

# Endogenous Transcription Occurs at the 1-Cell Stage in the Mouse Embryo

Christine Bouniol, Eric Nguyen, Pascale Debey  
1995r

Opracowała: Magdalena Barbachowska

# Wstęp:

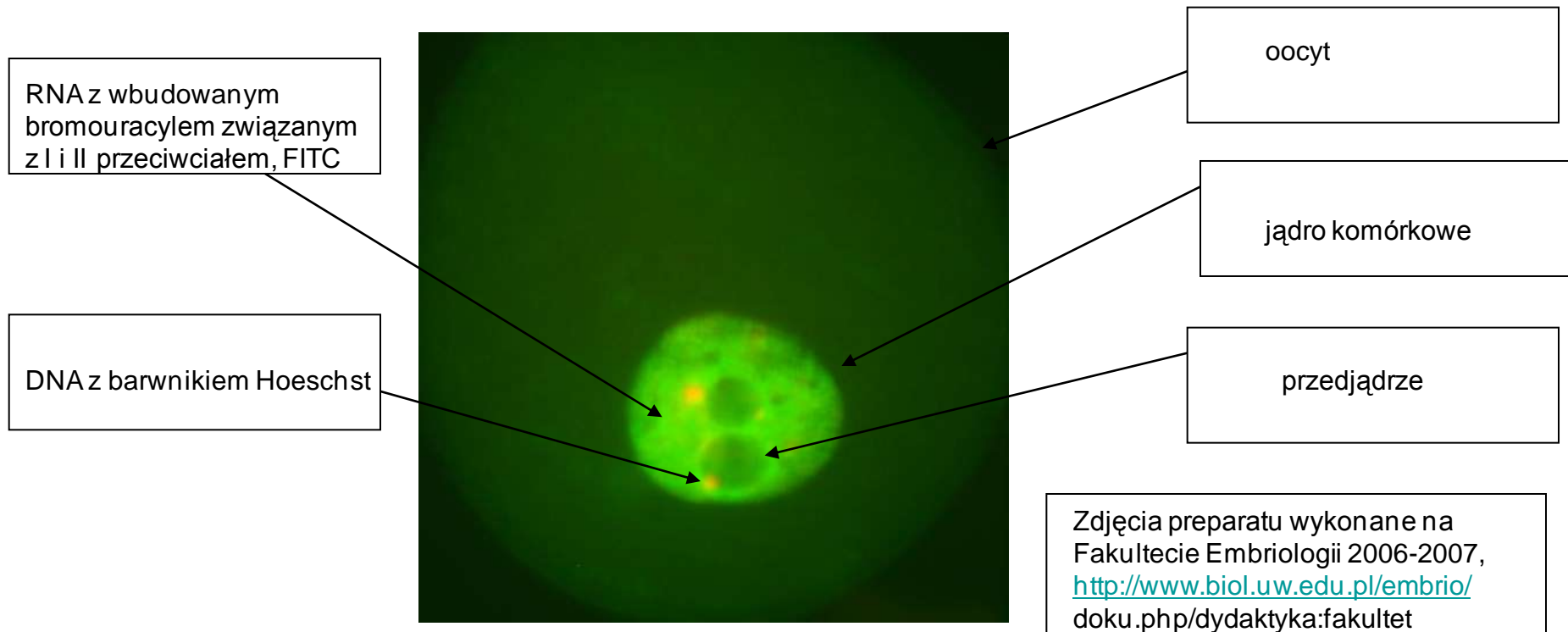
- U większości gatunków zwierząt początek rozwoju embrionalnego jest nieczynny transkrypcyjnie
- Wczesne stadia embriogenezy kontrolowane są przez czynniki matczyne
- U myszy pierwsze biochemiczne zmiany związane z transkrypcją genu widoczne są w stadium 2-komórkowym
- Ekspresja genów zarodka jest  $\alpha$ -amanityno wrażliwa
- W stadium 2-kom - synteza białek *de novo*
  - - zmiany w sposobie syntezy polipeptydów
- Traktowanie  $\alpha$ -amanityną 1-kom zarodka nie powoduje przejścia do stadium 2-kom
- Zarodek w stadium 1-kom jest bierny transkrypcyjnie

