, během kterého dojde k diferenciaci trofoektodermu a vnitřní masy buněk. Velmi zajímavá je také jeho následná exprese ve vnitřní mase buněk, která je několikanásobně vyšší než v buňkách trofoektodermu, a po downregulaci genu pro trofoektodermální transkripční faktor *TEAD4* je jeho exprese v buňkách více než 10-násobně upregulována (nepublikované výsledky z laboratoře). Naše analýza RNA-seq dat (Wang et al., 2018; Andergassen et al., 2017) také ukázala, že po implantaci embrya začne exprese genu *Socs3* stoupat v linii vedoucí k placentě a je tam vyšší než v somatických tkáních samotného embrya.

Publikovaný výzkum ukázal, že *pSTAT3* a *SOCS3* se navzájem regulují (Schmitz et al., 2000; Morgani & Brickman, 2015). S tím jsou v souladu RNA-seq data postimplantačních embryí (Andergassen et al. 2017), kde v linii vedoucí k placentě je také hojně exprimován gen *Stat3*, zatímco v embryonálních somatických tkáních je exprimován pouze do malé míry. To může souviset s tím, proč je delece genu *Socs3* fatální pro vývoj placenty, ale ne pro vývoj samotného embrya – v placentě je tak narušena rovnováha mezi *pSTAT3* a *SOCS3*. Naproti tomu v preimplantačním vývoji exprese *Socs3* nekoreluje s expresí *Stat3* a je proto možné, že je exprese *Socs3* regulována i nějak jinak. Také nevíme, proč je *Socs3* downregulován v trofoektodermu preimplantačních embryí.

Tato rozdílnost v hladinách exprese *SOCS3* mezi linií trofoektodermu a vnitřní masy buněk byla zkoumána pomocí imunofluorescenčního barvení *SOCS3* v myších embryích, zafixovaných v E3.5. Vzhledem k podstatně vyšší míře exprese tohoto genu ve vnitřní mase buněk se předpokládalo, že tento rozdíl budeme pozorovat také na úrovni proteinů. K tomu ale nedošlo, a i přes použití většího množství protilátek a testování několika postupů se nepodařilo pozorovat rozdíl mezi buňkami trofoektodermu a vnitřní masy buněk. Je možné,

že na proteinové úrovni není rozdíl v množství SOCS3, ale důvodem může být také nespecifické barvení primárními protilátkami, protože se nám nepodařilo potvrdit, zda barvení SOCS3 protilátkami, které pozorujeme, je specifické. Jako jedno z možných vysvětlení možné nespecificity se nabízela chyba, provedená v postupu fixace a barvení embryí, která ale byla vyvrácena zopakováním experimentu zkušenějším pracovníkem. Druhou možností bylo stáří většiny používaných protilátek a jejich degradace, ke které mohlo časem dojít, což ale nevysvětluje potenciální nespecificitu nově zakoupených protilátek. Jako řešení do budoucna by mohla sloužit optimalizace fixačního protokolu podle publikací, kde imunofluorescence SOCS3 fungovala.

Dalším provedeným experimentem bylo fluorescenční barvení pSTAT3. Důvodem k tomuto experimentu byla vzájemná provázanost STAT3 se SOCS3 a vzájemná regulace, ke které mezi nimi dochází. Fosforylovaný STAT3 v buněčných jádrech podporuje expresi Socs3 (Schmitz et al., 2000) a lze proto očekávat, že bude mít velmi podobný proteinový profil, jako SOCS3. Stejně jako u fluorescenčního barvení SOCS3 bylo i pro barvení pSTAT3 použito více protilátek. Ani tato barvení však neprobíhala specificky, a tudíž nebyly z tohoto experimentu získány žádné použitelné výsledky. Jedním z vysvětlení nefungujících protilátek bylo opět jejich možné znehodnocení stářím nebo neoptimální fixační postup.

