

**Endogenna transkrypcja
w mysich embrionach zachodzi
w stadium
1-komórkowym**

ENDOGENOUS TRANSCRIPTION OCCURS AT
THE 1-CELL STAGE IN THE MOUSE EMBRYO
CHRISTINE BOUNIOL, ERIC NGUYEN AND PASCALE DEBEY

Prezentuje: Magdalena Jasińska

W którym momencie w rozwoju embrionalnym myszy rozpoczyna się endogenna transkrypcja?

Hipoteza I: Endogenna transkrypcja rozpoczyna się w embrionach będących w stadium 2-komórkowym

Hipoteza II: Endogenna transkrypcja rozpoczyna się w embrionach będących w stadium 1-komórkowym

Warto wiedzieć:

α -Amanityna - organiczny związek chemiczny. Należy do najsilniej działających toksyn w grzybach. Silnie wiąże się z polimerazą RNA II, blokując elongację podczas syntezy RNA, a także duże stężenie wpływa na polimerazę RNA III, Polimeraza RNA I jest niewrażliwa na jej działanie.

Hipoteza I: Endogenna transkrypcja rozpoczyna się w embrionach będących w stadium 2-komórkowym

Wykazano, że:

- Wykrycie specyficznych dla pierwszych stadiów rozwoju białek jest możliwe we wczesnym i w późnym stadium 2-komórkowym
- Traktowanie α -amanityną embrionów w stadium 1-komórkowym nie wpływa na ich rozwój aż do osiągnięcia późnego stadium 2-komórkowego
- Wykrycie syntezy białek dziedziczonych od ojca jest możliwe od momentu osiągnięcia przez embrion stadium 2-komórkowego

Hipoteza II: Endogenna transkrypcja rozpoczyna się w embrionach będących w stadium 1-komórkowym

Wykazano, że:

- Znajdujące się w przedjądrzach embrionu 1-komórkowego heterogenne jądrowe poli(A)-RNA inkorporują na niskim poziomie [H^3]adenozyne
- Cytoplazma pochodząca z wyjądrzonego embrionu 1-komórkowego wzmacnia transkrypcję genów w jądrze pochodzącym z traktowanego α -amanityną embrionu 2-komórkowego
- Przejściowa ekspresja genu reporterowego wprowadzonego do przedjądra męskiego metodą mikroiniekcji zachodzi na niskim poziomie w embrionach znajdujących się w późnym stadium 1-komórkowym
- Przynajmniej jeden gen ulega ekspresji w stadium 1-komórkowym (analiza bibliotek cDNA z preimplantacyjnych zarodków)

MATERIAŁY I METODY



♀ C57/CBA

X

♂ C57/CBA

- Wiek: 4-8 tygodni
- Indukcja hormonalna: PMSG, hCG
- Zapłodnienie - ok 12 hphCG
- Izolacja embrionów – 17 hphCG
- Oczyszczenie w hialuronidazie (1 mg/ml)
- Hodowla in vitro w pożywce „Whitten’s medium” (Wm)

Embriony użyte do eksperymentu:

Czas od indukcji hCG do mikroiniekcji BrUTP (100mM)	Stadia rozwoju embrionalnego	Sposób podania i stężenie α -amanityny	Czas od indukcji hCG do podania α -amanityny
22 hphCG	wczesne stadium 1-komórkowe	bufor do iniekcji (50 μ g/ml)	22 hphCG
26-29 hphCG	późne stadium 1-komórkowe	bufor do iniekcji (50 μ g/ml)	26-29 hphCG
34 hphCG	wczesne stadium 2-komórkowe	pożywka Wm (10 μ g/ml)	28 hphCG
48 hphCG	późne stadium 2-komórkowe	pożywka Wm (10 μ g/ml)	28 hphCG
58 hphCG	stadium 4-komórkowe	brak danych	brak danych

- Mikroiniekcja wybranych embrionów 100 mM BrUTP (pH 7.4, 140mM KCl) – 1-5% objętości komórki
- Inkubacja 15 lub 60 minut (Temp. 37⁰C, 5% CO₂)
- Utrwalenie komórek i inkubacja z przeciwciałami

