

UNIVERZITA KARLOVA V PRAZE PŘÍRODOVĚDECKÁ FAKULTA

KATEDRA BUNĚČNÉ A VÝVOJOVÉ BIOLOGIE

STUDIJNÍ PROGRAM: BIOLOGIE (B1501)

STUDIJNÍ OBOR: BBI (1501R001)



BAKALÁŘSKÁ PRÁCE

PRODUKCE A VÝVOJ HAPLOIDNÍCH EMBRYÍ MYŠI

PRODUCTION AND DEVELOPMENT OF HAPLOID MOUSE EMBRYOS

DOMINIKA JETTMAROVÁ

VEDOUcí PRÁCE: ING. JOSEF FULKA, DRSC.

PRAHA 2016

Prohlášení

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

Praha 11. 5. 2016

Dominika Jettmarová

Abstrakt

Přehledová bakalářská práce se zabývá dosavadními poznatky o haploidních embryích, určených pro derivaci haploidních embryonálních kmenových buněk. Hlavním tématem literární rešerše jsou metody produkce haploidních blastocyst laboratorní myši (*Mus musculus*) a zvláštnosti jejich vývoje.

Haploidní blastocysty mohou být připraveny parthenogeneticky, gynogeneticky nebo androgeneticky. Vývoj haploidních embryí bývá zřetelně odlišný od vývoje diploidních embryí. Dělení blastomer jsou zpožděna v řádu hodin a úspěšnost dosažení stádia blastocysty je nízká. Příčinou narušeného vývoje haploidních embryí by mohla být nedostatečná aktivace a/nebo nestandardní genová exprese. Navazující práce, využívající monitorovací systém Primo Vision, je přiblížena v experimentální části.

Znalost tématu je zásadní pro zefektivnění produkce haploidních blastocyst a odvození stabilních linií haploidních embryonálních kmenových buněk pro další biologický a medicínský výzkum.

Klíčová slova: embryo, haploidní, parthenogenese, gynogenese, androgenese.

Abstract

This bachelor thesis summarizes current knowledge of haploid embryos that are used for haploid embryonic stem cell derivation. The subject matter of this background research are production methods of haploid blastocysts of mice (*Mus musculus*) and the particularities of their development.

Haploid blastocysts can be prepared parthenogenetically, gynogenetically or androgenetically. The development of haploid embryos is substantially different from the development of diploid embryos. The division of blastomeres is delayed by several hours and the success rate of development to blastocysts is low. The reason for the impaired development of haploid embryos is hypothesized to be improper activation and/or non-standard gene expression. The follow-up study that utilizes the Primo Vision monitoring system is described in the experimental part.

Knowledge of this topic is crucial to raising the effectiveness of haploid blastocyst production and derivation of stable haploid embryonic stem cell lines for further biological and medical research.

Keywords: embryo, haploid, parthenogenesis, gynogenesis, androgenesis.

Obsah

Seznam zkratk	I
I Úvod	1
II Literární přehled	2
1 Produkce haploidních embryí myši	2
1.1 Parthenogenese	2
1.2 Gynogenese	5
1.3 Androgenese	6
2 Srovnání vývoje haploidních a diploidních embryí myši	7
2.1 Vývoj parthenogenetických haploidních embryí myši	7
2.1.1 Nukleocytoplasmatický poměr	7
2.1.2 Centrioly a mitotické vřeténko	8
2.1.3 Mitotické dělení	9
2.1.4 Vlastnosti a počet blastomer	10
2.1.5 Genová exprese	11
2.1.6 Postimplantační vývoj	11
2.2 Vývoj gynogenetických a androgenetických embryí myši	12
2.2.1 Preimplantační vývoj	12
2.2.2 Postimplantační vývoj a chiméry	13
2.2.3 DNA methylace a genomický imprinting	15
2.2.4 Inaktivace X chromosomu	17
2.3 Vývoj parthenogenetických diploidních embryí myši	19
2.3.1 Ultrastruktura embryí	19
2.3.2 Postimplantační vývoj	20
III Experimentální část	21
2.4 Monitorování vývoje embryí	21
2.5 Materiál a metody	21
2.6 Výsledky a diskuse	22
IV Závěr	24
Seznam literatury	25

Seznam zkratek

5mC	5-methyl cytosin
6-DMAP	6-dimethyl aminopurin
AG-haESCs	androgetické haploidní embryonální kmenové buňky
cAMP	cyklický adenosin monofosfát
CB	cytochalasin B
CD	cytochalasin D
DMR	odlišně methylovaná oblast – differentially methylated region
GG-haESCs	gynogenetické haploidní embryonální kmenové buňky
hCG	lidský choriový gonadotropin – human chorionic gonadotropin
HTF	lidská tubární tekutina – human tubal fluid
ICM	embryoblast, vnitřní buněčná masa – inner cell mass
ICSI	intracytoplasmatická injekce spermie
KSOM	draslíkem obohacené jednoduché optimalizované médium – potassium simplex optimized medium
NADH	redukovaný nikotinamid adenin dinukleotid
PG-haESCs	parthenogenetické haploidní embryonální kmenové buňky
PMSG	gonadotropin séra březích klisen – pregnant mare serum gonadotropin

Úvod

Haploidní embrya a haploidní embryonální kmenové buňky obsahují jen jednu sadu chromosomů – maternální, nebo paternální. To znamená, že jim chybí druhá alela každého genu, která by maskovala mutace a recesivní vlohy.

V biomedicínském výzkumu jsou proto haploidní embryonální kmenové buňky značným přínosem. Poloviční karyotyp, ve spojení s vlastnostmi a využitelností embryonálních kmenových buněk, usnadňuje a zrychluje techniky genetické modifikace a analýzy. Kvůli svým vývojovým odchylkám jsou haploidní embrya velmi zajímavá nejen pro zkoumání samotných genů, ale také pro studium epigenetických mechanismů (shrnuto v Horii a Hatada, 2015).

Rozlišují se tři základní druhy haploidních embryonálních buněk, podle původu jejich genomu: partenogenetické haploidní embryonální kmenové buňky (PG-haESCs), derivované z blastocyst připravených pouhou aktivací oocyty, gynogenetické haploidní embryonální kmenové buňky (GG-haESCs) a androgenetické haploidní embryonální kmenové buňky (AG-haESCs), získané z oplozených oocytů, na jejichž vývoji se podílelo pouze samičí, respektive samčí prvořád.

Jedny z prvních odvozených obratlovčích haploidních embryonálních kmenových buněk byly žabí (*Rana pipiens*) AG-haESCs (Freed a Mezger-Freed, 1970), po téměř čtyřiceti letech následovaly rybí (*Oryzias latipes*) GG-haESCs (Yi *et al.*, 2009). Velký zájem byl a stále je o haploidní buňky myši (*Mus musculus*), jednoho z nejpoužívanějších laboratorních savců. Zpočátku byl problém udržet kmenové buňky v haploidním stavu, spontánně diploidizovaly (Kaufman *et al.*, 1983). Později se vědecké týmy k pokusům vrátili a ustanovily linie PG-haESCs (Elling *et al.*, 2011; Leeb a Wutz, 2011), AG-haESCs (Li *et al.*, 2012; Yang *et al.*, 2012) a GG-haESCs (Kobayashi a Yoshida, 2015), zachovávající jednu sadu chromosomů i po mnohonásobném pasážování. Další získané savčí haploidní kmenové buňky byly krysí (*Rattus norvegicus*) AG-haESCs (Li *et al.*, 2013) a opičí (*Macaca fascicularis*) PG-haESCs (Yang *et al.*, 2013). Vzhledem k úspěšné derivaci u primáta byl očekáván úspěch i u člověka. V březnu 2016 se poprvé podařilo připravit lidské parthenogenetické haploidní embryonální kmenové buňky (Sagi *et al.*, 2016).

Pro derivaci embryonálních kmenových buněk je nutné nejprve vytvořit blastocysty. Důvody zpoždění dělení blastomer haploidních embryí a faktory ovlivňující přeměnu v blastocystu nejsou dosud dostatečně známy. Cílem této bakalářské práce je shrnout metody přípravy parthenogenetických, gynogenetických a androgenetických blastocyst myši, popsat zvláštnosti ve vývoji haploidních embryí a diskutovat jejich možné příčiny. Použité obrázky byly vytvořeny autorkou práce.

Literární přehled

1 Produkce haploidních embryí myši

Rozmnožování myši (*Mus musculus*) typicky probíhá splynutím haploidní samičí pohlavní buňky, oocytu, s haploidní samčí pohlavní buňkou, spermií. Vznikne diploidní zygota, která se mitoticky dělí a zachovává si dvě sady chromosomů, každou od jednoho z rodičů.

Uniparentální embrya obsahují pouze maternální, nebo pouze paternální genom, pocházející jen od jednoho rodiče. Podle metody přípravy se dělí na tři hlavní skupiny: parthenogenetická, gynogenetická a androgenetická.

Parthenogenetická embrya vznikají bez oplození, samotnou aktivací oocytu v metafázi II. Obsahují tedy jednu, v případě diploidizace dvě maternální sady chromosomů. Pro vytvoření gynogenetických embryí jsou oocyty oplozeny spermií a poté je jim odebráno samčí prvojádro. Androgenetická embrya se obdobně vytvářejí odebráním samičího prvojádra před, nebo po oplození oocytu. Oplození může být zajištěno přirozenou cestou, nebo *in vitro* fertilizací, při které je oocyt ponechán ve vysoké koncentraci spermií (Kono *et al.*, 1993), nebo častěji intracytoplasmatickou injekcí spermie (ICSI), kdy je do oocytu vnesena vybraná samčí pohlavní buňka mikromanipulační technikou (Latham *et al.*, 2002).

Zkráceně je pro parthenogenetická embrya používán název parthenogenony (z britské literatury, obdobně gynogenon a androgenon), v americké literatuře se označují jako parthenoty (Kaufman, 1983).

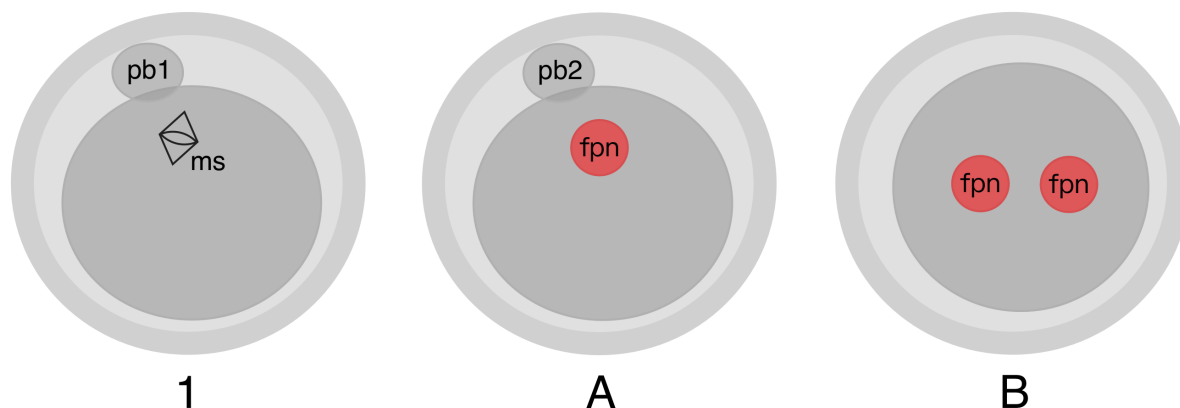
1.1 Parthenogenese

Ekvivalenty řeckého výrazu parthenogenese jsou v češtině samobřezost a pannobřezost. Jak název napovídá, zárodek je vytvořen bez účasti druhého pohlaví, bez oplození. Některé rostliny a bezobratlí se nepohlavně rozmnožují běžně, ale u obratlovců (některé paryby, ryby, obojživelníci a plazi) se parthenogenese vyskytuje zřídka a u savců pravděpodobně vůbec.

Metody parthenogenetické aktivace se uplatňují i při studiu embryí člověka. Takový přístup je navíc eticky méně kontroverzní než jiné techniky, neboť se při něm nemanipuluje s životaschopnými lidskými jedinci (Bos-Mikich *et al.*, 2016).

Přirozeně se oocyty v metafázi aktivují k dalšímu vývoji oplozením spermií. Ta vyvolá, prostřednictvím fosfolipasy C zeta (Saunders *et al.*, 2002), zvýšení koncentrace vápenatých iontů v cytoplasmě. Po opakovaném snižování a zvyšování koncentrace vápníku následuje mnoho dalších reakcí, především dokončení meiotického dělení. Metody

umělé aktivace se snaží tuto takzvanou vápníkovou oscilaci, trvající u myši 3–4 hodiny, vyvolat či napodobit (shrnuto v Machaty, 2016).



Obrázek 1: Parthenogenetická aktivace. **1:** Oocyt v metafázi II po prvním meiotickém dělení. **A:** Haploidní embryo po parthenogenetické aktivaci. **B:** Diploidní embryo po parthenogenetické aktivaci se zabráněním vytvoření druhého pólového tělíška. pb1, první pólové tělíško; ms, meiotické vřeténko; pb2, druhé pólové tělíško; fpn, samičí prvojádru.

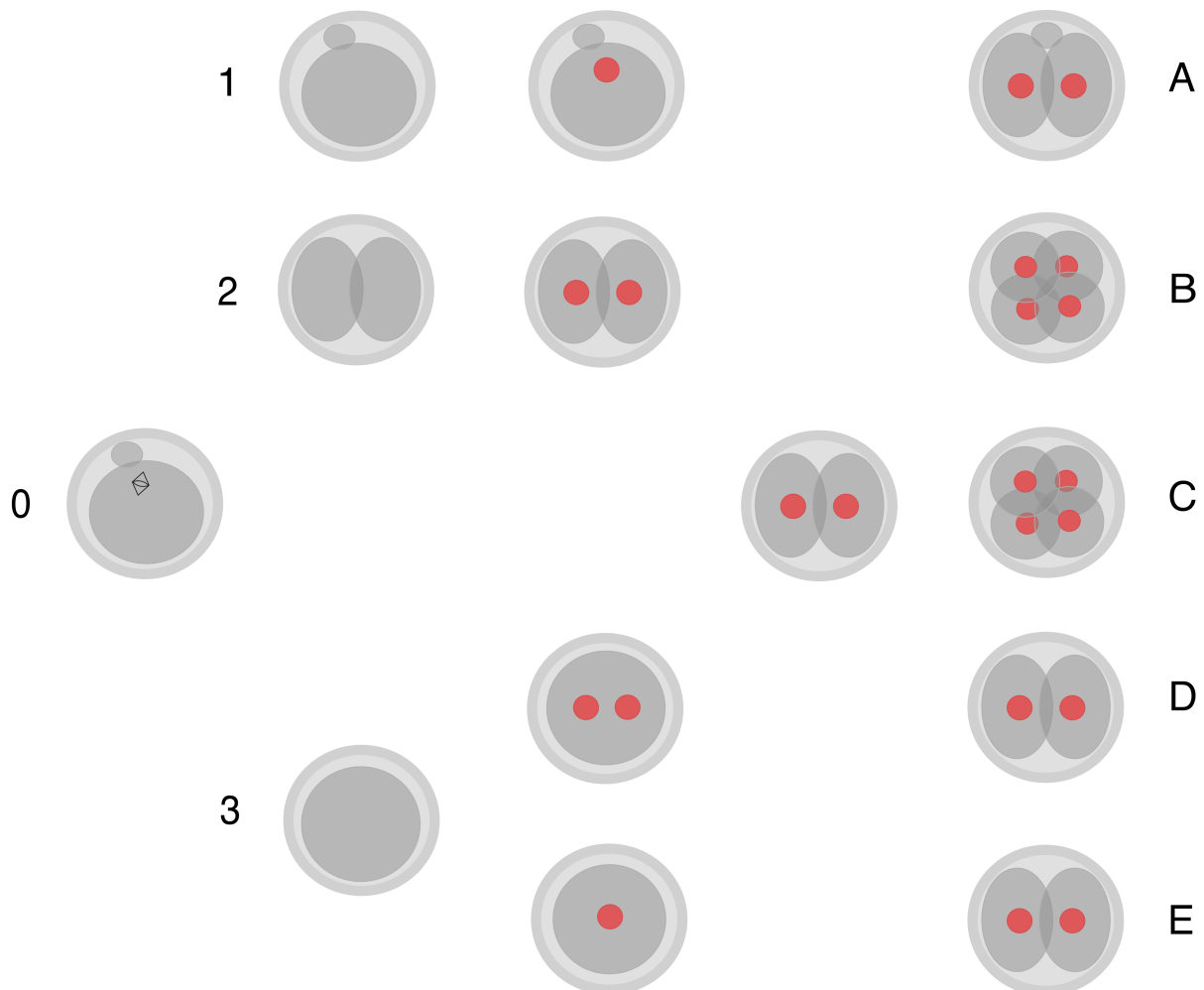
Zpočátku se pro parthenogenetickou aktivaci používaly *in situ* postupy, například působení elektrošoku na ampullu vejcovodu. Úspěšnost se pohybovala kolem 50 % a výsledkem byla především haploidní embrya (Witkowska, 1973). Jedno z takto vytvořených embryí se vyvíjelo až do stádia osmi somitů, ale odhaduje se – protože se u něj během pokusu neověřoval karyotyp –, že se zrovna jednalo o diploidního jedince (Tarkowski *et al.*, 1970).

