



„The Maternal Nucleolus Is Essential for Early Embryonic Development in Mammals”

autorstwa Sugako Ogushi
Science vol 319, luty 2008

Prezentacja Kamil Kowalski

Jąderko pochodzenia matczynego jest konieczne do wczesnego rozwoju zarodkowego u ssaków

- Podczas zapłodnienia ojcowski i matczyne wkład w powstanie zygoty nie jest jednakowy
- Oocyt i plemnik są mimo to wyposażone w komplet struktur komórkowych i molekularnych koniecznych do utworzenia zarodka
- Do utworzenia zygoty konieczne jest nie tylko połączenie DNA plemnika i zygoty ale również niektórych białek, RNA i organelli.
- Niektóre zygotyczne składniki mają ściśle matczyne lub ojcowskie pochodzenie

OJCOWSKIE

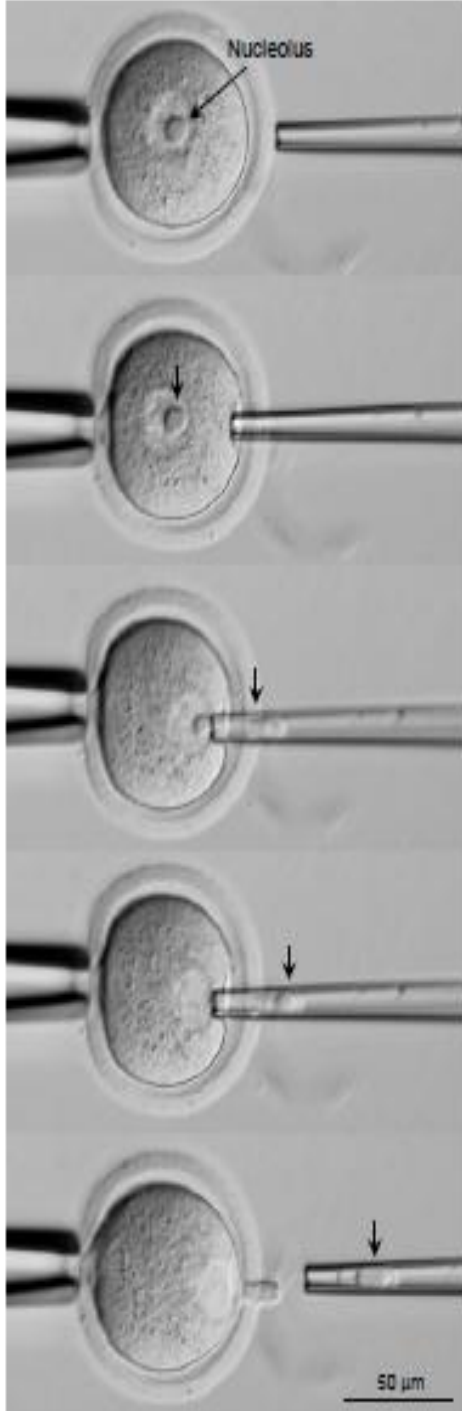
centriole u ssaków
(wyjątek gryzonie)

MATCZYNE

mitochondria
jąderko

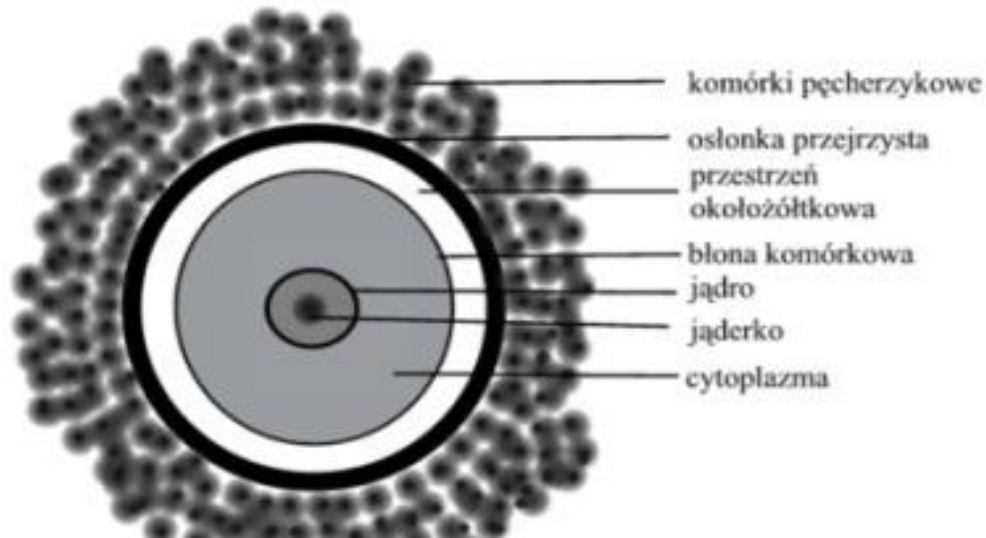
Obiekty doświadczalne





Stosowane metody

- Immunofluorescencja
- Barwienie chromatyny DAPI i Hoest
- Mikromanipulacje na oocytach, zygotach, ES i k. somatycznych
- Aktywacja oocytów → elektro-aktywacja (świnia), inkubacja w Ca^{2+} i SrCl_2 (mysz)



