



Disruption of *c-mos* causes parthenogenetic development of unfertilized mouse eggs

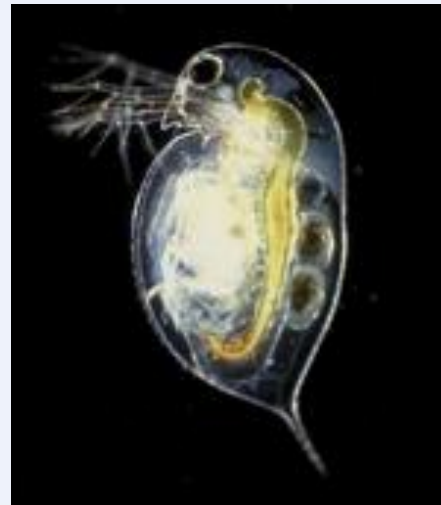
W. H. Colledge, M. B. L. Carlton, G. B. Udy
& M. J. Evans

przygotowała Katarzyna Czajkowska

Dysrupcja (rozbicie) genu *c-mos*
powoduje partenogenetyczny rozwój
niezapłodnionych jaj mysich



Partenogeneza (z greckiego *παρθενος*, "dziewica" oraz *γενεσις* "narodziny") to sposób rozmnażania polegający na **rozwoju osobników potomnych z niezapłodnionej komórki**



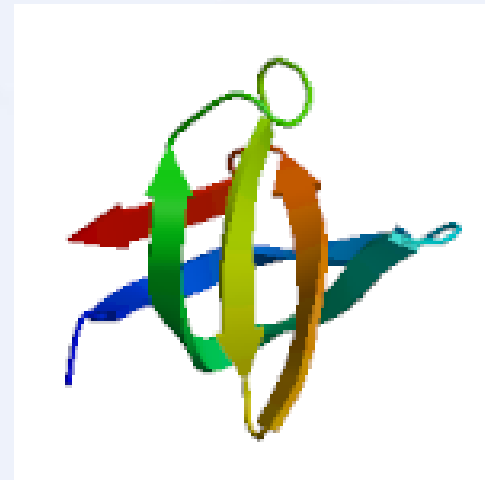


c-mos:

- Protoonkogen
- Koduje białko pp39^{mos} – cytoplazmatyczną kinazę serynowo-treoninową



<http://modbase.compbio.ucsf.edu/>



<http://swissmodel.expasy.org/>

c-mos:

- U myszy: **dojrzewanie meiotyczne** podczas spermatogenezy i oogenezy
- U *Xenopus* (ektopowa ekspresja): **dojrzewanie meiotyczne oocytów i zatrzymanie bruzdkowania blastomerów**



Xenopus:

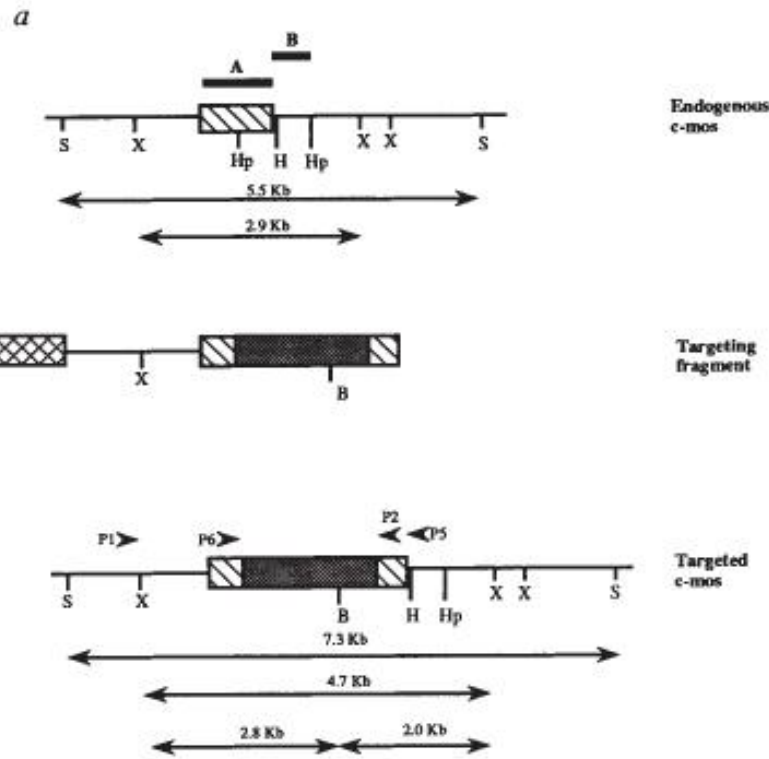
- **gromadzenie pp39^{mos} w czasie dojrzewania mejoetycznego i jego szybka degradacja po zapłodnieniu**
- **mikroiniekcja *mos* RNA wstrzymuje podziały mitotycznie blastomerów → pp39^{mos}**
składnikiem czynnika cytostatycznego CSF,
odpowiedzialnego za blok metafazowy?

