

# Birth of parthenogenetic mice that can develop to adulthood

Kono et al.

Nature, 2004

Aleksandra Respondek  
Listopad 2011

**Partenogeneza** – odmiana rozmnażania, polegająca na rozwoju osobników potomnych z komórki jajowej bez udziału plemnika

Naturalnie:

- wrotki
- nicienie
- skorupiaki
- roztocza
- owady (pszczoły, osy, chruściki)
- ryby (rekin młot), płazy, gady (waran, gekon)


Sztucznie:

- żaby
- ryby
- króliki
- i...



MYSZY! O czym traktuje niniejsza prezentacja

# Kilka istotnych faktów:

- zarodki myszy stworzone partenogenetycznie umierają ok. 10 dnia po zapłodnieniu
  - do rozwoju zarodka niezbędne są odmatczyne oraz ojcowskie modyfikacje epigenetyczne genomu zarodka podczas gametogenezy
  - „genomic imprinting” prowadzi do nierównocennej ekspresji genów z alleli matczynych i ojcowskich w zarodku
  - do czasu tej publikacji nie udowodniono, że imprinting jest jedyną przeszkodą dla prawidłowego rozwoju partenogenetycznego
- 

# Genomic imprinting

- polega na różnym stopniu metylacji genów w komórkach jajowych i plemnikach (w procesie gametogenezy)
- gen jest metylowany w allelu pochodzącym od jednego z rodziców
- znoszony jest rodzicielski wzór metylacji i nakładany nowy, zależny od płci
- metylacja uniemożliwia przyłączenie TF do promotora/enhancera  
→ wyciszenie genu
- imprinting jest wynikiem konkurencji materiału genetycznego żeńskiego (przekazywanie genów, wychowanie potomstwa) i męskiego (odżywianie i rozwój zarodka)

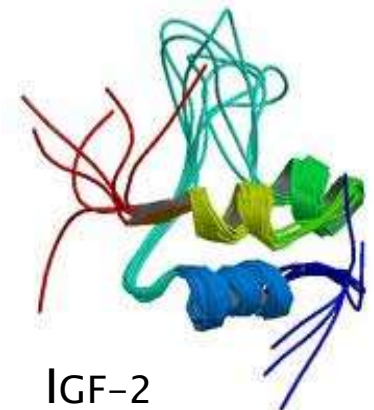
# Przykłady

**H19** – gen długiego niekodującego RNA, wydaje się odgrywać znaczącą rolę w procesie kancerogenezy. Odojcowska kopia genu jest wyciszana.

**Igf-2** – insulinopodobny czynnik wzrostu 2, białkowy hormon o strukturze podobnej do insuliny. Główny regulator rozwoju zarodkowego. Odmatczyna kopia genu jest wyciszana.

Ekspresja H19 oraz Igf-2 jest koordynowana przez elementy cis-regulatorowe, których działanie zależy od:

- statusu metylacji w DMR genu H19
- endodermalnie-specyficznych enhancerów



# Genomic imprinting

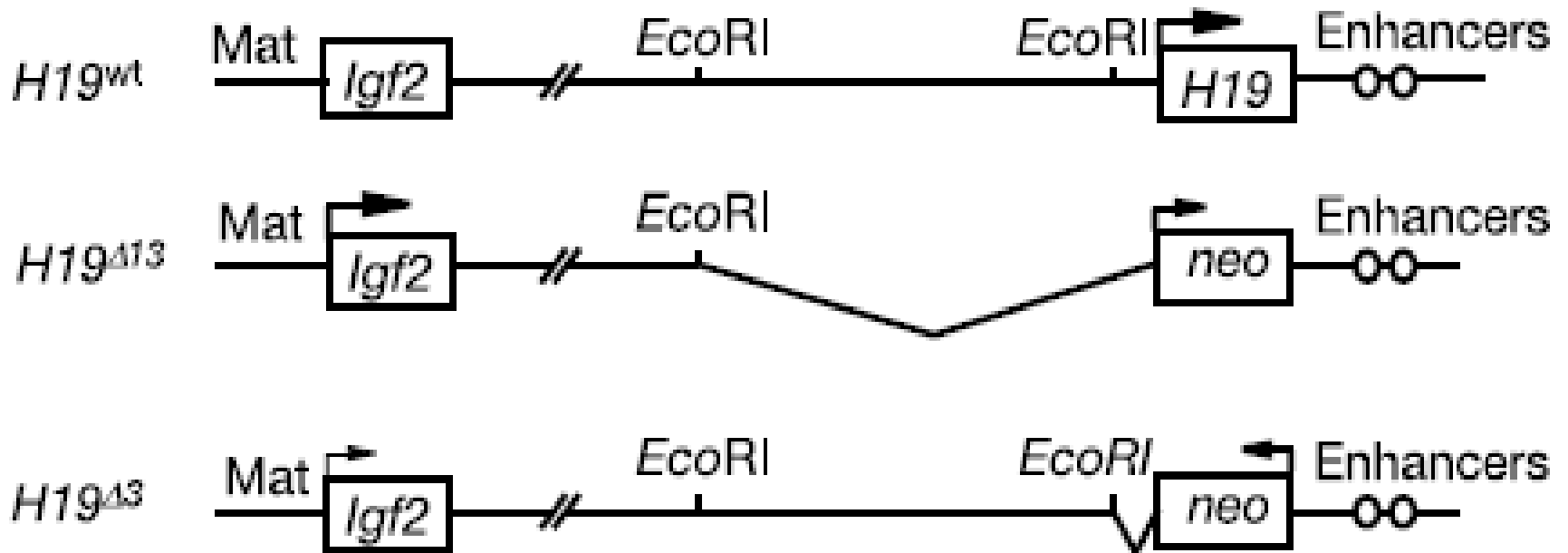
Odmatczyna metylacja *de novo* zachodzi w „naznaczonych” *loci* podczas wzrostu oocytów żeńskich zarodków; oocyty nowonarodzonych samic są „naiwne” i podatne na manipulacje genetyczne

- **ng** – non-growing – naiwny oocyt z nowonarodzonej samicy
- **fg** – fully grown – oocyt dojrzałej płciowo samicy

Zarodek ngwt/fgwt z niezmienionymi kopiami genów H19 i Igf-2 – obumiera w 13.5 dniu rozwoju

Zarodek ngH19 $\Delta$ 3/fgwt obumiera w 17.5 dniu rozwoju (z 3 kb delecją w jednostce transkrypcyjnej)

i



Pokazane są allele odmatczyne.

Fragment -10 do -50 kb (pomiędzy miejscami cięcia EcoRI) zawiera DMR



# Materiały i metody

I. Stworzenie mutantów H19 $\Delta$ 13 (z 13 kb delecją w jednostce transkrypcyjnej)

1. Iniekcja celowanych komórek CCE ES do blastocyst szczepu A
2. Wsteczne skrzyżowanie ♂ mutantu (B) z ♀ szczepu A

II. Pobranie oocytów **ng** zablokowanych w fazie MI, ♀ 1-dniowe

III. ♀ szczepu B6D2F1

1. eCG → śmierć → izolacja oocytów GV (**fg**) jajnikowych w fazie MII (48h)
2. hCG → śmierć → izolacja owulowanych oocytów w fazie MII (**fg**) (16h)

Manipulacje wykonywane w pożywce z 200  $\mu$ M dbcAMP (utrzymuje blok meiotyczny w diplotenie) i 5% surowicą cielęcą