SYMULACJA

USUNIĘCIE
JĄDERKA

PONOWNA
INIEKCJA
JĄDERKA

SYMULACJA
SCNT

POZBAWIONE
JĄDERKA SCNT

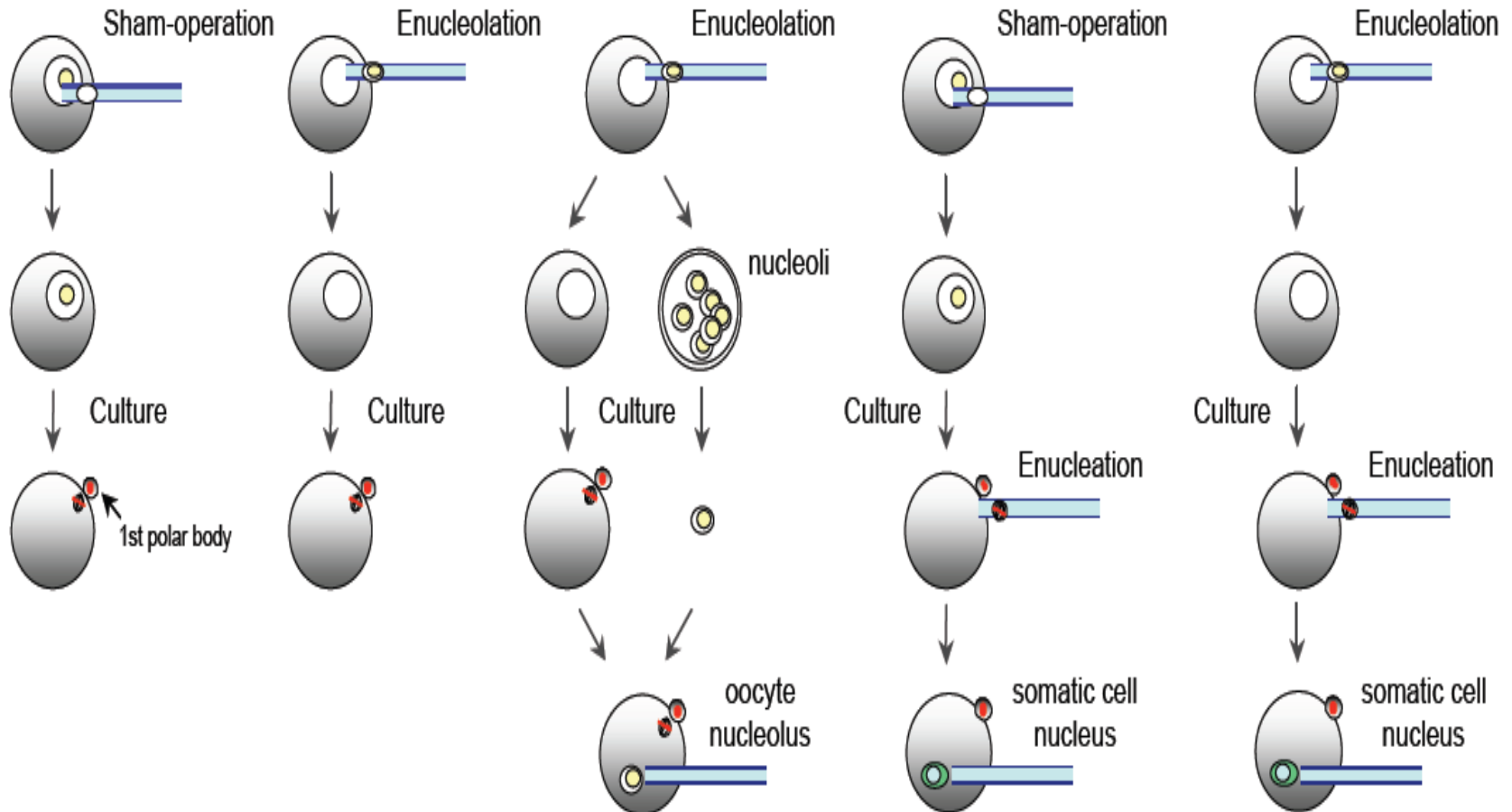
Sham

Enucleated

Nucleolus reinjected

Sham-SCNT

Enucleated-SCNT



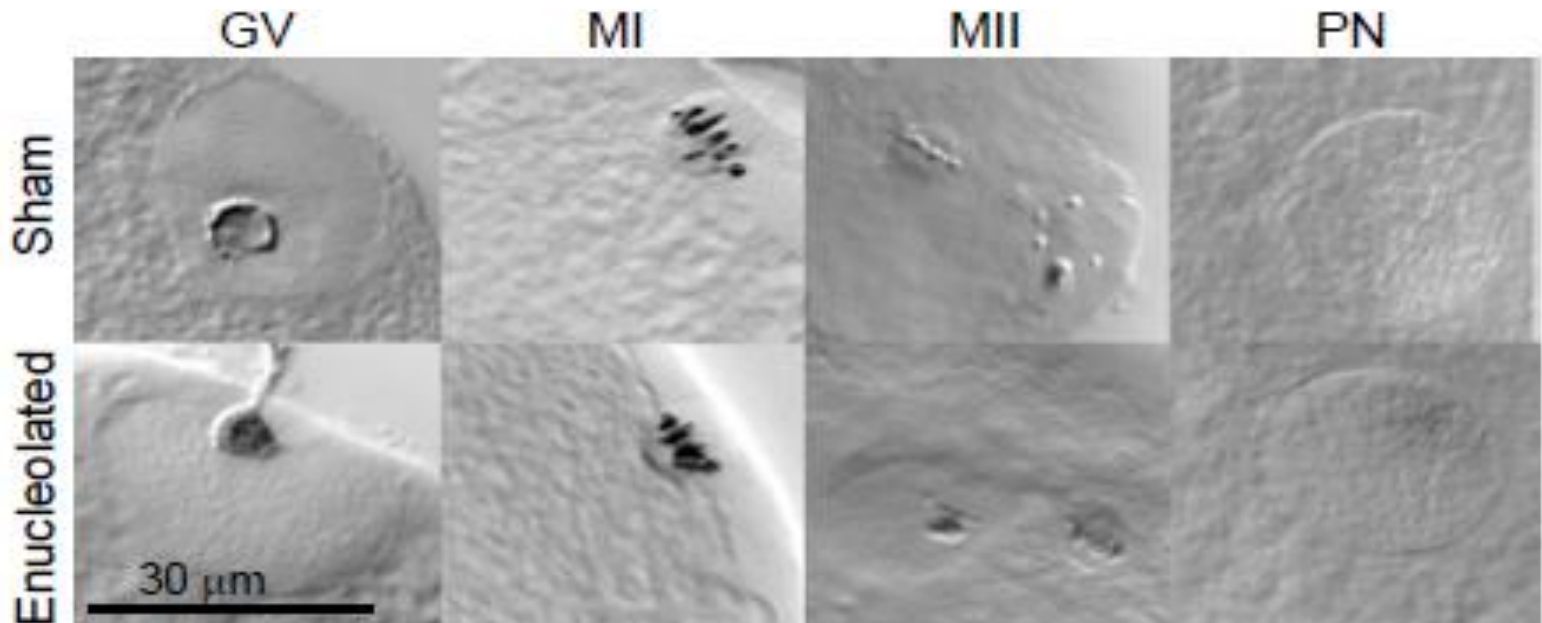
SCNT --> komórka z przeszczepionym jądrem
komórki somatycznej

Do prawidłowego dojrzewania oocytu jąderko nie jest niezbędne.

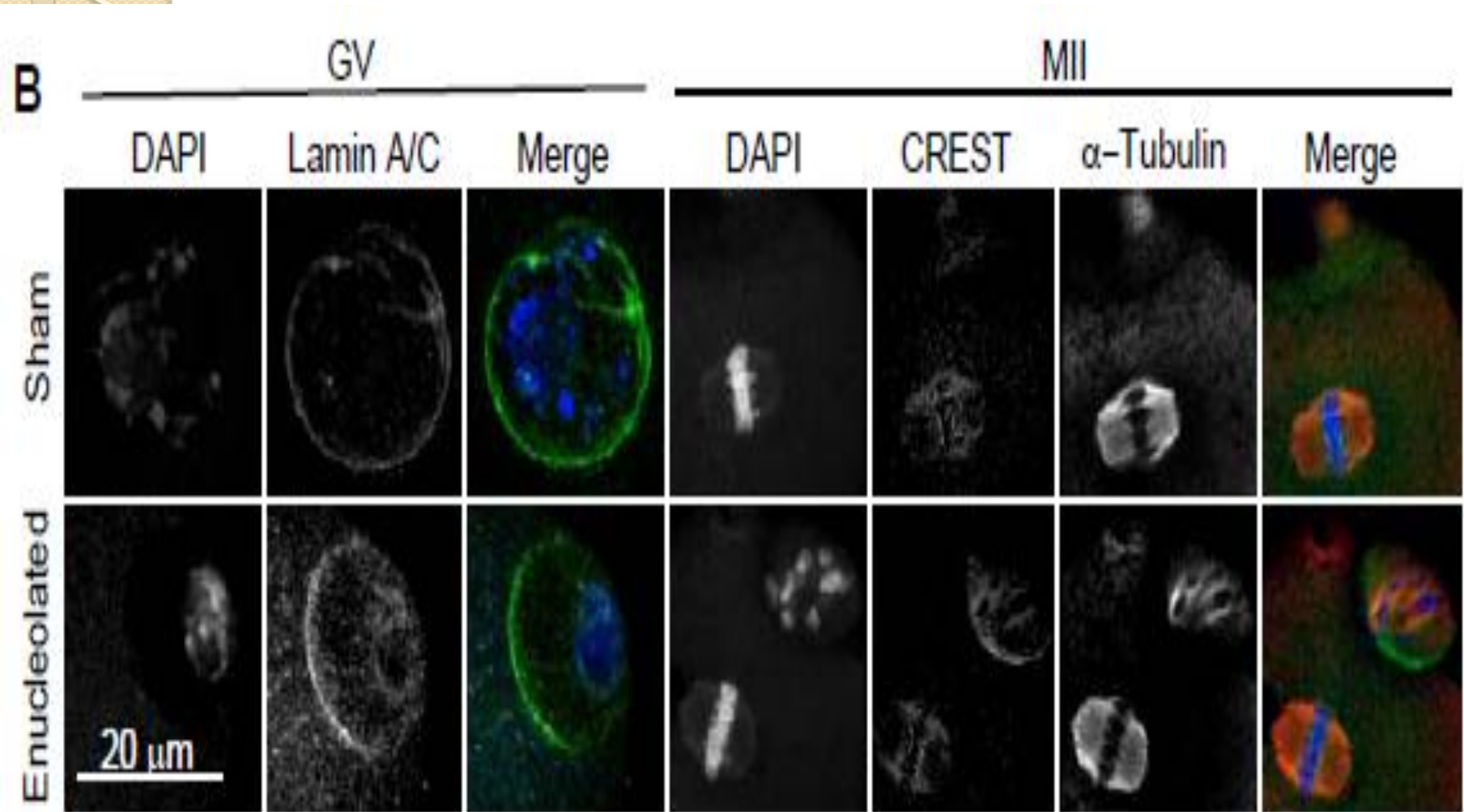
POZBAWIONE JĄDERKA OOCYTY:

- 1) Wykształcają prawidłowe wrzeciono podziałowe
- 2) Wyrzucają ciało kierunkowe
- 3) Czas cykli jest porównywalny z kontrolą aż do metafazy II

Etapy u świni → pęcherzyk zarodkowy, mitoza I, mitoza II, etap przedjądrzy

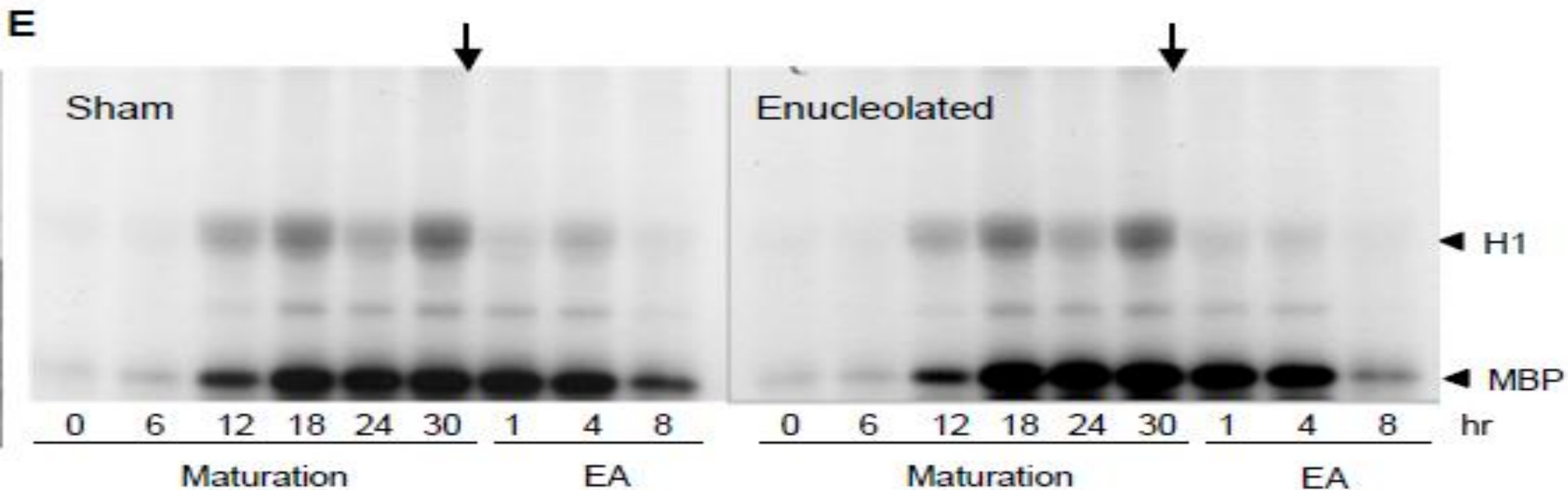


Porównanie wyglądu rozwijającego się oocytu u myszy



Badania aktywności czynników regulujących kinetykę podziałów komórkowych

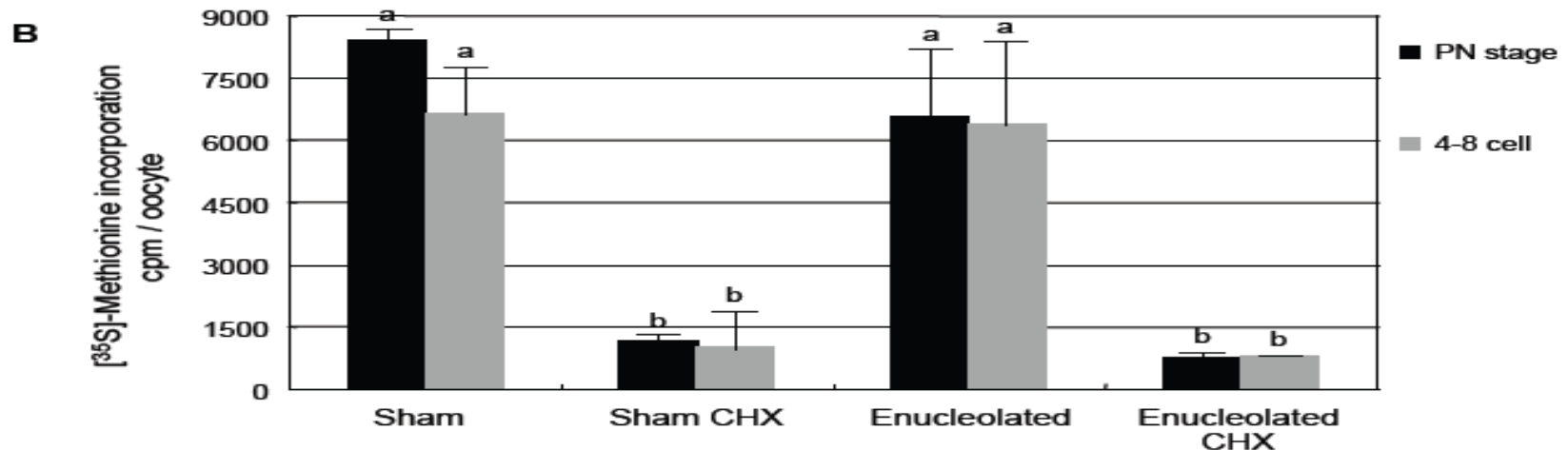
CDKI oraz MAP kinaza za pośrednictwem fosforylacji histonu H1 i MBP



Brak istotnych różnic pomiędzy oocytem bezjąderkowym a kontrolą → jąderko nie jest niezbędne do wczesnego rozwoju

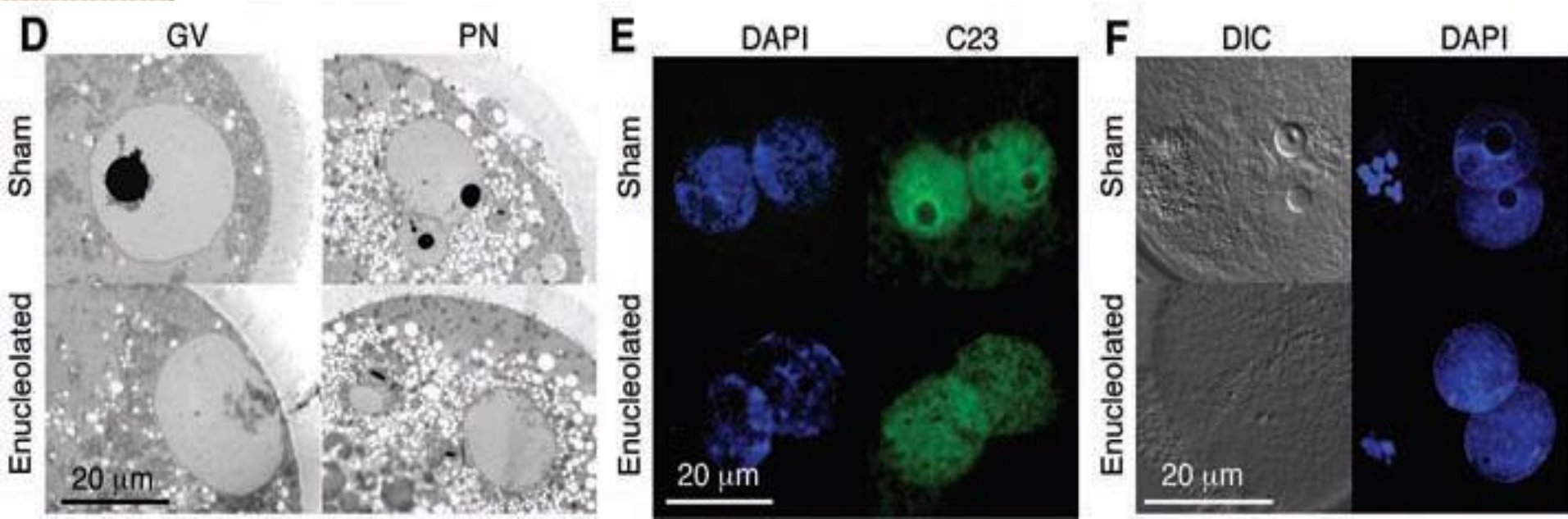
Beźjąderkowe oocyty mogą być skutecznie aktywowane partogenetycznie (świania 100%, mysz 75%) bądź przez zapłodnienie (świnia 57%, mysz 69%)