Myszy: By wyjaśnić rolę pp39^{mos} stworzono homozygotyczne mutanty mysie pozbawione funkcjonalnej kopii genu *c-mos*



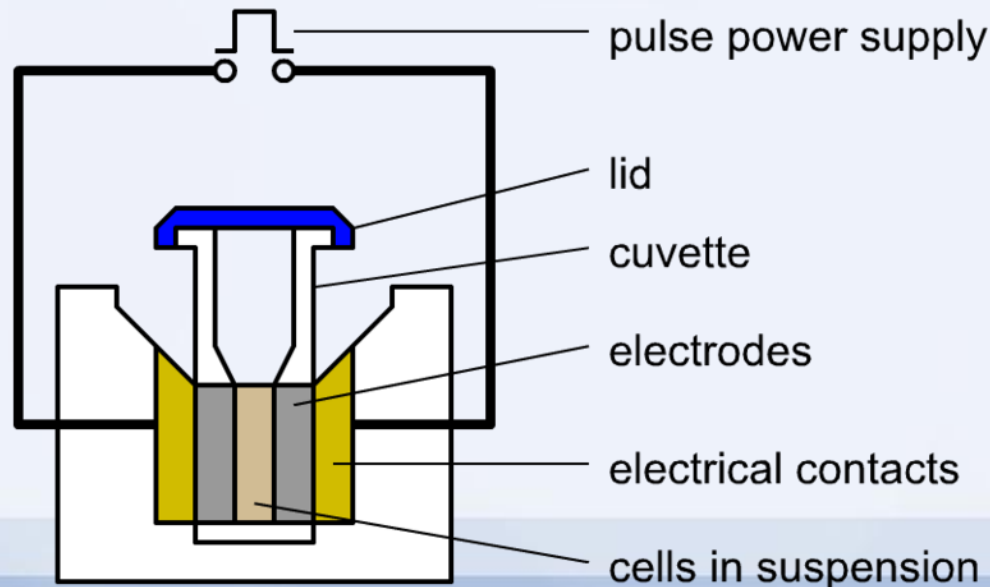
Otrzymanie mutantów *mos*^{-/-}

Wektor pMS1(neo)tk z genem oporności na neomycynę wprowadza kodon stop w ramkę odczytu *c-mos*, uniemożliwiając translację sekwencji kluczowych dla aktywności kinazy pp39^{mos}



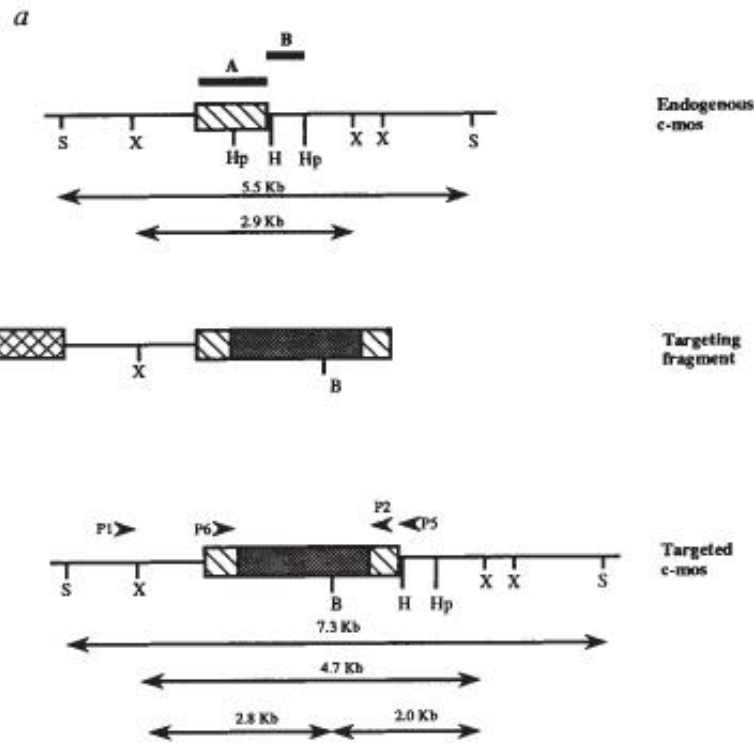
Otrzymanie mutantów *mos^{-/-}*

- Wprowadzono wektor pMS1(neo)tk **do zarodkowych komórek macierzystych CCE** (linia ES pochodzących ze szczepu 129/Sv) metodą elektroporacji