Aktivace chladem (cold-shock), další z dříve testovaných *in situ* technik, na myší oocyty nefunguje. Avšak zahřívání (heat-shock) vaječnicků a vejcovodů 44–45 °C teplou vodou po dobu 5–10 minut je aktivovat dokáže (Braden a Austin, 1954). Heat-shock metodu je možné použít *in vitro*, aby se dala lépe zajistit požadovaná teplota působící na jednotlivé oocyty. Ani tak ale není tento postup získávání parthenogenetických embryí příliš vhodný, neboť velká část z aktivovaných oocytů bývá poškozená (Komar, 1973). Úspěšnost *in situ* metod může ovlivnit použité anestetikum, které samo dokáže aktivaci vyvolat. Tento účinek byl popsán u etheru (Braden a Austin, 1954) nebo avertinu, u něhož, pokud bylo podání vhodně načasováno, byla pozorována aktivace téměř poloviny oocytů (Kaufman, 1975).

Příkladem velmi efektivní chemické aktivace je použití 7% ethanolu, který však u téměř pětiny embryí způsoboval aneuploidie (Kaufman, 1982). Další z mnoha látek s prokázaným pozitivním vlivem na aktivaci jsou například cykloheximid a puromycin (Siracusa *et al.*, 1978), kalcium ionofory (Steinhardt *et al.*, 1974), oblíbené při manipulaci s lidskými oocyty (Sagi *et al.*, 2016; Yanagida *et al.*, 2008), nebo hyaluronidasa, používaná k odstranění kumulárních buněk (Graham, 1970; Kaufman, 1973a). Stroncium chlorid (SrCl_2) je v současné době nejpoužívanější látkou k aktivaci oocytů myši.

Na rozdíl od většiny metod vyvolává vápníkovou oscilaci (Bos-Mikich *et al.*, 1995).

Pro získání většího počtu diploidních parthenogenonů je třeba zabránit vydělení pólóvého tělíska, případně zamezit prvnímu dělení. Tento účel plní například cytochalasin B a D (CB, CD), inhibující polymerizaci aktinových filament (shrnuto v Kaufman, 1983; Liu *et al.*, 2002), nebo 6-dimethyl aminopurin (6-DMAP, Hu *et al.*, 2015a).



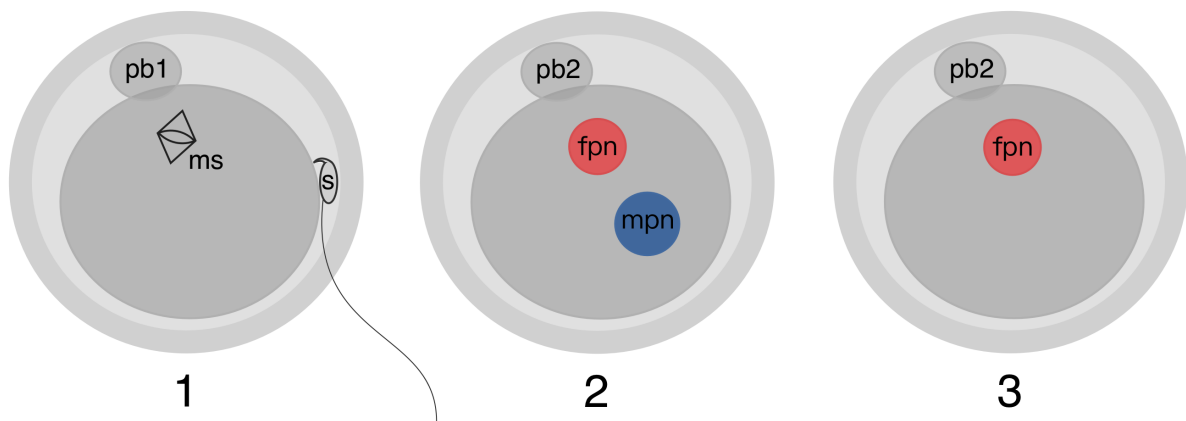
Obrázek 2: Schéma vývoje po parthenogenetické aktivaci. **0:** Ovulovaný oocyt před aktivací, ve druhé metafázi s prvním pólóvým tělískem a druhým meiotickým vřeténkem. **1A:** Vydělení druhého pólóvého tělíska po druhém meiotickém dělení, jedno haploidní prvojádro, haploidní embryo. **2B:** Immediate cleavage, jedno haploidní prvojádro v každé blastomeře, mosaikové haploidní embryo. **3C:** Nevydělení druhého pólóvého tělíska, dvě haploidní prvojádra, delayed immediate cleavage, mosaikové haploidní embryo. **3D:** Nevydělení druhého pólóvého tělíska, dvě haploidní prvojádra, diploidní embryo. **3E:** Nevydělení druhého pólóvého tělíska, jedno diploidní prvojádro, diploidní embryo. Podle Kaufman, 1976.

Obvyklé výsledky parthenogenetické aktivace a následujícího mitotického dělení jsou znázorněny na obrázku 2. Nejčastější z nich je vydělení druhého pólóvého tělíska a vývoj v haploidní embryo, blíže popsán na obrázku 1. Jedna z odchylek od očekávaného vývoje je například immediate cleavage (Braden a Austin, 1954), kdy je pólóvé tělísko nápadně zvětšeno, takže připomíná hlavní vaječnou buňku a analogicky se i vyvíjí.

Jelikož při prvním meiotickém dělení došlo ke crossing-overu, nejsou tyto dvě blastomery geneticky zcela identické (Kaufman, 1978). Stává se tak hlavně u pozdě aktivovaných, přestárlých oocytů. Pro představu, pokud je aktivace hyaluronidasou provedena po 13 hodinách po ovulaci, může být podíl těchto chimér až 60 %. Úspěšnost aktivace mladších oocytů, 6–7 hodin po ovulaci, je srovnatelná, ale žádoucích jednopronukleárních embryí je 95–99 % (Graham a Deussen, 1974; Kaufman, 1973a). Pravděpodobnou příčinou tohoto jevu je významné zestárnutí oocytů po 12 hodinách od ovulace. Projevu se ztrátou stability membrány a meiotické vřetenko se pak přemístí více ke středu buňky (Szollosi, 1971).

1.2 Gynogenese

Jednou z prvních metod přípravy gynogenetických embryí bylo oplození spermií inaktivovanou rentgenovými paprsky (Edwards, 1957a) nebo UV zářením (Edwards, 1957b). Další možností získání gynogenonů (a androgenonů zároveň) je bisekce jednobuněčné zygoty (Tarkowski, 1977; Tarkowski a Rossant, 1976). V současné době se používá mikromanipulační technika vyjmutí prvojádra (McGrath a Solter, 1983), znázorněná na obrázku 3. Krátce po oplození je tak odstraněno samčí prvojádro (Modlinski, 1975), které se dá obvykle poznat podle lokace – samičí prvojádro je blíže pólovému tělísku – i velikosti – samčí prvojádro je až dvojnásobně větší než samičí (Austin a Braden, 1955).

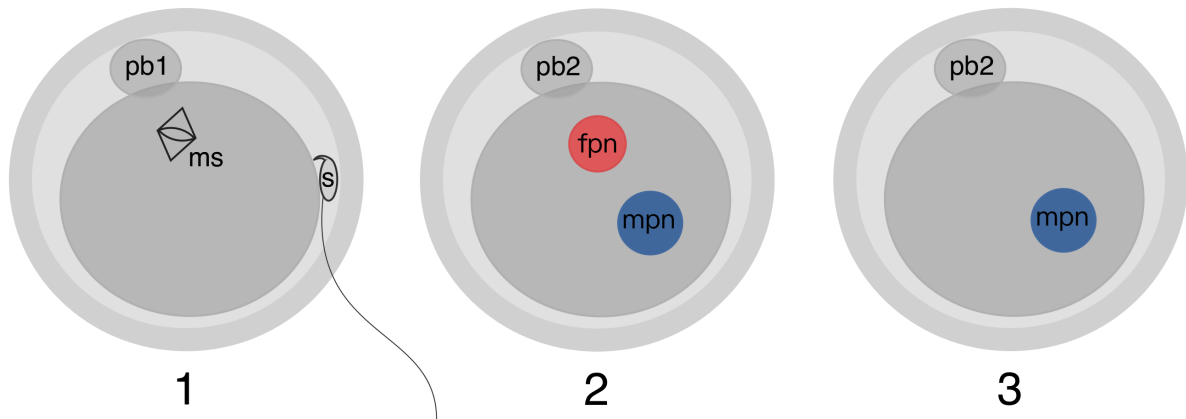


Obrázek 3: Gynogenese. **1:** Oplození oocytu v metafázi II spermií (s). **2:** Odstranění samčího prvojádra (mpn). **3:** Haploidní gynogenetické embryo se samičím prvojádrem (fpn). pb1, první pólové tělísko; ms, meiotické vřetenko; pb2, druhé pólové tělísko.

Ponechané prvojádro může být zdiploidizováno cytochalasinem B, přičemž se, podle načasování, zabrání prvnímu, nebo druhému mitotickému dělení (Markert a Petters, 1977). Pokud se ještě před enukleací inhibuje druhé meiotické dělení, přináší metoda lepší výsledky. Je to pravděpodobně proto, že buňky pak nejsou zcela homozygotní kvůli proběhlému crossing-overu (obdobně jako immediate cleavage), a navíc se supresí dělení nesníží počet blastomer (Borsuk, 1982).

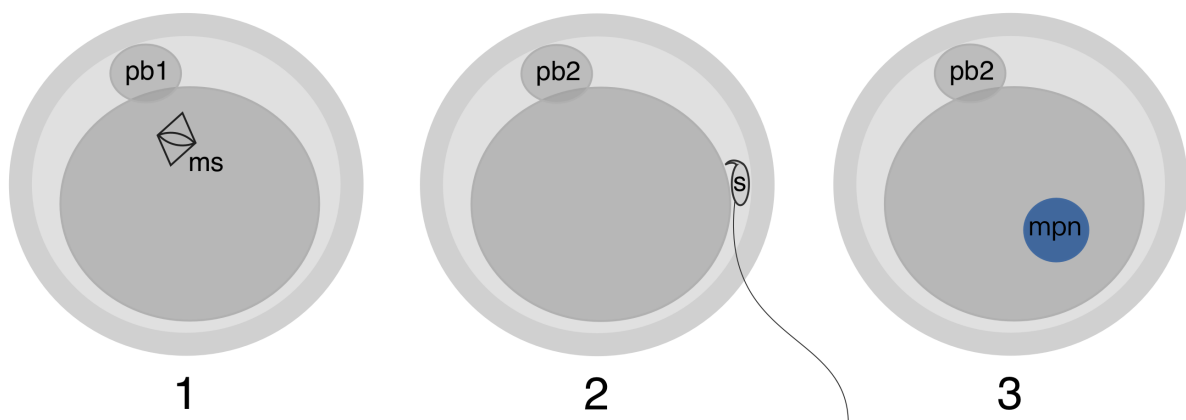
1.3 Androgenese

Pro vytvoření androgenonů se nejprve používaly chemikálie ničící dělicí vřeténko, jako kolchicin a kolcemid (Edwards, 1958), výsledná ploidita však nebyla kontrolovatelná. Později se prováděla zmíněná bisekce oplozeného jednobuněčného embrya (Tarkowski, 1977; Tarkowski a Rossant, 1976). Stejně jako u gynogenetických embryí se nejvíce využívá mikromanipulační technika vyjmutí prvojádra po oplození (Hoppe a Illmensee, 1977; Markert a Petters, 1977; Modlinski, 1975), přibližně na obrázku 4.



Obrázek 4: Androgenese enukleací po oplození. **1:** Oplození oocyty v metafázi II spermii (s). **2:** Extrakce samičího prvojádra (fpn). **3:** Haploidní androgenetické embryo se samčím prvojádrem (mpn). pb1, první pólové tělísko; ms, meiotické vřeténko; pb2, druhé pólové tělísko.

Analogicky ke gynogenonům je také možné odstranit meiotické vřeténko s chromosomy a teprve pak enukleovaný oocyt oplodnit, jako na obrázku 5. Pro vytvoření diploidních androgenonů se používá cytochalasin (Hoppe a Illmensee, 1977). Bipaterenní embrya se dají získat například oplozením dvěma spermii (Obata *et al.*, 2000).



Obrázek 5: Androgenese enukleací před oplozením. **1:** Extrakce meiotického vřeténka (ms) z oocyty v metafázi II. **2:** Oplození spermii (s). **3:** Haploidní androgenetické embryo se samčím prvojádrem (mpn). pb1, první pólové tělísko; pb2, druhé pólové tělísko.

2 Srovnání vývoje haploidních a diploidních embryí myši

Vývoj haploidních embryí přibližuje, jak se na stavbě a růstu embrya podílí maternální a jak paternální genom; který se v jaké fázi uplatňuje více a jak spolu kooperují. Pomáhají také pochopit, jak v evoluci vznikala diploidita, proč se udržuje a co je pro ni nezbytné.

Mnoho druhů hmyzu je haplodiploidní a dokáže se množit parthenogeneticky. Podařilo se izolovat haploidní buněčné linie i z diploidních druhů hmyzu, konkrétně octomilky (Debec, 1984). Poměrně bez obtíží se daří udržovat také haploidní buňky ryb (Michalik *et al.*, 2015; Yi *et al.*, 2009). Zdá se tedy, že si svůj genom přísně hlídají především savci. Nežádoucí karyotyp regulují apoptosou, programovanou buněčnou smrtí, případně se snaží haploidní buňky zdiploidizovat (Hardy, 1997; Liu *et al.*, 2002). Patrně se během evoluce postupně vytvořily nejrůznější kontrolní mechanismy, zachovávající pouze diploidní jedince.

Myši i lidská uniparentální embrya se někdy vyskytují přirozeně. Parthenogenetickou aktivací oocyty po prvním meiotickém dělení vznikají na vaječníku ovariální teratomy (Stevens a Varnum, 1974). Androgenetická embrya se nazývají mola hydatidosa (Mutter, 1997). Jedná se ale o náhodné odchylky, které se nevyvíjí dlouho.