Synteza białek na stadium PN oraz 4-8 komórkowego zarodka



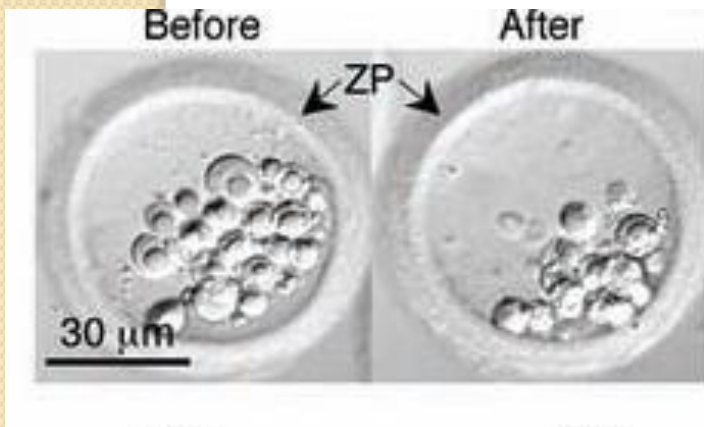
W kontroli (jąderko pozostawione) jąderko było wykrywalne na etapie pęcherzyka zarodkowego (GV) oraz obu przedjądrzy (PN)

W doświadczeniu z oocytom bezjąderkowym, jąderko nie było wykrywalne w GV oraz PN (jeżeli brakuje jąderka w oocycie to nie odbuduje się ono z materiału zawartego w plemniku)

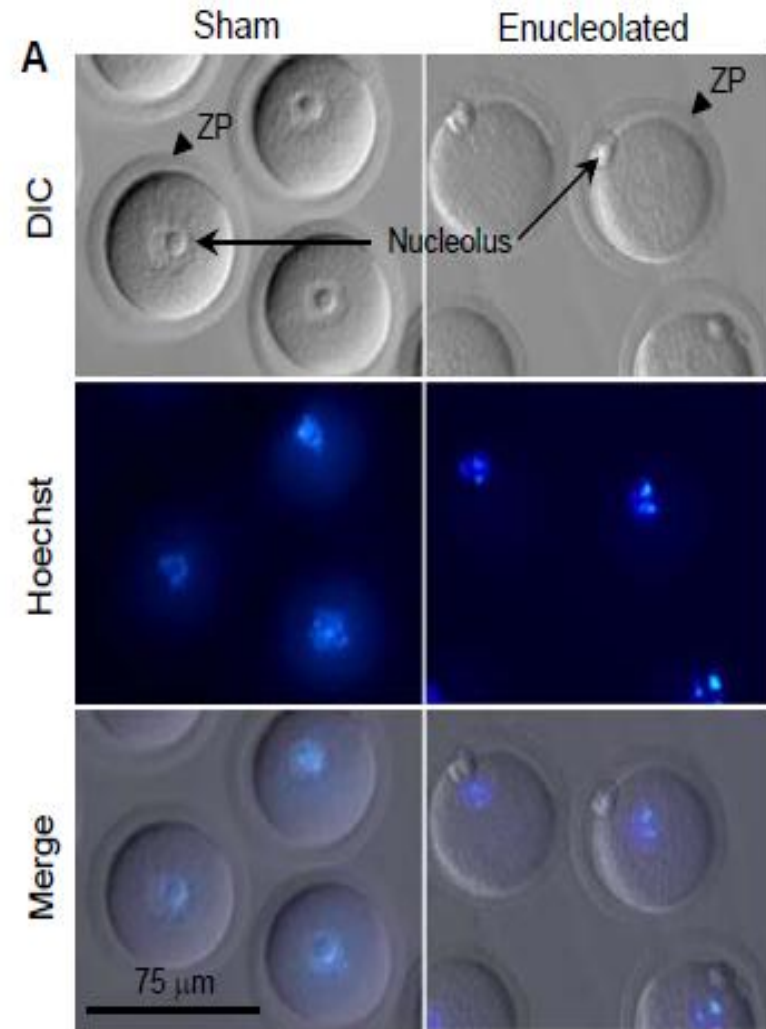


Badanie odzyskiwania funkcji jąderka po ponownej iniekcji do oocyty

Usunięcie jąderka z oocytów i przetrzymywanie ich w osłonce przejrzystej u świni przez 26 h, a u myszy przestrzeni okołożółtkowej przez 14 h



