

*Epigenetic modifications during oocyte
growth correlates with extended
parthenogenetic development in the mouse*

Tomohiro Kono, Yayoi Obata, Tomomi Yoshimzu,
Tatsuo Nakahara & John Carroll

Rozwój partenogenetyczny u ssaków

- U ssaków łożyskowych nie opisano partenogenezy
- Do rozwoju zarodka niezbędny jest genom zarówno od matki jak i od ojca
- Zarodki partenogenetyczne żyją do 10 dni po aktywacji, wykazują ograniczony rozwój błon zewnątrzzarodkowych
 - → imprinting

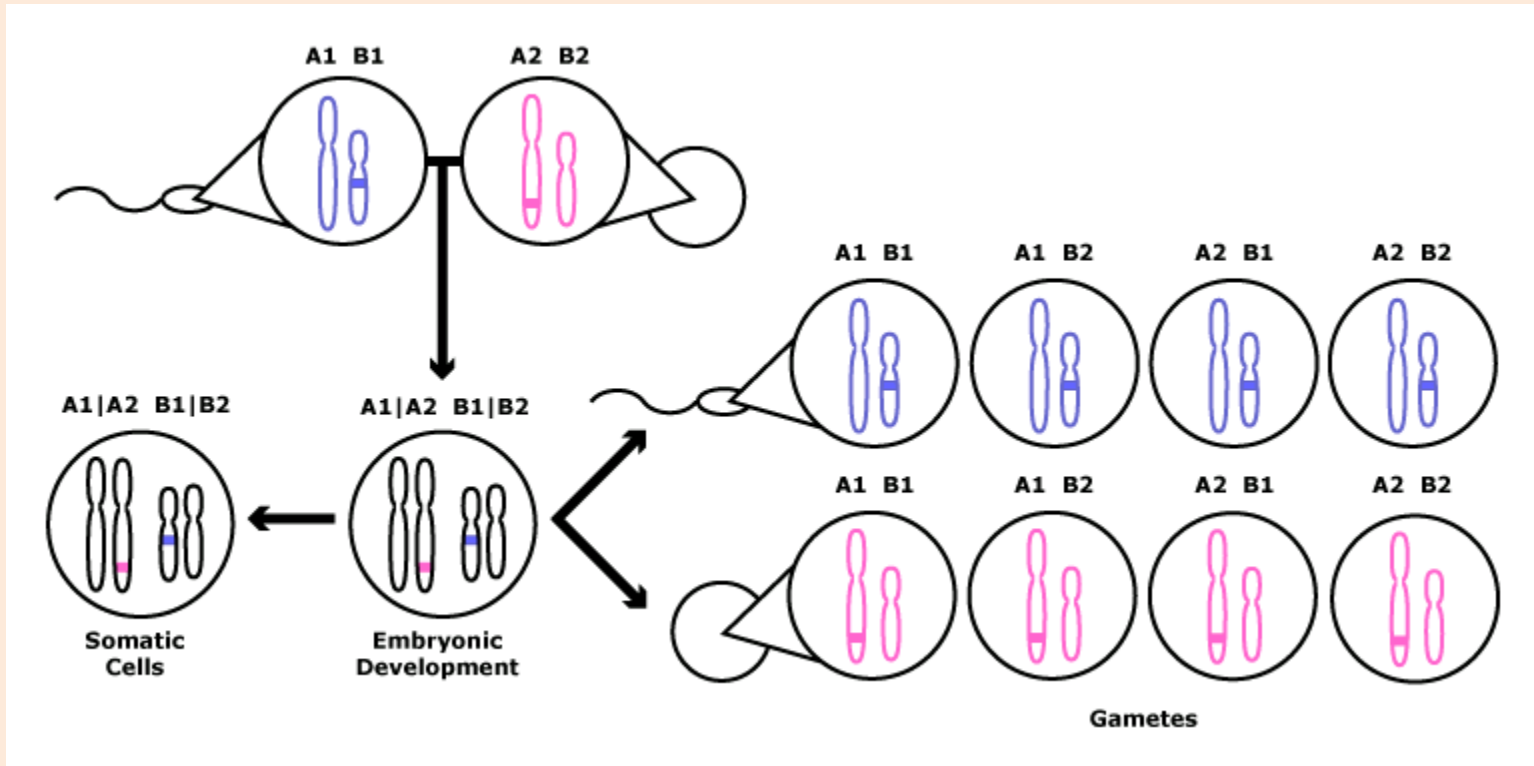
Imprinting

- Wyciszanie aktywności genów
- Geny podlegające piętnowaniu mają monoalleliczną ekspresję (aktywny tylko 1 allel). Ekspresja zależy od tego, czy gen jest dziedziczony od ojca czy od matki
- W zarodku partenogenetycznym niektóre geny będą nieaktywne lub ich aktywność będzie podwójna-aktywność bialleliczna