Vzájemné regulace mezi pSTAT3 a SOCS3 bylo využito i v dalším experimentu, kdy experimentální embrya podstupovala část svého vývoje v médiu s přidaným pSTAT3 inhibítorem. Tento inhibitor způsoboval v embryích inhibici pSTAT3, a očekávali jsme, že následně bude vést k downregulaci Socs3. Protože předchozí nepublikovaná data z naší laboratoře ukázala, že downregulace Socs3 přes RNAi vedla ke zvýšené proliferaci v E3.5, očekávali jsme, že i pSTAT3 inhibice by mohla vést ke zvýšenému počtu buněk u inhibovaných embryí. To se ale nepotvrdilo. Použití obou inhibitorů mělo buď jen nepatrný vliv na počet buněk, nebo vedlo ke zpomalení vývoje a snížení celkového počtu buněk v embryích v závislosti na koncentraci a délce vystavení embryí inhibitoru. Při vysokých koncentracích docházelo u některých embryí dokonce k úplnému zastavení vývoje a k odumření. Je možné, že jsme použili příliš vysokou koncentraci inhibitoru, nebo byl negativní vliv na vývoj embryí způsoben i dalšími efekty downregulace pSTAT3 kromě potenciální inhibice exprese Socs3.

Zda pSTAT3 inhibice skutečně vede k downregulaci genu Socs3 jsme se pokusili ověřit pomocí imunofluorescenčního barvení SOCS3. V embryích, inhibovaných inhibítorem Cryptotanshinone, která měla nízkým počet buněk (do 19), docházelo k barvení jader, které se s narůstajícím počtem buněk postupně vytrácelo. Tento jev, pokud se jednalo o specifické

barvení, byl s největší pravděpodobností způsoben výrazným snižováním exprese Socs3 od stádia 8 buněk. Nepozorovali jsme ale snížení intenzity barvení SOCS3 po použití inhibitoru. Do budoucna by bylo vhodné ověřit snížení exprese Socs3 pomocí extrakce RNA, reverzní transkripce a real-time PCR.

Dále jsme delemovali gen Socs3 pomocí Cre ve speciálně připravené myší linii Socs3 fl/fl. Potvrdili jsme, že Cre mRNA je funkční a očekávali jsme, že důsledkem mikroinjikace mRNA konstruktů dojde v mikroinjikované blastomeře k delecii genu Socs3, která se přenesení do dceřiných buněk. Na základě předchozích dat z RNAi downregulace Socs3 naše hypotéza předpokládala, že klon buněk s downregulovaným Socs3, nebo celé embryo, by měly mít vyšší počet buněk než kontrolní embryo. Porovnání počtu buněk v mikroinjikovaných a v kontrolních embryích naopak ukázalo snížení počtu buněk v mikroinjikovaných embryích oproti kontrolám. Jednalo se ale pouze o jeden experiment a je třeba ho zopakovat.

Jako příprava pro budoucí experimenty byla nasyntetizována genově specifická sgRNA, sloužící k delecii Socs3 pomocí CRISPR/Cas9 systému a HA-tagovaná Socs3 mRNA pro upregulaci Socs3. Oba tyto konstrukty budou využity při dalším zkoumání vlivu genu Socs3 na preimplantační vývoj myších embryí ve stádiu prvního rozhodnutí o buněčném osudu. Tento další výzkum jistě poskytne velmi zajímavé výsledky a nové poznatky o časném embryonálním vývoji.

Budoucí výzkumy tohoto genu by mohly být zaměřeny také na jeho roli při druhém rozhodnutí o buněčném osudu, tedy na období segregace primitivního endodermu a epiblastu, zejména v kontextu role SOCS3 při regulaci pluripotence a diferenciaci embryonálních kmenových buněk (Forrai et al., 2006; Li et al., 2005).