# Materiały i metody

IV. Transfer jądra 1n oocyty ng (H19 $\Delta$ 13) do 1n oocyty fg (wt) (GV/MII)

V. Fuzja oocytów GV (H19 $\Delta$ 13/wt) z pozbawionymi jądra oocytami GV wywołana przez inaktywowany wirus Sandai

VI. Hodowla w pożywce MEM – 14h

VII. Ponowny transfer jądra 2n do pozbawionych jądra oocytów MII

VIII. Sztuczna aktywacja oocytów 10mM chlorkiem strontu w pożywce M16 pozbawionej jonów wapnia – 2h


# Materiały i metody

IX. Hodowla zarodków w pożywce M16, w atm. 5% dwutlenku węgla, 5% tlenu i 90% azotu, w temp. 37 st C.

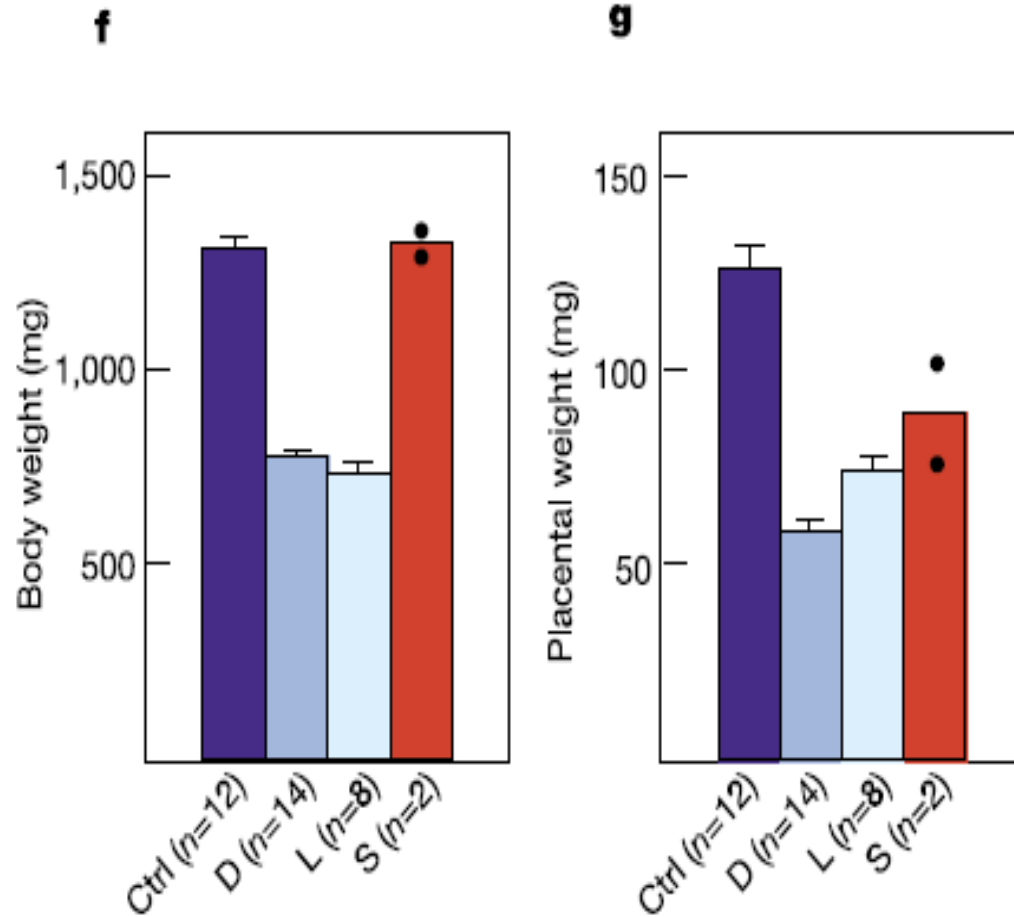
X. Otrzymane blastocysty przeniesione do macic samic, u których wcześniej wywołano rzekomą ciążę