Preimplantační, a především postimplantační vývoj embryí s genetickou výbavou jen od jednoho rodiče je jiný než vývoj embryí, ve kterých se doplňuje maternální i paternální genom. Stejně tak vývoj haploidních embryí myši je ve srovnání s diploidními značně odlišný.

2.1 Vývoj parthenogenetických haploidních embryí myši

Pro derivaci haploidních embryonálních kmenových buněk stačí získat blastocysty, které se dají připravit nejrůznějšími metodami, jak bylo shrnuto v předchozí kapitole. Jejich preimplantační vývoj je však velmi pomalý a k formování blastocoelu se dostane jen zlomek z vytvořených embryí. Nejsnažší technikou vznikají haploidní parthenogenetická embrya. Nyní budou srovnávána se svými diploidními protějšky, jež také postrádají chromosomy jednoho z rodičů, a s normálními oplozenými embryi.

2.1.1 Nukleocytoplasmatický poměr

Vztah mezi velikostí jádra a objemem cytoplasmy se nazývá nukleocytoplasmatický poměr (nucleocytoplasmic ratio). Během prvních cyklů rýhování se s každým dělením zvětšuje o polovinu. Mechanismy, které podle něj kontrolují, v které fázi vývoje buňka je, fungují například u regulace přechodu do stádia střední blastuly obojživelníků (midblastula transition stage, Newport a Kirschner, 1982). Proto se o něm uvažovalo jako o možné příčině pomalého vývoje haploidních embryí myši (Kaufman, 1983).

Prvořádno haploidních parthenogenetických embryí je s objemem kolem $4\,080\ \mu\text{m}^3$ o trochu menší než samčí prvořádno ($4\,100\ \mu\text{m}^3$, samičí prvořádno je o více než polovinu menší – $1\,700\ \mu\text{m}^3$) a také menší než součet samčího a samičího jádra po oplození (přibližně $5\,790\ \mu\text{m}^3$). Zdá se, že materiál pro tvorbu prvojader je dostupný v cytoplasmě v předem daném množství. Samčí prvořádno je v získávání stavebního materiálu úspěšnější a vezme si ho více, a proto bývá větší než samičí. Patrně existuje pro prvořádno určitá maximální velikost, která je kontrolována zejména tehdy, když jedno z nich chybí. Podle srovnání haploidních, diploidních a triploidních dvoubuněčných embryí zřejmě objem jádra, součet objemu jadérek, ani jejich počet s ploeditou příliš nesouvisí (Austin a Braden, 1955).

Vliv objemu cytoplasmy na dělení buněk ověřovala studie z osmdesátých let, ve které byla enukleací vytvořena haploidní gynogenetická a androgenetická embrya. Rozpůlením zygota byl poté upraven nukleocytoplasmatický poměr. Gynogenony a androgenony získané bisekcí i ty vytvořené enukleací a následným zmenšením cytoplasmy, tedy s normalizovaným nukleocytoplasmatickým poměrem, se vyvíjely lépe než embrya připravená jen přenosem prvojadra. Počet získaných blastocyst byl větší, ovšem pro navození normálního vývoje tyto úpravy nestačily (McGrath a Solter, 1986). Naopak v případě, kdy se dvoubuněčným embryím experimentálně dvakrát zvýšil objem cytoplasmy (poměr klesl), embrya kavitovala až o 12 hodin později. Na rychlost dělení ale úprava neměla vliv (Evsikov *et al.*, 1990).

Hypotézu vyvrátilo také měření genové exprese, při kterém se nenašly rozdíly mezi buňkami upravenými bisekcí a těmi kontrolními. Embryo na nový poměr nereagovalo změnou syntézy proteinů ani povrchových antigenů (Petzoldt a Muggleton-Harris, 1987).

Není přesně známo, jak a proč je objem cytoplasmy důležitý, ale nejrůznější studie potvrdily, že práh ještě umožňující vývoj zygota je jeho polovina (Cui *et al.*, 2005). Jak popsali Wakayama a Yanagimachi (1998), oplozená embrya s polovičním objemem se vyvíjela do narození, ale větší zásah nebyl sluchitelný ani s rozdělením do dvou buněk. Samotný nukleocytoplasmatický poměr však není dostatečné vysvětlení pro narušený vývoj haploidních embryí (Latham *et al.*, 2002).

2.1.2 Centrioly a mitotické vřeténko

Odhadovalo se, že nepřítomnost paternální centrioly, kterou by do vajíčka přinesla spermie, je pro vývoj haploidních buněk zásadní. Myš ale během prvních dělení centrioly vůbec nemá (Szollosi *et al.*, 1972). Centrosomy hlodavců jsou dědičné maternálně (Schatten *et al.*, 1991) a byly elektronovým mikroskopem nalezeny až v 32–64buněčném stádiu (Gueth-Hallonet *et al.*, 1993).

Lee *et al.* (2011) uvažovali, že absence paternální centrioly je důvod, proč ještě nebyly získány jiné parthenogenetické buňky než myši. Parthenogenetická embrya jiných

druhů si však centrosomy dokáží vytvořit samy. Dokonce se u lidí a jiných druhů savců ukazuje, že haploidní parthenogenony mívají více centriol než je obvyklé (Brevini *et al.*, 2011). Paternální centrioly mohou sloužit jako zpětná vazba, která by zastavila další syntézu (Marshall, 2007). Nadbytek centrosomů sice preimplantační vývoj parthenogenetických embryí nezpomaluje, ale může být zodpovědný za neobvyklé tvary buněk nebo aneuploidie (Brevini *et al.*, 2012).

Co se týče velikosti dělicího vřeténka, jeho délka je ovlivněna velikostí buňky a nukleocytoplasmatickým poměrem (Novakova *et al.*, 2016). Jak ale bylo v předchozí části popsáno, objem cytoplasmy není hlavní faktor související s problematickým vývojem haploidních embryí. Patrně se u hlodavců během evoluce přenesla kontrola účasti samce z centriolu na celou paternální polovinu genomu (Schatten *et al.*, 1991), což potvrzují úvahy v dalších částech práce.

2.1.3 Mitotické dělení

První mitotické dělení tvoří hranici mezi jednobuněčnou zygotou a mnohobuněčným embryem. Haploidní parthenogenetická embrya mají opožděný nástup a delší trvání první mitosy. Čekají s prvním dělením déle než diploidní parthenogenony, podle některých pozorování i o 3–4 hodiny (Liu *et al.*, 2002). Celková délka první mitosy myši bývá kolem 2 hodin (Kaufman, 1973c). U haploidních parthenogenetických embryí však trvá o téměř 40 minut déle, přibližně 156 minut.

Pro detailnější analýzu měření byla mitosa rozdělena na několik pozorovatelných fází: I, pronukleární fáze; IIa, pozdní pronukleární fáze a raná prometafáze; IIb, pozdní prometafáze; III, syngamická část metafáze; IV, chromatidová část metafáze; Va, pozdní metafáze; Vb, anafáze. Právě fáze IV a Vb se u parthenogenetických haploidních a oplozených diploidních embryí liší nejvíce. Trvání těchto dvou fází je u haploidních parthenogenonů 3–5× delší a doba od IV do Vb trvá průměrně kolem 67,5 minut, oproti 26,5 minutám u oplozených diploidních embryí (Kaufman, 1973b). Při měření těchto časových úseků je ale potřeba vzít v úvahu vliv prostředí, protože například teplota již lehce pod 37 °C může vývoj výrazně zpomalovat (Kaufman, 1973c).

Nejen že první dělení zahajují se zpožděním, ale celkový vývoj haploidních parthenogenetických embryí je s každým dalším mitotickým rozdělením pomalejší než vývoj diploidních uniparentálních i normálně oplozených embryí.

Studie monitorující haploidní parthenogenetická a androgenetická embrya člověka do osmibuněčného stádia odhalila, že u lidských parthenogenonů nastává zpoždění dělení už během druhého buněčného cyklu, naopak androgenony mají urychlené dělení během cyklu třetího (Escribá *et al.*, 2016). Proč tomu tak je, není zatím jasné.

Jak změřili Henery a Kaufman (1992), průměrný čas zdvojnásobení počtu buněk haploidních parthenogenetických embryí je přibližně 15,3 hodin, diploidních partheno-

genonů 12,3 hodin a normálně oplozených kontrol 12,7 hodin. Haploidní parthenogenony se v rychlosti dělení od diploidních parthenogenonů ještě tolik neliší v prvních dvou děleních, ve dvoubuněčném a čtyřbuněčném stádiu. Poté ovšem haploidním trvá kolem 57 hodin dosažení osmibuněčného stádia, což je o 7 hodin více než u diploidních s průměrně 50 hodinami. Pro srovnání s předchozí studií to odpovídá času zdvojení 14,3 hodin. Pro přeměnu v morulu haploidní parthenogenony potřebují kolem 92 hodin, zatímco diploidní jen 58 hodin. Do stádia blastocysty se dostanou za 129, respektive 92 hodin, tedy s rozdílem téměř 37 hodin (Cui *et al.*, 2007).

Liu *et al.* (2002) popisují, že 48 hodin po aktivaci, případně oplození, byla diploidní parthenogenetická a normální embrya ve stádiu moruly, ale parthenogenetická haploidní embrya ještě ve čtyř- nebo osmibuněčném stádiu.

Konkrétní časové hodnoty je opět třeba brát jen orientačně, neboť se měnily postupy, média i monitorovací systémy. Přesto i vlastní pozorování, přiblížené v experimentální části této práce, potvrzuje, že haploidní parthenogenony mají v řádu hodin opožděný preimplantační vývoj.

2.1.4 Vlastnosti a počet blastomer

Při pohledu na parthenogenetické haploidní embrya je nápadná rozdílná velikost blastomer. Zdá se, jako by pocházely z různých kol dělení (Kaufman, 1983). Haploidní embrya jsou méně kompaktní a blastocysty méně expandované. Nedostatečná kompaktace může narušovat těsné spoje mezi vnějšími buňkami, což by mohla být jedna z příčin obtíží při tvorbě blastocoelu (Cui *et al.*, 2007; Pratt *et al.*, 1982). Celkový počet buněk většinou bývá zřetelně redukován.

V již citované práci se Liu *et al.* (2002) zaměřili na souvislost mezi ploeditou, parthenogenetickou aktivací a apoptosou. Pro spuštění apoptotických signálů není paternální genom vůbec potřeba, protože mitochondrie, které apoptosu zahajují, buňky dědí maternálně (Liu *et al.*, 2000). V haploidních parthenogenonech bylo 72 hodin po aktivaci spočítáno přibližně 27 buněk, což odpovídá stádiu moruly. Je to o hodně méně než počet buněk diploidních parthenogenonů (39) a oplozených embryí (36), ze kterých v té době již povětšinou byly blastocysty (90 %). Apoptotické buňky byly nalezeny u haploidních embryí v 7 % objemu, u diploidních parthenogenetických jen ve 3 % a u oplozených ve 4 %. Po 96 hodinách od aktivace byl počet buněk haploidních embryí kolem 47 a diploidní už obsahovala více než dvakrát tolik: parthenogenony 104 a oplozená embrya 102 buněk. Apoptotických buněk pak bylo u jednotlivých skupin 17 %, 4 % a 6 %.

Haploidní embrya obsahují výrazně méně buněk než diploidní embrya, zpočátku o třetinu, později o polovinu, a mají také nejprve dvojnásobný a časem troj- až čtyřnásobný výskyt apoptosy (Liu *et al.*, 2002). Tyto dva faktory jsou pravděpodobně propojeny, neboť zastavení buněčného cyklu je úzce spjato s apoptosou (shrnutí v Meikrantz

a Schlegel, 1995). Haploidita je spojena s programovanou buněčnou smrtí, ale ta sama o sobě nesouvisí s parthenogenetickou aktivací. Jak přesně tento vztah funguje, není známo.

2.1.5 Genová exprese

Cui *et al.* (2007) porovnávali haploidní parthenogenetická embrya, aktivovaná ionomycinem, a diploidní parthenogenetická embrya, diploidisovaná cytochalasinem B, z hlediska jejich genové exprese. Dvoubuněčná haploidní a diploidní uniparentální embrya byla v přepisu sledovaných genů stejná. Následující den, po 44 hodinách od aktivace, se už v míře exprese lišila ve 38 a později (58 hodin po aktivaci) už v 665 z celkem 15 195 genů.

Protože haploidní embrya jsou ve vývoji pomalejší, porovnávaly se také výsledky vzhledem k dosaženému embryonálnímu stadiu. V tomto případě se haploidní embrya po 49 hodinách a diploidní embrya po 44 hodinách od aktivace v genové expresi výrazně neodlišovala. Stejně tak při měření ve fázi blastocysty (138 hodin vývoje haploidních, respektive 102 hodin vývoje diploidních parthenogenonů), se exprese neshodovala jen v 15 genech, z nichž většina (12) byla více přepisována u haploidních embryí. Co se týče oplozených embryí, ve sledovaných genech se v porovnání s diploidními parthenogenony našly rozdíly exprese pouze u čtyř z nich, přičemž jeden souvisí s chromosomem Y a další bývá maternálně imprintován.

Toto srovnání potvrdilo, že haploidní parthenogenetická embrya se genovou expresí téměř vyrovnají diploidním parthenogenonům, avšak celý vývoj mají značně opožděný. Haploidních parthenogenetických blastocyst se podařilo získat 12 % a diploidních parthenogenetických téměř 82 %. Pomalý a neúspěšný vývoj je podle Cui *et al.* (2007) důsledkem zpomalené transkripce kvůli chybějící polovině genetického materiálu.

2.1.6 Postimplantační vývoj

Haploidní parthenogenony se kvůli svým časovým a morfologickým odchylkám zřídka kdy úspěšně uhnízdí. Typicky zůstávají ve stádiu moruly (Liu *et al.*, 2002). Jejich postimplantační vývoj byl zaznamenáván do stádia embryonálního válce (egg-cylinder stage) a jen raritně do stádia primitivního proužku (Kaufman, 1978; Kaufman *et al.*, 1977).

Zdá se, že větší úspěšnost implantace diploidních parthenogenetických embryí tkví nejen v lepším načasování vývoje, ale také v tom, že se v době nidace skládají z více buněk. A to jak celkově, tak v samotné vnitřní buněčné mase (ICM) blastocysty (Henery a Kaufman, 1992). Jak bylo výše popsáno, ubývání buněk haploidních embryí nesouvisí jen se samotnou aktivací nebo absencí paternálního genomu, ale zásadní je jejich haploidita. Diploidní parthenogenony jsou totiž v množství apoptotických buněk srovnatelné s oplozenými embryi (Liu *et al.*, 2002).

2.2 Vývoj gynogenetických a androgenetických embryí myši

Gynogenetická a androgenetická embrya prošla ve srovnání s parthenogenetickými embryi ideální aktivací oplozením. Přestože se diploidní gynogenetická a androgenetická embrya vyvíjí s většími obtížemi než diploidní parthenogenony, používají se pro srovnání funkce jednotlivých parentálních genomů. Přispěly zejména ke studiu role imprintingu v diferenciaci buněk. Je možné, že právě nedokonalá aktivace oocyty a následná (de)methylace DNA mohou být hlavní příčinou neúspěšného vývoje. Proto budou nyní popsána i diploidní uni- a biparentální embrya a z nich vytvořené chiméry.