# Transkrypcja może być inicjowana w zarodku 1-komórkowym

- 1) W przedjądrzu zarodka myszy wykrywalny niski poziom wewnętrznej inkorporacji adenozyliny w heterogenne jądrowe poli(A)- RNA
- 2) Cytoplazma wyjądrzonego zarodka 1-kom. podtrzymuje aktywność transkrypcyjną jądra zarodka 2-kom. traktowanego  $\alpha$ -amanityną
- 3) Wykrywalny niski poziom przejściowej ekspresji genu nośnikowego (po mikroiniekcji) w przedjądrzu męskim zarodka 1-kom.
- 4) Analiza banku cDNA przedimplantacyjnego zarodka pokazuje, że przynajmniej jeden gen wykazuje przejściowy wzrost ekspresji w stadium 1-kom.

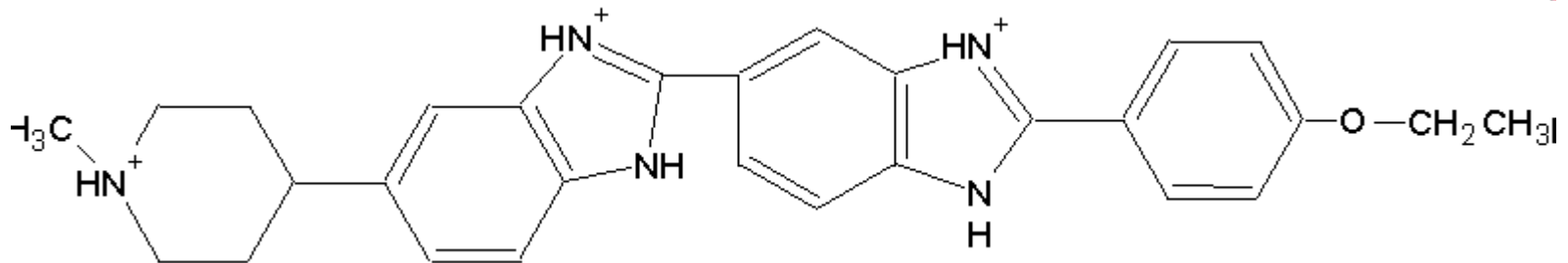
# Detekcja immunofluorescencyjna

- BrUTP wbudowane podczas transkrypcji w RNA jako bromouracyl
- I przeciwciało monoklonalne myszy (IgG), anti-BrdU
- II przeciwciało monoklonalne kozy (IgG), anti-mysie IgG, skoniugowane z fluoresceiną (FITC)