XI. Rozwój postimplantacyjny oceniono przez wykonanie sekcji 19.5 dnia ciąży

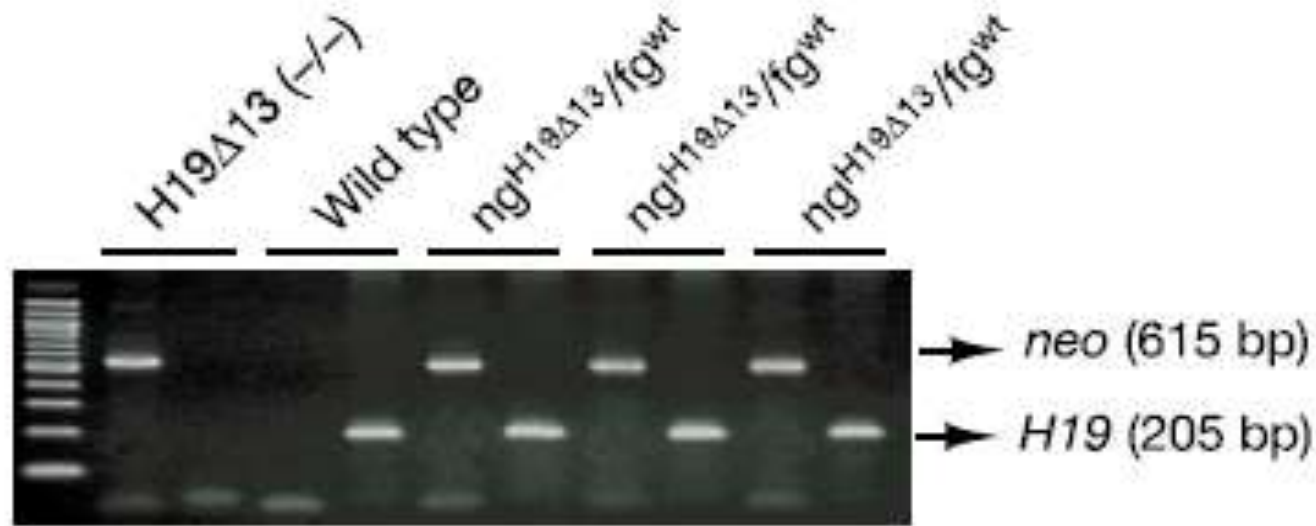
# ngH19 $\Delta$ 13/fgwt – Wyniki

- oocyty ekspresują Igf-2 z zestawu chromosomów oocytów ng
  - n=598
  - 457 (78%) utworzyło diploidalną komórkę, która uformowała dwa ciała kierunkowe i przedjądrza
  - 371 (91%) rozwinęło się do stadium moruli/blastuli
  - te przeniesiono do rogów macic 26 samic
  - 24 samice „zaszły w ciążę”
- 

# ngH19 $\Delta$ 13/fgwt – Wyniki



# ngH19 $\Delta$ 13 /fgwt – Wyniki



- PCR z użyciem primerów dla genu H19 oraz kasety neomycynowej ujawnił, że mysz była ngH19 $\Delta$ 13/fgwt

# ngH19 $\Delta$ 13/fgwt – Wyniki

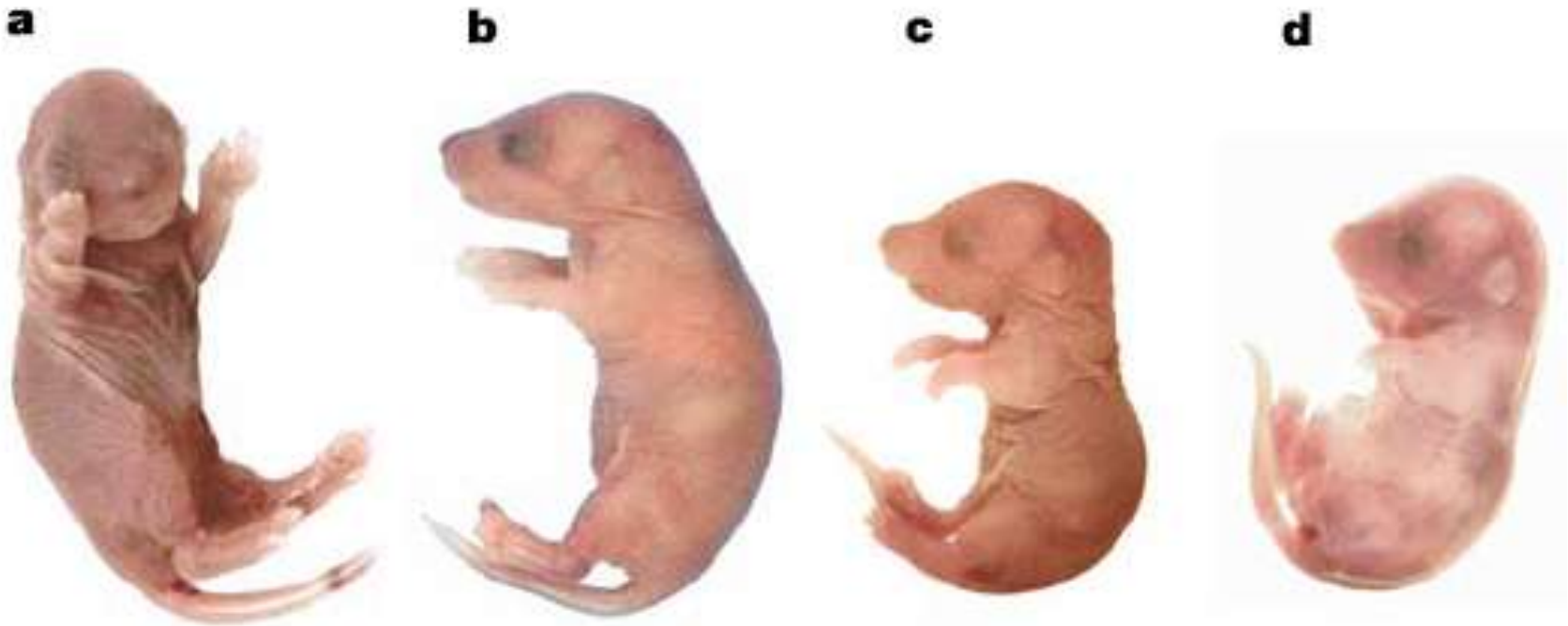
- Kaguya urosła, skrzyżowano ją z samcem i donosiła młode