Otrzymanie mutantów *mos*^{-/-}

**Klony odporne na G418 –
antybiotyk genetyczny**
(posiadające wstawkę z *neo*^r)
i gancyklowir (który po
fosforylacji przez kinazę
tymidynową HSV staje się
toksyczny) sprawdzano pod
kątem przyjęcia wstawki za
pomocą analizy typu Southern
oraz analizy restrykcyjnej



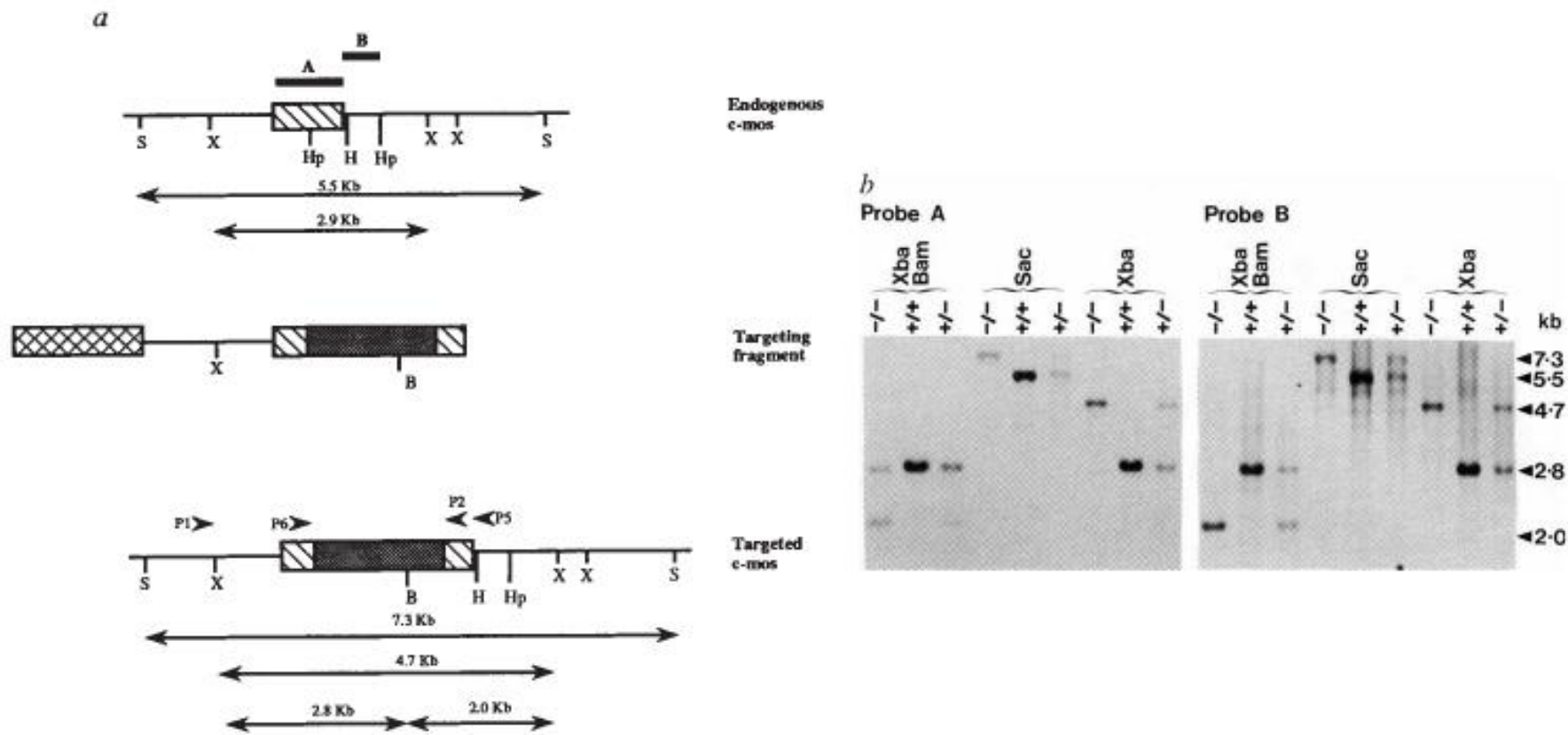


FIG. 1 Targeted disruption of the murine *c-mos* gene. **a**, Targeting vector and recombination at the *c-mos* locus. The *c-mos* 1-kb coding exon is shown hatched, the *neo^r* cassette stippled and the herpes simplex virus (HSV) thymidine kinase gene cross hatched. Bars marked A and B show the location of probes used to confirm targeting. PCR screening primers are shown by arrowheads. Expected restriction fragment sizes are indicated by arrows. B, *Bam*HI; H, *Hind*III; Hp, *Hpa*I; S, *Sac*I; X, *Xba*I. **b**, Southern blot analysis of the three genotype categories derived from heterozygote crosses.