# Detekcja immunofluorescencyjna

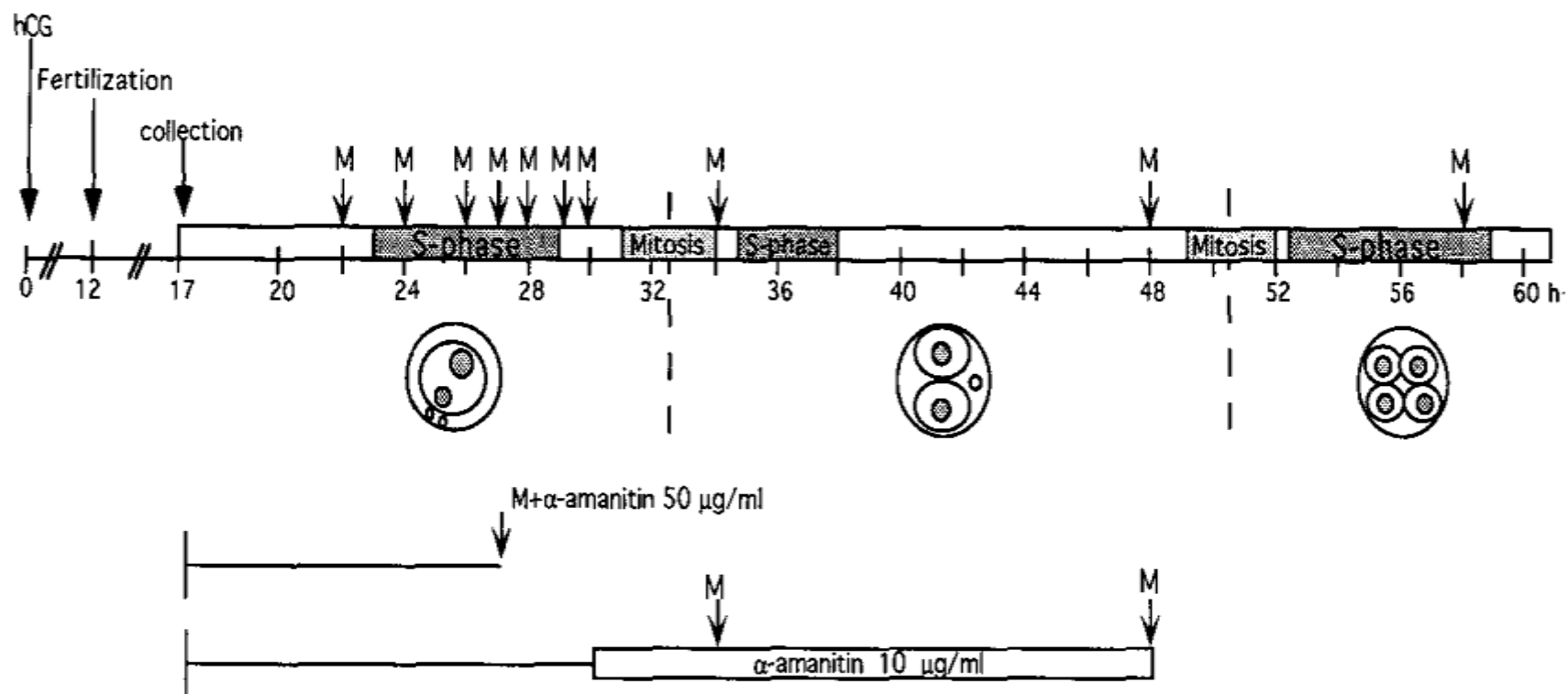
- barwnik Hoeschst 33342- barwnik fluorescencyjny bis-benzimidazol, wybarwia DNA na zasadzie interkalacji,
- wzbudzenie UV przy  $\lambda = 345 \text{ nm}$
- wybarwienie: jądra kom, chromosomów, mitochondriów
- siła sygnału wprost proporcjonalna do ilości DNA



# Materiały i metody:

- Immunofluorescencyjna detekcja inkorporacji BrU w powstającym RNA, prekursor BrUTP
- Myszy:
  - C57/CBA (cztero- -ośmioletniowe)
  - superowulowane: 5 j.m. PMSG, po 48h 5 j.m. hCG
  - C57/CBA
- Zapłodnienie po ok. 12h od podania hCG
- Zapłodnione kom. jajowe uzyskano z ampulli po 17h od podania hCG, przeniesione do hialuronidazy (1mg/ml)
- Do czasu mikroiniekcji przechowywanie w „Whitten’s medium” w 37°C w wilgotnej atmosferze (5% CO<sub>2</sub> w powietrzu)

- Pierwsze dwa cykle kom. trwają ok. 20h każdy
- Odpowiednik czasowy w doświadczeniu:
  - stadium 1-kom. wczesne i późne odpowiednio 22h i 26-29h,
  - stadium 2-kom. wczesne i późne odpowiednio 34h i 48h,
  - stadium 4-kom. 58h od podania hCG
- Mikroiniekcja 100mM BrUTP (1-5% V kom.) do cytoplazmy na każdym etapie rozwoju (w: 2mM PIPES, pH 7,4, 140 mM KCl)
- Inkubacja 15 lub 60 min
- Immunofluorescencja *in situ*
- Zablokowanie  $\alpha$ -amanityną RNA polimerazy II- zależnej transkrypcyjnie



**FIG. 1.** Timing of mouse embryonic development and schedule of experimental variants. hCG injection is taken as reference for the approximate timing of mouse embryonic development. Microinjections (M) are indicated by arrows. Experimental protocols using drug treatment are represented by white boxes below the time line.