# ngH19 $\Delta$ 13/fgwt – Wyniki

- druga mysz, która przeżyła, została wykorzystana do analiz ekspresji genów
- pozostałe myszy żywo-urodzone – opóźnione w rozwoju – nie żyły dłużej niż 15 min
  - niedorozwój wątroby
  - atrofia łożyska (vide: slajd nr 6: H19 – gen dla długiego niekodującego RNA, wydaje się odgrywać znaczącą rolę w procesie kancerogenezy. Odojcowska kopia genu jest wyciszana.)
- średnia masa ciała u żywo-urodzonych = 744 mg
- a u martwych = 786 mg (???)





a) i b) normalne fenotypowo myszy partenogenetyczne

a) to Kaguya


b) to mysz użyta do badania ekspresji genów

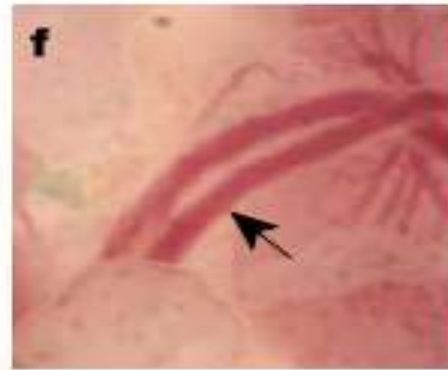
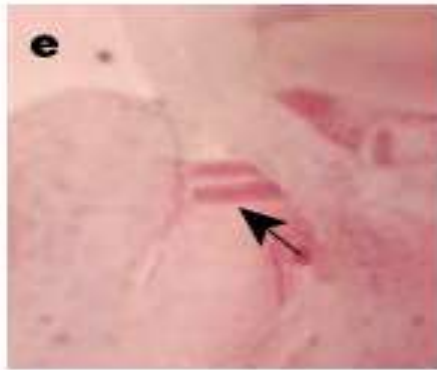
c) i d) myszy opóźnione w rozwoju