6. Seznam literatury

- Abe, K. -ichiro, Funaya, S., Tsukioka, D., Kawamura, M., Suzuki, Y., Suzuki, M. G., Schultz, R. M., & Aoki, F. (2018). Minor zygotic gene activation is essential for mouse preimplantation development. *Proceedings Of The National Academy Of Sciences*, 115(29), E6780-E6788. <https://doi.org/10.1073/pnas.1804309115>
- 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>
- Andergassen, D., Dotter, C. P., Wenzel, D., Sigl, V., Bammer, P. C., Muckenhuber, M., Mayer, D., Kulinski, T. M., Theussl, H. -C., Penninger, J. M., Bock, C., Barlow, D. P., Pauler, F. M., & Hudson, Q. J. (2017). Mapping the mouse Allelome reveals tissue-specific regulation of allelic expression. *Elife*, 6. <https://doi.org/10.7554/eLife.25125>
- Avilion, A. A., Nicolis, S., Pevny, L., Perez, L., Vivian, N., & Lovell-Badge, R. (2003). Multipotent cell lineages in early mouse development depend on SOX2 function [Online]. *Genes & Development*, 17(1), 126-140. <https://doi.org/10.1101/gad.224503>
- Cacalano, N. A., Sanden, D., & Johnston, J. A. (2001). Tyrosine-phosphorylated SOCS-3 inhibits STAT activation but binds to p120 RasGAP and activates Ras. *Nature Cell Biology*, 3(5), 460-465. <https://doi.org/10.1038/35074525>
- Cockburn, K., & Rossant, J. (2010). Making the blastocyst: lessons from the mouse [Online]. *Journal Of Clinical Investigation*, 120(4), 995-1003. <https://doi.org/10.1172/JCI41229>
- Cooney, R. N. (2002). Suppressors of Cytokine Signaling (SOCS): Inhibitors of the JAK/STAT Pathway. *Shock*, 17(2), 83-90. <https://doi.org/10.1097/00024382-200202000-00001>
- Do, D. V., Ueda, J., Messerschmidt, D. M., Lorthongpanich, C., Zhou, Y., Feng, B., Guo, G., Lin, P. J., Hossain, M. Z., Zhang, W., Moh, A., Wu, Q., Robson, P., Ng, H. H., Poellinger, L., Knowles, B. B., Solter, D., & Fu, X. -Y. (2013). A genetic and developmental pathway from STAT3 to the OCT4-NANOG circuit is essential for maintenance of ICM lineages in vivo. *Genes & Development*, 27(12), 1378-1390. <https://doi.org/10.1101/gad.221176.113>
- Emery, B., Merson, T. D., Snell, C., Young, K. M., Ernst, M., & Kilpatrick, T. J. (2006). SOCS3 negatively regulates LIF signaling in neural precursor cells. *Molecular And Cellular Neuroscience*, 31(4), 739-747. <https://doi.org/10.1016/j.mcn.2006.01.005>
- Forrai, A., Boyle, K., Hart, A. H., Hartley, L., Rakar, S., Willson, T. A., et al. (2006). Absence of Suppressor of Cytokine Signalling 3 Reduces Self-Renewal and Promotes Differentiation in Murine Embryonic Stem Cells [Online]. *Stem Cells*, 24(3), 604-614. <https://doi.org/10.1634/stemcells.2005-0323>
- Graham, S. J. L., & Zernicka-Goetz, M. (2016). The Acquisition of Cell Fate in Mouse Development [Online]. In *Essays on Developmental Biology, Part B* (pp. 671-695). Elsevier. <https://doi.org/10.1016/bs.ctdb.2015.11.021>