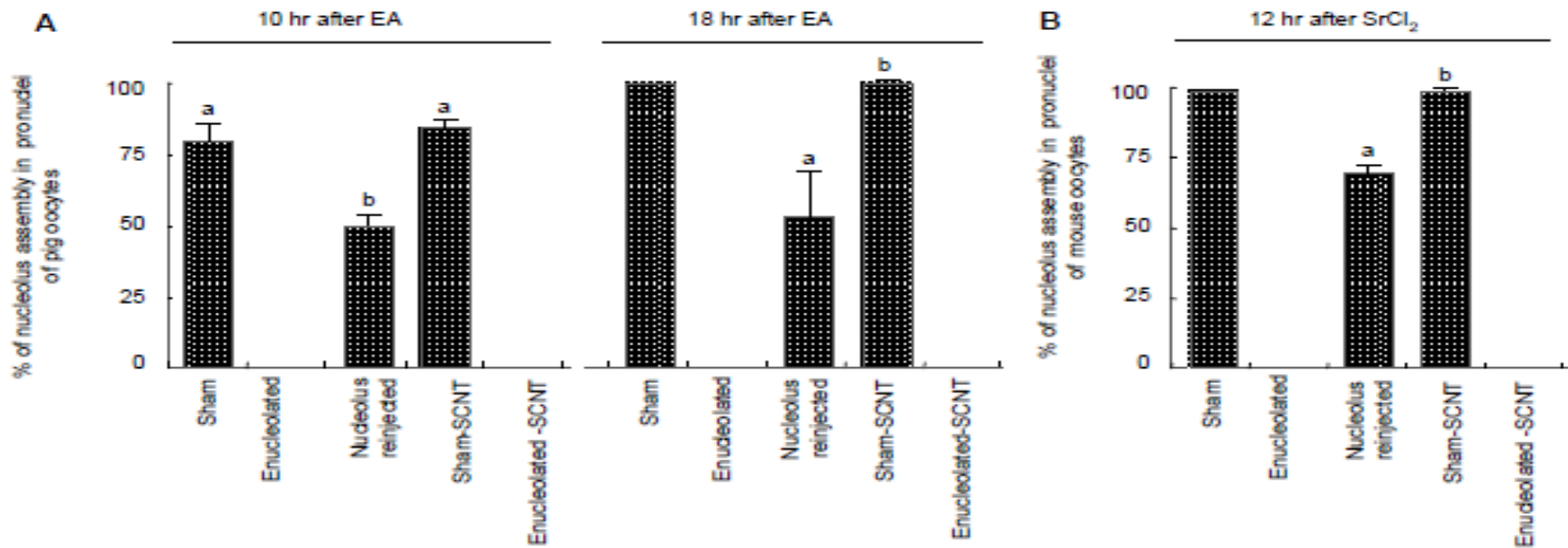
świnia



mysz

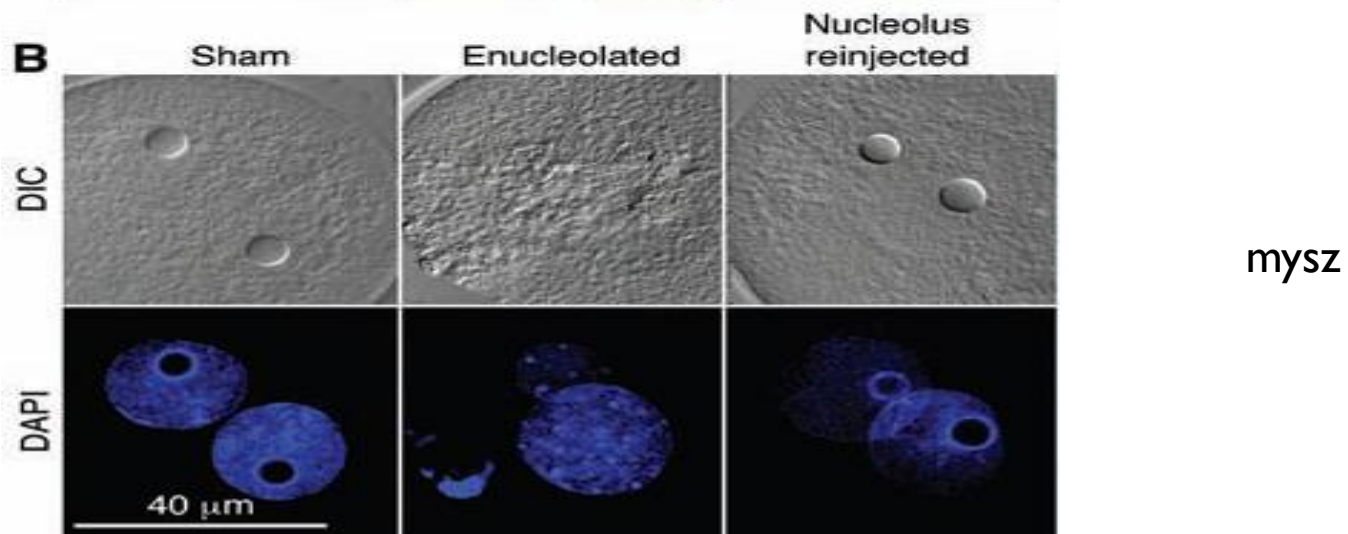
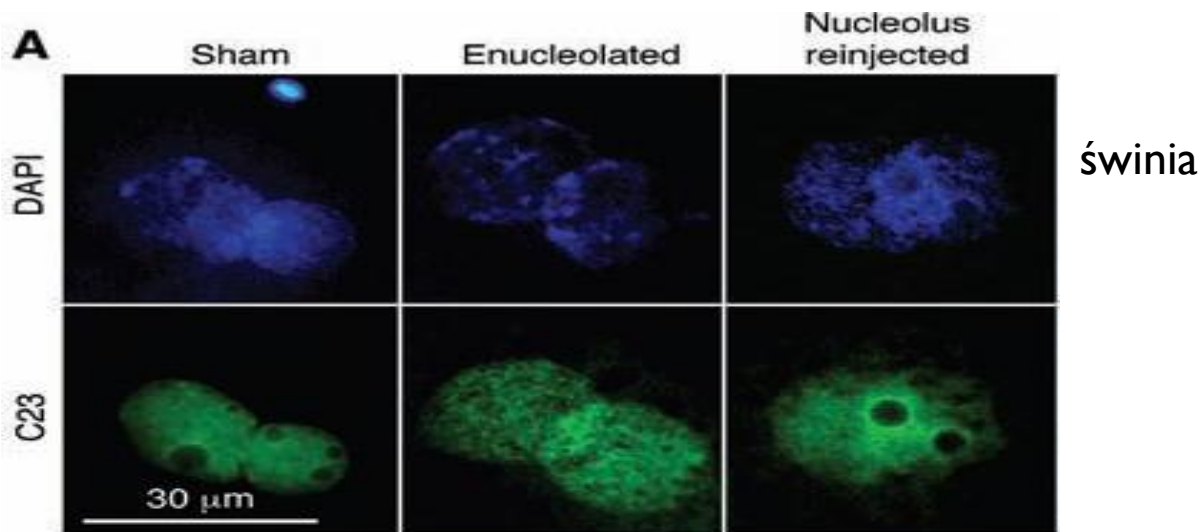
- Po ponownym wstrzyknięciu jąderko znika w cytoplazmie
- Po aktywacji oocyty z ponownie wstrzykniętym jąderkiem, jąderko staje się wykrywalne (świnia 53%, mysz 69%).

% złożonych jąderek w przedjądrzach



świnia

mysz



C23- immunofluorescencja przeciwko C23

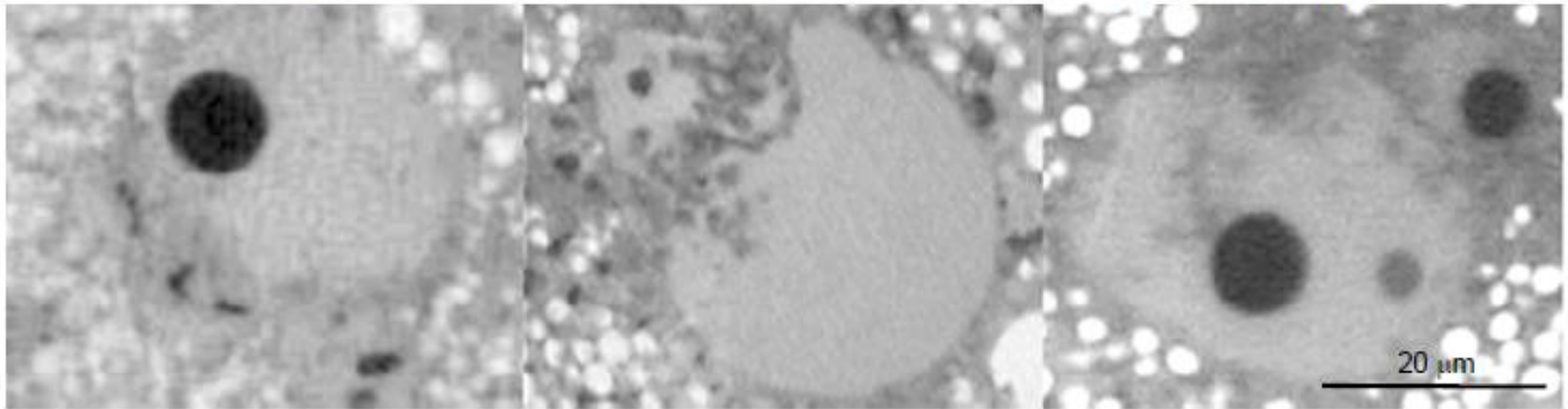
DIC- mikroskopia optyczna z kontrastem fazowym

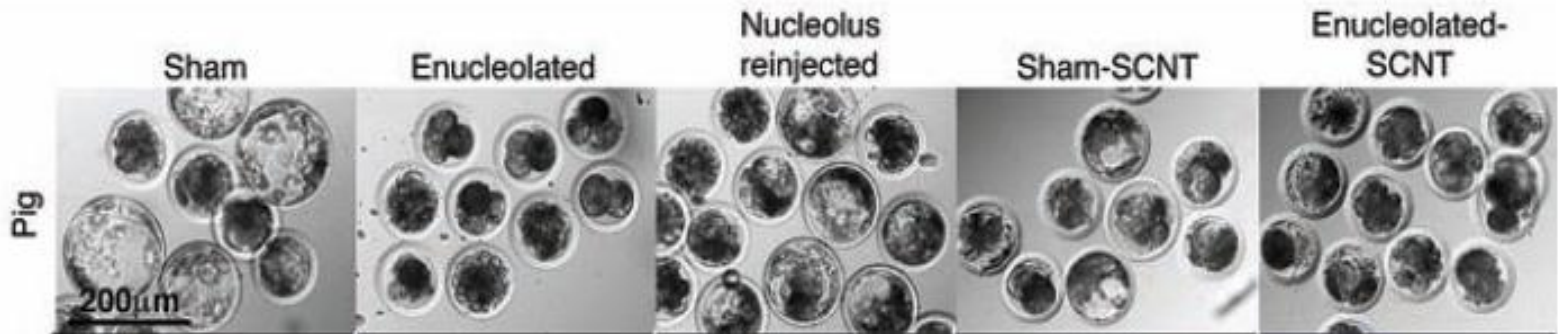
- Zapłodniony in vitro oocyt z reiniekcją jąderka tworzy zygotę z przedjądrzami zawierającymi jąderka