c) zdechła tuż po narodzinach

d) tuż przed narodzinami

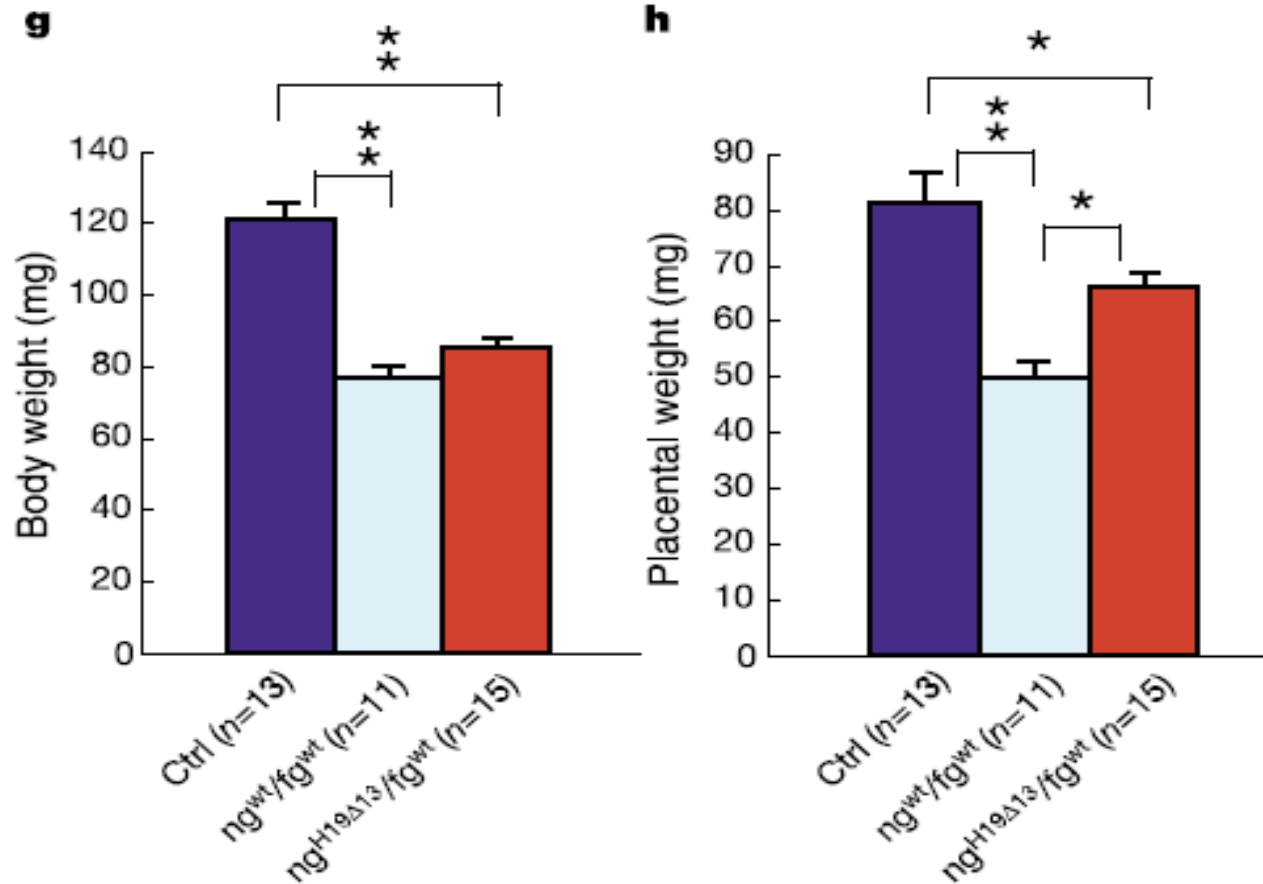
# Badanie ekspresji genów myszy ngH19 $\Delta$ 13/fgwt vs. ngwt/fgwt vs. wt

- użyto mikromacierzy K11 w 12.5 dniu ciąży
  - fenotypy myszy partenogenetycznych nieodbiegające od myszy wt
  - mniejsze masy płodów i łożysk u myszy partenogenetycznych, niż wt
  - pępowina niezmienną u myszy ngH19 $\Delta$ 13/fgwt, mierna u ngwt/fgwt
  - profile genetyczne myszy partenogenetycznych znacznie różniły się od siebie
  - klastryzację przeprowadzono za pomocą programów Cluster i TreeView
  - poziom istotności  $P < 0.001$  dla 1038 genów (testy jednowartościowe)
- 



- a) wt
- b) *ngwt/fgw*
- c) *ngH19 $\Delta$ 13/fgwt*

↑ słabo!!



**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<sup>wt</sup>/fg<sup>wt</sup> parthenogenetic embryos; **c, f**, ng<sup>H19Δ13</sup>/fg<sup>wt</sup> parthenogenetic embryos. Note that the umbilical cord (indicated by arrows) was well developed in the ng<sup>H19Δ13</sup>/fg<sup>wt</sup> fetus (**f**) but was very poor in the ng<sup>wt</sup>/fg<sup>wt</sup> parthenote. **g, h**, Graphical representations of body (**g**) and placental (**h**) weights. Values are means ± s.e.m. Significant differences at \*  $P < 0.05$  and \*\*  $P < 0.01$ .