- Haan, S., Ferguson, P., Sommer, U., Hiremath, M., McVicar, D. W., Heinrich, P. C., Johnston, J. A., & Cacalano, N. A. (2003). Tyrosine Phosphorylation Disrupts Elongin Interaction and Accelerates SOCS3 Degradation. *Journal Of Biological Chemistry*, 278(34), 31972-31979. <https://doi.org/10.1074/jbc.M303170200>
- Hansen, J. A., Lindberg, K., Hilton, D. J., Nielsen, J. H., & Billestrup, N. (1999). Mechanism of Inhibition of Growth Hormone Receptor Signaling by Suppressor of Cytokine Signaling Proteins. *Molecular Endocrinology*, 13(11), 1832-1843. <https://doi.org/10.1210/me.13.11.1832>
- Hilton, D. J., Richardson, R. T., Alexander, W. S., Viney, E. M., Willson, T. A., Sprigg, N. S., Starr, R., Nicholson, S. E., Metcalf, D., & Nicola, N. A. (1998). Twenty proteins containing a C-terminal SOCS box form five structural classes. *Proceedings Of The National Academy Of Sciences*, 95(1), 114-119. <https://doi.org/10.1073/pnas.95.1.114>
- Hirate, Y., Hirahara, S., Inoue, K. -ichi, Suzuki, A., Alarcon, V. B., Akimoto, K., et al. (2013). Polarity-Dependent Distribution of Angiomotin Localizes Hippo Signaling in Preimplantation Embryos [Online]. *Current Biology*, 23(13), 1181-1194. <https://doi.org/10.1016/j.cub.2013.05.014>
- Chazaud, C., & Yamanaka, Y. (2016). Lineage specification in the mouse preimplantation embryo [Online]. *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 [Online]. *Developmental Cell*, 10(5), 615-624. <https://doi.org/10.1016/j.devcel.2006.02.020>
- Johnson, M. H., Pratt, H. P. & Handyside, A. H. 1981. The generation and recognition of positional information in the preimplantation mouse embryo. In: Cellular and Molecular Aspects of Implantation (eds S. R. Glasser & D. W. Bullock), pp. 55– 74. Plenum Press, New York.
- Kelley, R. L., & Gardner, D. K. (2017). Addition of interleukin-6 to mouse embryo culture increases blastocyst cell number and influences the inner cell mass to trophectoderm ratio. *Clinical And Experimental Reproductive Medicine*, 44(3), 119-125. <https://doi.org/10.5653/cerm.2017.44.3.119>
- Kim D, Langmead B and Salzberg SL. [HISAT: a fast spliced aligner with low memory requirements.](#) *Nature Methods* 2015
- Kim, D., Paggi, J.M., Park, C. et al. [Graph-based genome alignment and genotyping with HISAT2 and HISAT-genotype.](#) *Nat Biotechnol* **37**, 907–915 (2019).
- Leonard, W. J. (2001). Role of Jak Kinases and STATs in Cytokine Signal Transduction. *International Journal Of Hematology*, 73(3), 271-277. <https://doi.org/10.1007/BF02981951>

- Leung, C. Y., & Zernicka-Goetz, M. (2013). Angiomotin prevents pluripotent lineage differentiation in mouse embryos via Hippo pathway-dependent and -independent mechanisms [Online]. *Nature Communications*, 4(1). <https://doi.org/10.1038/ncomms3251>
- Li, L., Lu, X., & Dean, J. (2013). The maternal to zygotic transition in mammals. *Molecular Aspects Of Medicine*, 34(5), 919-938. <https://doi.org/10.1016/j.mam.2013.01.003>
- Li, Y., McClintick, J., Zhong, L., Edenberg, H. J., Yoder, M. C., & Chan, R. J. (2005). Murine embryonic stem cell differentiation is promoted by SOCS-3 and inhibited by the zinc finger transcription factor Klf4. *Blood*, 105(2), 635-637. <https://doi.org/10.1182/blood-2004-07-2681>
- Lokken, A. A., & Ralston, A. (2016). The Genetic Regulation of Cell Fate During Preimplantation Mouse Development [Online]. In *Mammalian Preimplantation Development* (pp. 173-202). Elsevier. <https://doi.org/10.1016/bs.ctdb.2016.04.006>
- Mihajlović, A. I., & Bruce, A. W. (2017). The first cell-fate decision of mouse preimplantation embryo development: integrating cell position and polarity [Online]. *Open Biology*, 7(11). <https://doi.org/10.1098/rsob.170210>
- Morgani, S. M., & Brickman, J. M. (2015). LIF supports primitive endoderm expansion during pre-implantation development. *Development*, 142(20), 3488-3499. <https://doi.org/10.1242/dev.125021>
- Nicholson, S. E., De Souza, D., Fabri, L. J., Corbin, J., Willson, T. A., Zhang, J. -G., Silva, A., Asimakis, M., Farley, A., Nash, A. D., Metcalf, D., Hilton, D. J., Nicola, N. A., & Baca, M. (2000). Suppressor of cytokine signaling-3 preferentially binds to the SHP-2-binding site on the shared cytokine receptor subunit gp130. *Proceedings Of The National Academy Of Sciences*, 97(12), 6493-6498. <https://doi.org/10.1073/pnas.100135197>
- Nishioka, N., Inoue, K. -ichi, Adachi, K., Kiyonari, H., Ota, M., Ralston, A., et al. (2009). The Hippo Signaling Pathway Components Lats and Yap Pattern Tead4 Activity to Distinguish Mouse Trophectoderm from Inner Cell Mass [Online]. *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., et al. (2008). Tead4 is required for specification of trophectoderm in pre-implantation mouse embryos [Online]. *Mechanisms Of Development*, 125(3-4), 270-283. <https://doi.org/10.1016/j.mod.2007.11.002>
- Pertea M, Kim D, Pertea G, Leek JT and Salzberg SL. [Transcript-level expression analysis of RNA-seq experiments with HISAT, StringTie and Ballgown](#). *Nature Protocols* 2016
- Plusa, B., Piliszek, A., Frankenberg, S., Artus, J., & Hadjantonakis, A. -K. (2008). Distinct sequential cell behaviours direct primitive endoderm formation in the mouse blastocyst [Online]. *Development*, 135(18), 3081-3091. <https://doi.org/10.1242/dev.021519>