Sham

Enucleolated

Nucleolus reinjected



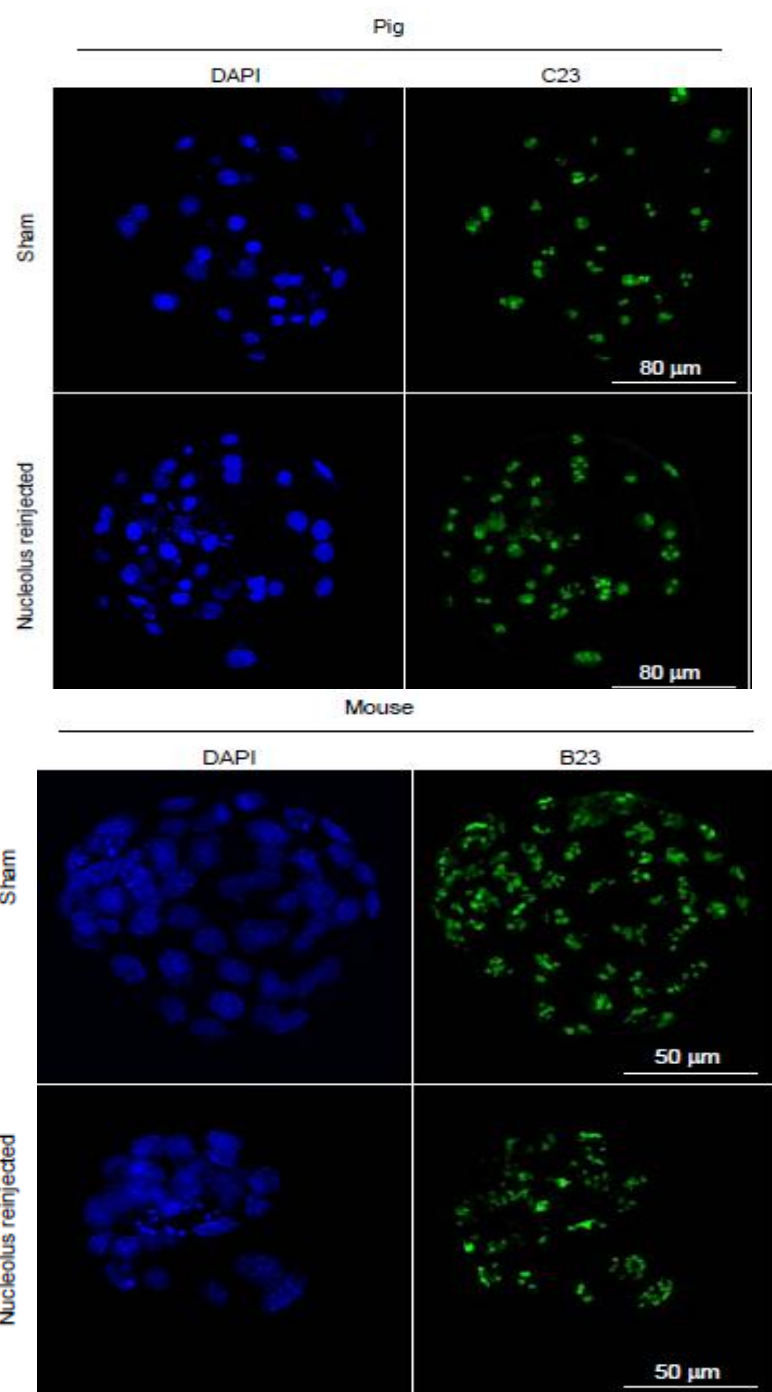


Rozwój zarodka świni zapoczątkowany z bezjąderkowego oocyty zostaje zahamowany na stadium kilkukomórkowym (brak jąder w blastomerach). Zarodki z grupy kontrolnej oraz reiniekcji jąderka rozwijają się normalnie z blastomerami posiadającymi wykrywalne jąderka i osiągają stadium blastocysty

	Type of pig oocyte				
	Sham	Enucleolated	Nucleolus reinjected	Sham-SCNT	Enucleolated-SCNT
Total number of oocytes examined	148	228	194	156	200
Total number and % of oocytes cleaved	128 (86)	168 (74)	174 (90)	120 (77)	175 (88)
Total number and % of oocytes forming blastocysts	92 (62)	0 (0)	72 (37)	48 (31)	0 (0)

Zarodek świni powstały z oocyty z reiniekcją jąderka wykazywał regularne cykle podziałowe z blastomerami posiadającymi widoczne jąderka co prowadziło do powstania blastocysty

U mysiego zarodka podobnie, tylko oocyty zawierające jąderka (grupa kontrolna bądź reiniekcja) dawały początek prawidłowo rozwijającym się zarodkom



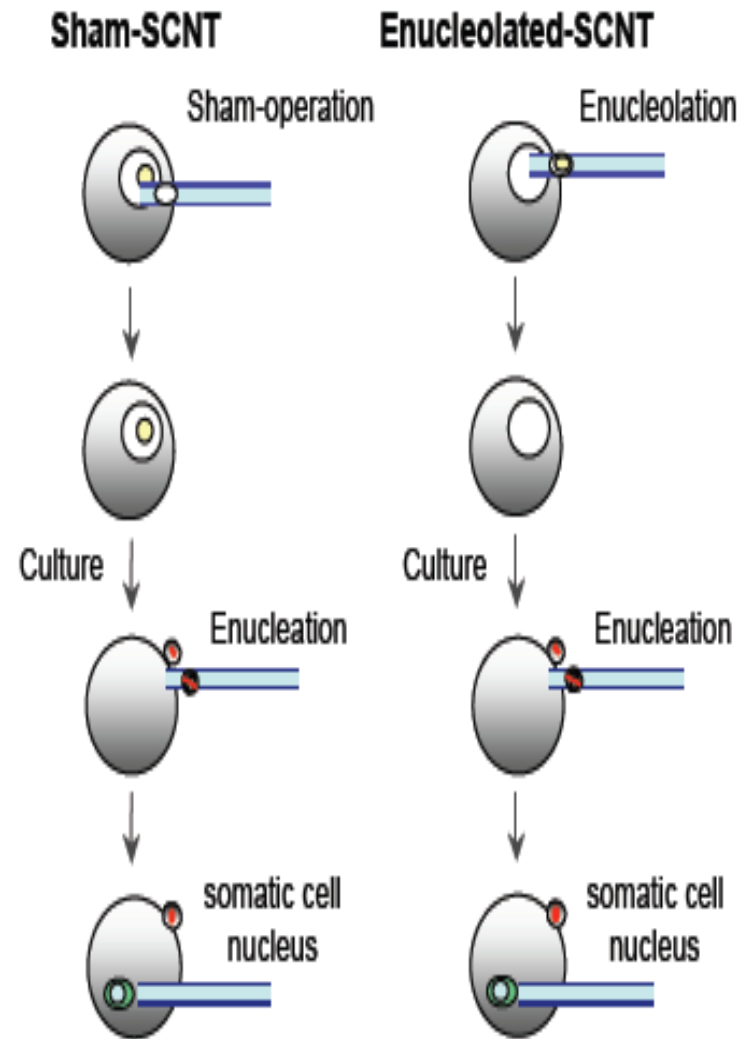
Efekty przeniesienia 2-komórkowego zarodka pochodzącego z grupy kontrolnej, oocyty bezjąderkowego i oocyty z reiniekcją jąderka

type of mouse oocytes	Sham	Enucleolated	Nucleolus reinjected
total no. of embryos transferred (recipients)	72 (4)	45 (3)	133 (7)
total no. of pregnant recipients	2	0	5
pups	6	0	17

Czy somatyczne jąderko może zastąpić jąderko oocytarne?