2.2.1 Preimplantační vývoj

Ve srovnávací studii z roku 2015 (Hu *et al.*, 2015a) se ze všech kombinací nejlépe vyvíjely diploidní androgenony (9,8 % se dostalo do stádia blastocysty) a naopak nejhůře haploidní androgenony (4,0 % blastocyst). Diploidní i haploidní gynogenony dávaly poměrně srovnatelné výsledky (4,4 % a 4,6 % blastocyst). Parthenogenetická embrya se vyvíjela úspěšně v 19,4 %. Diploidní androgenetická embrya se pátý den vývoje skládala z méně buněk, kolem 22, než normálně oplozené kontroly, které měly průměrně 36 buněk. Jejich dělení je tedy znatelně pomalejší.

V této studii se ale objevují mnohem menší čísla než bylo dříve popsáno, což, jak v diskusi autoři sami uznávají, mohlo být kvůli zvolené metodě, kmeni myši nebo použitým médiem. Haploidní androgenetická a gynogenetická embrya byla získána přirozeným oplozením myším samcem a následnou enukleací. Diploidní embrya byla vytvořena spojením dvoubuněčných haploidních andro- a gynogenonů a parthenogenetická embrya aktivací 7% ethanolem a případně diploidisací 6-DMAP (Hu *et al.*, 2015a). V jiném případě byly diploidní androgenony připraveny oplozením dvěma spermii a vyvíjelo se jich do blastocytu i 56,5 % (Obata *et al.*, 2000). Pokud byla nejprve provedena enukleace metafázického oocyty a poté oplození, bylo diploidních androgenetických blastocyst 43 % a haploidních androgenetických blastocyst 11 % (Kono *et al.*, 1993). Také různé kmeny myši dávají rozdílné výsledky. Například u kmene C57BL/6 se podařilo získat 70,4 % diploidních parthenogenetických blastocyst, ale u kmene DBA/2 stejným postupem jen 52,9 %. Diploidních androgenetických blastocyst prvního kmene bylo 32,9 %, kmene druhého pouhých 9,6 % (Liang *et al.*, 2009).

Pro seřazení úspěšnosti vývoje jednotlivých typů embryí se však uvedená data zdají být relevantní. Parthenogenetická embrya se obvykle vyvíjí nejlépe – diploidní rychleji a úspěšněji než haploidní. Androgenony byly na pomyslném druhém místě v případě diploidních a na posledním v případě haploidních embryí. Schopnost přeměny haploidních a diploidních gynogenonů v blastocystu byla v této studii z neznámého důvodu velmi podobná.

Jedna z prvních teorií, vysvětlujících horší vývoj haploidních androgenonů než gyno-

negonů popisovala, že enukleací samičího prvojádra se poruší některé vaječné struktury. Jak bylo uvedeno, samičí prvojádro se nachází blíže pólovému tělísku. Odhadovalo se, že je s ním stále spojeno jakýmsi cytoskeletálním útvarem nebo se při odebrání naruší zona pellucida více než v případě enukleace samčího prvojádra (Henery a Kaufman, 1992). Membrána totiž může být v blízkosti pólového tělíska ztenčená předchozím odškrcením, a proto může být více náchylná k mechanickému poškození (Modlinski, 1975). Tato úvaha se ale nepotvrdila, při enukleaci samičího prvojádra se, srovnatelně s kontrolami, dělí kolem 95 % připravených embryí (Hu *et al.*, 2015b).

Haploidní gynogenetická embrya podle Edwardse (1958) zaostávala o téměř jedno celé dělení za diploidními. Jeho závěry plynoucí ze srovnání s tetraploidními embryi zněly, že takto zpomalený vývoj nesouvisí s počtem sad chromosomů. Naopak se mu zdálo, že haploidní androgenony se vždy buď dělí stejně rychle jako ty diploidní, nebo se nevyvíjí vůbec.

Zajímavým nápadem bylo spojení haploidního parthenogenetického embrya s prvojádrem haploidního androgenonu v pozdním dvoubuněčném stádiu. Překvapivě se tyto zárodky vyvíjely jako zcela normální diploidní embrya, dokonce se narodily zdravé myši. Vyplývá z toho, že se oba genomy, maternální a paternální, mohou aktivovat samostatně, různým způsobem, překonat transfer prvojádra, a přesto se zdárně vyvíjet. Cytoplasma nevyžaduje účast samčího genomu minimálně do dvoubuněčného stadia (Barra a Renard, 1988).

2.2.2 Postimplantační vývoj a chiméry

Převratné a zároveň zpochybňované je první doložené narození pěti gynogenetických a dvou androgenetických diploidních samic myši (Hoppe a Illmensee, 1977). První dva týdny života byly myši ve srovnání s obvyklými mláďaty o dost menší, ale velikostní rozdíl v době odstavu dohnaly. Všechny samice, kromě jedné z nich, prokázaly plodnost vlastními vrhy.

V diskusi Hoppe a Illmensee (1977) zmiňují, že přístup kombinující enukleaci a diploidizaci cytochalasinem B je pro vývoj uniparentálních embryí lepší než parthenogeneze kvůli proběhlému oplození. Právě to je podle nich klíčový moment a pouhá aktivace oocyty bez účasti samce pro zdárný vývoj nestačí. Tento závěr je v rozporu s pozorováním ostatních vědců, kterým se v té době naopak embrya po parthenogenetické aktivaci vyvíjela podobně jako ta po oplození, ale pro další vývoj byla zásadní přítomnost prvojader obou pohlaví (Barton *et al.*, 1985).

Surani *et al.* (1984) v této hlavní vlně experimentování s uni- a biparentálními embryi zkoušeli přidat do haploidních parthenogenonů prvojádro v jednom případě paternální, v druhém maternální. Embrya s přidaným paternálním prvojádrem se bez větších obtíží vyvíjela až do narození, avšak ta s maternálním, tedy s celkem dvěma samičími

prvojádry, přinejlepším jen do stádia blastocysty a implantaci nezvládala. Přichází proto na myšlenku, že je pro zdárný postimplantační vývoj nutná participace paternálního genomu. A že úspěch, který se povedl Hoppemu s gynogenetickými embryi, byl způsoben buď tím, že se trofoblast zcela raritně vyvinul natolik, aby se plod vyvíjel až do narození, nebo byla prováděná enukleace nekompletní, a tudíž se na vývoji daného embrya samec alespoň částečně podílel. Podle Suraniho nelze vyloučit, že jakýsi mimogenetický pozůstatek v cytoplasmě zygoty zůstane po migraci prvojádra z periferie do centra buňky. To také Hoppe a Illmensee (1982) sami přiznávají v diskusi, ve které zmínili, že spermie mohla do cytoplasmy přinést specifickou substanci, nebo přímo organelu.

Výzkumné týmy se tedy v osmdesátých letech dvacátého století shodně pozastavují nad tím, že samotný maternální genom parthenogenetických a gynogenetických embryí sice může zajistit preimplantační a raný postimplantační vývoj, ale k proliferaci extraembryonálních tkání je nutný především paternální genom (Barton *et al.*, 1984; McGrath a Solter, 1984; Surani *et al.*, 1984).

K rozlišení, jak se který rodič podílí na růstu embrya, byly vytvářeny chiméry. Jedny z prvních takových chimér byla embrya sestavená z různých kombinací parthenogenetických, gynogenetických a androgenetických ICM a trofoektodermu. Na první pohled se chiméry lišily svou velikostí. Ty s buňkami androgenetického původu byly větší, ty s gyno- a parthenogenetickými naopak menší. Nezáleželo příliš na tom, zda z normálního oplozeného embrya pocházela ICM, nebo trofoblast (Barton *et al.*, 1985).

Dalšími chimérami byla osmibuněčná embrya s jednou upravenou blastomerou navíc (Surani *et al.*, 1987). Buňky pocházející z blastomery androgenetického původu pak byly nalezeny hlavně ve tkáních odvozených z trofoektodermu. Parthenogenetické a gynogenetické buňky se podílely na všech tkáních embrya a extraembryonálního mesodermu, ale v extraembryonálním endodermu ani ve tkáních trofoektodermálního původu se příliš nevyskytovaly (Surani *et al.*, 1988; Thomson a Solter, 1988).

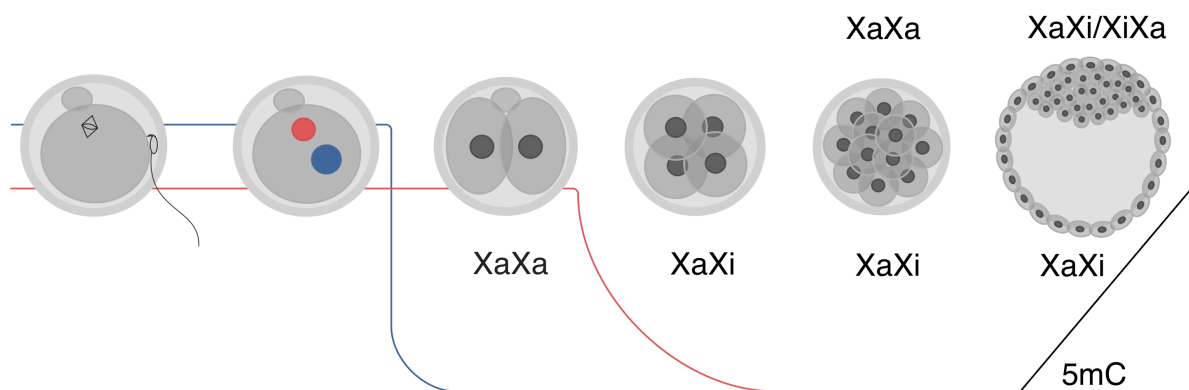
V dalších podrobnějších studiích bylo na základě produkce chimér detailněji popsáno, jak odlišně se jejich buňky podílí na výstavbě orgánů. Více androgenetických buněk bylo nalezeno v srdeční a kosterní svalovině, játrech, slezině a slinivce břišní, naopak nižší zastoupení měly v mozkové tkáni (omezovaly se zejména na oblast hypothalamu). Androgenetické chiméry se potýkaly s defekty sternu a hypertrofií žeberních chrupavek. Podílí se tedy přednostně na mesodermu. Chiméry s gynogenetickou nebo parthenogenetickou částí byly vzrůstově menší a upravené buňky byly obsaženy především v mozku (tvořily především cortex, striatum a hippocampus), epidermis a zárodečných tkáních – tvoří tedy přednostně neuroektodermální tkáně (Barton *et al.*, 1991; Keverne *et al.*, 1996; Mann *et al.*, 1990).

Parthenogenetické buňky navíc v chimérách postupně ubývají (Fundele *et al.*, 1989), hlavně mezi 13. a 15. dnem vývoje (Fundele *et al.*, 1990). Podléhají selekci a ani v místech své hlavní koncentrace nemohou konkurovat normálním buňkám.

2.2.3 DNA methylace a genomický imprinting

Diferenciace buněk jednotlivých tkání souvisí s epigenetickými modifikacemi chromatinu. Vymazávání původních parentálních methylací začíná již v jednobuněčné zygotě. Nejprve dochází k rychlé aktivní demethylaci paternálního genomu a od druhého dělení se přidává pomalá pasivní demethylace maternálního genomu, jak je znázorněno na obrázku 6. Nově se popisuje, že aktivní demethylaci podléhá i maternální genom (Guo *et al.*, 2014), ale pro nedostatek důkazů a kvůli rozporu s dalšími studiemi je zobrazena původní představa. Na zahájení se podílí jak spermie, tak i cytoplasma oocyty (Beaujean *et al.*, 2004).

Methylační procesy se liší u jednotlivých druhů savců a typů embryí (shrnutí v Ma *et al.*, 2012). V bipaternálním embryu se druhý samčí genom rovněž demethyluje (Santos *et al.*, 2002), ale androgenetická embrya mají později problém s opětovnou remethylací. Naopak maternální genomy gynogenetických a parthenogenetických embryí nejsou náležitě demethylovány (Barton *et al.*, 2001). Protože methylovanější DNA se replikuje pomaleji, narušení demethylačních procesů je možnou příčinou pomalého vývoje parthenogenetických embryí (Escribá *et al.*, 2016).



Obrázek 6: Demethylace parentálních genomů a inaktivace chromosomu X během preimplantačního vývoje. **5mC:** Křivky relativního množství 5-methyl cytosinu ilustrují paternální (modře) a maternální (červeně) demethylaci, při přeměně v blastocystu *de novo* methylaci (černě). **XaXa:** Aktivní maternální i paternální X chromosom. **XaXi:** Inaktivovaný paternální X chromosom, zachovávající se v trofoektodermu. **XaXi/XiXa:** Náhodně inaktivovaný jeden z X chromosomů ve vnitřní buněčné mase.

Většina autosomálních genů je přepisována podle obou chromosomů, ale některé mají jednu z alel umlčenou – paternální, nebo maternální. Označení, sloužící k jejich rozlišení i po demethylaci ostatních genů, se nazývá genomický imprinting (shrnutí v Kono, 2009; Li a Sasaki, 2011; Monk, 1988). Jelikož diploidní androgenony, gynogenony a parthenogenony obsahují dvojnásobnou genetickou sadu od jednoho rodiče, množství transkripce odlišně methylovaných oblastí (DMR) by podle očekávání mělo být buď zdvojnásobené, pokud imprintovaná alela chybí, nebo vůbec nedetekovatelné,

pokud je imprintovaná alela přítomna dvakrát (Hu *et al.*, 2015a). Dosavadní studie však tento předpoklad v mnoha konkrétních případech vyvrátily.

Růstové odchylky chimér byly nejprve vysvětlovány nestandardní expresí *Igf2* a příslušného receptoru *Igf2r*, jedněch z prvních identifikovaných imprintovaných genů (Barlow *et al.*, 1991; DeChiara *et al.*, 1991). Množství srovnávacích studií později ukázalo, že existují celé oblasti podléhající imprintingu a jejich exprese u uniparentálních a biparentálních embryí neodpovídá očekávání. Například některé geny s maternální expresí, jako právě *Igf2r* nebo *Phlda2*, i některé geny s paternální expresí, jako je *Impact*, byly aktivní u všech vzorků diploidních androgenonů i gynogenonů. *Impact* byl podle studie Ogawy *et al.* (2006) dokonce exprimován i u parthenogenetických embryí, i když v menší míře než u androgenetických embryí, což je opačný výsledek než zaznamenali Hu *et al.* (2015a). Naopak maternálně přepisovaný *Asb4* byl v obou studiích detekovaný u diploidních andro- a parthenogenonů, ale nikoli u gynogenonů, tedy přesně naopak, než by měl být (Hu *et al.*, 2015a; Ogawa *et al.*, 2006). Produkt paternálně imprintovaného genu *H19* byl nalezen i v androgenetických buňkách (Allen *et al.*, 1994; Sotomaru *et al.*, 2002). U triploidních embryí, která byla připravena oplozením a přidáním prvojádra navíc, bylo zjištěno, že ta se dvěma samičími se liší v expresi sedmi z osmi zkoumaných imprintovaných genů, kdežto ta se samčím navíc měla jejich expresi srovnatelnou s kontrolami (Yamazaki *et al.*, 2015).

Podobné výsledky byly zaznamenány i u haploidních embryí. Receptorový gen *Igf2r* byl u androgenonů přepisován méně než u kontrol, naopak u gynogenonů dokonce 60× více. Geny *Mest* a *Peg10* s paternální expresí byly aktivní jen u androgenetických embryí, tedy podle očekávání, jen byla jejich aktivita mnohem nižší než v případě kontrol. *Abs4* opět potvrdil nestandardní výskyt u androgenonů (Hu *et al.*, 2015b).