- Robb, L., Boyle, K., Rakar, S., Hartley, L., Lochland, J., Roberts, A. W., Alexander, W. S., & Metcalf, D. (2005). Genetic reduction of embryonic leukemia-inhibitory factor production rescues placentation in SOCS3-null embryos but does not prevent inflammatory disease. *Proceedings Of The National Academy Of Sciences*, 102(45), 16333-16338. <https://doi.org/10.1073/pnas.0508023102>
- Roberts, A. W., Robb, L., Rakar, S., Hartley, L., Cluse, L., Nicola, N. A., Metcalf, D., Hilton, D. J., & Alexander, W. S. (2001). Placental defects and embryonic lethality in mice lacking suppressor of cytokine signaling 3. *Proceedings Of The National Academy Of Sciences*, 98(16), 9324-9329. <https://doi.org/10.1073/pnas.161271798>
- Sands, W. A., Woolson, H. D., Milne, G. R., Rutherford, C., & Palmer, T. M. (2006). Exchange Protein Activated by Cyclic AMP (Epac)-Mediated Induction of Suppressor of Cytokine Signaling 3 (SOCS-3) in Vascular Endothelial Cells. *Molecular And Cellular Biology*, 26(17), 6333-6346. <https://doi.org/10.1128/MCB.00207-06>
- Sasaki, H. (2010). Mechanisms of trophoctoderm fate specification in preimplantation mouse development [Online]. *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 [Online]. *Development, Growth & Differentiation*, 59(1), 12-20. <https://doi.org/10.1111/dgd.12335>
- Schmitz, J., Weissenbach, M., Haan, S., Heinrich, P. C., & Schaper, F. (2000). SOCS3 Exerts Its Inhibitory Function on Interleukin-6 Signal Transduction through the SHP2 Recruitment Site of gp130. *Journal Of Biological Chemistry*, 275(17), 12848-12856. <https://doi.org/10.1074/jbc.275.17.12848>
- Schultz, R. M. (1993). Regulation of zygotic gene activation in the mouse [Online]. *Bioessays*, 15(8), 531-538. <https://doi.org/10.1002/bies.950150806>
- Schultz, R. M. (2002). The molecular foundations of the maternal to zygotic transition in the preimplantation embryo [Online]. *Human Reproduction Update*, 8(4), 323-331. <https://doi.org/10.1093/humupd/8.4.323>
- 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 trophoctoderm in the mouse blastocyst [Online]. *Development*, 132(9), 2093-2102. <https://doi.org/10.1242/dev.01801>
- Stuart, H. T., van Oosten, A. L., Radzisheuskaya, A., Martello, G., Miller, A., Dietmann, S., Nichols, J., & Silva, J. C. R. (2014). NANOG Amplifies STAT3 Activation and They Synergistically Induce the Naive Pluripotent Program. *Current Biology*, 24(3), 340-346. <https://doi.org/10.1016/j.cub.2013.12.040>
- Takahashi, Y., Carpino, N., Cross, J. C., Torres, M., Parganas, E., & Ihle, J. N. (2003). SOCS3: an essential regulator of LIF receptor signaling in trophoblast giant cell differentiation. *The Embo Journal*, 22(3), 372-384. <https://doi.org/10.1093/emboj/cdg057>