# Badanie ekspresji genów myszy ngH19 $\Delta$ 13/fgwt vs. ngwt/fgwt vs. wt

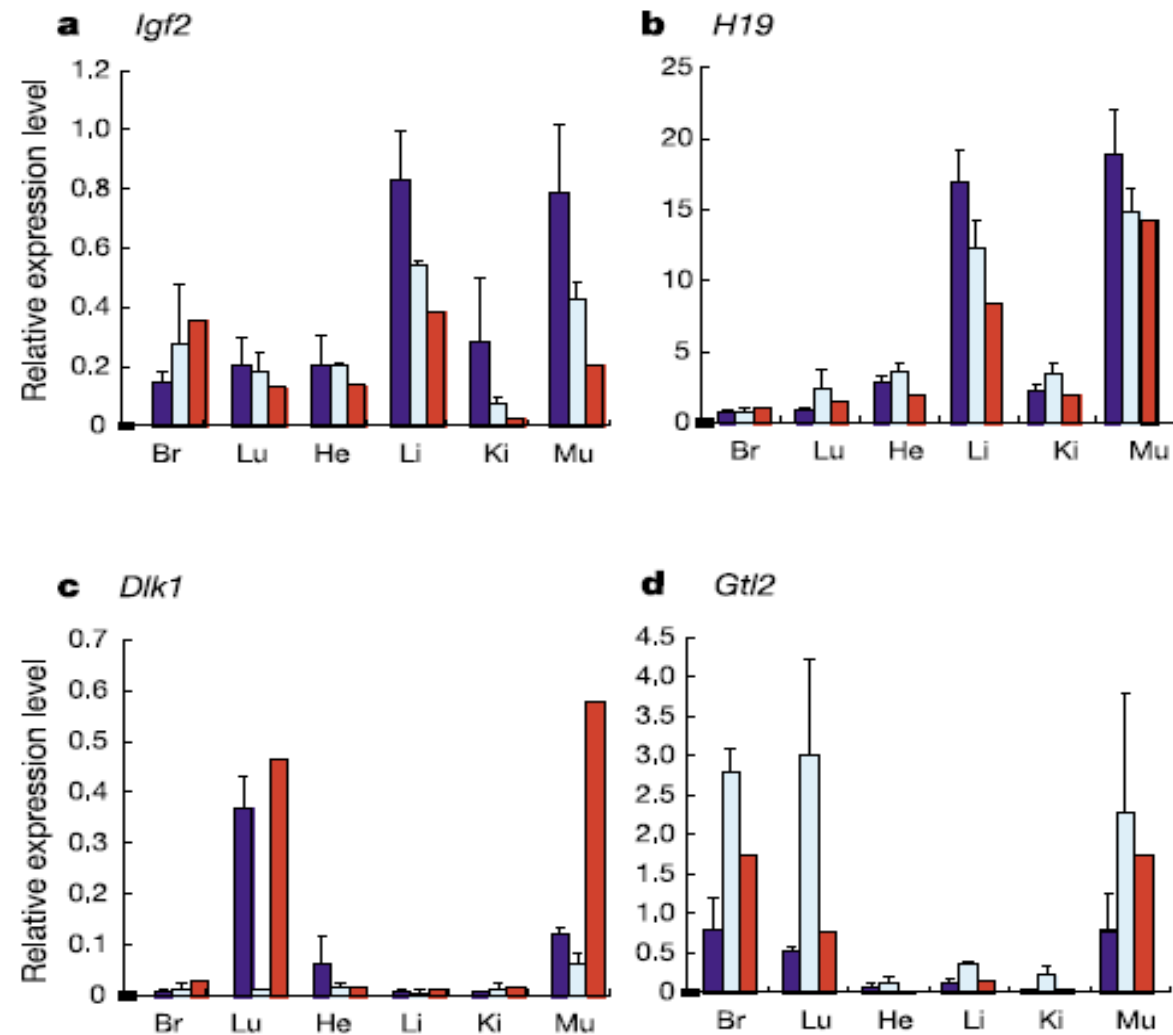
- regulacja zaszła we wszystkich genach podlegających imprintingowi
- jedynie 2/34 geny: Grb10 i Nnat były 2x silniej lub 2x słabiej regulowane (por. wt)
- 11/34 genów za słabo regulowane
- 1/34 (Grb10) za silnie regulowany w ngwt/fgwt
- liczba genów które były 2x za silnie ekspymowane (por. wt) to 11 do 42 (śr.30) u ngH19 $\Delta$ 13/fgwt
- dla kontrastu: liczba genów ekspymowanych znacząco inaczej u ngwt/fgwt to 431 do 1324 (śr. 842), ALE...

