

***„Birth of parthenogenetic mice that  
can develop to adulthood”***

Tomohiro Kono, Yayoi Obata, Quiong Wu, Katsutoshi  
Niwa, Yukiko Ono, Yuji Yamamoto, Eun Sung Park,  
Jeong-Sun Seo & Hidehiko Ogawa

Autor:  
Malwina Hepner

# Imprinting

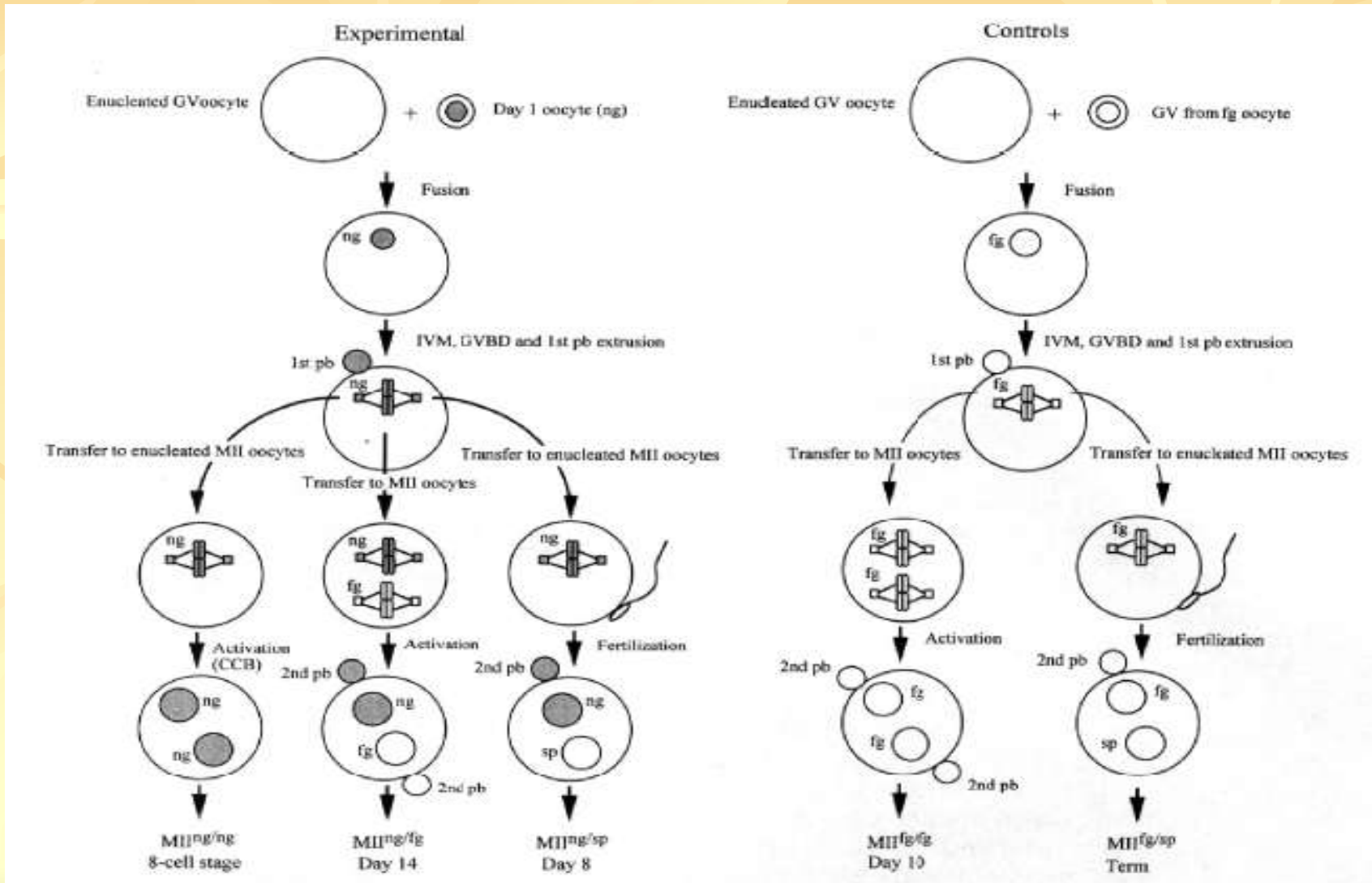
- Inaczej piętnowanie genomu gamety żeńskiej i męskiej.
- Są to modyfikacje genomu na poziomie epigenetycznym polegające na różnym stopniu metylacji genów w komórkach jajowych i plemnikowych, co daje funkcjonalną różnicę między genomami rodzicielskimi.

# Bialleliczna Ekspresja

- Oznacza ekspresje genu (lub jej brak) z obu alleli, które posiada zarodek (oba allele pochodzą od matki lub ojca)
- Bialleliczna ekspresja jest główną przyczyną śmierci większości partogenetycznych zarodków.

# Doświadczenie z 1996

na podstawie artykułu „*Epigenetic modifications during oocyt growth correletes with extended phartenogenethic development in mouce*”