Przebieg eksperymentu

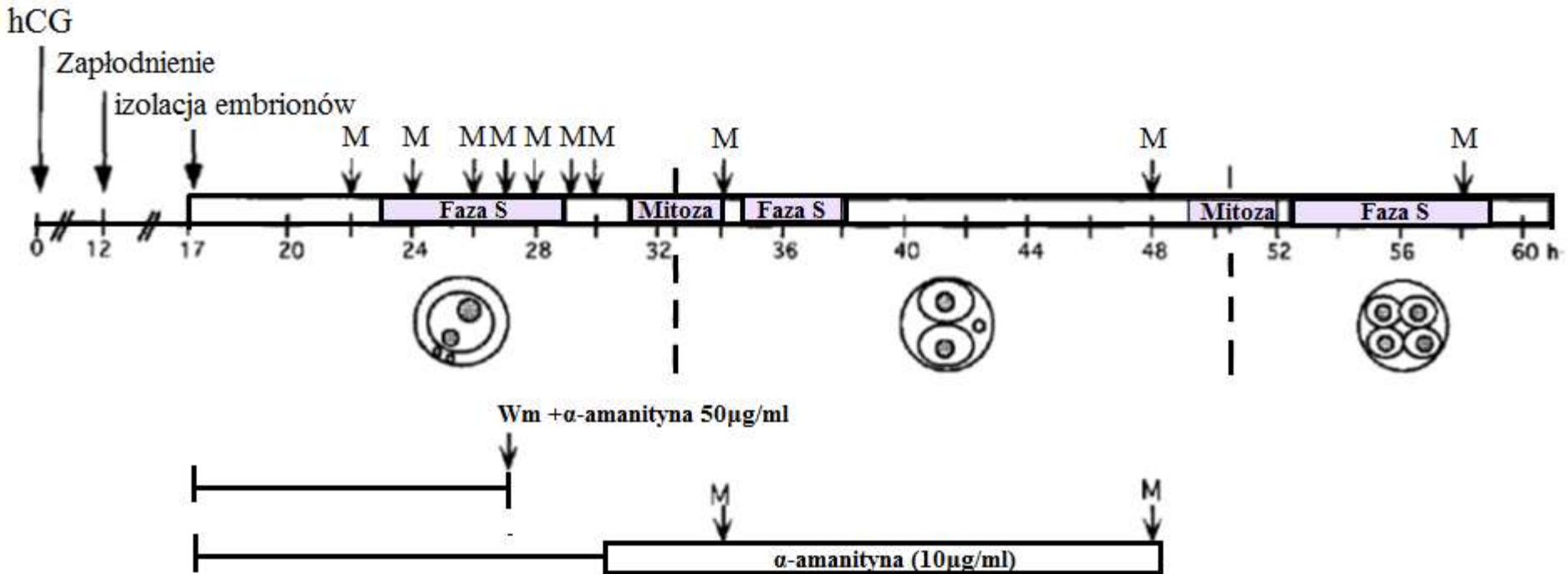


Fig.1. Przebieg eksperymentu ukazany na osi czasu. Za referencję uznano moment indukcji hCG; Strzałkami oznaczono kolejne mikroiniekcje;

Przebieg eksperymentu

Zapłodnienie

Izolacja embrionów na odpowiednich stadiach rozwojowych

Inkubacja w pożywce Wm ← α-amanityna

Mikroiniekcja BrUTP ←

Inkubacja 15 lub 60 minut w pożywce Wm

Utrwalenie w 2% PFA w PBS (20min)

Płukanie w PBS

Permeabilizacja w PBS z 0,2% tritonem (15min) ← Rnaza A (400μg/ml)

Płukanie w PBS ← lub Dnaza I (100μg/ml)

Blokowanie w PBS z 2% BSA (1h)

Płukanie w PBS

Inkubacja z I-rzędowym, monoklonalnym przeciwciałem anti-BrdU(3h)

Płukanie w PBS

Inkubacja z II-rzędowym przeciwciałem (1h)