# Badanie ekspresji genów myszy ngH19 $\Delta$ 13/fgwt vs. ngwt/fgwt vs. wt

- wśród nich tylko gen Dlk1 wykazał zmiany w ekspresji u wszystkich 4 osobników ngH19 $\Delta$ 13/fgwt
- zidentyfikowano 329 tych samych genów o zróżnicowanej ekspresji u myszy ngwt/fgwt
- w porównaniu ngH19 $\Delta$ 13/fgwt do ngwt/fgwt:
  - 131 do 295 (śr. 208) genów wykazało ekspresję większą niż dwukrotna

# Badanie ekspresji genów myszy ngH19 $\Delta$ 13/fgwt vs. ngwt/fgwt vs. wt

- Dlk Gtl2 – mutacje letalne dla płodu, podlegają imprintingowi w czasie spermatogenezy
- RT-PCR pokazał że oba geny: IGF2 i H19 są ekspresowane na podobnym poziomie w głównych organach → wynik spodziewany
- Gen Gtl2 zarodków ngH19 $\Delta$ 13/fgwt opóźnionych w rozwoju ekspresowany na poziomie 2 – 4 x niższym (por. wt)
- Gen Dlk1 ekspresowany w komórkach płuc, mięśni i serca u myszy wt, u ngH19 $\Delta$ 13/fgwt tylko w płucach i mięśniach
- Wyniki potwierdzone hybrydyzacją *in situ* w 12.5 dniu ciąży
- Spadek ekspresji Gtl2 i aktywacja Dlk1 jako przyczyna normalnego rozwoju partenogenetycznych myszy?



ciemnoniebieski – kontrola,  
n=3

biały lub błękitny, jak kto woli  
– ngH19 $\Delta$ 13/fgwt, opóźnione  
w rozwoju, n=3

Czerwony – ngH19 $\Delta$ 13/fgwt,  
przeżyła, n=1

**Figure 3** Graphical representations of the expression of the two sets of coordinate imprinted genes in parthenogenetic fetuses. The expressions of four imprinted genes, **a**, *Igf2*; **b**, *H19*; **c**, *Dlk1*; and **d**, *Gtl2* in six different tissues of 19.5-day ng<sup>H19 $\Delta$ 13</sup>/fg<sup>wt</sup> fetuses were analysed by quantitative real-time PCR. Br, brain; Lu, lung; He, heart; Li, liver; Ki, kidney; Mu, muscle. The values represent the levels of expression relative to that of the internal control gene (*Gapdh*). Control ( $n = 3$ ; dark blue); growth-retarded ng<sup>H19 $\Delta$ 13</sup>/fg<sup>wt</sup> parthenogenetic pups ( $n = 3$ ; light blue); and survived ng<sup>H19 $\Delta$ 13</sup>/fg<sup>wt</sup> parthenogenetic pup ( $n = 1$ ; red). Values are means  $\pm$  s.e.m.



# Wnioski

- myszy partenogenetyczne są (przynajmniej ta jedna była) i mogą wydawać potomstwo
- mysz tę wyhodowano dzięki zwiększeniu aktywności Igf2 i monoallelicznej ekspresji genu H19
- ale w naturze odcjowski imprinting zapobiega partenogenezie, co zapewne ojcu swój udział w rozwoju potomstwa
- ekspresja genu Igf2 prowadzi do dalszego rozwoju osobników stworzonych na drodze partenogenezy
- zarodki partenogenetyczne ngH19 $\Delta$ 3/fgwt nie żyją dłużej niż do 17 dnia ciąży
- ale zarodki ngH19 $\Delta$ 13/fgwt już tak
- regulacja genów w mutantach ngH19 $\Delta$ 13/fgwt i zbliżony do naturalnego profil ekspresji w tkankach pozwala im dotrzeć do dalszych stadiów rozwoju niż myszom ngwt/fgwt



Dziękuję