# Kolejne doświadczenia grupy Pana Kono

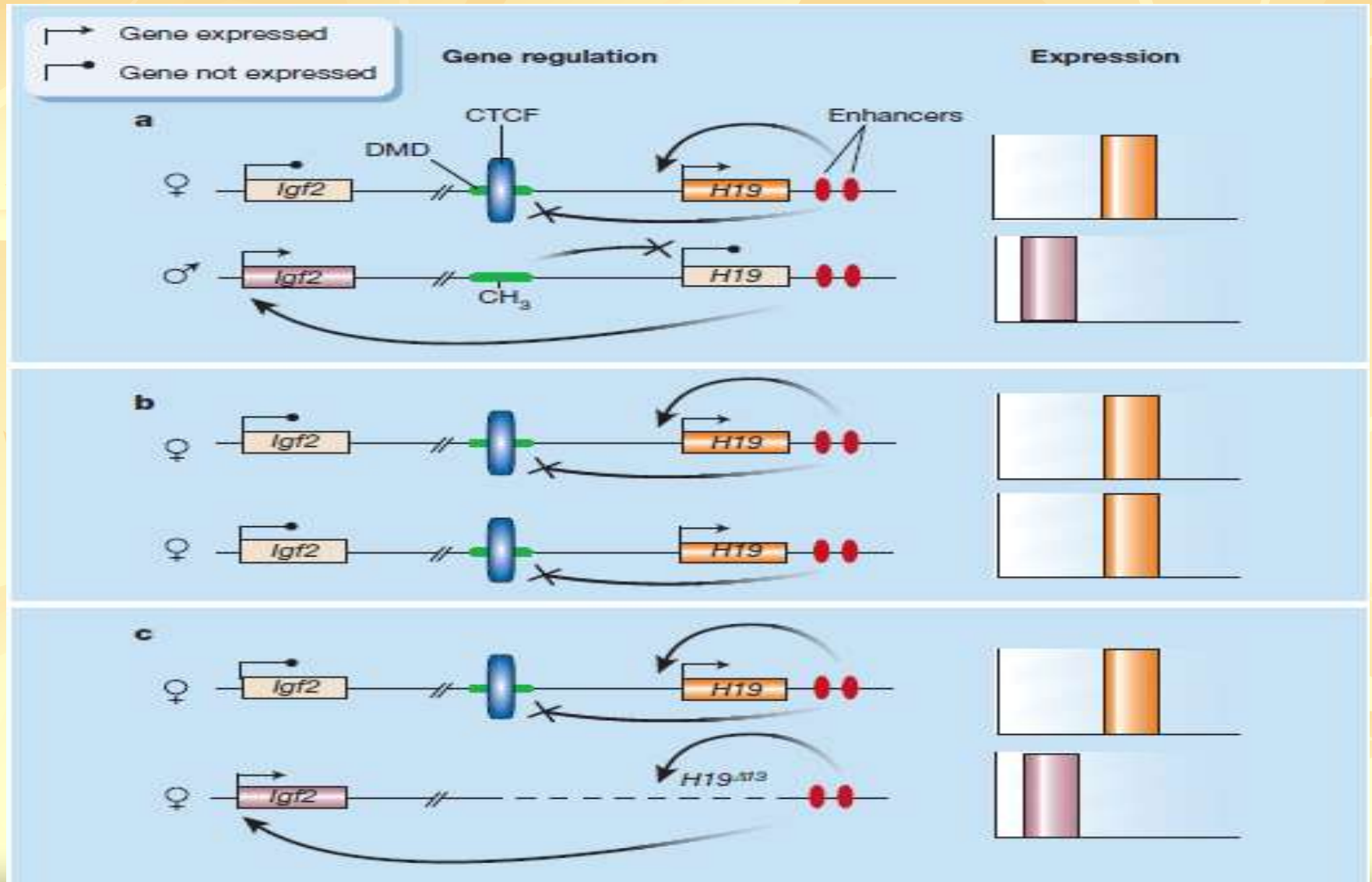
			EKSPRESJA GENÓW		
Rok doświadczenia	RODZAJ KRZYŻÓWKI	OSIĄGANY DZIEŃ ROZWOJU	H19	Igf2	Igf2r
1996	fg/fg	10	<b>bialleliczna</b> (2 x H19+)	<b>bialleliczna</b> (2 x Igf-)	<b>bialleliczna</b> (2 x Igf2r+)
1996	ng/fg	14.5	<b>bialleliczna</b> (2 x H19+)	<b>bialleliczna</b> (2 x Igf-)	<b>monoalleliczna</b> (Igf2+ z fg i Igf2- z ng)
2000	ngH19D3/fg	17.5	<b>monoalleliczne</b> (H19+ iH19-)	<b>bialleliczne</b> (Igf2- i Igf2-)	monoalleliczna (Igf2+ z fg i Igf2- z ng)
2004	ngH19D13/fg	żywe narodziny	<b>monoalleliczne</b> (H19+ iH19-)	<b>monoalleliczna</b> (Igf2+ z ng i Igf2-z fg)	<b>monoalleliczna</b> (Igf2+ z fg i Igf2- z ng)