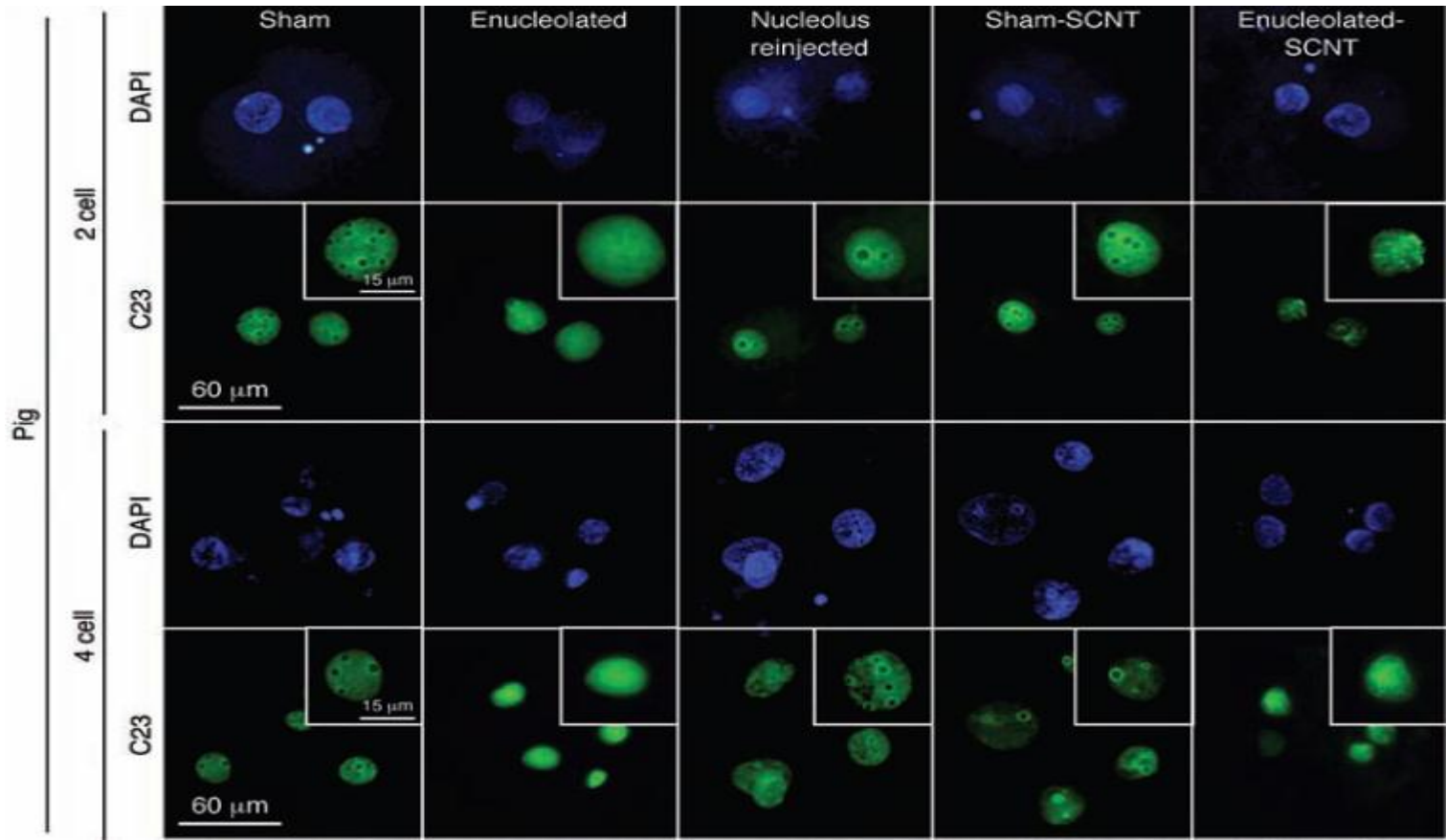
Sprawdzenie metodą transferu jądra somatycznego (SCNT)

- 1) Oocyt w GV pozbawiamy jąderka
- 2) Oocyt wyrzuca I ciałko komórkowe → pobieramy chromosomy
- 3) Do bezjądrowego i pozbawionego składników jąderkowych oocytu wstrzykujemy jądro somatyczne (posiadające jąderko)

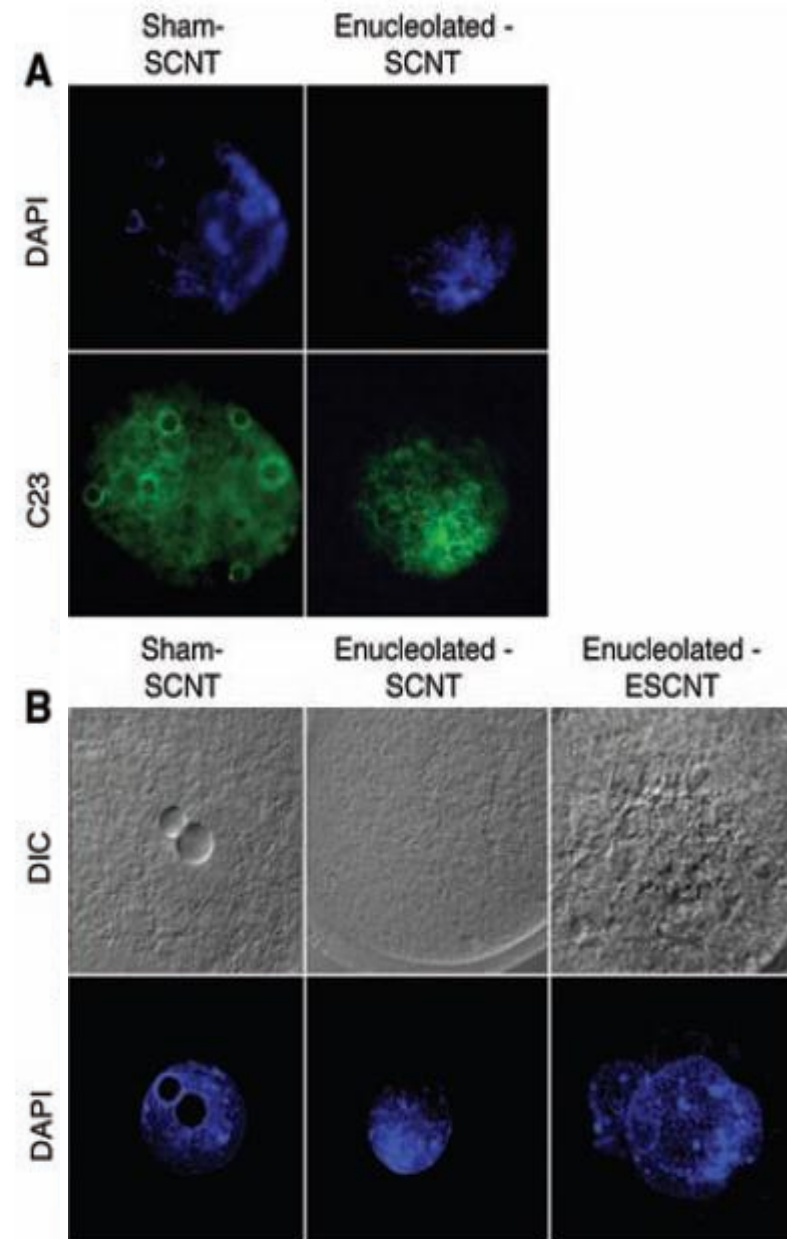


SCNT

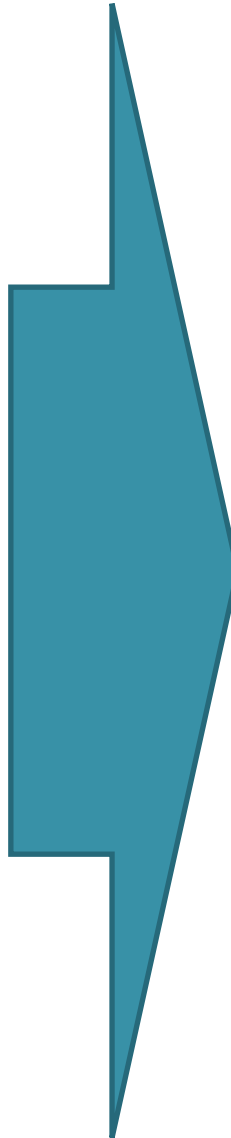
Początkowe stadia rozwoju zarodka są identyczne w grupie kontrolnej i bezjąderkowej SCNT. Zarodki SCNT na tym etapie (2-4 komórkowym) były nadal żywotne i syntetyzowały białka na poziomie zbliżonym do kontrolnego ale nie wykształciły jąderek



- Usunięcie jąderka w GV powoduje pozbawienie potencjalnej zygoty całego oryginalnego materiału jąderkowego.
- Jądro somatyczne posiada jąderko które jednak nie jest w stanie zastąpić jąderka oocytarnego podczas rozwoju zarodkowego.
- Grupa kontrolna posiadała wykrywalne jąderko
- Zarodkowe komórki macierzyste także nie posiadają zdolności odbudowy jąderka