Płukanie w PBS

Płukanie w PBS z Hoechst 33342

Ponowne utrwalenie w PBS z 2% PFA

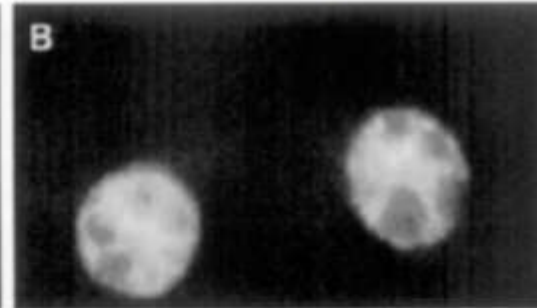
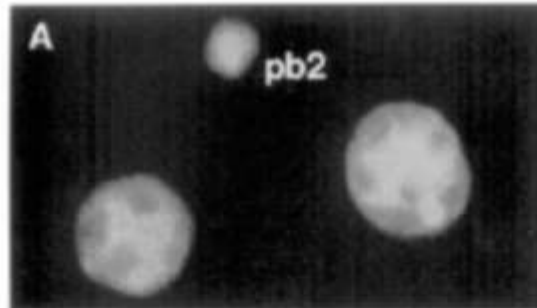
Płukanie w PBS

Wyniki

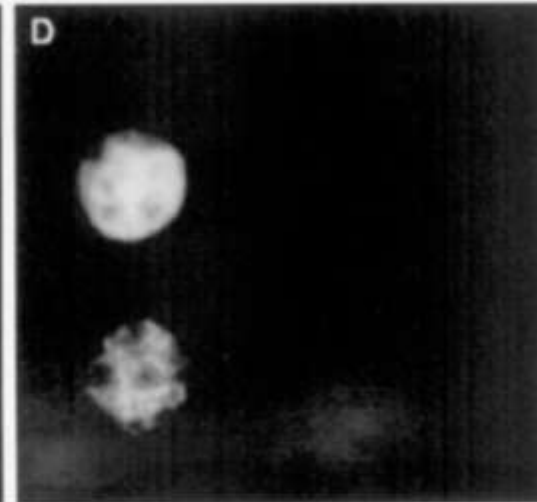
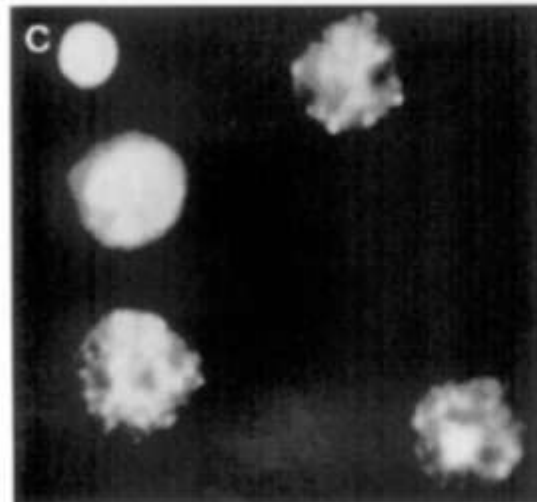
Hoechst 33342

Immunodetekcja BrU

Wczesne stadium
2-komórkowe



Stadium
4-komórkowe



Późne stadium
2-komórkowe po
podaniu α -amanityny

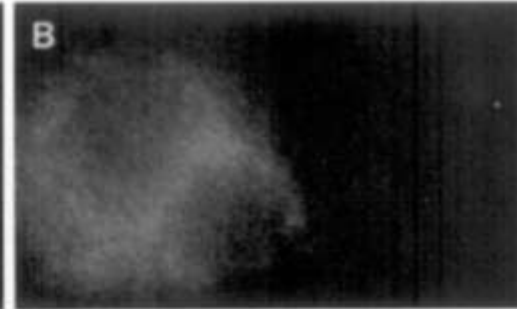
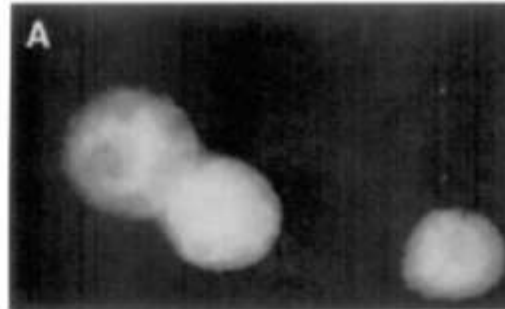