# Geny Igf2 i H19

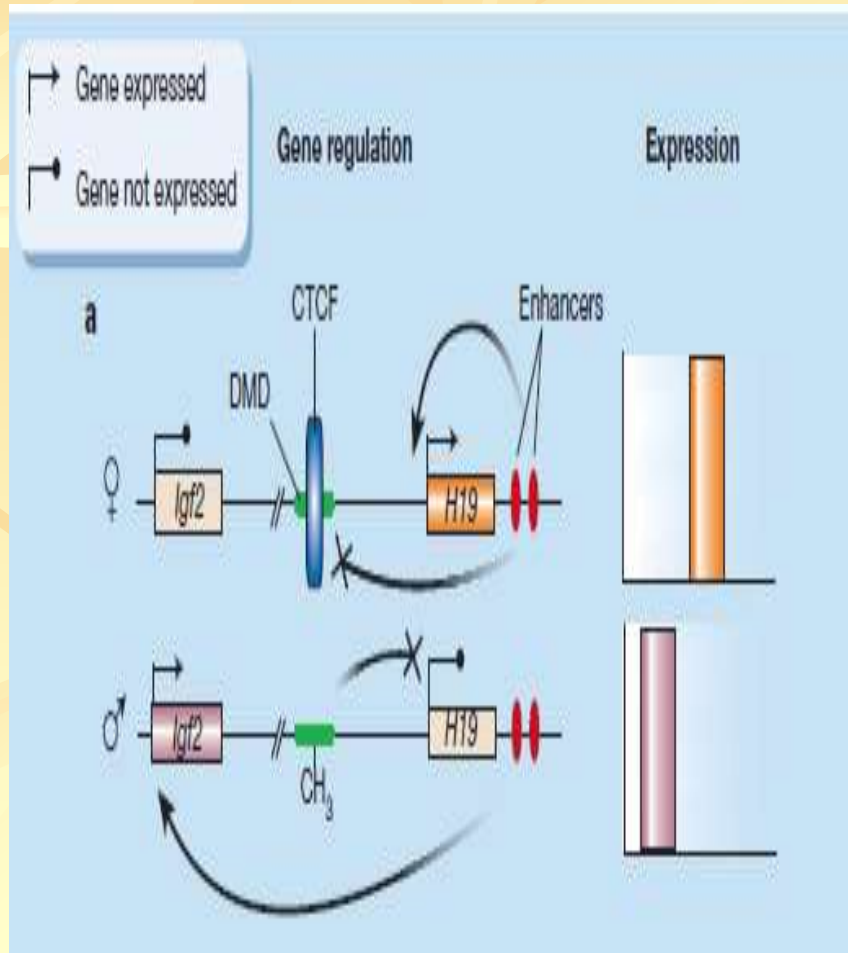
- Oba geny znajdują się na tym samym allelu.
- Ich ekspresja jest ze sobą ściśle powiązana (mają wspólny enhancer).
- Ekspresja tych genów jest wykrywana w tych samych tkankach (wątrobie, nerkach, jelitach)
- W „zwykłym” zarodku gen H19 ulega ekspresji z allelu matczynego (na kopi ojca jest on zmetylowany).
- Natomiast Igf2 otrzymujemy z ekspresji kopi allelu ojca.



# Ekspresja Genów H19 i Igf2



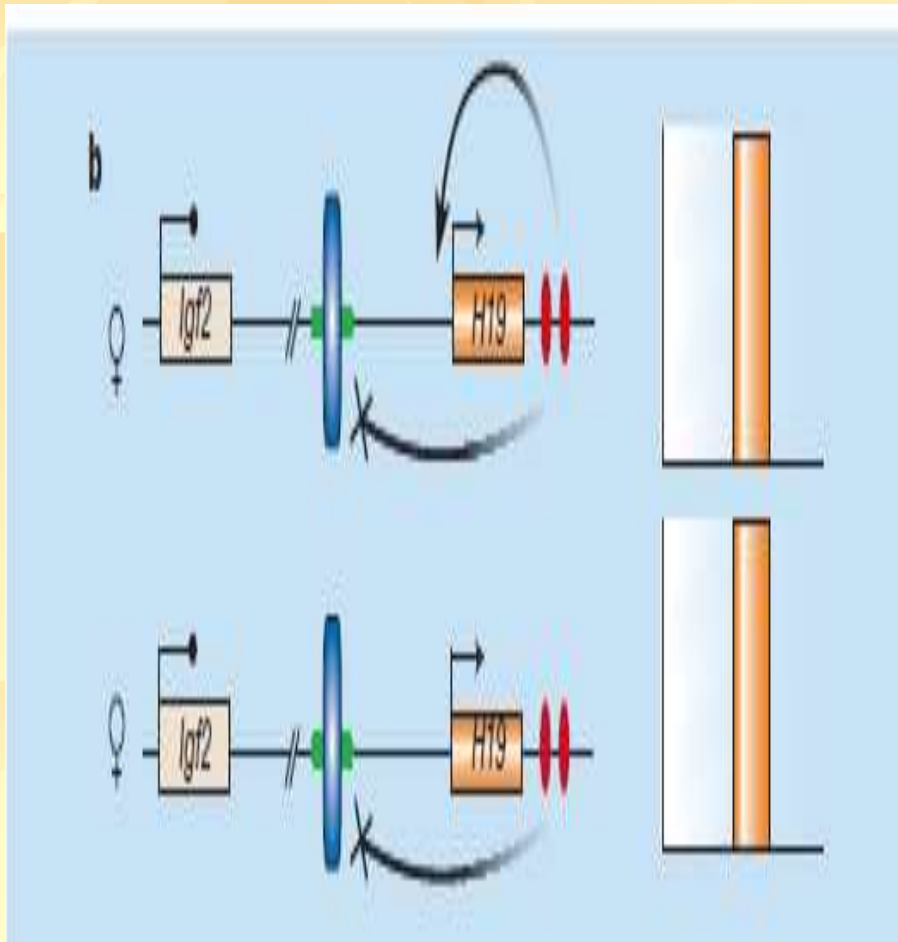
# Ekspresja H19 i Igf2 w normalnym zarodku



- W normalnych warunkach CTCF łączy się z regionem DMD
- Kompleks ten daje sygnał stop dla ekspresji genu Igf2 i promuje ekspresję H19
- W allelu ojcowskim region DMD jest zmetylowany i CTf nie ma szansy na oddziaływanie.
- Powoduje to ekspresję IGF2