METHODS. To generate the targeting plasmid, a 2.8 kb *Sac*I–*Hind*III *c-mos* genomic fragment from pMS-1²⁰ was cloned into the corresponding sites of pSP64 to give pSP(MS-1). A PGKneo cassette²¹ from pKJ-1

was released by *Eco*RI–*Hind*III digestion and blunt ligated into the unique *Hpa*I site within the *c-mos* coding region of pSP(MS-1) to generate pMS1(neo). A 2.0 kb blunt-ended *tk*-fragment driven by a modified HSV promoter obtained from pMC1neo was subcloned into the *Sac*I site of pMS1(neo) to generate the targeting vector pMS1(neo)tk. ES cells were cultured and electroporated with 5 μ g linearized targeting construct as described previously²². G418^r/ganc^r clones were screened for a targeting event using a 500 bp *Bgl*II–*Hpa*I fragment (probe B) immediately downstream of the *c-mos* coding sequence. Lack of an intact *c-mos* coding exon was confirmed using a 900 bp *Ava*I–*Hind*III coding fragment (probe A).

- Southern blot z sondą skierowaną przeciwko *mos* **nie wykazał obecności wt (wild-type) eksonu c-mos u myszy *mos*^{-/-}**
- Northern blot – brak normalnego sygnału hybrydyzacji RNA pochodzącego z *mos*^{-/-} z fragmentami eksonu *c-mos* myszy *mos*^{+/+} → **dysrupcja genu *c-mos* skutkuje zaburzeniem transkrypcji lub destabilizacją transkryptu**

- Żywe myszy *mos^{-/-}* rodzą się zgodnie z przewidywaną częstością – **działająca kopia tego genu nie jest wymagana do normalnego rozwoju embrionalnego**



Płodność myszy $mos^{-/-}$

W stosunku do równowiekowej grupy kontrolnej (myszy $mos^{+/+}$ lub $mos^{+/-}$) :

- **Samce $mos^{-/-}$ płodne**
- **Samice $mos^{-/-}$ mają obniżoną płodność**

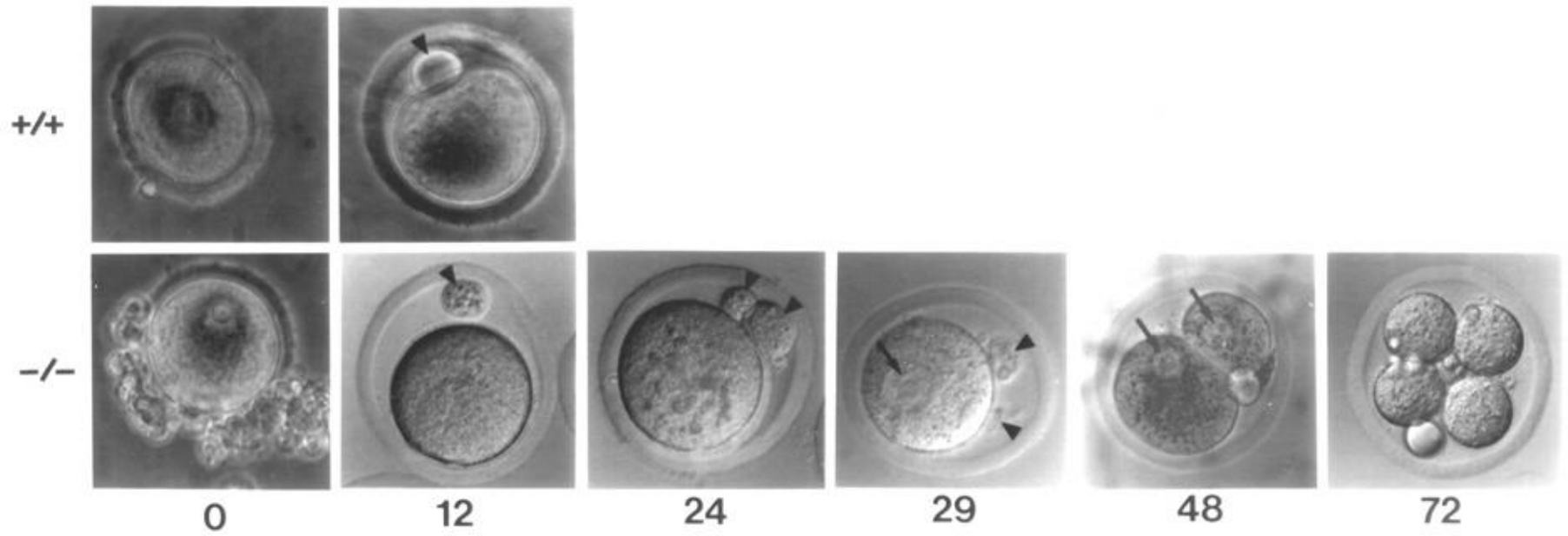
- **Brak** statystycznie istotnych **różnic w płodności** (liczbie potomstwa) **samców** *mos^{-/-}* oraz samców z grupy kontrolnej
 - **Brak** statystycznie istotnych **różnic w morfologii jąder** oraz występowaniu dojrzałego nasienia u samców *mos^{-/-}* oraz samców z grupy kontrolnej
- **nieuszkodzony gen *c-mos* nie jest niezbędny do zajścia spermatogenezy**