Imprinting

- Genomy ojca i matki uzupełniają się
- Nakładany podczas gametogenezy- w oocytach nakładany w stadium GV
- W gametogenezie następuje zniesienie piętna matczynego i ojcowskiego, aby zarodek „mógł nałożyć” własne piętno

Imprinting c.d.



Metylacja

- Mechanizm imprintingu
- Przyłączanie grupy $-CH_3$ do reszt cytozyny na wyspach CpG, które często występują w promotorach genów
- → zwinięcie chromatyny
- → zazwyczaj uniemożliwienie transkrypcji (inaktywacja genu)

Matka vs Ojciec

- W interesie matki jest wyciszenie niektórych genów, które kodują czynniki wzrostu
- W interesie ojca jest silny rozwój zarodka
- IGF2- czynnik wzrostu, jego gen aktywny u ojca, a wyciszany przez matkę
- IGF2r-receptor wychwytyjący czynnik wzrostu z krwi → czynnik IGF2 nie dociera do zarodka. Ten gen aktywny u matki

IGF2r

- Koduje receptor dla białka IGF2 (insulino podobny czynnik wzrostu II)- korzystne dla matki
- Ekspresja tylko allelu matczynego
- Metylacja genu- 3 intron regionu 2
- Metylacja w trakcie wzrostu oocyty (locus niezmetylowane w nierosnącym oocycie, a zmetylowane w wyrośniętym)

Cel doświadczenia

- *Badanie modyfikacji epigenetycznych (przede wszystkim metylacji w genie IGF2r) podczas wzrostu oocyty oraz we wczesnych fazach rozwoju zarodka*

Materiał i metody

- Myszy B6CBF1 (C57BL/6j × CBA)
- Wyrośnięte oocyty wyizolowane z jajnika po 48 h od wstrzyknięcia PMSG
- Niewyrośnięte oocyty wyizolowane z jajnika 'jednodniowej' myszy
- Oocyty w stadium GV umieszczone w roztworze dbcAMP
- Oocyty w MII wyizolowane z jajowodów 16 h po wstrzyknięciu hCG

Materiał i metody

- Transfer jądra
- Fuzja niewyrośniętego oocyty z wyjądrzonym oocytem GV zaindukowana inaktywowanym wirusem Sendai
- Oocyty 1h po fuzji umieszczone w pożywce Waymouth MB752/1 (Gibco) 14 h
- Blastocysty przeniesione do macicy samicy myszy utrzymywanej w stanie ciąży rzekomej
- Analiza PCR metylacji genu IGF2r

Transfer jądrowy

- Fuzja oocyty pierwszorzędowego ng (non-growing) z wyrośniętym oocytem bez jądra fg (fully grown)
- → grupa doświadczalna:
dojrzałe cytoplazmy oocytów I-rzędowych z chromatyną pochodzącą z nierosnących oocytów- oocyty gotowe do zapłodnienia, ale bez metylacji

Kontrola

- Grupa kontrolna:

Fuzja wyrośniętego oocyty bez jądra z jądrem innego wyrośniętego oocyty

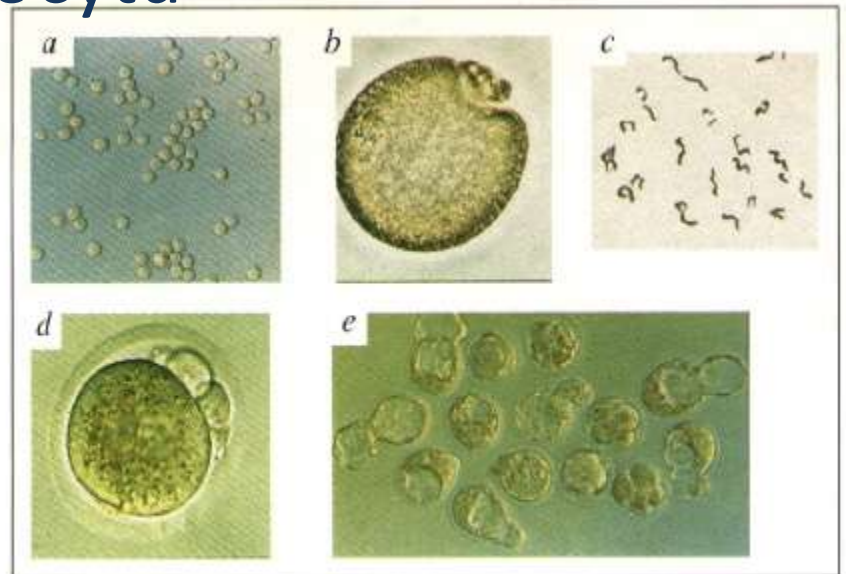
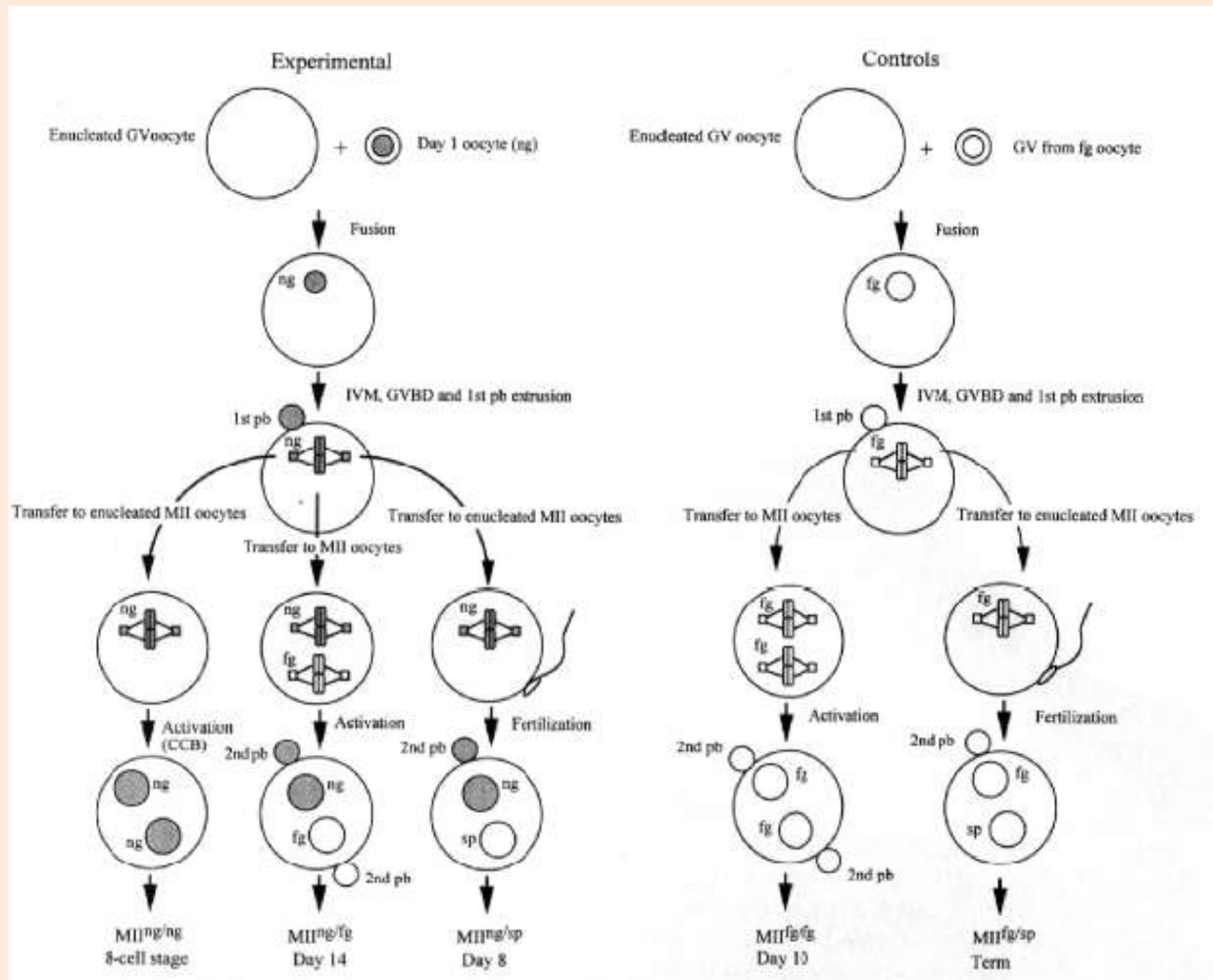