Jako hlavní oblasti zodpovědné za placentaci jsou identifikovány paternálně methylované *H19*-DMR a IG-DMR na chromosomech 7 a 12 (Kawahara *et al.*, 2006). Částečně vysvětlují, proč mají tato embrya problém s postimplantačním vývojem. Pravděpodobně jsou ale pro vývoj potřebné i některé paternálně imprintované geny, které se exprimují ještě před implantací. Pokud se totiž čtyřbuněčným diploidním androgenonům přidalo mRNA z cytoplasmy parthenogenetických nebo oplozených morul, znatelně se zvýšil podíl získaných blastocyst, z 19 % na 47 % (Hagemann a First, 1992).

Očekávalo se, že parthenogenetická diploidní embrya mají zachovaný maternální imprinting (Liu *et al.*, 2008), ale zmíněné studie spíše naznačují, že u savců existuje dosud neznámý mechanismus, kterým parentální genomy navzájem ovlivňují stabilitu imprintingu (Jiang *et al.*, 2007) a expresi jednotlivých genů (Yamazaki *et al.*, 2015).

Obecně tedy paternální genom (androgenetické buňky) více tvoří extraembryonální a mesodermální struktury a maternální genom (gynogenetické a parthenogenetické buňky) samotné embryo, především neuroektodermální tkáň. Pokud se genomický imprinting, řídící diferenciaci jednotlivých tkání, povede u embryí upravit a vytvoří se tak

rozdíl mezi oběma polovinami jejich genomu (Liu *et al.*, 2008), například genetickou modifikací (Kono *et al.*, 2002; Li *et al.*, 2016) nebo spojením více embryí k sobě (Bai *et al.*, 2016; Shan *et al.*, 2012), mohou se parthenogenetická (Kono *et al.*, 2004) i gynogenetická embrya (Li *et al.*, 2016) vyvíjet až do narození (shrnutí v Hikichi *et al.*, 2010; Kono, 2009; Wu *et al.*, 2006).

2.2.4 Inaktivace X chromosomu

Proliferace trofoektodermy popisovaných chimér a celkově vývoj uni- a biparentálních embryí může být negativně ovlivněn nejen autosomálně, ale také gonosomálně. Během preimplantačního vývoje samičích zárodků dochází nejprve ve stádiu dvou buněk a poté během přeměny v blastocystu ke kompenzaci genové exprese dvou X chromosomů tím, že se jeden z nich inaktivuje. V extraembryonálních strukturách zůstává přednostně umlčený paternální X chromosom, ale v ICM je prvotní inaktivace zrušená a ustanovuje se znovu a náhodně (Lyon, 1961). Přibližně v polovině buněk embrya je vypnutý mateřský chromosom X, ve druhé polovině ten otcovský (shrnutí v Sado a Ferguson-Smith, 2005; Takagi a Sasaki, 1975). Podkladem pro rozdělení jsou právě imprintingové methylační značky. Pro názornost jsou tyto změny popsány na obrázku 6.

Oplozeným embryím se dvěma X chromosomy se v trofoektodermu a primitivním endodermu přednostně inaktivuje paternální X chromosom. Proto když chybí (gynogenony), nebo jsou tam naopak hned dva (XX androgenony), může to být pro inaktivační procesy problém (Endo a Takagi, 1981; Takagi *et al.*, 1978).

Ve své studii se Kay *et al.* (1994) domnívají, že exprese (RNA) *Xist*, řídícího inaktivaci, závisí jen na původu chromosomů, ale nespojuje s jejich počtem, takže u androgenetických embryí s genomem XX vůbec nedochází k inaktivaci a zůstávají oba chromosomy aktivní. Opačně Latham (1996) odhaduje, že v takovém případě se inaktivují oba, neboť u androgenonů exprese *Xist* zaznamenal (Latham a Rambhatla, 1995).

K rozsouzení přispěli Obata *et al.* (2000) stanovením poměru pohlaví androgenetických embryí. V této studii se vkládaly do dělohy pseudopregnantních myší blastocysty, nikoli do vejcovodů jedno- až dvoubuněčná embrya hned po přenosu prvojádra, jako tomu bylo v předchozích pokusech (Barton *et al.*, 1984; Kaufman *et al.*, 1989). Ze 112 androgenetických diploidních embryí bylo po devátém dni vývoje 73 XY, 39 XX a 0 YY, poměr samců a samic přibližně 2 : 1. Mohou se tedy vyvíjet obě kombinace, kromě té s úplnou absencí X chromosomu (Obata *et al.*, 2000).

Nemožnost vývoje bez chromosomu X dokládají i Hoppe a Illmensee (1977). Některé diploidní gyno- a androgenony brzy po mikromanipulaci fragmentovaly nebo ukončily vývoj ještě před čtyřbuněčným stádiem. Nejspíše to byly ty, do nichž spermie přinesla chromosom Y a kterým Hoppe a Illmensee zároveň odebrali samičí prvojádro. V souladu s tím Hu *et al.* (2015a) pozorovali, že embrya se dvěma Y chromosomy se přestanou vy-

víjet ve troj- nebo čtyřbuněčném stádiu. Stejně tak polovina haploidních androgenonů, ta s Y chromosomem, není schopna se vyvíjet již během prvních dělení (Hu *et al.*, 2015b; Latham *et al.*, 2002).

Okamoto *et al.* (2000) popsali, že androgenony se dvěma X chromosomy mají náhodnou X inaktivaci i v extraembryonálních tkáních, kde je obvykle přednostně inaktivován paternální chromosom X.

O rok později byl u diploidních parthenogenetických embryí detekován *Xist* maternálních X chromosomů. Jeho transkripce byla zpožděná, stejně jako zjistili Kay *et al.* (1994) u partheno- i gynogenonů. Ve většině parthenogenetických buněk byl ovšem *Xist* přepisován pouze z jednoho X chromosomu (Nesterova *et al.*, 2001).

Pro vytvoření blastocysty je zásadní rozdělení na embryoblast a trofoblast. Tento velmi komplexní proces, začínající již v osmibuněčném stádiu, je řízen a doprovázen mnohými epigenetickými modifikacemi (shrnuto v Paul a Knott, 2014). Uniparentální embrya mají narušené i histonové modifikace (Chen a Yu, 2014), u parthenogenonů byla pozorována například hyperacetylace lysinu H3K9 (Li *et al.*, 2015).

U haploidních embryí navíc nelze zajistit poměr jednoho X chromosomu ku dvěma sadám autosomů (shrnuto v Leeb a Wutz, 2013). Gynogenetická embrya se dvěma chromosomy X i s jedním chybějícím (X0) se po implantaci nevyvíjela dobře, avšak embrya s jedním X chromosomem (X0) a oběma parentálními sadami autosomů se vyvíjela bez výrazných odchylek (Mann a Lovell-Badge, 1987). Přesto se XX parthenogenony vyvíjí hůře než parthenogenony XY (Kaufman *et al.*, 1989). Vývojové problémy tedy souvisí jak s autosomy, tak i s gonosomy (Mann a Lovell-Badge, 1988).

2.3 Vývoj parthenogenetických diploidních embryí myši

Parthenogenetická embrya myši i člověka (Taylor a Braude, 1994) mívají oproti oplozeným jen o trochu opožděný vývoj a menší počet buněk jak celkově, tak v samotném embryoblastu (Hardy a Handyside, 1996; O'Neill *et al.*, 1991). Parthenogenetická diploidní embrya jsou ideálním prostředkem pro odlišení, co je u parthenogenetických haploidních embryí způsobeno haploiditou a co je důsledek absence paternálního genomu. Protože se vyvíjí lépe než ta haploidní – během preimplantačního vývoje se téměř vyrovnají normálně oplozeným embryím (Cui *et al.*, 2007; Henery a Kaufman, 1992; Liu *et al.*, 2002) –, využívají se hlavně pro výzkum postimplantačního vývoje.

2.3.1 Ultrastruktura embryí

Parthenogenetická diploidní embrya, aktivovaná působením hyaluronidasy a osmotickým šokem, byla podrobena zkoumání pod elektronovým mikroskopem. Byly popsány mnohé odchylky v jejich ultrastruktuře, které mohou napovědět něco o obecných mechanismech vývoje parthenogeneticky aktivovaných embryí.

Běžně se na povrchu oocyty i během pronukleárního stádia nachází jen velmi málo mikrokků (microvilli), jejich počet poté s každým dělením roste. U parthenogenetických embryí však nebyla pozorována v žádném vývojovém stádiu. Jelikož jsou nejspíše pro další vývoj potřebná, může jejich absence přispívat k problematickému vývoji (Solter *et al.*, 1974).

Mezi blastomerami se mohou v důsledku nedokonalého dělení objevovat cytoplasmatické fragmenty, obvykle obsahující organely (Solter *et al.*, 1974; Tarkowski *et al.*, 1970). Spojovací komplexy parthenogenetických embryí odpovídají normálním embryím. Mezi blastomerami byly nalezeny četné gap junctions a mezi buňkami moruly desmosomy. V blastocystě pak typické zonulae occludentes, zonulae adhaerentes, predesmosomy, desmosomy i gap junctions mezi všemi buňkami trofoblastu. Gap junctions i predesmosomy byly popsány i v ICM a mezi ICM a trofoblastem (Niimura a Futatsumata, 1998).

Kortikální granula parthenogenetických embryí zůstávají v cytoplasmě – některá hlouběji, některá více u povrchu. Dokazují tak, že u uměle aktivovaných embryí nedochází ke kortikální reakci, při které se granula oplozených embryí vypouští pod zonu pellucidu. Další důsledek absence kortikální reakce je nepřítomnost krystaloidních žlutkových struktur v cytoplasmě (Solter *et al.*, 1974). U oplozených embryí bývají rozeznatelné od osmibuněčného stádia a postupně přibývají (Calarco a Brown, 1969). Niimura a Asami (1996a, cit. dle Niimura a Asami, 1997a), oproti Solterovi *et al.* (1974), pozorovali v parthenogenetických blastocystách, aktivovaných ethanolem a diploidizovaných cytochalasinem B, méně lipidových kapének.

Jádra parthenogenonů postrádají lamellae annulatae, ale mají širokou nucleolonomu (Niimura a Asami, 1996b). Co se týče jadérek, parthenogenetická embrya i v osmi-

buněčném stádiu obsahují průměrně jedno až tři primární densní jádérka, kterým na rozdíl od oplozených embryí chybí rozdělení na fibrilární a granulární část.

Dále bylo v parthenogenech nalezeno velmi málo volných ribosomů. Naopak větší seskupení ribosomů nebo hrubé endoplasmatické retikulum se v cytoplasmě embryí vůbec nevyskytovalo (Solter *et al.*, 1974). Málo volných ribosomů a polysomů popisují také Niimura a Asami (1996b) u parthenogenetických blastocyst. Redukovaný je i počet lysosomů a rozsah Golgiho aparátu. Mitochondrií mají velice mnoho, avšak s neobvykle vakuolizovanými kristami.

Histochemické studie parthenogenetických blastocyst popisují nižší metabolismus progesteronu, estrogeneru a cyklického adenosin monofosfátu (cAMP) a také nižší metabolismus glukosy, pyruvátu a nukleových kyselin (shrnuto v Niimura a Asami, 1997a). Snížená je také aktivita kyselých fosfatásy, glycerofosfát dehydrogenasy a NADH (redukováný nikotinamid adenin dinukleotid) dehydrogenasy (Niimura a Asami, 1997b). Strukturní a biochemické odchylky dokazují nedokonalé zpracování živin, sníženou produkci energie (Niimura a Asami, 1996b) a narušenou syntézu proteinů (Solter *et al.*, 1974)

2.3.2 Postimplantační vývoj

Parthenogenetická diploidní embrya přenesená do pseudopregnantních myší se dožívají nejvýše jedenáctého dne vývoje. Dosahují stádia E9.5, které mívá kolem 25 somitů a vyznačuje se založenými předními končetinovými pupeny. Jedná se ale jen o výjimku, většina těchto embryí se po implantaci dlouho nevyvíjí. Ve studii Kaufmana *et al.* (1977) pouhých 35 % dosáhlo stádia embryonálního válce a jen 25 % somitového stádia. Některá z nich byla životaschopná, nejvyvinutější měla funkční srdce. Celkově ale vykazovala narušenou organogenesi (Kaufman *et al.*, 1977), podobně jako gynogenetická embrya. Pokud byl k parthenogenetickým ICM přidán normální trofoblast, vyvíjela se až do 30–40somitového stádia (Barton *et al.*, 1985).

Vývoj parthenogenetických embryí delší než dva týdny (Kono *et al.*, 1996) není možný především kvůli chybějící expresi paternálních genů nezbytných pro funkční placentu (McGrath a Solter, 1984). Na rozdíl od normálních oplozených zárodků mají narušenou expresi mnoha genů, které jsou běžně umlčeny imprintingem na základě jejich parentálního původu (Cui *et al.*, 2007).

S využitím technik genového inženýrství je možné problém methylovaných oblastí kompenzovat. V únoru 2003 se tímto způsobem docílilo prvního narození parthenogenetického savce: bimaternální diploidní myši pojmenované Kaguya (Kono *et al.*, 2004). Zvláštní na těchto myších s upravenými DMR na chromosomech 7 a 12 je také to, že žily průměrně o 186 dní, tedy téměř o 30 % déle než kontroly (Kawahara a Kono, 2010). Tento úspěch potvrdil, že jednou ze zásadních překážek embryonálního vývoje jsou ne-standardní epigenetické modifikace (Kono, 2009).

Experimentální část

2.4 Monitorování vývoje embryí

Monitorovací systémy byly vyvinuty primárně pro účely center asistované reprodukce. Dosavadní praxí bylo každodenní vyjímání embryí z inkubátoru, pozorování pod mikroskopem, zaznamenání vývojového stádia a opětovné navrácení do kultivačních podmínek. Nevýhod má takový postup hned několik. Jednak je narušováno prostředí embryí – vystavení světlu a změně teploty – a je s nimi fyzicky manipulováno, což může negativně ovlivnit jejich vývoj. Dalším nedostatkem je sledování změn v denním intervalu. Time-lapse systémy v nastavené frekvenci snímají kultivovaná embrya a vytváří ze snímků video k dalšímu vyhodnocení. Jsou tak zachycena všechna stádia a přesně časově určena jednotlivá dělení blastomer.

V současnosti jsou na trhu tři monitorovací systémy: Primo Vision (Vitrolife), který se jako mikroskop vkládá do inkubátoru, EmbryoScope (Unisense Ferilitech), který sám funguje jako inkubátor, a EEVA (Early Embryonic Viability Assessment, Auxogyn), využívající techniku mikroskopie temného pole (Kovacs, 2014). Uplatňují se v klinické praxi i ve výzkumu.

Monitorovací systém Primo Vision se skládá z mikroskopu určeného k vložení do inkubátoru a propojení s počítačem. Kultivace embryí probíhá ve speciálních miskách po devíti nebo šestnácti jamkách. Embrya se mohou vkládat samostatně, nebo po několika do jedné jamky. Překryta jsou kultivačním médiem a celá miska je zalita olejem. Na rozdíl od EmbryoScope probíhá snímání všech embryí najednou a nijak se s nimi nehýbe, jsou méně vystavována světlu a elektromagnetickému záření (Kovacs, 2014).

2.5 Materiál a metody

Šestitýdenní samice myši (*Mus musculus*) kmene B6D2F1 byly stimulovány k superovulaci intraperitoneálně podanými 7,5 IU PMSG (gonadotropin séra březích klisen) a po 48 hodinách 5 IU hCG (lidský choriový gonadotropin).

Po dalších 16 hodinách byly metafázické oocyty, získané z ampully vejcovodu, zbaveny kumulárních buněk 1% hyaluronidasou, promyty HTF (lidská tubární tekutina) a aktivovány pomocí SrCl_2 (5 mM) v KSOM (draslíkem obohacené jednoduché optimalizované médium). Pro vytvoření diploidních parthenogenetických embryí byl do aktivačního média přidán cytochalasin B (5 $\mu\text{g/ml}$).