# Przygotowanie zarodków i mikroskopia immunofluorescencyjna

- 20 min w paraformaldehydzie w PBS
- 15 min płukania w PBS z Triton X-100
- Zablokowane w PBS z BSA przez 1h
  
- 3h inkubacji z pierwszym przeciwciałem monoklonalnym
- 1h inkubacji z drugim przeciwciałem monoklonalnym
- Każda inkubacja poprzedzona trzymaniem zarodków w PBS zawierającym barwnik DNA, Hoest 33342, przez 20 min
  
- Przed obserwacją 25 min w paraformaldehydzie w PBS
  
- Kontrola: trawienie DNazą I pozbawioną RNazy lub trawienie RNazą A (przez 30 min zaraz po płukaniu w PBS z Triton X-100)

# Wyniki:

1. BrUTP jest wydajnie inkorporowany w nowo zsyntezowanym RNA w 2- i 4-komórkowych zarodkach myszy

Sprawdzono, czy sygnał punktowy przedstawia nowo zsyntezowane RNA

- zbadano związki BrUTP jako substratu dla RNA polimerazy zarodka myszy w stadiach, w których transkrypcja zachodzi efektywnie

- 1h inkubacji z BrUTP → mocny sygnał punktowy w jądrze stadium 2-kom. wczesnym i późnym (fig.2A,B) oraz w stadium 4-kom. (fig.2C,D)
- Poza obszarem jądrowym (fig.2A,C)
- Brak sygnału:
  - ~ pominięcie BrUTP lub I przeciwciała
  - ~ zarodek poddany trawieniu RNazą A przed immunodetekcją lub inkorporacją BrU
- Trawienie DNazą wolną od RNazy nie znosi specyfiki znakowania BrU
- Brak sygnału po dodaniu  $\alpha$ -amanityny → RNA polimeraza II jest zaangażowana w aktywność syntezy RNA

- Wczesne i późne stadium 2-kom 34h po hCG.- zawsze 2 jądra (fig.2B)
- Stadium 4-kom. 58h po hCG- tylko 2 jądra należące do kom. siostrzanej były pozytywne (fig.2D)- stałość mostków cytoplazmatycznych między siostrzanymi blastomerami 2-go podziału mitotycznego
- Brak znakowania BrU w jądrze poza późnym stadium 2-kom.- trudność dostępu przeciwciał do przedziałów, w których zachodzi aktywna transkrypcja genów rybosomalnych
- Barwienie jądra może być widoczne w późnym stadium 2-kom. po traktowaniu  $\alpha$ -amanityną

# Wyniki:

2. Endogenna RNA polimeraza II- zależna transkrypcyjnie jest obecna w 1-komórkowym zarodkach myszy w stadium odpowiadającym późnej fazie S lub G2

- Tab.1. Sygnał BrU w zarodkach 1-kom

Mikroiniekcja BrUTP (czas od podania hCG) [h]	sygnał	Liczba pobranych do mikroiniekcji zarodków	% zarodków, u których widoczny był sygnał (w obu przedjądrzach)
22	nie	Nie podano	0
24	nie	Nie podano	0
26- 29	tak	160	62

- Brak sygnału po 22h po hCG (fig.3A,B)
- Silny sygnał po 28h po hCG w obu przedjadrzach (fig.3C,D)
- Sygnał po 27h po hCG tylko w przedjadrzu męskim (fig.3E,F)
- Zauważalny wzrost obu przedjadrzy między 22h i 28h po hCG (fig.3A,E)