Wyniki

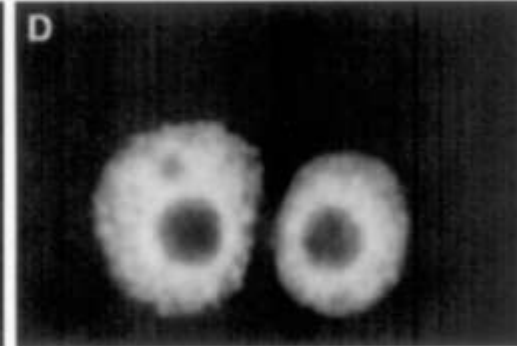
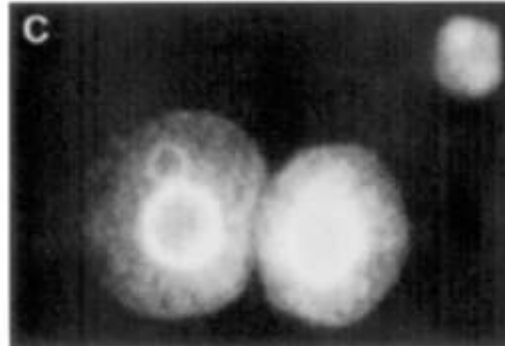
Hoechst 33342

Immunodetekcja BrU

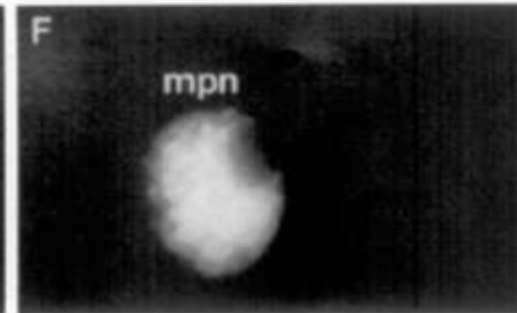
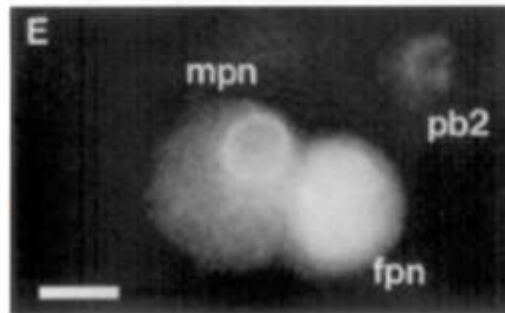
22 hphCG
Inkubacja po
mikroiniekcji - 1h



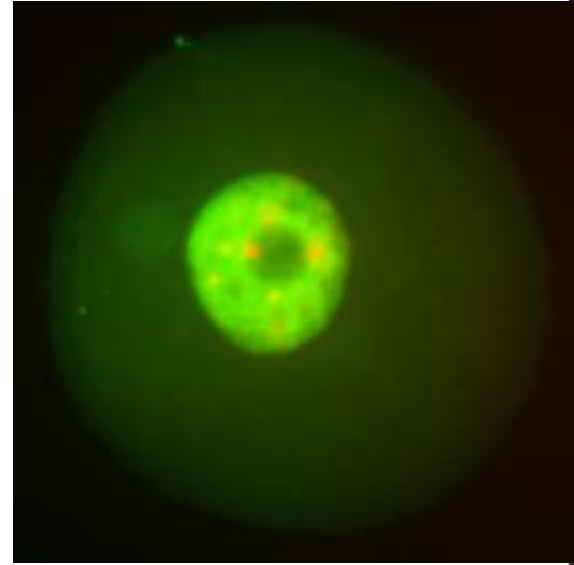
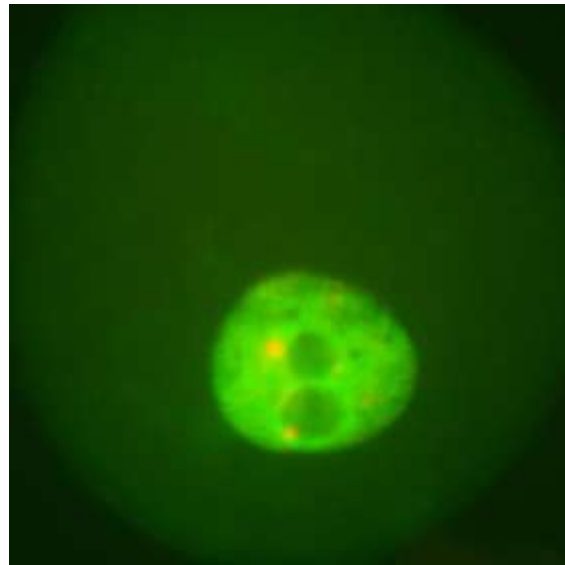
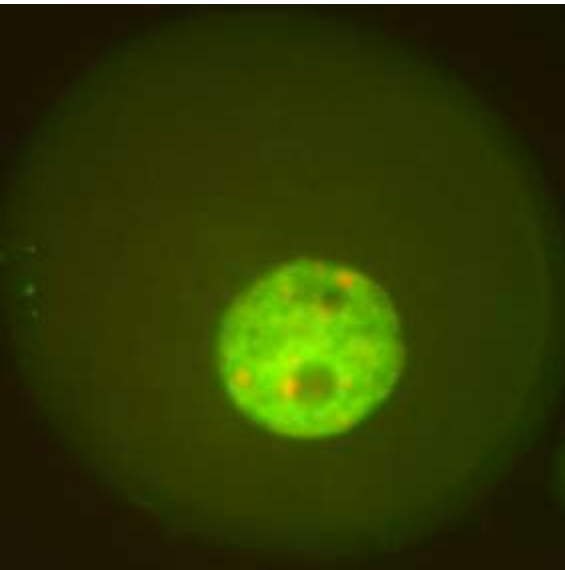
28 hphCG
Inkubacja po
mikroiniekcji - 1h