- Takahashi, Y., Dominici, M., Swift, J., Nagy, C., & Ihle, J. N. (2006). Trophoblast Stem Cells Rescue Placental Defect in SOCS3-deficient Mice. *Journal Of Biological Chemistry*, 281(17), 11444-11445. <https://doi.org/10.1074/jbc.C600015200>
- Takahashi, Y., Takahashi, M., Carpino, N., Jou, S. -T., Chao, J. -R., Tanaka, S., Shigeyoshi, Y., Parganas, E., & Ihle, J. N. (2008). Leukemia Inhibitory Factor Regulates Trophoblast Giant Cell Differentiation via Janus Kinase 1-Signal Transducer and Activator of Transcription 3-Suppressor of Cytokine Signaling 3 Pathway. *Molecular Endocrinology*, 22(7), 1673-1681. <https://doi.org/10.1210/me.2008-0058>
- Takeda, K., Noguchi, K., Shi, W., Tanaka, T., Matsumoto, M., Yoshida, N., Kishimoto, T., & Akira, S. (1997). Targeted disruption of the mouse Stat3 gene leads to early embryonic lethality. *Proceedings Of The National Academy Of Sciences*, 94(8), 3801-3804. <https://doi.org/10.1073/pnas.94.8.3801>
- Tarkowski, A. K. & Wroblewska, J. 1967. Development of blastomeres of mouse eggs isolated at the 4- and 8-cell stage. *J. Embryol. Exp. Morphol.*, 18, 155–180.
- Wang, C., Liu, X., Gao, Y., Yang, L., Li, C., Liu, W., Chen, C., Kou, X., Zhao, Y., Chen, J., Wang, Y., Le, R., Wang, H., Duan, T., Zhang, Y., & Gao, S. (2018). Reprogramming of H3K9me3-dependent heterochromatin during mammalian embryo development. *Nature Cell Biology*, 20(5), 620-631. <https://doi.org/10.1038/s41556-018-0093-4>
- White, M. D., Zenker, J., Bissiere, S., & Plachta, N. (2018). Instructions for Assembling the Early Mammalian Embryo [Online]. *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 [Online]. *Plos Genetics*, 10(10). <https://doi.org/10.1371/journal.pgen.1004618>
- Wong, Y. Q., Xu, H., Wu, Q., Liu, X., Lufei, C., Xu, X. Q., & Fu, X. -Y. (2018). STAT3-Inducible Mouse ESCs: A Model to Study the Role of STAT3 in ESC Maintenance and Lineage Differentiation. *Stem Cells International*, 2018, 1-13. <https://doi.org/10.1155/2018/8632950>
- Yarwood, S. J., Borland, G., Sands, W. A., & Palmer, T. M. (2008). Identification of CCAAT/Enhancer-binding Proteins as Exchange Protein Activated by cAMP-activated Transcription Factors That Mediate the Induction of the SOCS-3 Gene. *Journal Of Biological Chemistry*, 283(11), 6843-6853. <https://doi.org/10.1074/jbc.M710342200>
- Zhang, B., Zheng, H., Huang, B., Li, W., Xiang, Y., Peng, X., Ming, J., Wu, X., Zhang, Y., Xu, Q., Liu, W., Kou, X., Zhao, Y., He, W., Li, C., Chen, B., Li, Y., Wang, Q., Ma, J., et al. (2016). Allelic reprogramming of the histone modification H3K4me3 in early mammalian development. *Nature*, 537(7621), 553-557. <https://doi.org/10.1038/nature19361>