Fig. 2 Production of oocytes and embryos containing the nucleus of non-growing primary oocytes. *a*, Non-growing primary oocytes isolated from a 1-day-old female mouse. *b*, An experimental oocyte containing chromatin from a nongrowing oocyte (MI^{0/0}). *c*, The bivalent chromosomes of an MI^{0/0} experimental oocyte. *d*, A pronucleate stage parthenogenetic MI^{0/0} embryo derived from an experimental oocyte. *e*, Blastocysts obtained after culture of embryos shown in (*d*) for 4 days.

Eksperyment



Wyniki

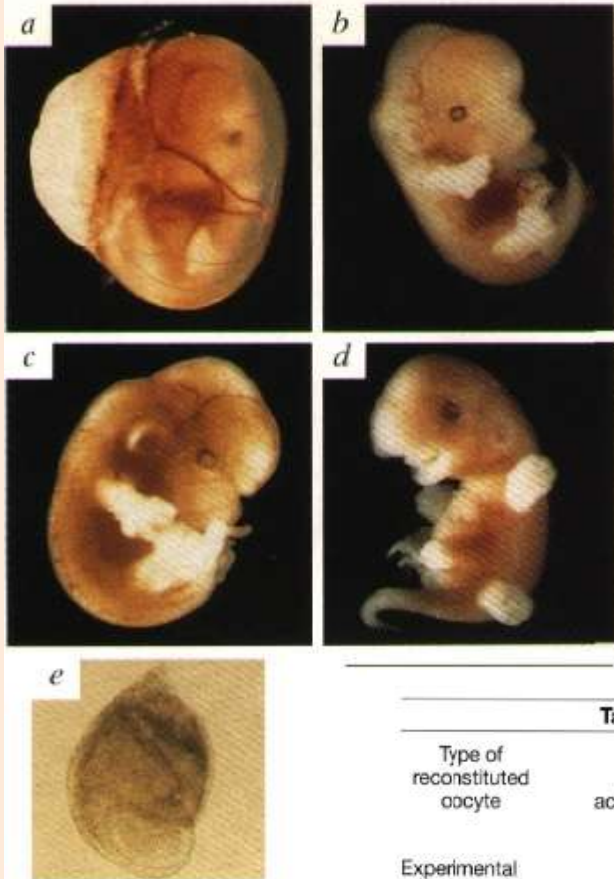


Table 1 Development of embryos containing chromatin from non-growing primary oocytes

Type of reconstituted oocyte	Normally fertilized or activated oocytes/ total	Blastocysts/ total	Pregnant recipients/ total	Day of autopsy	Conceptuses/ total	Fetuses			
						<8mm	>8mm	>9mm	>10mm
Experimental									
MII ng/ng (parthenogenetic)	39/43	0/39 (5/39 8-cells)							
MII ng/sp (fertilized)	122/199	70/101	1/1	9.5 dpc	6/11	1			
			1/1	10.5 dpc	6/11				
			1/1	11.5 dpc	9/10				
			2/3	12.5 dpc	13/16				
MII ng/fg (parthenogenetic)	175/274	124/131	2/2	13.5 dpc	13/18		2	3 (2 alive)	1 (alive)
			2/2	14.5 dpc	10/15	1	1	2	1
			2/2	15.5 dpc	14/18	3	3	1	1
Controls									
MII fg/sp (fertilized)	16/31	11/16	2/2	19.5 dpc	6/11	4 live young			
MII fg/fg (parthenogenetic)	32/50	27/32	2/2	11.5 dpc	15/27	all resorbed			