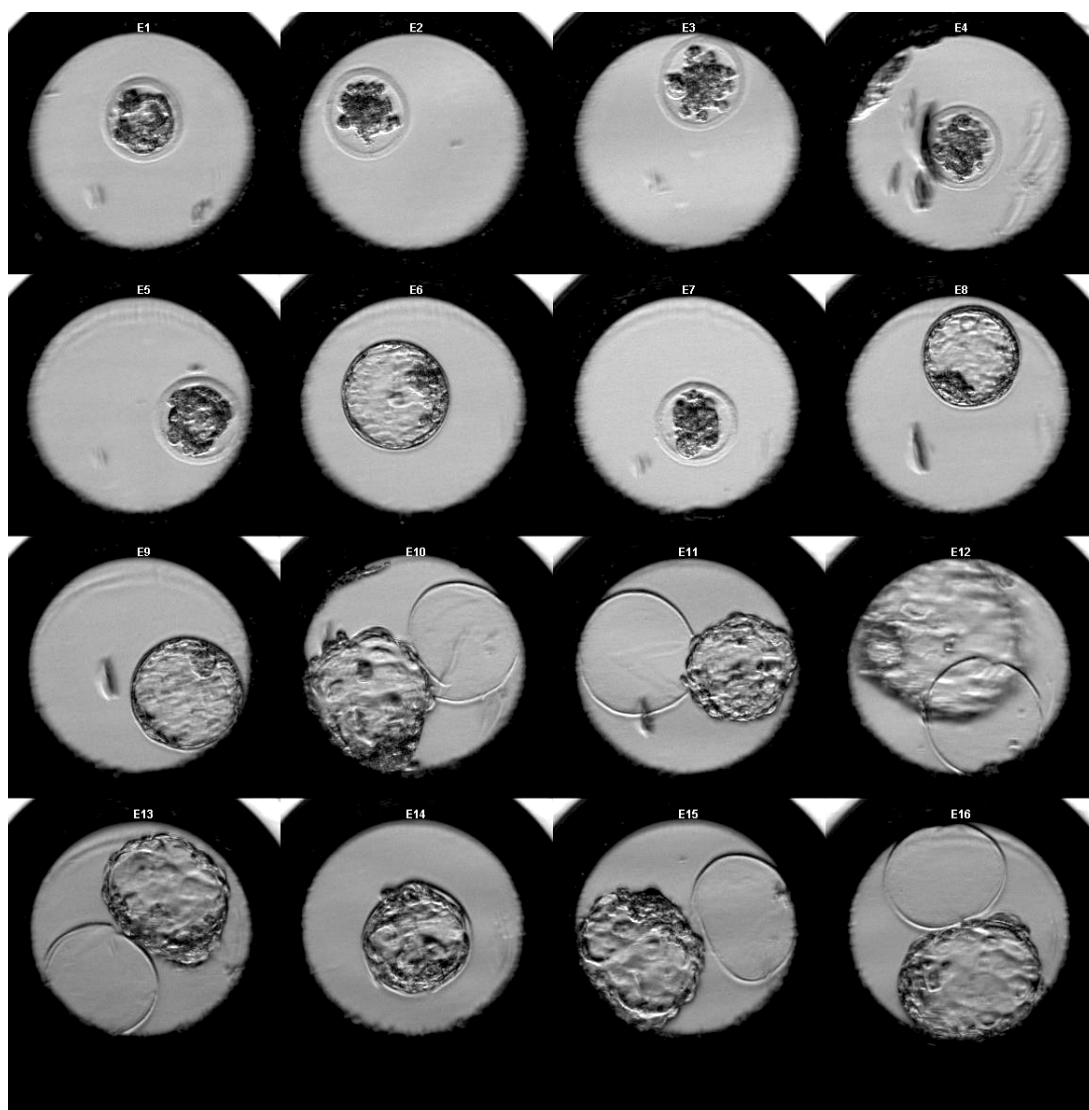
Vybraná pronukleární haploidní a diploidní embrya byla po jednom vložena do jamek Primo Vision misky s KSOM a zalita minerálním olejem.

2.6 Výsledky a diskuse

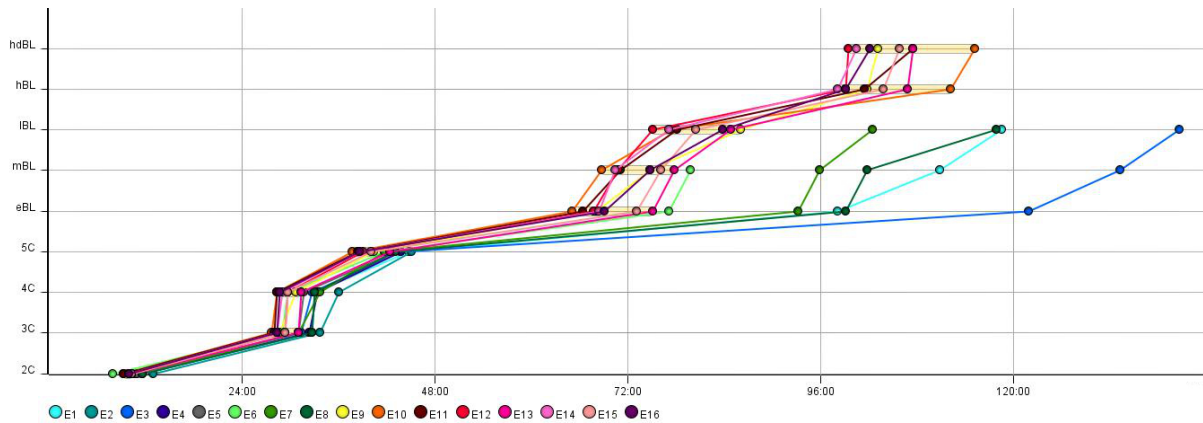
Při pětidenním pozorování pomocí time-lapse monitorovacího systému Primo Vision, jsou odchylky ve vývoji výrazně vidět. Již první dělení do dvou buněk bývá oproti diploidním embryím zpožděno. Zpoždění dále roste a největší je při přechodu v blastocystu, kdy překračuje i deset hodin. Haploidních embryí, která se dostanou do fáze blastocysty, není tolik jako v kontrolní skupině diploidních parthenogenonů.

Obrázky 8, 9 a 10 znázorňují výsledky tří provedených experimentů, ve kterých bylo pozorováno celkem 24 haploidních a 24 diploidních parthenogenetických embryí. V posledním případě se do blastocysty vyvíjelo všech 16 embryí, ale i přesto je v grafu patrný pomalejší vývoj haploidních embryí, podobně jako v předchozích dvou experimentech.

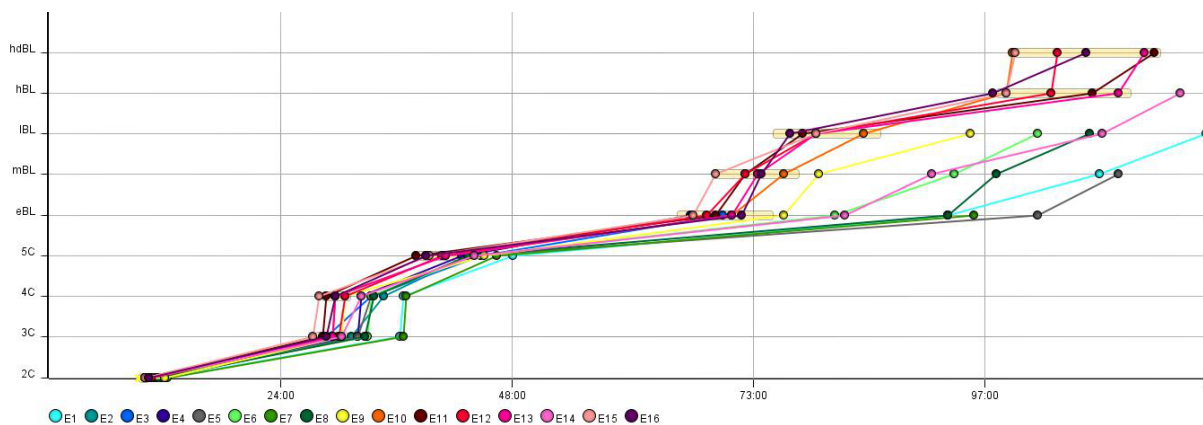
Diploidní parthenogenetická embrya stabilně dosahují blastocysty. Výnosnost haploidních parthenogenetických embryí je ovšem ve srovnání s nimi nízká, jak dokazuje obrázek 7 druhého experimentu.



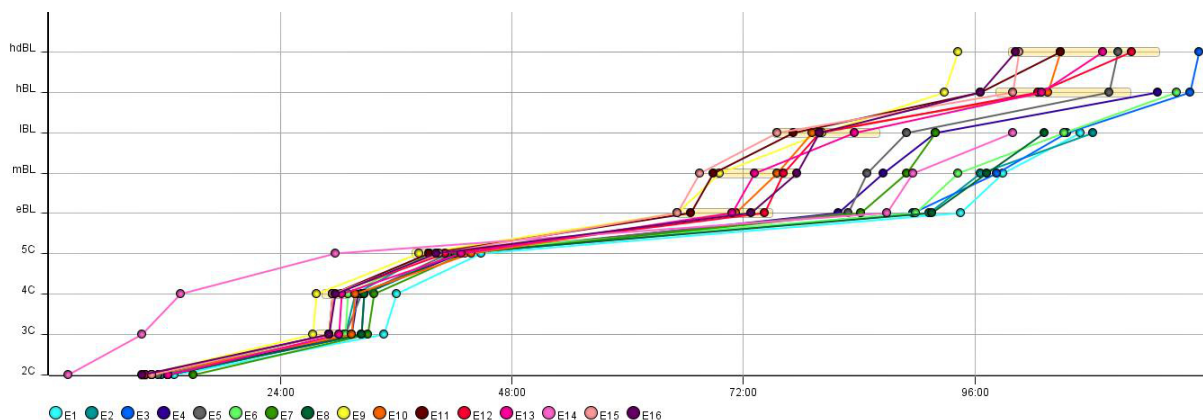
Obrázek 7: Snímek pořízený monitorovacím systémem Primo Vision. **E1–E8:** Haploidní parthenogenetická embrya. **E9–E16:** Diploidní parthenogenetická embrya.



Obrázek 8: Graf vývoje embryí prvního experimentu, vytvořený z dat získaných monitorovacím systémem Primo Vision. **E1–E8:** Haploidní parthenogenetická embrya. **E9–E16:** Diploidní parthenogenetická embrya. **Svislá osa:** 2C, 3C, 4C, 5C, dvou-, troj-, čtyř- a pětibuněčné stádium; eBL, časná blastocysta; mBL, střední blastocysta; IBL, pozdní blastocysta; hBL, „klubající se“ (hatching) blastocysta; hdBL, blastocysta uvolněná ze zony pellucidy (hatched). **Vodorovná osa:** Čas (hodiny:minuty) od začátku pozorování.



Obrázek 9: Graf vývoje embryí druhého experimentu, vytvořený z dat získaných monitorovacím systémem Primo Vision. **E1–E8:** Haploidní parthenogenetická embrya. **E9–E16:** Diploidní parthenogenetická embrya. Shodná legenda s obrázkem 8.



Obrázek 10: Graf vývoje embryí třetího experimentu, vytvořený z dat získaných monitorovacím systémem Primo Vision. **E1–E8:** Haploidní parthenogenetická embrya. **E9–E16:** Diploidní parthenogenetická embrya. Shodná legenda s obrázkem 8.

Závěr

Rešeršní práce shrnuje, jakými metodami je možné připravit haploidní blastocysty myši určené pro derivaci haploidních embryonálních kmenových buněk. Základní dělení uniparentálních embryí odpovídá původu jejich genomu. Rozlišují se parthenogenetická, gynogenetická a androgenetická embrya. Parthenogenony vznikají samotnou aktivací oocyty, gynogenony a androgenony jsou nejčastěji získávány mikromanipulační technikou vyjmutí prvojádra.

Vývoj těchto embryí vykazuje ve srovnání s diploidními embryi znatelné odchylky. Mezi nejnápadnější patří pomalejší dělení buněk a menší počet blastomer. Postimplantační vývoj haploidních embryí je výrazně omezen. Také vývoj diploidních parthenogenonů, gynogenonů a androgenonů je odlišný od normálních oplozených embryí s paternální i maternální částí genomu.

Příčiny nejsou stále dostatečně známy. Výsledky jednotlivých studií se neshodují v časových údajích rychlosti vývoje, ani v úspěšnosti aktivace a dosažení jednotlivých vývojových stádií. Většina výzkumu se zaměřuje buď na parthenogenetická embrya, vzhledem k snadnosti jejich získání, nebo na diploidní gynogenetická a androgenetická embrya, kvůli jejich postimplantačnímu vývoji. Chybí tedy dostatek dat pro přesnější závěry ohledně příčin poruch preimplantačního vývoje haploidních embryí.

Jedním z klíčových okamžiků je aktivace oocyty. Umělá aktivace patrně nemůže nahradit přirozenou aktivaci spermií.

Zejména u diploidních embryí je diskutován vliv genomického imprintingu. Ten prostřednictvím methylace rozlišuje paternálně a maternálně zděděné alely. Pokud pak v embryu jedna z nich chybí, nebo jsou aktivní obě, vede to přirozeně k narušení genové exprese. V důsledku toho jsou pravděpodobně orgány v buňkách defektní, neprobíhá správně syntéza proteinů a metabolická aktivita je snížena. To vše má celkově za následek pomalejší vývoj a problémy s diferenciací buněk. Ukazuje se, že právě aktivační a kultivační procesy mohou epigenetické modifikace embrya ovlivnit.

Vzhledem k vývojovým poruchám a strukturním odlišnostem, popsaným ve druhé kapitole a doloženým v experimentální části, je současným předmětem výzkumu – a navazující diplomové práce – zjistit, jak zefektivnit metody produkce haploidních blastocyst. Úspěšnost přípravy uniparentálních embryí je totiž stále poměrně nízká, avšak ve srovnání s minulým stoletím mají dnes vědecké týmy k dispozici více znalostí a nástrojů. Vyřešení problémů s vývojem haploidních embryí zdokonalí další laboratorní metody, kde je výhodou použití homozygotních buněk či jedinců. Jejich výzkum je zásadní především pro širokou oblast genetiky, asistovanou reprodukci, výzkum rakoviny, testování léčiv, případně pro jejich přímé využití v regenerativní medicíně.