- **Istotnie statystycznie ($P < 0.005$) różnice w płodności (liczbie potomstwa) samic *mos*^{-/-} oraz samic z grupy kontrolnej → **nieobecność białka wiąże się z brakiem zahamowania mejozy w trakcie oogenezy****



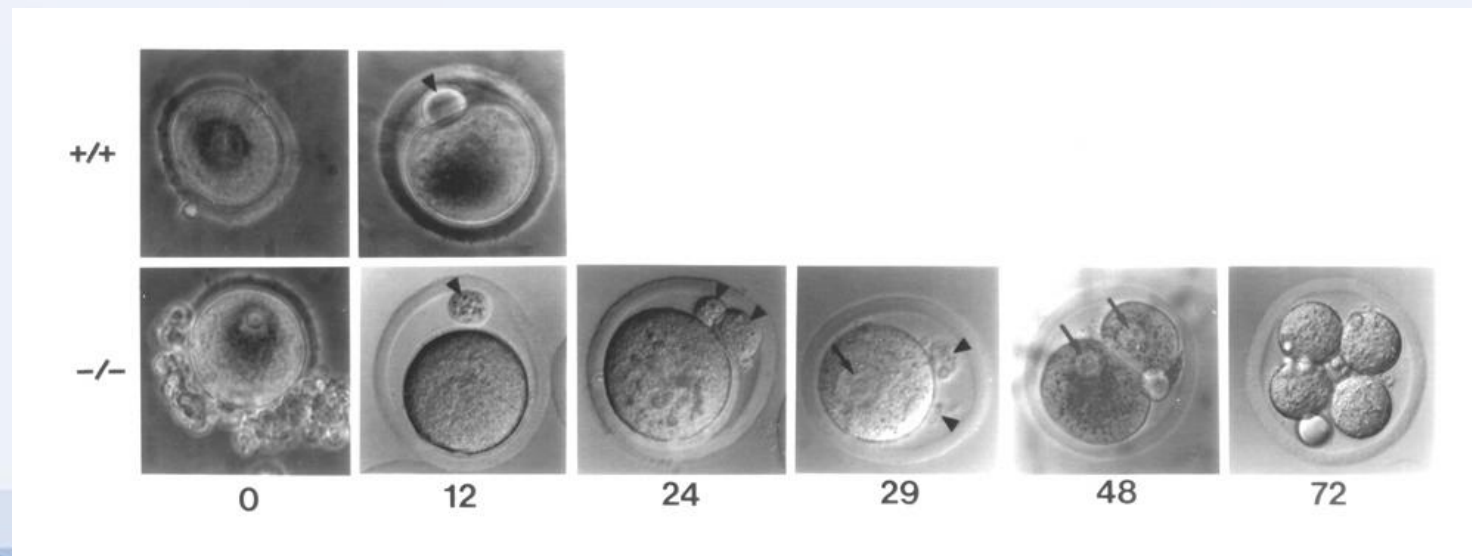
- **Superowulacja i izolacja oocytów z pęcherzyków jajnikowych** i ich dojrzewanie *in vitro* – zarówno u mutantów, jak i u myszy z grupy kontrolnej dochodzi do rozpadu pęcherzyka zarodkowego i wyrzucenia pierwszego ciała biegunowego – ***wt pp39^{mos}* nie jest niezbędny do normalnego dojrzewania oocytów.**

ALE! Oocyty myszy *wt* wchodziły w blok metafazowy, zaś **oocyty *mos^{-/-}* kontynuowały mejozę z wyrzuceniem drugiego ciała kierunkowego**