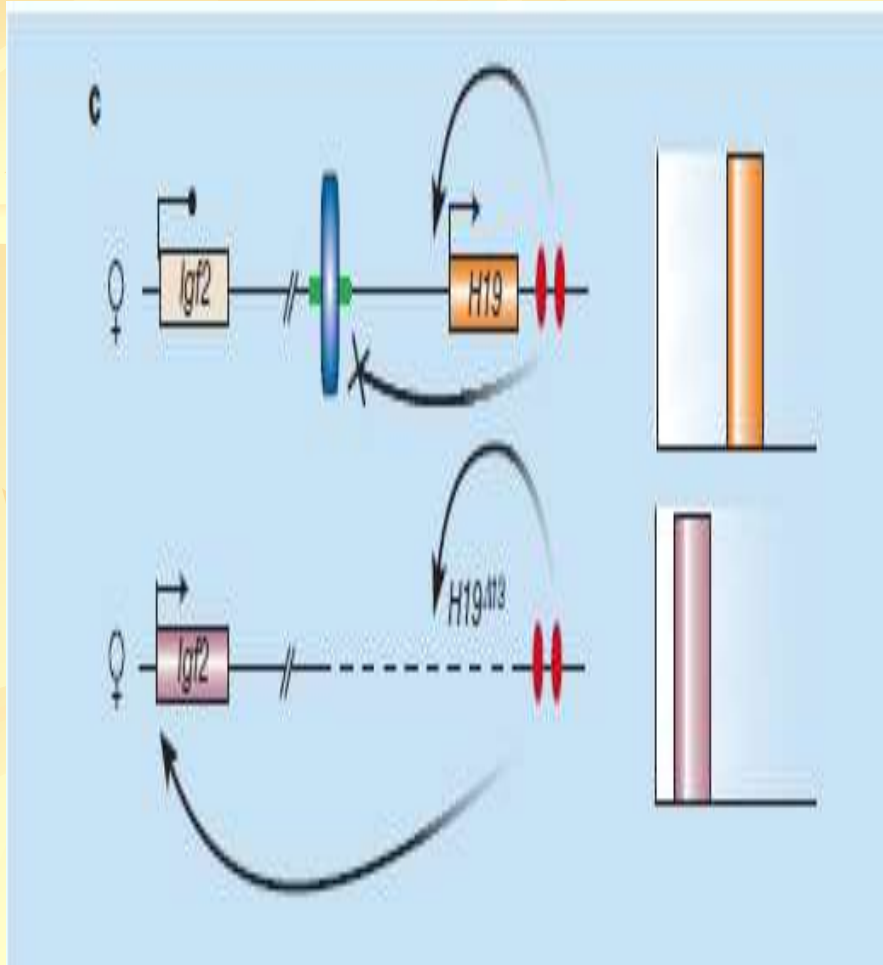


# Ekspresja Genów H19 i Igf2 w zarodku partenogenetycznym (ng/fg)



- Mutanty z delecją 3KB nie posiadały tylko regionu enhancera.
- Jednak region DMD nadal był zdolny do wiązania się z CTCF i blokował ekspresję *Igf2*

# Ekspresja Genów H19 i Igf2 w zarodku partenogenetycznym (ng ngH19D13/fg)



- Wycięcie obszaru o wielkości 13 KB spowodowało usunięcie regionu DMD.
- CTCF nie ma się jak przyłączyć.
- Pozytywny sygnał dla ekspresji

# Material i metody

- • Myszy B6CBF1 (C57BL/6j × CBA) oraz myszy z mutacją H19D13
- • Wyrośnięte oocyty wyizolowane z jajnika po 48 h od wstrzyknięcia PMSG
- • Niewyrośnięte oocyty wyizolowane z jajnika ‘jednodniowej’ myszy(ngH19D13)
- • Oocyty w stadium GV umieszczone w roztworze dbcAMP
- • Oocyty w MII wyizolowane z jajowodów 16 h po wstrzyknięciu hCG
- Transfer jądra
- • Fuzja niewyrośniętego oocytu z wyjądrzonym oocytom GV zaindukowana inaktywowanym wirusem Sendai
- • Oocyty 1h po fuzji umieszczone w pożywce WaymouthMB752/1 (Gibco) 14 h
- • Blastocysty przeniesione do macicy samicy myszy utrzymywanej w stanie ciąży rzekomej
- • Analiza ekspresji enów metodą PCR i mikromacierzą

# Wyniki

Table 1 **Development of reconstructed parthenogenetic embryos**

Developmental progress	Number
Number of reconstructed eggs	457
Number of embryos developed to blastocysts	417 (91.2% of reconstructed eggs)
Number of embryos transferred	371 (89.0% of blastocysts)
Number pregnant/ recipients	24/26
Number of implantation to recipients	246 (71.7% of embryos transferred to pregnant)
Number of pups	28 (8.2% of embryos transferred to pregnant)
Dead	18 (5.2% of embryos transferred to pregnant)
Live	8 (2.3% of embryos transferred to pregnant)
Survived	2 (0.6% of embryos transferred to pregnant)