Seznam literatury

- Allen, N. D., Barton, S. C., Hilton, K., Norris, M. L., Surani, M. A. (1994). A functional analysis of imprinting in parthenogenetic embryonic stem cells. *Development*, 120(6):1473–1482.
- Austin, C. R., Braden, A. W. H. (1955). Observations on nuclear size and form in living rat and mouse eggs. *Experimental Cell Research*, 8(1):163–172.
- Bai, G.-Y., Song, S.-H., Wang, Z.-D., Shan, Z.-Y., Sun, R.-Z., Liu, C.-J., Wu, Y.-S., Li, T., Lei, L. (2016). Embryos aggregation improves development and imprinting gene expression in mouse parthenogenesis. *Development, Growth & Differentiation*, 58(3):270–279.
- Barlow, D. P., Stöger, R., Herrmann, B. G., Saito, K., Schweifer, N. (1991). The mouse insulin-like growth factor type-2 receptor is imprinted and closely linked to the Tme locus. *Nature*, 349(6304):84–87.
- Barra, J., Renard, J. (1988). Diploid mouse embryos constructed at the late 2-cell stage from haploid parthenotes and androgenotes can develop to term. *Development*, 102(4):773–779.
- Barton, S. C., Adams, C. A., Norris, M. L., Surani, M. A. H. (1985). Development of gynogenetic and parthenogenetic inner cell mass and trophoctoderm tissues in reconstituted blastocysts in the mouse. *Journal of Embryology and Experimental Morphology*, 90:267–285.
- Barton, S. C., Arney, K. L., Shi, W., Niveleau, A., Fundele, R., Surani, M. A., Haaf, T. (2001). Genome-wide methylation patterns in normal and uniparental early mouse embryos. *Human Molecular Genetics*, 10(26):2983–2987.
- Barton, S. C., Ferguson-Smith, A. C., Fundele, R., Surani, M. A. (1991). Influence of paternally imprinted genes on development. *Development*, 113(2):679–687.
- Barton, S. C., Surani, M. A. H., Norris, M. L. (1984). Role of paternal and maternal genomes in mouse development. *Nature*, 311(5984):374–376.
- Beaujean, N., Taylor, J. E., McGarry, M., Gardner, J. O., Wilmut, I., Loi, P., Ptak, G., Galli, C., Lazzari, G., Bird, A., Young, L. E., Meehan, R. R. (2004). The effect of interspecific oocytes on demethylation of sperm DNA. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 101(20):7636–7640.
- Borsuk, E. (1982). Preimplantation development of gynogenetic diploid mouse embryos. *Journal of Embryology and Experimental Morphology*, 69:215–222.
- Bos-Mikich, A., Bressan, F. F., Ruggeri, R. R., Watanabe, Y., Meirelles, F. V. (2016). Parthenogenesis and human assisted reproduction. *Stem Cells International*, doi:10.1155/2016/1970843.
- Bos-Mikich, A., Swann, K., Whittingham, D. G. (1995). Calcium oscillations and protein synthesis inhibition synergistically activate mouse oocytes. *Molecular Reproduction and Development*, 41(1):84–90.
- Braden, A. W. H., Austin, C. R. (1954). Reactions of unfertilized mouse eggs to some experimental stimuli. *Experimental Cell Research*, 7(1):277–280.
- Brevini, T. A. L., Pennarossa, G., de Eguileor, M., Tettamanti, G., Ragni, G., Paffoni, A., Gandolfi, F. (2011). Parthenogenetic cell lines: an unstable equilibrium between pluripotency and malignant transformation. *Current Pharmaceutical Biotechnology*, 12(2):206–212.
- Brevini, T. A. L., Pennarossa, G., Maffei, S., Tettamanti, G., Vanelli, A., Isaac, S., Eden, A., Ledda, S., de Eguileor, M., Gandolfi, F. (2012). Centrosome amplification and chromosomal instability in human and animal parthenogenetic cell lines. *Stem Cell Reviews and Reports*, 8(4):1076–1087.
- Calarco, P. G., Brown, E. H. (1969). An ultrastructural and cytological study of preimplantation development of the mouse. *The Journal of Experimental Zoology*, 171(3):253–283.
- Chen, Y.-H., Yu, J. (2014). Epigenetic disruptions of histone signatures for the trophoctoderm and inner cell mass in mouse parthenogenetic embryos. *Stem Cells and Development*, 24(5):550–564.
- Cui, L. B., Huang, X. Y., Sun, F. Z. (2005). Nucleocytoplasmic ratio of fully grown germinal vesicle oocytes is essential for mouse meiotic chromosome segregation and alignment, spindle shape and

- early embryonic development. *Human Reproduction*, 20(10):2946–2953.
- Cui, X. S., Li, X. Y., Kim, N. H. (2007). Global gene transcription patterns in in vitro-cultured fertilized embryos and diploid and haploid murine parthenotes. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 352(3):709–715.
- Debec, A. (1984). Evolution of karyotype in haploid cell lines of *Drosophila melanogaster*. *Experimental Cell Research*, 151(1):236–246.
- DeChiara, T. M., Robertson, E. J., Efstratiadis, A. (1991). Parental imprinting of the mouse insulin-like growth factor II gene. *Cell*, 64(4):849–859.
- Edwards, R. G. (1957a). The experimental induction of gynogenesis in the mouse. I. Irradiation of the sperm by X-rays. *Proceedings of the Royal Society of London, B* 146(925):469–487.
- Edwards, R. G. (1957b). The experimental induction of gynogenesis in the mouse. II. Ultra-Violet irradiation of the sperm. *Proceedings of the Royal Society of London, B* 146(925):488–504.
- Edwards, R. G. (1958). The number of cells and cleavages in haploid, diploid, polyploid, and other heteroploid mouse embryos at 3.5 days gestation. *Journal of Experimental Zoology*, 138(2):189–207.
- Elling, U., Taubenschmid, J., Wirnsberger, G., O'Malley, R., Demers, S. P., Vanhaelen, Q., Shukalyuk, A. I., Schmauss, G., Schramek, D., Schnuetgen, F., Von Melchner, H., Ecker, J. R., Stanford, W. L., Zuber, J., Stark, A., Penninger, J. M. (2011). Forward and reverse genetics through derivation of haploid mouse embryonic stem cells. *Cell Stem Cell*, 9(6):563–574.
- Endo, B. S., Takagi, N. (1981). A preliminary cytogenetic study of X chromosome inactivation in diploid parthenogenetic embryos from LT/Sv mice. *The Japanese Journal of Genetics*, 56(4):349–356.
- Escribá, M.-J., Escrich, L., Galiana, Y., Grau, N., Pellicer, A. (2016). Kinetics of the early development of uniparental human haploid embryos. *Fertility and Sterility*, 105(5):1360–1368.
- Evsikov, S. V., Morozova, L. M., Solomko, A. P. (1990). The role of the nucleocytoplasmic ratio in development regulation of the early mouse embryo. *Development*, 109(2):323–328.
- Freed, J. J., Mezger-Freed, L. (1970). Stable haploid cultured cell lines from frog embryos. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 65(2):337–344.
- Fundele, R., Norris, M. L., Barton, S. C., Reik, W., Surani, M. A. (1989). Systematic non-uniform distribution of parthenogenetic cells in adult mouse chimaeras. *Development*, 106(2):29–35.
- Fundele, R. H., Norris, M. L., Barton, S. C., Fehla, M., Howlett, S. K., Mills, W. E., Surani, M. A. (1990). Temporal and spatial selection against parthenogenetic cells during development of fetal chimaeras. *Development*, 108(1):203–211.
- Graham, C. F. (1970). Parthenogenetic mouse blastocysts. *Nature*, 226(5241):165–167.
- Graham, C. F., Deussen, Z. A. (1974). In vitro activation of mouse eggs. *Journal of Embryology and Experimental Morphology*, 31(2):497–512.
- Gueth-Hallonet, C., Antony, C., Aghion, J., Santa-Maria, A., Lajoie-Mazenc, I., Wright, M., Maro, B. (1993). Gamma-tubulin is present in acentriolar MTOCs during early mouse development. *Journal of Cell Science*, 105(1):157–166.
- Guo, F., Li, X., Liang, D., Li, T., Zhu, P., Guo, H., Wu, X., Wen, L., Gu, T.-P., Hu, B., Walsh, C. P., Li, J., Tang, F., Xu, G.-L. (2014). Active and passive demethylation of male and female pronuclear DNA in the mammalian zygote. *Cell Stem Cell*, 15(4):447–458.
- Hagemann, L. J., First, N. L. (1992). Embryonic cytoplasmic extracts rescue murine androgenones to the blastocyst stage. *Development*, 114(4):997–1001.
- Hardy, K. (1997). Cell death in the mammalian blastocyst. *Molecular Human Reproduction*, 3(10):919–925.
- Hardy, K., Handyside, A. H. (1996). Metabolism and cell allocation during parthenogenetic preimplantation mouse development. *Molecular Reproduction and Development*, 43(3):313–322.

- Henery, C. C., Kaufman, M. H. (1992). Cleavage rate of haploid and diploid parthenogenetic mouse embryos during the preimplantation period. *Molecular Reproduction and Development*, 31(4):258–263.
- Hikichi, T., Ohta, H., Wakayama, S., Wakayama, T. (2010). Functional full-term placentas formed from parthenogenetic embryos using serial nuclear transfer. *Development*, 137(17):2841–2847.
- Hoppe, P. C., Illmensee, K. (1977). Microsurgically produced homozygous-diploid uniparental mice. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 74(12):5657–5661.
- Hoppe, P. C., Illmensee, K. (1982). Full-term development after transplantation of parthenogenetic embryonic nuclei into fertilized mouse eggs. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 79(6):1912–1916.
- Horii, T., Hatada, I. (2015). Genome editing using mammalian haploid cells. *International Journal of Molecular Sciences*, 16(10):23604–23614.
- Hu, M., TuanMu, L.-C., Wei, H., Gao, F., Li, L., Zhang, S. (2015a). Development and imprinted gene expression in uniparental preimplantation mouse embryos in vitro. *Molecular Biology Reports*, 42(2):345–353.
- Hu, M., Zhao, Z., TuanMu, L.-C., Wei, H., Gao, F., Li, L., Ying, J., Zhang, S. (2015b). Analysis of imprinted gene expression and implantation in haploid androgenetic mouse embryos. *Andrologia*, 47(1):102–108.
- Jiang, H., Sun, B., Wang, W., Zhang, Z., Gao, F., Shi, G., Cui, B., Kong, X., He, Z., Ding, X., Kuang, Y., Fei, J., Sun, Y. J., Feng, Y., Jin, Y. (2007). Activation of paternally expressed imprinted genes in newly derived germline-competent mouse parthenogenetic embryonic stem cell lines. *Cell Research*, 17(9):792–803.
- Kaufman, M. H. (1973a). Parthenogenesis in the mouse. *Nature*, 242:475–476.
- Kaufman, M. H. (1973b). Timing of the first cleavage division of haploid mouse eggs, and the duration of its component stages. *Journal of Cell Science*, 13(2):553–566.
- Kaufman, M. H. (1973c). Timing of the first cleavage division of the mouse and the duration of its component stages: a study of living and fixed eggs. *Journal of Cell Science*, 12(3):799–808.
- Kaufman, M. H. (1975). Parthenogenetic activation of mouse oocytes following avertin anaesthesia. *Journal of Embryology and Experimental Morphology*, 33(4):941–946.
- Kaufman, M. H. (1976). Complete preimplantation development in culture of parthenogenetic mouse embryos. *Journal of Embryology and Experimental Morphology*, 35(1):179–190.
- Kaufman, M. H. (1978). Chromosome analysis of early postimplantation presumptive haploid parthenogenetic mouse embryos. *Journal of Embryology and Experimental Morphology*, 45:85–91.
- Kaufman, M. H. (1982). The chromosome complement of single-pronuclear haploid mouse embryos following activation by ethanol treatment. *Journal of Embryology and Experimental Morphology*, 71:139–154.
- Kaufman, M. H. (1983). *Early Mammalian Development: Parthenogenetic Studies*. Cambridge University Press.
- Kaufman, M. H., Barton, S. C., Surani, M. A. H. (1977). Normal postimplantation development of mouse parthenogenetic embryos to the forelimb bud stage. *Nature*, 265(5589):53–55.
- Kaufman, M. H., Lee, K. K., Speirs, S. (1989). Post-implantation development and cytogenetic analysis of diandric heterozygous diploid mouse embryos. *Cytogenetics and Cell Genetics*, 52(1):15–18.
- Kaufman, M. H., Robertson, E. J., Handyside, A. H., Evans, M. J. (1983). Establishment of pluripotent cell-lines from haploid mouse embryos. *Journal of Embryology and Experimental Morphology*, 73:249–261.
- Kawahara, M., Kono, T. (2010). Longevity in mice without a father. *Human Reproduction*, 25(2):457–461.

- Kawahara, M., Wu, Q., Yaguchi, Y., Ferguson-Smith, A. C., Kono, T. (2006). Complementary roles of genes regulated by two paternally methylated imprinted regions on chromosomes 7 and 12 in mouse placentation. *Human Molecular Genetics*, 15(19):2869–2879.
- Kay, G. F., Barton, S. C., Surani, M. A., Rastan, S. (1994). Imprinting and X chromosome counting mechanisms determine Xist expression in early mouse development. *Cell*, 77(5):639–650.
- Keverne, E. B., Fundele, R., Narasimha, M., Barton, S. C., Surani, M. A. (1996). Genomic imprinting and the differential roles of parental genomes in brain development. *Developmental Brain Research*, 92(1):91–100.
- Kobayashi, M., Yoshida, A. (2015). Establishment of gynogenetic haploid embryonic stem cells and generation of cloned oocytes in mice. *Fertility and Sterility*, 104(3):e92.
- Komar, A. (1973). Parthenogenetic development of mouse eggs activated by heat shock. *Journal of Reproduction and Fertility*, 35(3):433–443.
- Kono, T. (2009). Genetic modification for bimaternal embryo development. *Reproduction, Fertility and Development*, 21(1):31–36.
- Kono, T., Obata, Y., Wu, Q., Niwa, K., Ono, Y., Yamamoto, Y., Park, E. S., Seo, J.-S., Ogawa, H. (2004). Birth of parthenogenetic mice that can develop to adulthood. *Nature*, 428(6985):860–864.
- Kono, T., Obata, Y., Yoshimizu, T., Nakahara, T., Carroll, J. (1996). Epigenetic modifications during oocyte growth correlates with extended parthenogenetic development in the mouse. *Nature Genetics*, 13(1):91–94.
- Kono, T., Sotomaru, Y., Katsuzawa, Y., Dandolo, L. (2002). Mouse parthenogenetic embryos with monoallelic H19 expression can develop to day 17.5 of gestation. *Developmental Biology*, 243(2):294–300.
- Kono, T., Sotomaru, Y., Sato, Y., Nakahara, T. (1993). Development of androgenetic mouse embryos produced by in vitro fertilization of enucleated oocytes. *Molecular Reproduction and Development*, 34(1):43–46.
- Kovacs, P. (2014). Embryo selection: the role of time-lapse monitoring. *Reproductive Biology and Endocrinology*, 12:124–134.
- Latham, K. E. (1996). X chromosome imprinting and inactivation in the early mammalian embryo. *Trends in Genetics*, 12(4):134–138.
- Latham, K. E., Akutsu, H., Patel, B., Yanagimachi, R. (2002). Comparison of gene expression during preimplantation development between diploid and haploid mouse embryos. *Biology of Reproduction*, 67(2):386–392.
- Latham, K. E., Rambhatla, L. (1995). Expression of X-linked genes in androgenetic, gynogenetic, and normal mouse preimplantation embryos. *Developmental Genetics*, 17(3):212–222.
- Lee, B. Y., Shim, S. W., Kim, Y. S., Kim, S. B. (2011). The presence of centrioles and centrosomes in ovarian mature cystic teratoma cells suggests human parthenotes developed in vitro can differentiate into mature cells without a sperm centriole. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 415(2):401–404.
- Leeb, M., Wutz, A. (2011). Derivation of haploid embryonic stem cells from mouse embryos. *Nature*, 479(7371):131–134.
- Leeb, M., Wutz, A. (2013). Haploid genomes illustrate epigenetic constraints and gene dosage effects in mammals. *Epigenetics & Chromatin*, 6(1):41–50.
- Li, C., Fang, D., Yong, L., Fengrui, W., Biao, D., Rong, W., Wenyong, L. (2015). Comparative analysis of H3K9 acetylation level in parthenogenetic, and in vitro and in vivo developed mouse embryos. *Yi chuan = Hereditas / Zhongguo yi chuan xue hui bian ji*, 37(1):77–83.
- Li, W., Li, X., Li, T., Jiang, M.-G., Wan, H., Luo, G.-Z., Feng, C., Cui, X., Teng, F., Yuan, Y., Zhou, Q., Gu, Q., Shuai, L., Sha, J., Xiao, Y., Wang, L., Liu, Z., Wang, X.-J., Zhao, X.-Y., Zhou, Q. (2013). Genetic modification and screening in rat using haploid embryonic stem cells. *Cell Stem Cell*, 14(3):404–