- ❖ Cytoplast z oocyty w metafazie II i zygoty w fazie M powoduje wspomaganie rozwój zarodka SCNT
- ❖ Cytoplast zygoty w interfazie jest niezdolna do takiego oddziaływania na SCNT
- ❖ Cytoplast zygoty w interfazie zawierająca jąderko (chromatyna i błona jądrowa usunięte, jąderko pozostawione) wspomaga rozwój SCNT



To sugeruje występowanie nieznanego czynnika lub składnika w przedjądrzach zygoty biorących udział w przeprogramowaniu jądra somatycznego

Konsekwencje tworzenia cytoplastu

- Usunięcie jądra w interfazie powoduje że razem z chromatyną komórka traci także całe jąderko (zygota interfazowa)
- Usunięcie jądra w fazie M gdy chromatyna tworzy chromosomy powoduje że komórka traci wyłącznie DNA chromosomalne a niektóre składniki jąderka są rozproszone w cytoplazmie i pozostają w cytoplaście (zygota w M i oocyt w metafazie II)

Czy samo jąderko jest wystarczającym czynnikiem do reprogramowania jądra somatycznego? [mysz]

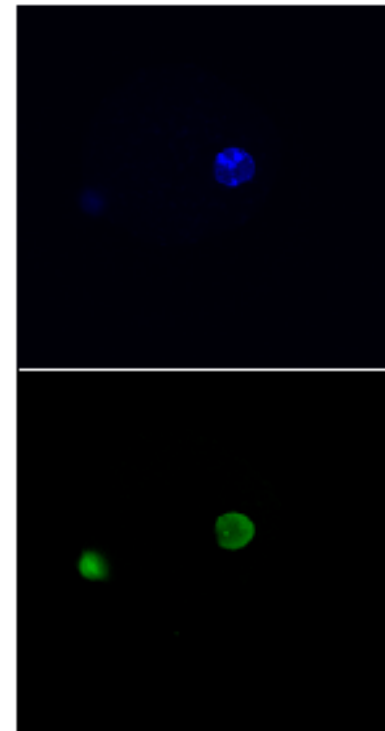


I) Zygota –SCNT → do cytoplastu z zygoty w interfazie przeniesione zostało jądro somatyczne (k. folikularnej) = brak rozwoju (zatrzymanie na etapie 2-komórkowym lub fragmentacja) i brak widocznych jąderek w blastomerach

Zygote-SCNT

DAPI

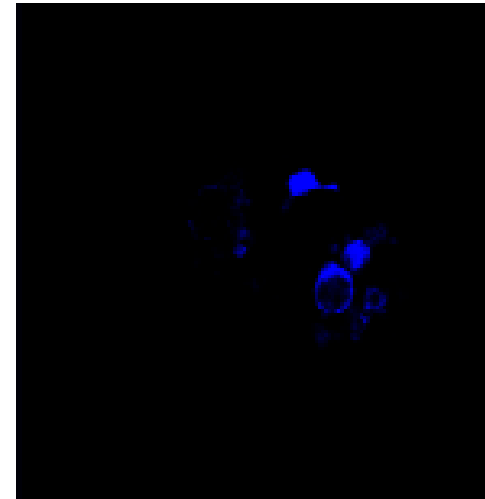
B23



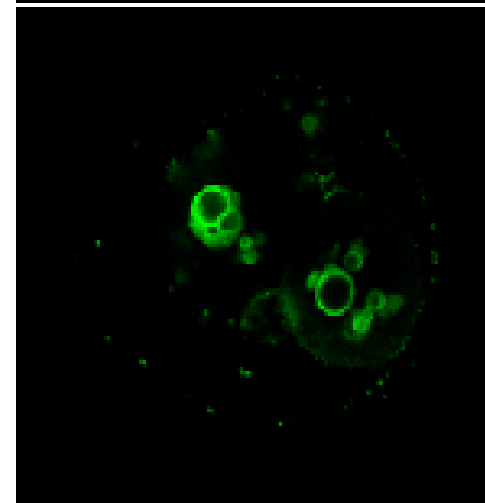
2) Zygota–SCNT+oocytarne jąderko → do cytoplastu z zygoty interfazowej przeniesione jądro somatyczne oraz jąderko z oocytu = zahamowanie rozwoju na stadium 2-komórkowym ale z uformowaniem widocznych jąderek w blastomerach

Zygote-
SCNT+Nucleolus

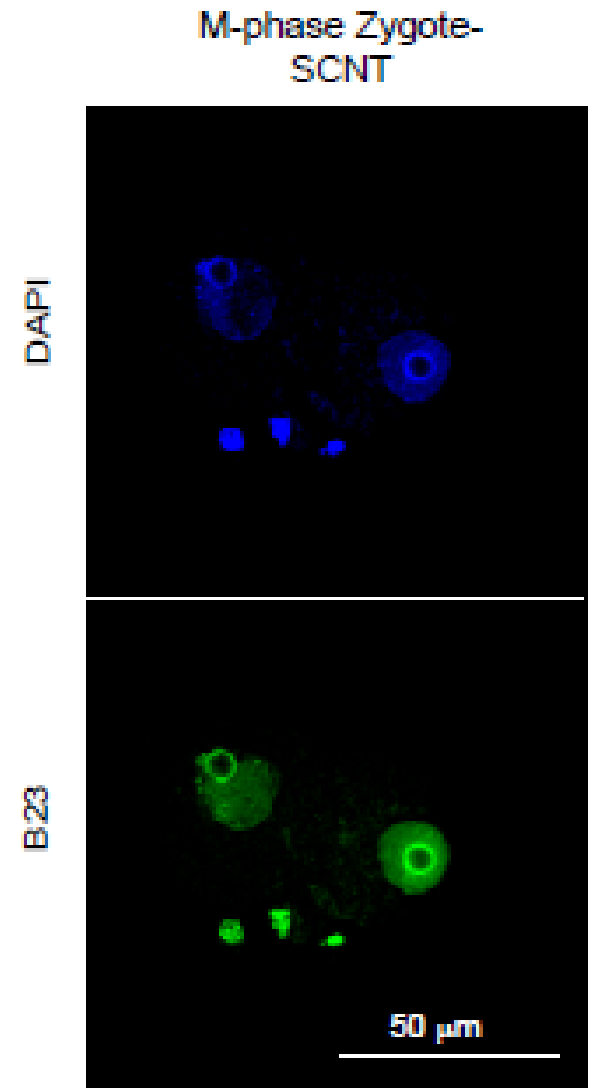
DAPI



B-23



3) Zygota w M fazie-
SCNT → do cytoplastu z
zygoty w fazie M
przeniesione jądro
somatyczne = rozwój do
blastocysty i widoczne
jąderka w blastomerach




Samo oocytarne jąderko nie jest w stanie przeprogramować jądra somatycznego, poza jąderkiem konieczne są dodatkowe komponenty jądrowe.

type of mouse zygotes	Zygote SCNT	Zygote SCNT+Nucleolus	M-phase Zygote SCNT
total no. of zygotes examined	70	92	37
total no. (%) of zygotes cleaved	32 (46)	28 (30)	22 (59)
total no. (%) of zygotes forming blastocysts	0 (0)	0 (0)	18 (49)

WYNIKI

- 1) Jąderko w ssaczej zygotie jest pochodzenia wyłącznie oocytarnego
- 2) Jąderko nie jest konieczne do dojrzewania oocyty
- 3) Jąderko jest niezbędne do prawidłowego rozwoju zarodka
- 4) Po przeniesieniu jądra somatycznego lub ES do cytoplasmu oocytarnego (metafaza II) źródłem uformowanego jąderka są matczyne składniki rozproszone w cytoplazmie

- 
- 5) Substancje zlokalizowane początkowo w pęcherzyku zarodkowym a następnie przedjądrzach które są odpowiedzialna za reprogramowanie jądra somatycznego po SCNT nie są jeszcze poznane
 - 7) Jednym z czynników reprogramujących jest jąderko pochodzące z oocytu
 - 8) Jąderko oocytarne dostarcza substancji do budowy jąderek nie tylko w przedjądrzach ale również pseudo – przedjądrzy po SCNT



Dziękuję za uwagę