# Wyniki

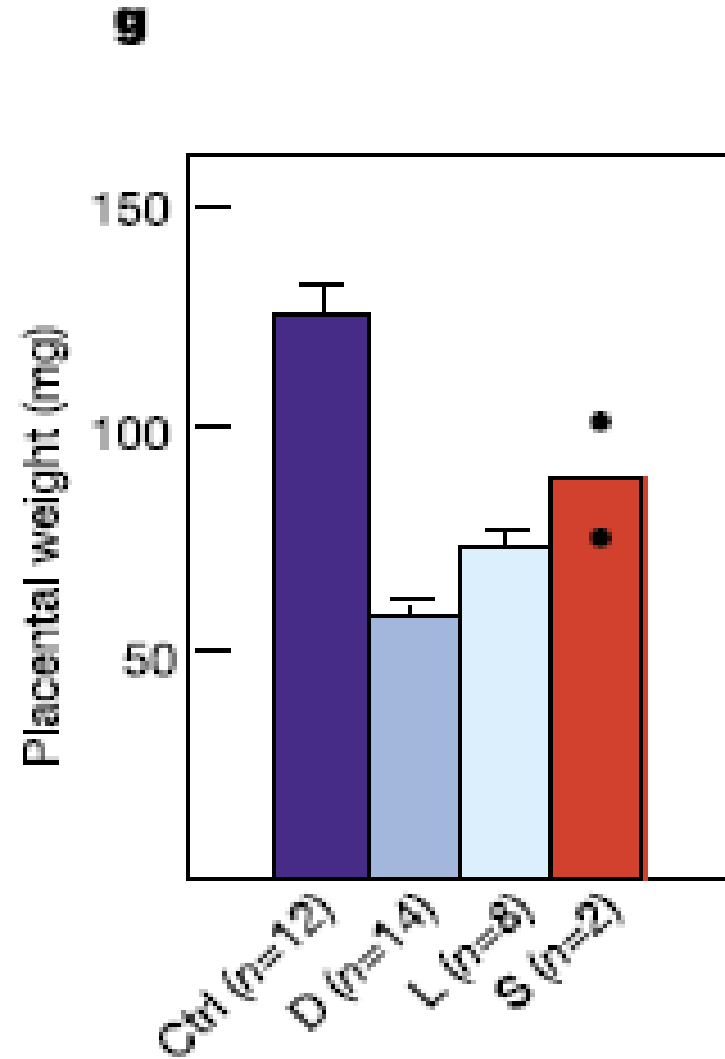
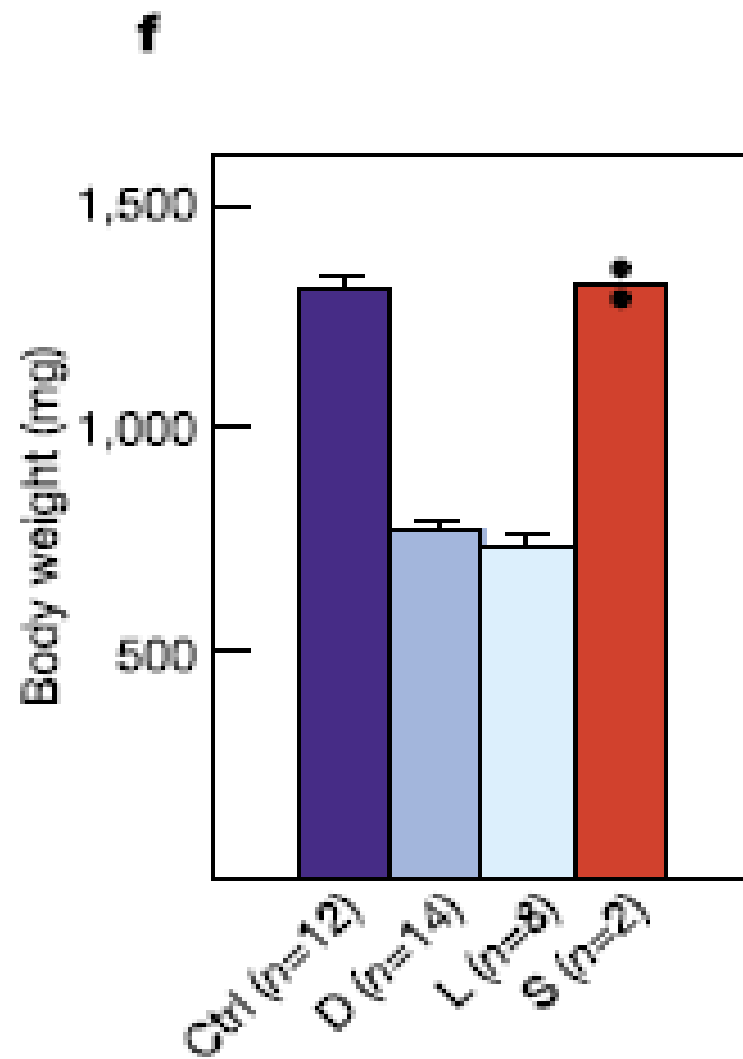


- Narodziny 2 żywych myszy, z których jedna została zachowana do dojrzałości i po osiągnięciu dojrzałości płciowej podano ją zapłodnieniu wyniku którego otrzymano zdrowy miot.
- Druga mysz została przeznaczona na analizę ekspresji genów (metody PCR i mikromacierze)
- Pozostałe myszy urodziły się martwe lub umarły zaraz po narodzinach.