## Barwienie w zarodku 1-kom, 24h od podania hCG

1. Brak sygnału:

- Koiniekcja z  $\alpha$ -amanityną,
- Trawienie RNazą A

2. Zachowanie sygnału po trawieniu DNazą wolną od RNazy

# Wyniki:

## 3. Transkrypcja zachodzi najpierw w przedjadrzu męskim

- Spośród 160 zygot poddanych mikroiniekcji BrUTP w czasie 26-29h od podania hCG:
  - 28% brak specyficznego znakowania
  - 10% aktywne transkrypcyjnie tylko w przedjadrzu (fig.2E,F)
- Badanie zależności czasowej:
- mikroiniekcje zygot (z jednej myszy) co godzinę między 25-29h od podania hCG → max inkorporacja BrUTP 29% (7/24 zygot) na etapie ok.27h od podania hCG
- Najprawdopodobniej uzyskano max 29% ponieważ czas od momentu podania hCG podaje przybliżone stadium rozwoju zygoty, gdyż naturalne zapłodnienie u myszy jest asynchroniczne
- Nigdy nie zaobserwowano zygot z wyznakowanym tylko przedjadrzem żeńskim

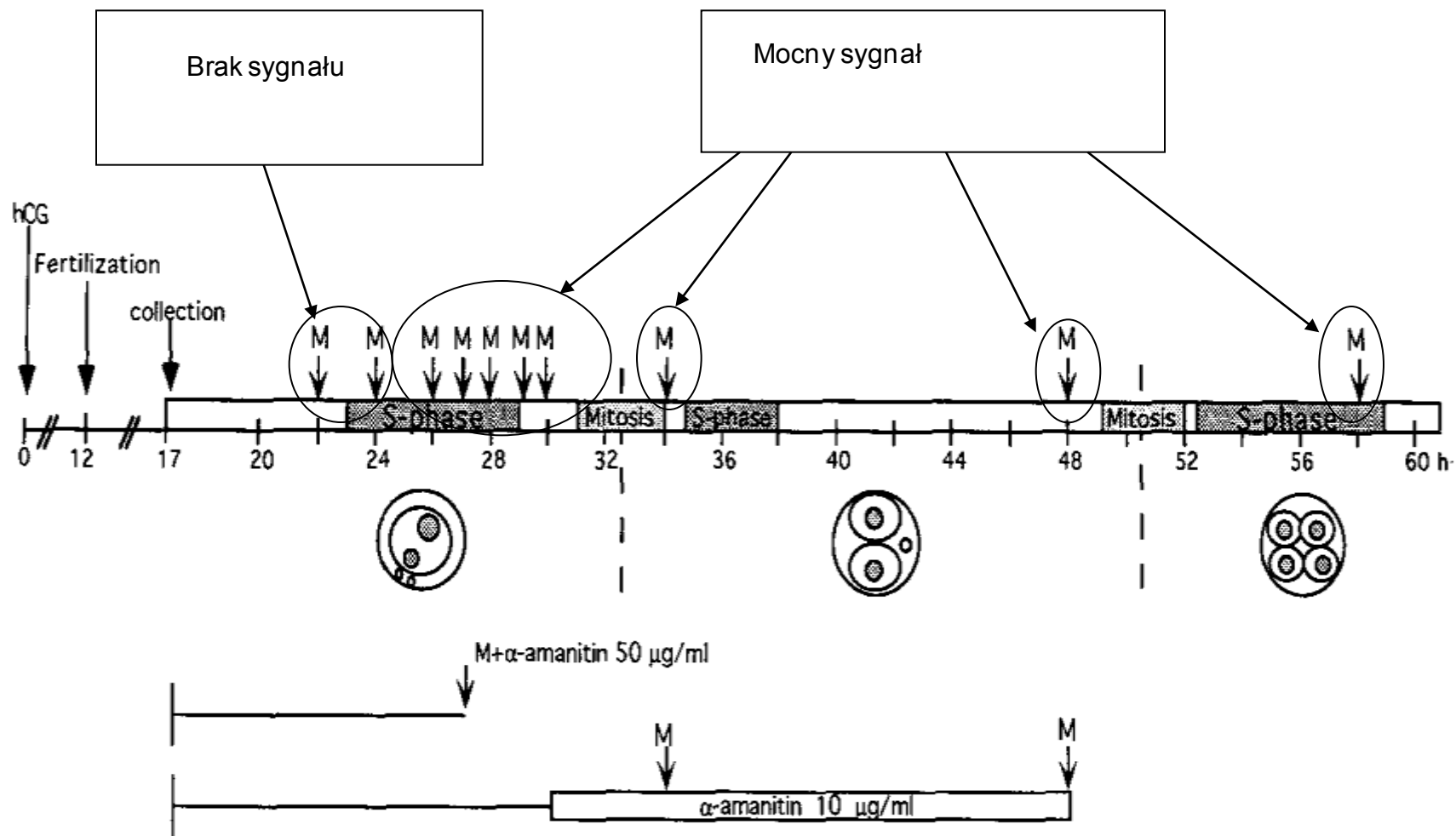
# Testy statystyczne:

- **Tab.2. Wyniki analizy rozmiarów promienia przedjądru męskiego w zarodku 1-kom. Obserwacje *in toto* po barwieniu DNA barwnikiem Hoest:**

Liczba przedjądru pozytywnych	Rozmiar promienia przedjądru męskiego [ $\mu\text{m}$ ]
2	10,9
1	10,53

- **W teście Studenta ( $P < 0,05$ )- przypadek, gdy tylko przedjądru jest pozytywne nie jest rzadki, ale może być związany z mniej zaawansowanym stopniem rozwoju**





**FIG. 1.** Timing of mouse embryonic development and schedule of experimental variants. hCG injection is taken as reference for the approximate timing of mouse embryonic development. Microinjections (M) are indicated by arrows. Experimental protocols using drug treatment are represented by white boxes below the time line.

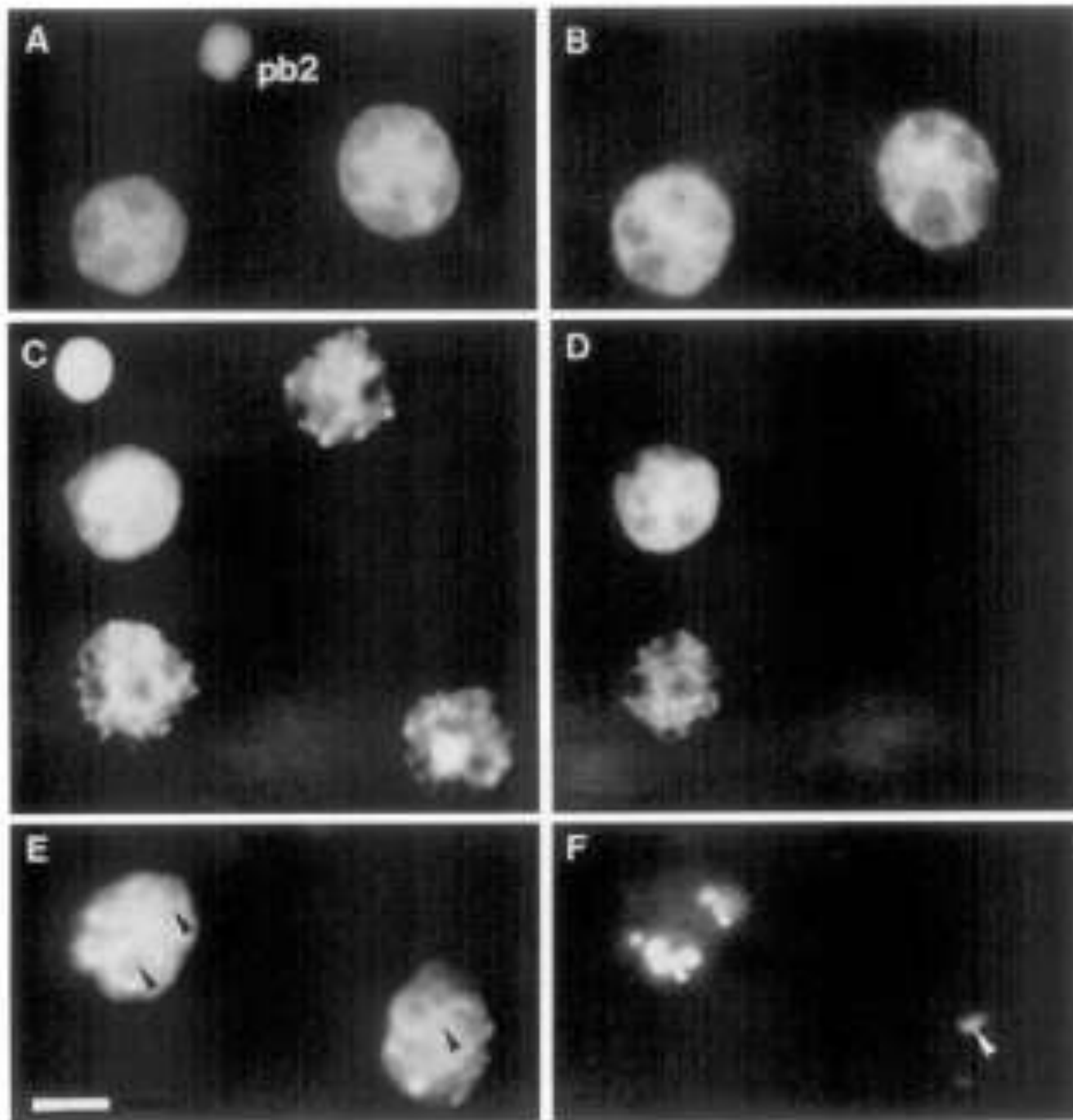


Fig. 2

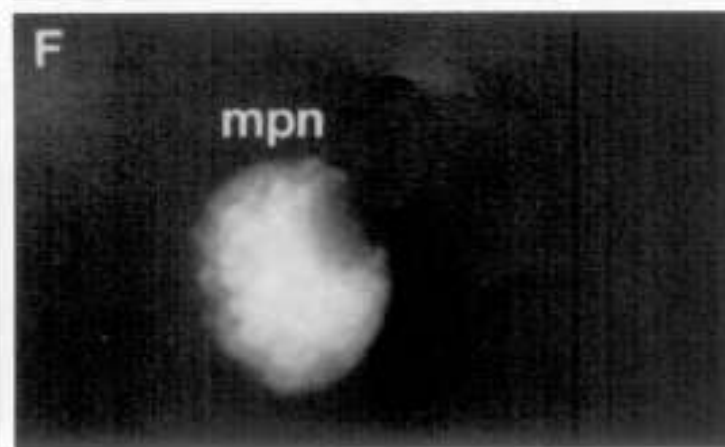
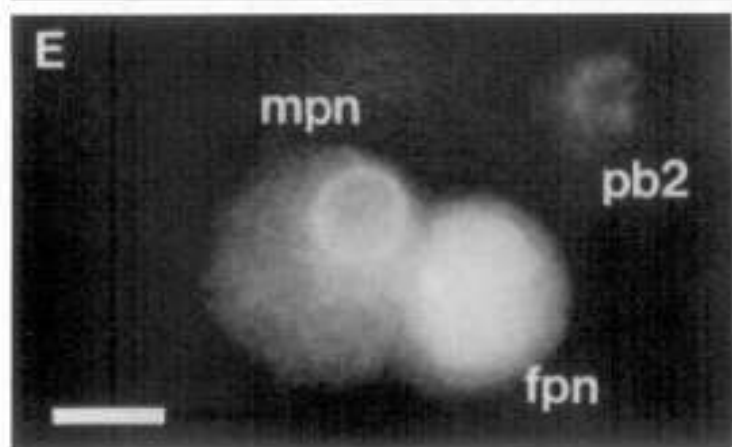
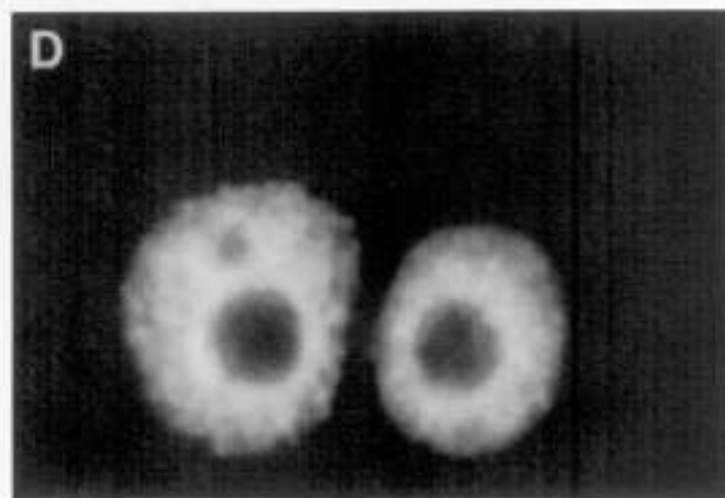
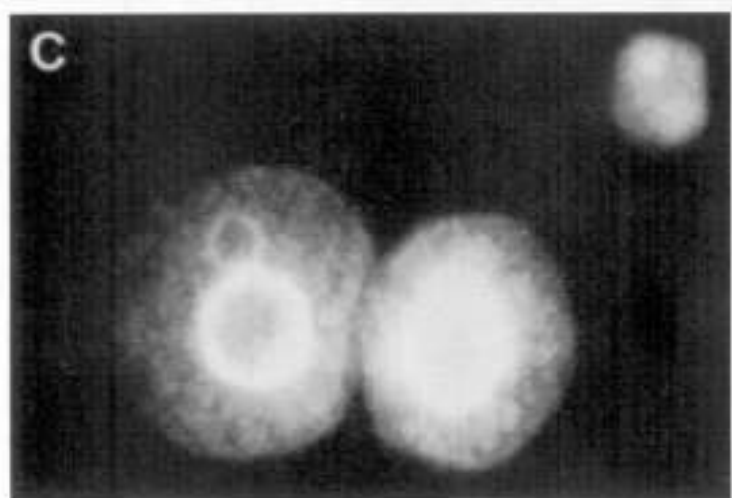
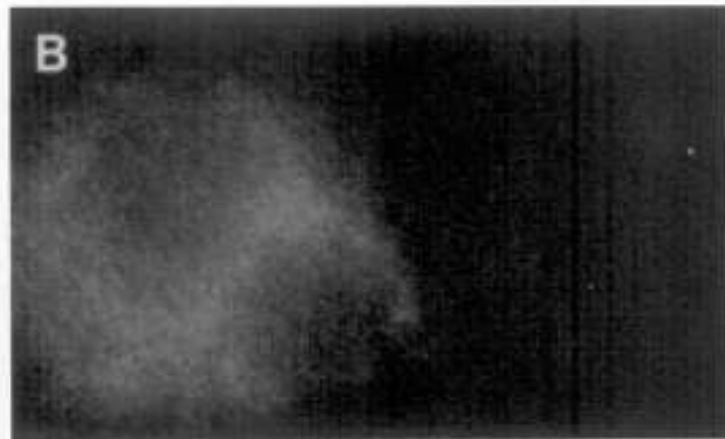