- Li, W., Shuai, L., Wan, H., Dong, M., Wang, M., Sang, L., Feng, C., Luo, G.-Z., Li, T., Li, X., Wang, L., Zheng, Q.-Y., Sheng, C., Wu, H.-J., Liu, Z., Liu, L., Wang, L., Wang, X.-J., Zhao, X.-Y., Zhou, Q. (2012). Androgenetic haploid embryonic stem cells produce live transgenic mice. *Nature*, 490(7420):407–411.
- Li, Y., Sasaki, H. (2011). Genomic imprinting in mammals: its life cycle, molecular mechanisms and reprogramming. *Nature*, 21(3):466–473.
- Li, Z., Wan, H., Feng, G., Wang, L., He, Z., Wang, Y., Wang, X.-J., Li, W., Zhou, Q., Hu, B. (2016). Birth of fertile bimaternal offspring following intracytoplasmic injection of parthenogenetic haploid embryonic stem cells. *Cell Research*, 26(1):135–138.
- Liang, C.-G., Han, Z., Cheng, Y., Zhong, Z., Latham, K. E. (2009). Effects of ooplasm transfer on paternal genome function in mice. *Human Reproduction*, 24(11):2718–2728.
- Liu, J.-H., Zhu, J.-Q., Liang, X.-W., Yin, S., Safiriyu Idowu Ola, Hou, Y., Chen, D.-Y., Schatten, H., Sun, Q.-Y. (2008). Diploid parthenogenetic embryos adopt a maternal-type methylation pattern on both sets of maternal chromosomes. *Genomics*, 91(2):121–128.
- Liu, L., Trimarchi, J. R., Keefe, D. L. (2000). Involvement of mitochondria in oxidative stress-induced cell death in mouse zygotes. *Biology of Reproduction*, 62(6):1745–1753.
- Liu, L., Trimarchi, J. R., Keefe, D. L. (2002). Haploidy but not parthenogenetic activation leads to increased incidence of apoptosis in mouse embryos. *Biology of Reproduction*, 66(1):204–210.
- Lyon, M. F. (1961). Gene action in the X-chromosome of the mouse (*Mus musculus* L.). *Nature*, 190:372–373.
- Ma, J.-Y., Liang, X.-W., Schatten, H., Sun, Q.-Y. (2012). Active DNA demethylation in mammalian preimplantation embryos: new insights and new perspectives. *Molecular Human Reproduction*, 18(7):333–340.
- Machaty, Z. (2016). Signal transduction in mammalian oocytes during fertilization. *Cell and Tissue Research*, 363(1):169–183.
- Mann, J. R., Gadi, I., Harbison, M. L., Abbondanzo, S. J., Stewart, C. L. (1990). Androgenetic mouse embryonic stem cells are pluripotent and cause skeletal defects in chimeras: Implications for genetic imprinting. *Cell*, 62(2):251–260.
- Mann, J. R., Lovell-Badge, R. H. (1987). The development of XO gynogenetic mouse embryos. *Development*, 99(3):411–416.
- Mann, J. R., Lovell-Badge, R. H. (1988). Two maternally derived X chromosomes contribute to parthenogenetic inviability. *Development*, 103(1):129–136.
- Markert, C. L., Petters, R. M. (1977). Homozygous mouse embryos produced by microsurgery. *The Journal of Experimental Zoology*, 201(2):295–302.
- Marshall, W. F. (2007). Stability and robustness of an organelle number control system: modeling and measuring homeostatic regulation of centriole abundance. *Biophysical Journal*, 93(5):1818–1833.
- McGrath, J., Solter, D. (1983). Nuclear transplantation in the mouse embryo by microsurgery and cell fusion. *Science*, 220(4603):1300–1302.
- McGrath, J., Solter, D. (1984). Completion of mouse embryogenesis requires both the maternal and paternal genomes. *Cell*, 37(1):179–183.
- McGrath, J., Solter, D. (1986). Nucleocytoplasmic interactions in the mouse embryo. *Journal of Embryology and Experimental Morphology*, 97:277–289.
- Meikrantz, W., Schlegel, R. (1995). Apoptosis and the cell cycle. *Journal of Cellular Biochemistry*, 58(2):160–174.
- Michalik, O., Dobosz, S., Zalewski, T., Sapota, M., Ocalewicz, K. (2015). Induction of gynogenetic and androgenetic haploid and doubled haploid development in the brown trout (*Salmo trutta* Linnaeus

- 1758). *Reproduction in Domestic Animals*, 50(2):256–262.
- Modlinski, J. A. (1975). Haploid mouse embryos obtained by microsurgical removal of one pronucleus. *Journal of Embryology and Experimental Morphology*, 33(4):897–905.
- Monk, D. (1988). Genomic imprinting. *Genes & Development*, 2(8):921–925.
- Mutter, G. L. (1997). Role of imprinting in abnormal human development. *Mutation Research*, 396(1-2):141–147.
- Nesterova, T. B., Barton, S. C., Surani, M. A., Brockdorff, N. (2001). Loss of Xist imprinting in diploid parthenogenetic preimplantation embryos. *Developmental Biology*, 235(2):343–350.
- Newport, J., Kirschner, M. (1982). A major developmental transition in early *Xenopus* embryos: I. characterization and timing of cellular changes at the midblastula stage. *Cell*, 30(3):675–686.
- Niimura, S., Asami, T. (1996a). The amounts of cytoplasmic inclusions in parthenogenetic mouse blastocysts. *Japanese Journal of Fertility and Sterility*, 41(3):234–239 (v japonštině, sekundární citace).
- Niimura, S., Asami, T. (1996b). Ultrastructure of parthenogenetic mouse blastocysts. *Japanese Journal of Fertility and Sterility*, 41(2):186–190 (v japonštině, abstrakt).
- Niimura, S., Asami, T. (1997a). A histochemical study of the steroid metabolism in parthenogenetic mouse blastocysts. *Journal of Reproduction and Development*, 43(3):251–256.
- Niimura, S., Asami, T. (1997b). Histochemical studies of enzymes in parthenogenetic mouse blastocysts. *Japanese Journal of Fertility and Sterility*, 42(1):78–82 (v japonštině, abstrakt).
- Niimura, S., Futatsumata, N. (1998). Morphological studies on cell-binding in parthenogenetic mouse embryos during the course of blastocyst formation. *Journal of Mammalian Ova Research*, 15(3):173–178.
- Novakova, L., Kovacovicova, K., Dang-Nguyen, T. Q., Sodek, M., Skultety, M., Anger, M. (2016). A balance between nuclear and cytoplasmic volumes controls spindle length. *Plos One*, 11(2):e0149535.
- Obata, Y., Ono, Y., Akuzawa, H., Kwon, O. Y., Yoshizawa, M., Kono, T. (2000). Post-implantation development of mouse androgenetic embryos produced by in-vitro fertilization of enucleated oocytes. *Human Reproduction*, 15(4):874–880.
- Ogawa, H., Wu, Q., Komiyama, J., Obata, Y., Kono, T. (2006). Disruption of parental-specific expression of imprinted genes in uniparental fetuses. *FEBS Letters*, 580(22):5377–5384.
- Okamoto, I., Tan, S., Takagi, N. (2000). X-chromosome inactivation in XX androgenetic mouse embryos surviving implantation. *Development*, 127(19):4137–4145.
- O'Neill, G. T., Rolfe, L. R., Kaufman, M. H. (1991). Developmental potential and chromosome constitution of strontium-induced mouse parthenogenones. *Molecular Reproduction and Development*, 30(3):214–219.
- Paul, S., Knott, J. G. (2014). Epigenetic control of cell fate in mouse blastocysts: The role of covalent histone modifications and chromatin remodeling. *Molecular Reproduction and Development*, 81(2):171–182.
- Petzoldt, U., Muggleton-Harris, A. (1987). The effect of the nucleocytoplasmic ratio on protein synthesis and expression of a stage-specific antigen in early cleaving mouse embryos. *Development*, 99(4):481–491.
- Pratt, H. P., Ziomek, C. A., Reeve, W. J., Johnson, M. H. (1982). Compaction of the mouse embryo: an analysis of its components. *Journal of Embryology and Experimental Morphology*, 70:113–132.
- Sado, T., Ferguson-Smith, A. C. (2005). Imprinted X inactivation and reprogramming in the preimplantation mouse embryo. *Human Molecular Genetics*, 14(1):59–64.
- Sagi, I., Chia, G., Golan-Lev, T., Peretz, M., Weissbein, U., Sui, L., Sauer, M. V., Yanuka, O., Egli, D., Benvenisty, N. (2016). Derivation and differentiation of haploid human embryonic stem cells. *Nature*, 532(7597):107–111.
- Santos, F., Hendrich, B., Reik, W., Dean, W. (2002). Dynamic reprogramming of DNA methylation in the

- early mouse embryo. *Developmental Biology*, 241(1):172–182.
- Saunders, C. M., Larman, M. G., Parrington, J., Cox, L. J., Royse, J., Blayney, L. M., Swann, K., Lai, F. A. (2002). PLC zeta: a sperm-specific trigger of Ca²⁺ oscillations in eggs and embryo development. *Development*, 129(15):3533–3544.
- Schatten, G., Simerly, C., Schatten, H. (1991). Maternal inheritance of centrosomes in mammals? Studies on parthenogenesis and polyspermy in mice. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 88(15):6785–6789.
- Shan, Z.-Y., Wu, Y.-S., Shen, X.-H., Li, X., Xue, Y., Zheng, Z., Wang, Z.-D., Liu, C.-J., Sun, R.-Z., Li, Z.-Y., Shen, J.-L., Liu, Z.-H., Lei, L. (2012). Aggregation of pre-implantation embryos improves establishment of parthenogenetic stem cells and expression of imprinted genes. *Development, Growth & Differentiation*, 54(4):481–488.
- Siracusa, G., Whittingham, D. G., Molinaro, M., Vivarelli, E. (1978). Parthenogenetic activation of mouse oocytes induced by inhibitors of protein synthesis. *Journal of Embryology and Experimental Morphology*, 43:157–166.
- Solter, D., Biczysko, W., Graham, C., Pienkowski, M., Koprowski, H. (1974). Ultrastructure of early development of mouse parthenogenones. *The Journal of Experimental Zoology*, 188(1):1–23.
- Sotomaru, Y., Katsuzawa, Y., Hatada, I., Obata, Y., Sasaki, H., Kono, T. (2002). Unregulated expression of the imprinted genes H19 and Igf2r in mouse uniparental fetuses. *Journal of Biological Chemistry*, 277(14):12474–12478.
- Steinhardt, R. A., Epel, D., Carroll, E. J., Yanagimachi, R. (1974). Is calcium ionophore a universal activator for unfertilised eggs? *Nature*, 252(5478):41–43.
- Stevens, L. C., Varnum, D. S. (1974). The development of teratomas from parthenogenetically activated ovarian mouse eggs. *Developmental Biology*, 37(2):369–380.
- Surani, M. A., Barton, S. C., Howlett, S. K., Norris, M. L. (1988). Influence of chromosomal determinants on development of androgenetic and parthenogenetic cells. *Development*, 103(1):171–178.
- Surani, M. A. H., Barton, S. C., Norris, M. L. (1984). Development of reconstituted mouse eggs suggests imprinting of the genome during gametogenesis. *Nature*, 308(5959):548–550.
- Surani, M. A. H., Barton, S. C., Norris, M. L. (1987). Influence of parental chromosomes on spatial specificity in androgenetic-parthenogenetic chimaeras in the mouse. *Nature*, 326(6111):395–397.
- Szollosi, D. (1971). Morphological changes in mouse eggs due to aging in the fallopian tube. *The American Journal of Anatomy*, 130(2):209–225.
- Szollosi, D., Calarco, P., Donahue, R. P. (1972). Absence of centrioles in the first and second meiotic spindles of mouse oocytes. *Journal of Cell Science*, 11(2):521–541.
- Takagi, N., Sasaki, M. (1975). Preferential inactivation of the paternally derived X chromosome in the extraembryonic membranes of the mouse. *Nature*, 256(5519):640–642.
- Takagi, N., Wake, N., Sasaki, M. (1978). Cytologic evidence for preferential inactivation of the paternally derived X chromosome in XX mouse blastocysts. *Cytogenetics and Cell Genetics*, 20(1):240–248.
- Tarkowski, A. K. (1977). In vitro development of haploid mouse embryos produced by bisection of one-cell fertilized eggs. *Journal of Embryology and Experimental Morphology*, 38:187–202.
- Tarkowski, A. K., Rossant, J. (1976). Haploid mouse blastocysts developed from bisected zygotes. *Nature*, 259(5545):663–665.
- Tarkowski, A. K., Witkowska, A., Nowicka, J. (1970). Experimental parthenogenesis in the mouse. *Nature*, 226(5241):162–165.
- Taylor, A. S., Braude, P. R. (1994). The early development and DNA content of activated human oocytes and parthenogenetic human embryos. *Human Reproduction*, 9(12):2389–2397.
- Thomson, J. A., Solter, D. (1988). The developmental fate of androgenetic, parthenogenetic, and gynogenetic cells in chimeric gastrulating mouse embryos. *Genes & Development*, 2(10):1344–1351.

- Wakayama, T., Yanagimachi, R. (1998). Fertilisability and developmental ability of mouse oocytes with reduced amounts of cytoplasm. *Zygote*, 6(4):341–346 (abstrakt).
- Witkowska, A. (1973). Parthenogenetic development of mouse embryos in vivo. I. Preimplantation development. *Journal of Embryology and Experimental Morphology*, 30(3):519–545.
- Wu, Q., Kumagai, T., Kawahara, M., Ogawa, H., Hiura, H., Obata, Y., Takano, R., Kono, T. (2006). Regulated expression of two sets of paternally imprinted genes is necessary for mouse parthenogenetic development to term. *Reproduction*, 131(3):481–488.
- Yamazaki, W., Takahashi, M., Kawahara, M. (2015). Restricted development of mouse triploid fetuses with disorganized expression of imprinted genes. *Zygote*, 23(6):874–884.
- Yanagida, K., Fujikura, Y., Katayose, H. (2008). The present status of artificial oocyte activation in assisted reproductive technology. *Reproductive Medicine and Biology*, 7(3):133–142.
- Yang, H., Liu, Z., Ma, Y., Zhong, C., Yin, Q., Zhou, C., Shi, L., Cai, Y., Zhao, H., Wang, H., Tang, F., Wang, Y., Zhang, C., Liu, X.-Y., Lai, D., Jin, Y., Sun, Q., Li, J. (2013). Generation of haploid embryonic stem cells from *Macaca fascicularis* monkey parthenotes. *Cell Research*, 23(10):1187–1200.
- Yang, H., Shi, L., Wang, B.-A., Liang, D., Zhong, C., Liu, W., Nie, Y., Liu, J., Zhao, J., Gao, X., Li, D., Xu, G.-L., Li, J. (2012). Generation of genetically modified mice by oocyte injection of androgenetic haploid embryonic stem cells. *Cell*, 149(3):605–617.
- Yi, M., Hong, N., Hong, Y. (2009). Generation of medaka fish haploid embryonic stem cells. *Science*, 326(5951):430–433.