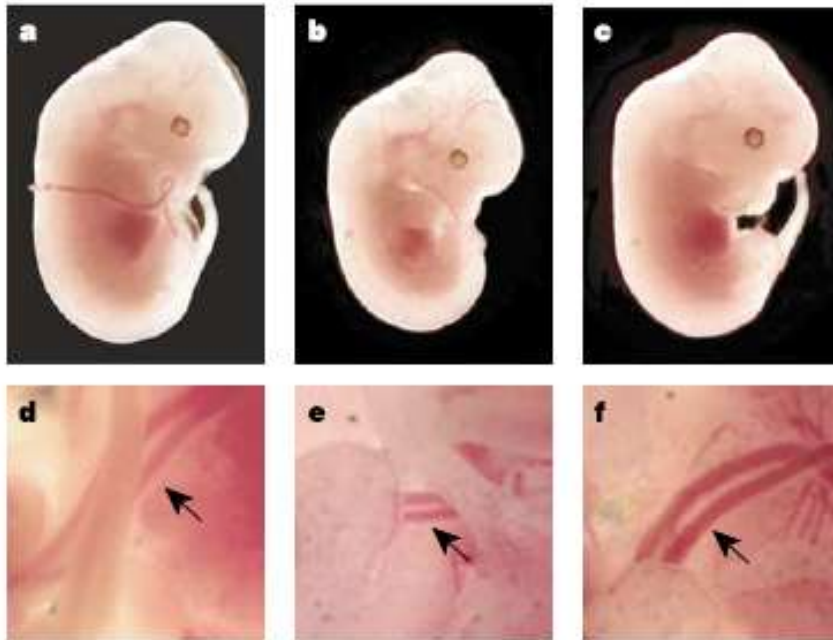




# Wyniki

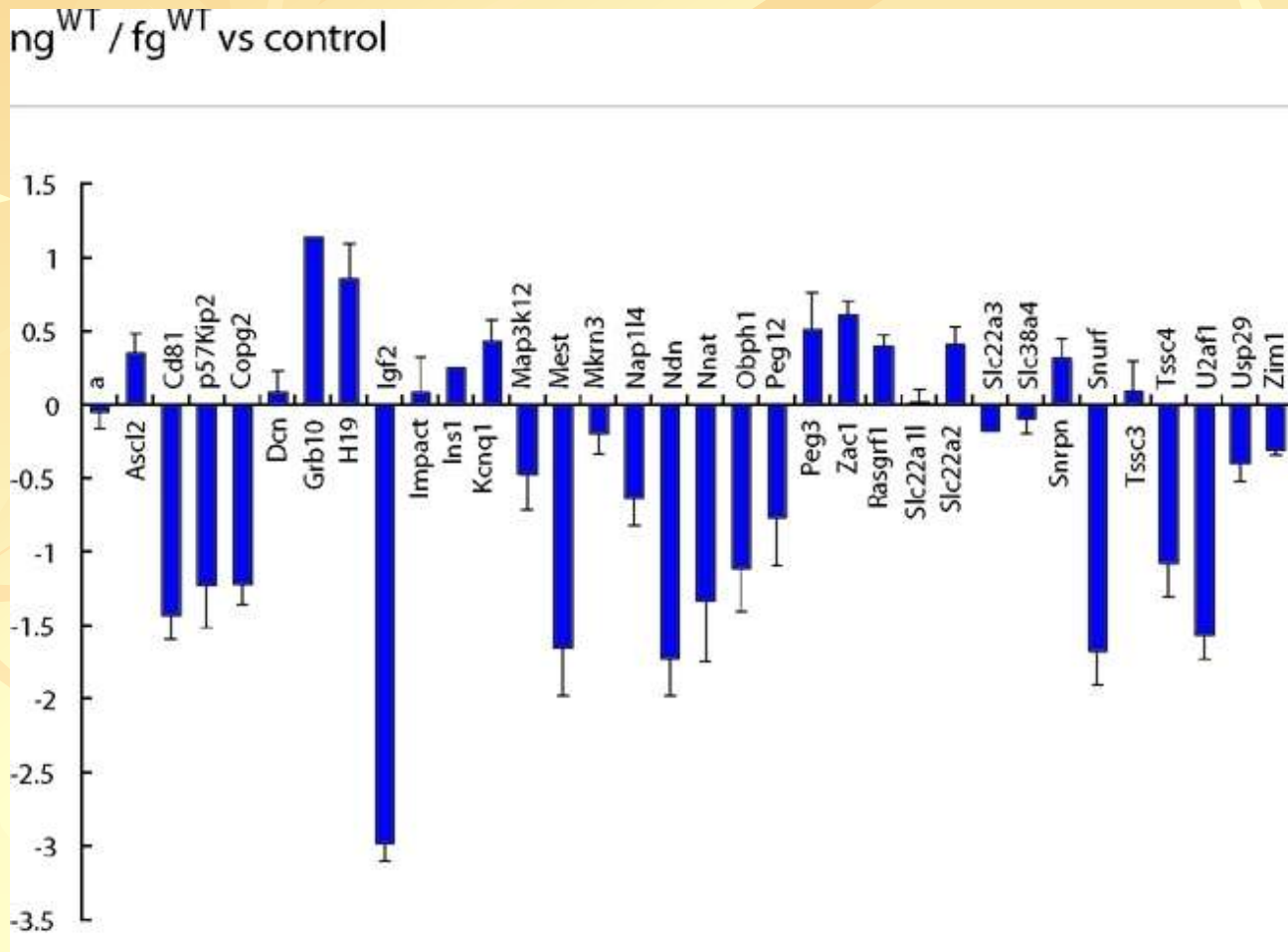


# Wyniki



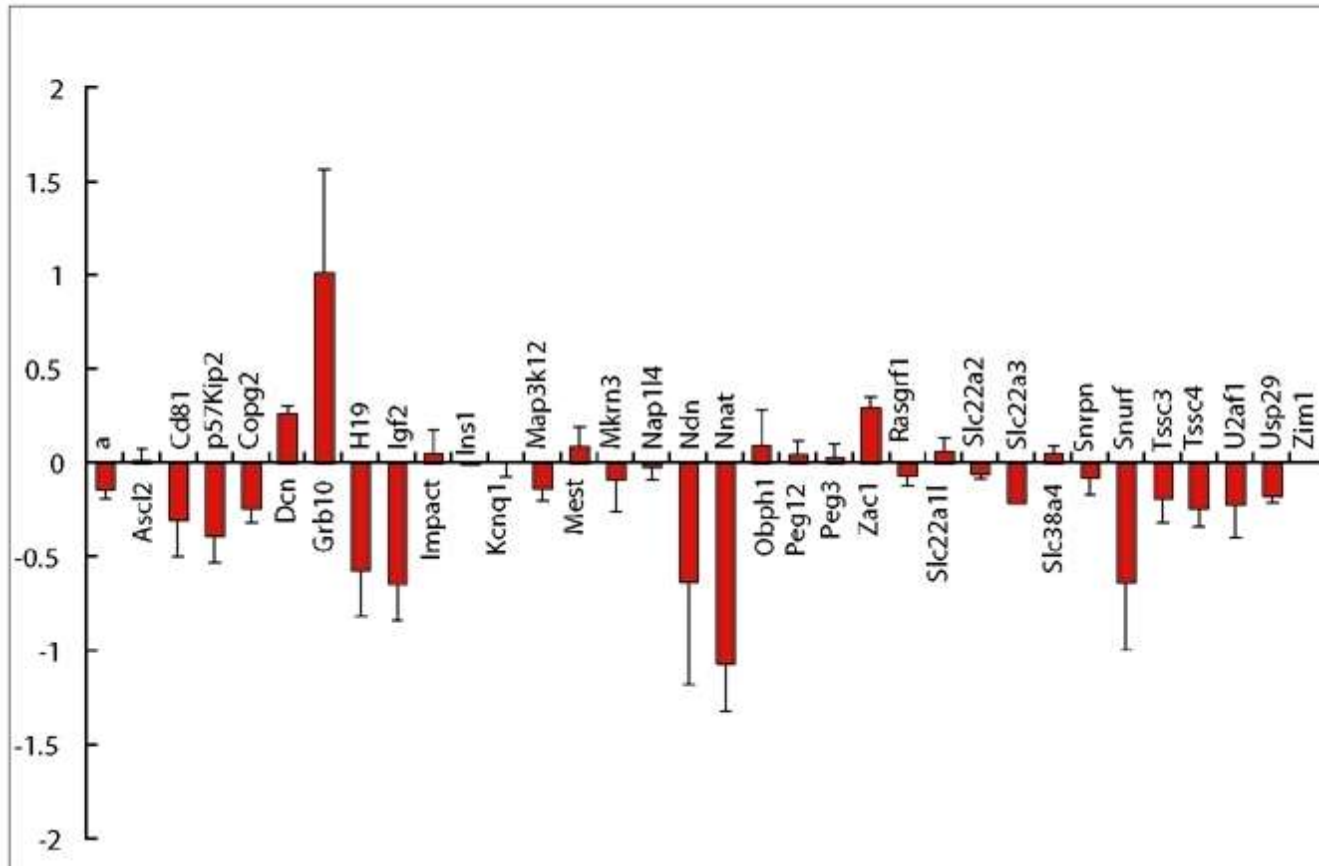
**Figure 2** Parthenogenetic fetuses at day 12.5 of gestation. **a, d**, Fetuses and the umbilical cords derived from control fertilized embryos; **b, e**,  $ng^{wt}/fg^{wt}$  parthenogenetic embryos; **c, f**,  $ng^{H19\Delta13}/fg^{wt}$  parthenogenetic embryos. Note that the umbilical cord (indicated by arrows) was well developed in the  $ng^{H19\Delta13}/fg^{wt}$  fetus (**f**) but was very poor in the  $ng^{wt}/fg^{wt}$  parthenote. **g, h**, Graphical representations of body (**g**) and placental (**h**) weights. Values are means  $\pm$  s.e.m. Significant differences at \*  $P < 0.05$  and \*\*  $P < 0.01$ .