Fig. 3

**FIG. 2.** Localization of BrU-labeled RNA in 2-cell and 4-cell mouse embryos. Live embryos were microinjected with BrUTP, incubated for 1 h, and processed as described under Materials and Methods. DNA staining by Hoechst 33342 (A, C, and E) and immunofluorescent detection of newly synthesized RNA transcripts (B, D, and F) in early 2-cell (A and B) and 4-cell embryos (C and D). Some nucleoli (arrowheads) are labeled at the late 2-cell stage after addition of  $\alpha$ -amanitin (E and F). pb2, second polar body. Bar, 10  $\mu$ m.

**FIG. 3.** Localization of BrU-labeled RNA in 1-cell mouse embryos. Zygotes were microinjected with BrUTP at various stages of development, incubated for 1 h (A to D) or 15 min (E and F), and processed as described under Materials and Methods. The corresponding Hoechst staining (A, C, and E) and immunofluorescent detection of transcripts (B, D, and F) are shown. (A and B) 22 hphCG, no transcriptional activity is observed even with excitation intensity and gain of the camera set at maximum. (C and D) 28 hphCG, both pronuclei are labeled. (E and F) 27 hphCG, a case of one embryo with only the male pronucleus (mpn) labeled. The female pronucleus (fpm) is smaller than the male pronucleus and is closer to the second polar body (pb2). Note the increase in the size of the two pronuclei between 22 hphCG (A) and 28 hphCG (E). Bar, 10  $\mu$ m.