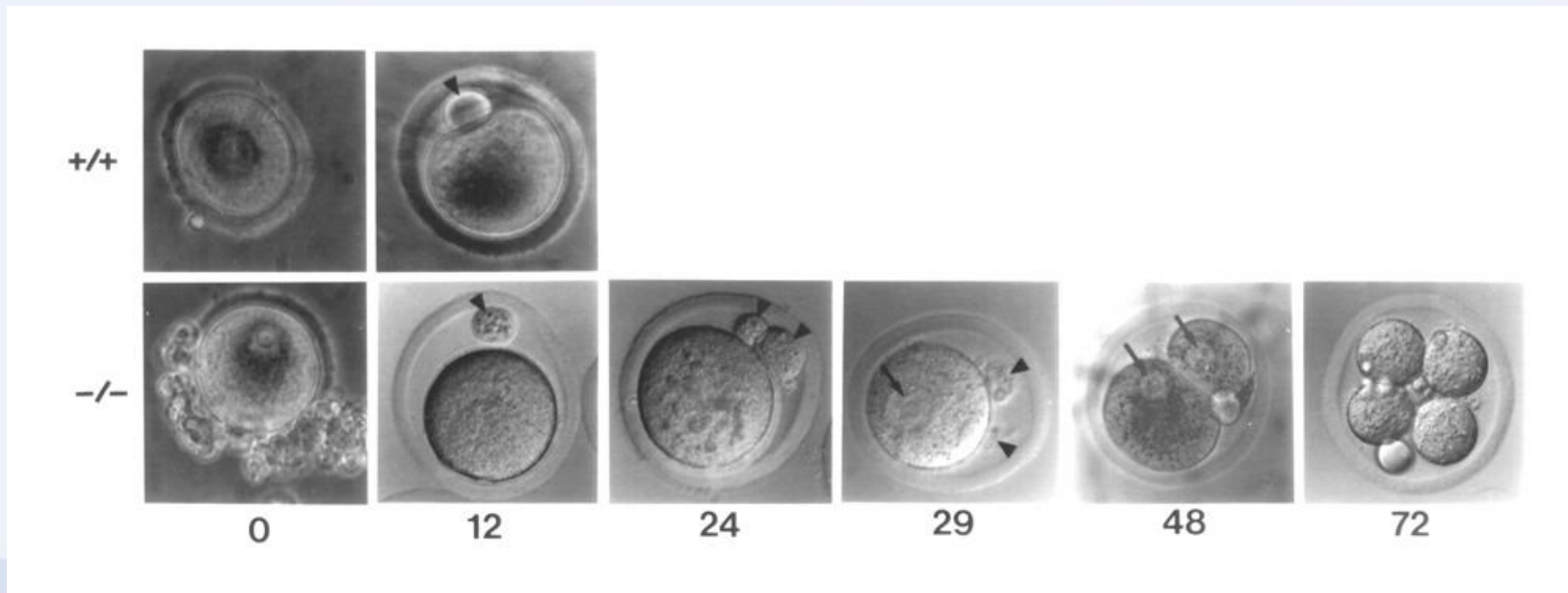
Superowulacja u 4 tygodniowych myszy-dziewic za pomocą PMSG i hCG, izolacja oocytów z myszy *mos*^{-/-} 18 h po podaniu hCG →

- *mos*^{-/-} – dwa ciała kierunkowe zawierające DNA
- kontrola – jedno ciało kierunkowe

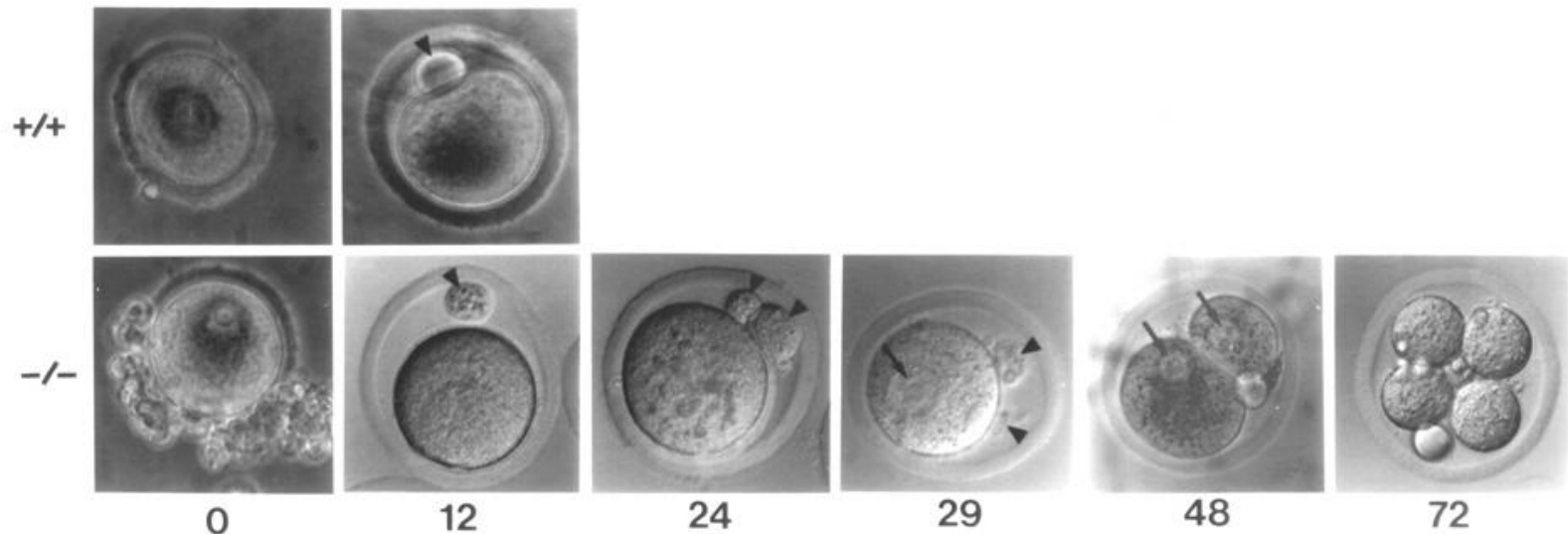


Dalsza hodowla oocytów *mos^{-/-}* →

- **40% oocytów wykształciło przedjądrze – wskaźnik rozwoju partenogenetycznego**