Wyniki

- Poziom zapłodnienia i partenogenetycznej aktywacji podobny w obu grupach
- Rozwój do blastocysty normalny, jeżeli zarodki posiadały zestaw alleli z wyrośniętego oocytu lub plemnika
- Zarodki ng/ng prawie nie dochodziły do stadium 8 kom
- W partenogenetycznych zarodkach ng/fg łożysko było w znacznym stopniu rozwinięte, rozwijały się 3 dni dłużej niż zwykłe zarodki partenogenetyczne
- Zarodki partenogenetyczne fg/fg wkrótce po implantacji zmarły (10 dni)

Wnioski

- Locus IGF2r ulega metylacji podczas wzrostu oocyty w stadium GV- oocyty i blastocysty nie były w stanie naprawić wzoru metylacji w tym genie
- Imprinting nakładany jest w konkretnym momencie oogenezy, zmiany w imprintingu mogą prowadzić do biallelicznej ekspresji genu
- Mały rozmiar partenogenetycznych zarodków fg/fg oraz większy wzrost zarodka ng/sp i łożyska w zarodkach ng/fg (niż w standardowej partenogenezie) potwierdzają, że geny 'odmatczyne' hamują wzrost zarodka

- Zmiana normalnego wzoru metylacji (zmiana ekspresji genu) może prowadzić do zmiany ekspresji innych genów- wymagane potwierdzenie ilościowe

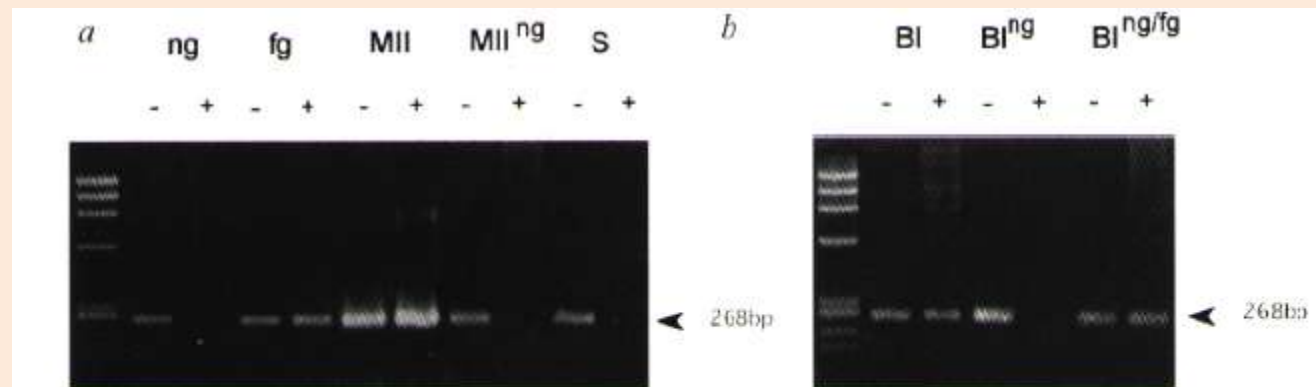


Fig. 4 Analysis of the pattern of DNA methylation of the *igf2r* gene in reconstituted oocytes and embryos. *a*, Methylation patterns in intact and experimental gametes. Non-growing primary oocytes from 1-day-old mice (ng), fully grown GV stage oocytes (fg), ovulated MII oocytes (MII), experimental oocytes containing chromatin from a non growing oocyte (MII^{ng}), and epididymal sperm (S). *b*, Methylation patterns in blastocysts derived from these gametes. Normal blastocysts from intact MII oocytes (BI), blastocysts derived from the fertilization of MII^{ng} oocytes (BI^{ng}), blastocysts derived from parthenogenetically activated MII^{ng/fg} oocytes (BI^{ng/fg}). Lanes (-) and (+) are *HpaII* digested and undigested samples, respectively.

Podsumowanie

- Epigenetyczne modyfikacje mają ogromny wpływ na rozwój zarodka po zapłodnieniu lub aktywacji partenogenetycznej
- Możliwość dokładnego określenia momentu, w którym zachodzi modyfikacja podczas wzrostu oocyty, stanowi istotny krok w zapoczątkowaniu badania molekularnych mechanizmów imprintingu w gametach