# Porównanie Ekspresji Genów



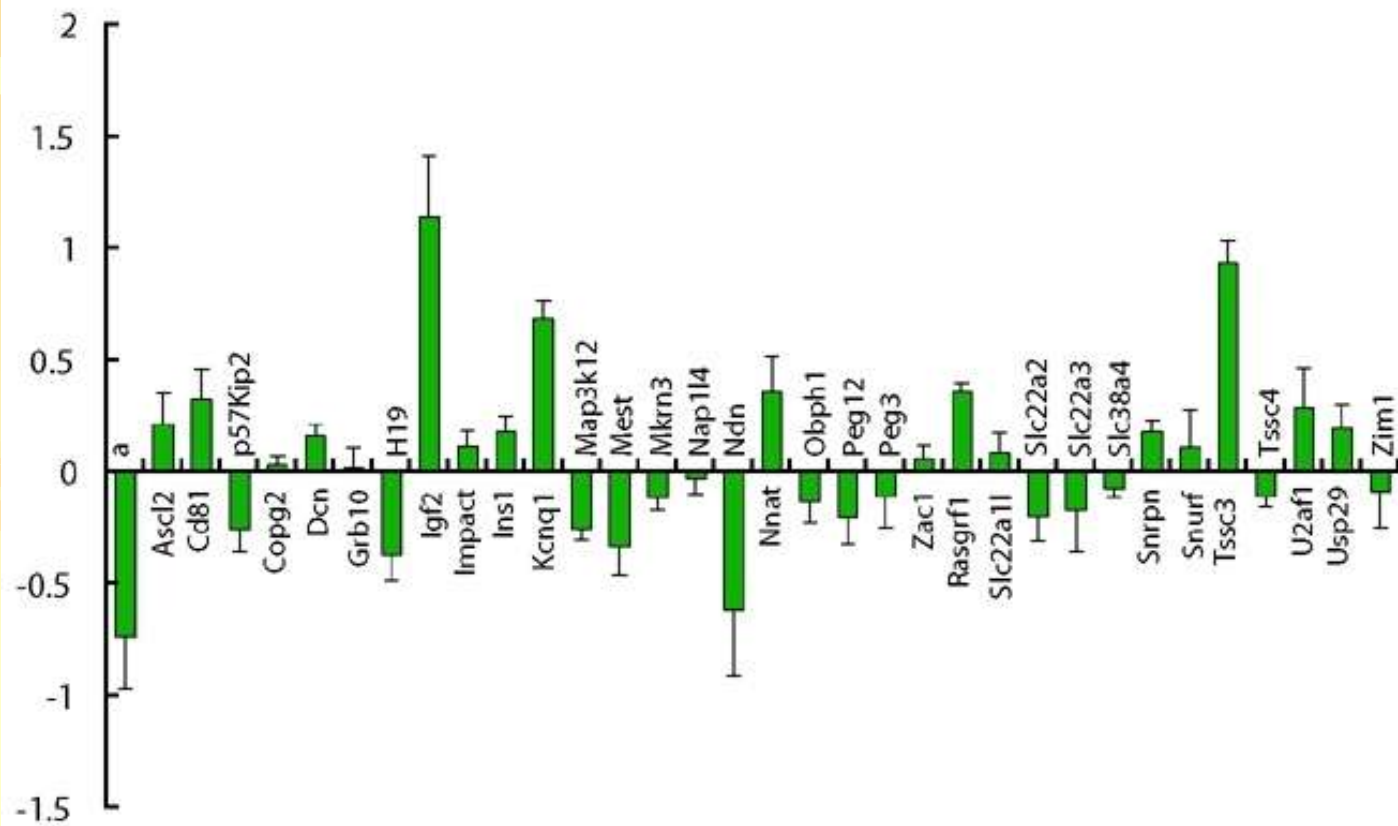
# Porównanie Ekspresji Genów

ng<sup>H19 $\Delta$ 13-KO</sup> / fg<sup>WT</sup> vs control



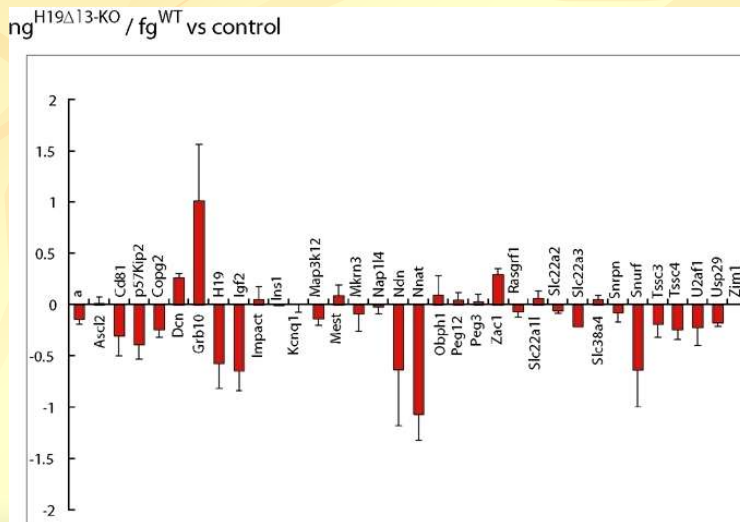
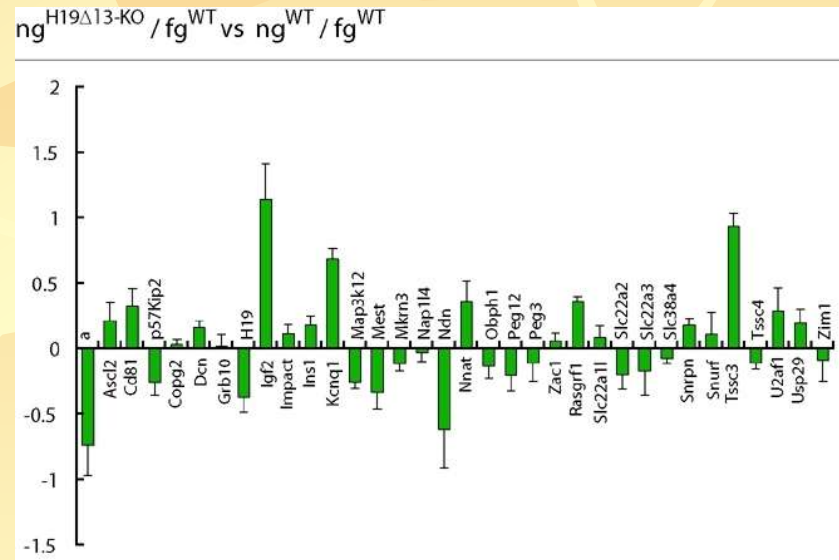
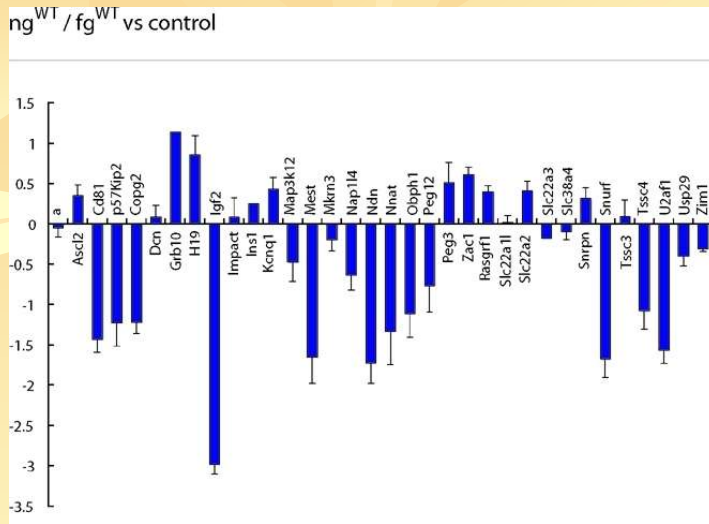
# Porównanie Ekspresji Genów

ng<sup>H19 $\Delta$ 13-KO</sup> / fg<sup>WT</sup> vs ng<sup>WT</sup> / fg<sup>WT</sup>





# Porównanie Ekspresji Genów



**Supplementary Figure S4.** Graphical representation of relative expression levels of imprinted genes. Data were obtained by oligonucleotide mouse 11K microarray analysis. Values are means  $\pm$  standard error.

# Podsumowanie

- Imprinting jest główną przeszkodą dla zachodzenia partenogenezy u ssaków.
- Genomy rodzicielskie uzupełniają się.  
(genom ojca jest potrzebny do prawidłowego rozwoju min. łożyska, a genom matki do rozwoju ciała zarodka)
- Monoaleliczna ekspresja genów H19 i Igf2 wpłynęła dodatnio na ekspresję pozostałych genów, doprowadzając do „prawidłowego” rozwoju zarodków. Jednak mechanizm nie jest na razie poznany.

**Dziękuję za uwagę. 😊**