- **30% z tych oocytów uległo podziałowi na dwie komórki, z których każda zawierała jądro**
- Czasami podział dochodził do stadium czterech komórek



- **Nie zaobserwowano rozwoju powyżej stadium 4-komórkowego** w związku z niskim potencjałem rozwojowym haploidalnych komórek
- Oocyty *wt* nie formowały drugiego ciała kierunkowego
- **Oocyty mutantów**, które nie rozpoczęły podziału, często ulegały fragmentacji cytoplazmatycznej, co rzadko występowało u oocytów *wt*

TABLE 1 Incidence of parthenogenetic activation in unfertilized eggs

Time post hCG	Genotype	Total no. of eggs			
		Class 0	Class 1	Class 2	Class 3
18 h	+/+	10	20	0	0
	-/-	0	6	33	0
32 h	+/+	0	80	0	2
	+/-	0	115	0	0
	-/-	0	0	42	129

Four-week-old mice were superovulated by PMS and hCG administration and eggs flushed from oviducts at the times indicated into M16 medium. The eggs were scored immediately into the following classes: class 0, germinal vesicle breakdown complete, no polar body; 1, eggs with a single polar body; 2, eggs with two polar bodies; 3, eggs showing cytoplasmic fragmentation.

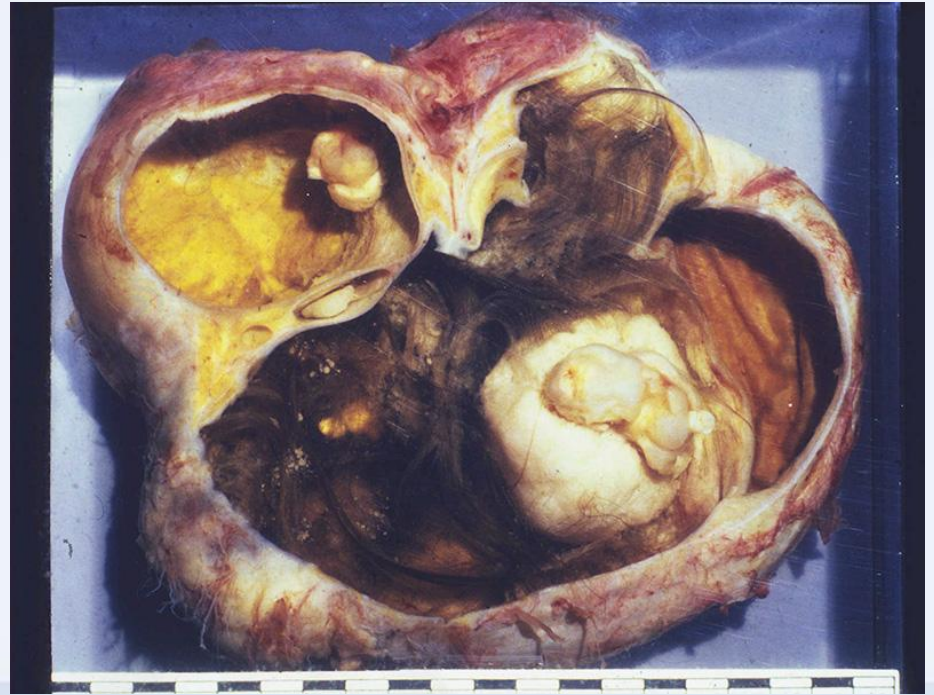
- Do aktywacji partenogenetycznej dochodziło jedynie wśród oocytów *mos^{-/-}* → białko pp39^{mos} jest zaangażowane w podtrzymywanie bloku metafazowego
- Mała liczba normalnie rozwiniętego potomstwa samic *mos^{-/-}* pochodzi z jaj zapłodnionych krótko po zakończeniu dojrzewania i przed aktywacją partenogenetyczną

- **brak funkcjonalnej kopii genu *c-mos* – aktywacja partenogenetyczna oocytów**
- **mikroiniekcja *mos* RNA lub ektopowa ekspresja *c-mos* – wstrzymanie podziałów mitotycznych komórek**