27 hphCG
Inkubacja po
mikroiniekcji - 15min



Zdjęcia preparatów zrobionych na fakulciecie Embriologia Eksperymentalna 2006/2007



Podsumowanie wyników:

Stadium rozwoju embrionalnego	Barwienie odczynnikiem Hoechst	Detekcja immunofluorescencji				Liczba jąder, w których zaszła transkrypcja
		Warunki standardowe	Po traktowaniu α -amanityną	Po traktowaniu RNazą A	Po traktowaniu DNazą I	
Wczesne stadium 1-komórkowe	+	-	-	-	-	0
Późne stadium 1-komórkowe	+	+	-	-	+	2 przedjądrza lub przedjądrze męskie
Wczesne stadium 2-komórkowe	+	+	-	-	+	2
Późne stadium 2-komórkowe	+	+	- *	-	+	2
Stadium 4-komórkowe	+	+	-	-	+	2

Podsumowanie wyników:

- W niektórych embrionach w późnym stadium 2-komórkowym po traktowaniu α -amanityną zaobserwowano fluorescencję w jąderkach
- Spośród 160 poddanych mikroiniekcji embrionów w późnym stadium 1-komórkowym:
 - 62% wykazywało jednolitą fluorescencję w obu przedjadrach
 - 28% nie wykazywało żadnej specyficznej fluorescencji
 - 10% zygot wykazywało aktywność transkrypcyjną tylko w przedjadrach męskich
- Spośród poddawanych mikroiniekcji embrionów pochodzących z tej samej myszy co godzinę w przedziale czasu 25-29 hphCG najwyższą proporcję zygot wykazujących aktywność transkrypcyjną tylko w męskim przedjadrze odnotowano w stadium odpowiadającym 27hphCG (29%). Zygot wykazujących aktywność jedynie w żeńskim przedjadrze nie zaobserwowano.

Wnioski

- **Endogenna transkrypcja przez polimerazę II RNA rozpoczyna się w embrionach znajdujących się w późnym stadium 1-komórkowym prawdopodobnie podczas późnej fazy S lub G2 pierwszego cyklu komórkowego**
- **Miejsca transkrypcji rozmieszczone są w postaci licznych kropek na obszarze całej nukleoplazmy, co wskazuje na podobną do występującej w komórkach somatycznych przestrzenną organizację domen transkrypcyjnie aktywnych w chromatynie**
- **Męskie przedjadrze jako pierwsze rozpoczyna endogenną transkrypcję w embrionach jednokomórkowych**
- **Transkrypcja RNA w stadium 1- komórkowym nie prowadzi do uruchomienia genomu zarodkowego, ponieważ nie towarzyszy jej pojawienie się nowych białek syntetyzowanych w wyniku ekspresji genomu zarodkowego.**



Dziękuję za uwagę !!