Teratomy

- Szczep LT/Sv – 10% oocytów ulega spontanicznej partenogenetycznej aktywacji
- Rozwijają się **teratomy (potworniaki)** – nowotwory z komórek różnicujących w różne typy tkanek
- Cysty w jajnikach myszy *mos^{-/-}* (5 osobników), nigdy u *mos^{+/+}* (19) i *mos^{+/-}* (10)
- Cysty często u starszych myszy (powyżej 6 miesięcy), ale występują też u młodych

łac. **teratoma**, z gr. τέρας /*téras*/ = potwór
+ gr. *-oma* - przyrostek oznaczający zmianę
guzowatą



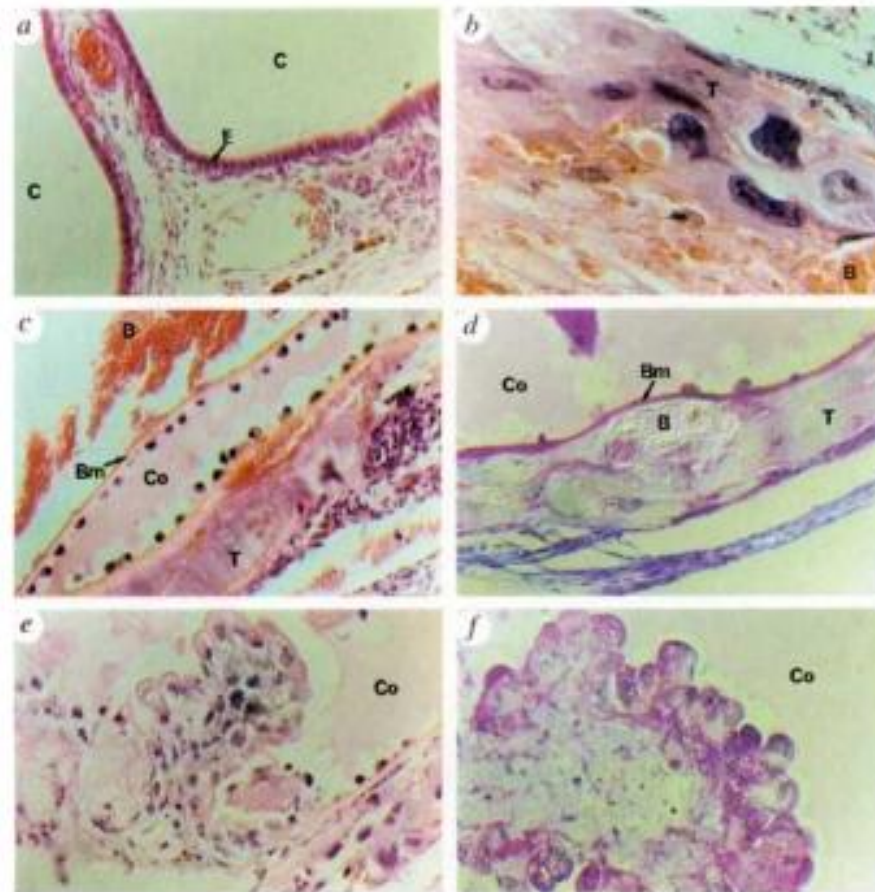


FIG. 3 Histology of ovarian cysts *a*, Columnar epithelium (E) lining the wall of a simple cyst (C) ($\times 200$, haematoxylin and eosin (H and E) stain); *b*, trophoblast-like giant cells (T) in a blood (B) filled cyst ($\times 200$, H and E stain); *c*, thyroid-like tissue illustrating close association with giant trophoblast-like cells ($\times 200$, H and E stain; Co, colloid); *d*, thyroid-like tissue stained with periodic acid-schiff (PAS) to illustrate basement membrane (Bm) layer surrounding the follicle ($\times 200$, PAS, H and E stain); *e*, hyperplastic secretory epithelia infiltrating colloid material ($\times 200$, H and E stain); *f*, secretory epithelia stained with PAS to shown glycoproteins and illustrate high level of secretory activity ($\times 400$, PAS, H and E).

METHODS. Cysts were fixed in 4% phosphate buffered formalin, embedded in paraffin wax and 10- μ m sections cut and stained.

WNIOSKI

- Białko pp39^{mos} odpowiada za zatrzymanie mejozy (blok metafazowy) przed zapłodnieniem
- Białko pp39^{mos} jest kluczowe dla aktywności cytostatycznej w komórkach ssaczych
- Oocyty bez funkcjonalnego pp39^{mos} ulegają spontanicznej aktywacji partenogenetycznej
- Brak funkcjonalnej kopii genu *c-mos* sprzyja rozwojowi teratom

Główną rolą pp39^{mos} - **zapobieganie spontanicznej partenogenetycznej aktywacji niezapłodnionych jaj.**



DZIĘKUJĘ ZA UWAGĘ

Pytania?

