

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

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

Partenogeneza-dzieworództwo, to sposób rozmnażania polegający na rozwoju z osobników potomnych z niezaplodnionej komórki jajowej.



Waran z Komodo (*Varanus komodoensis*)



Opuchlak z rodziny ryjkowcowatych



Tityus serrulatus

C-mos:

- protoonkogen
- koduje cytoplazmatyczną kinazę serynowo-treoninową- białko pp39^{mos}

Myszy:

- bierze udział w dojrzewaniu meiotycznym podczas spermatogenezy i oogenezy

*Płazy z rodzaju **Xenopus:***

- ekspresja pp39^{mos} powoduje meiotyczne dojrzewanie oocytów i zatrzymanie bruzdkowania blastomerów.

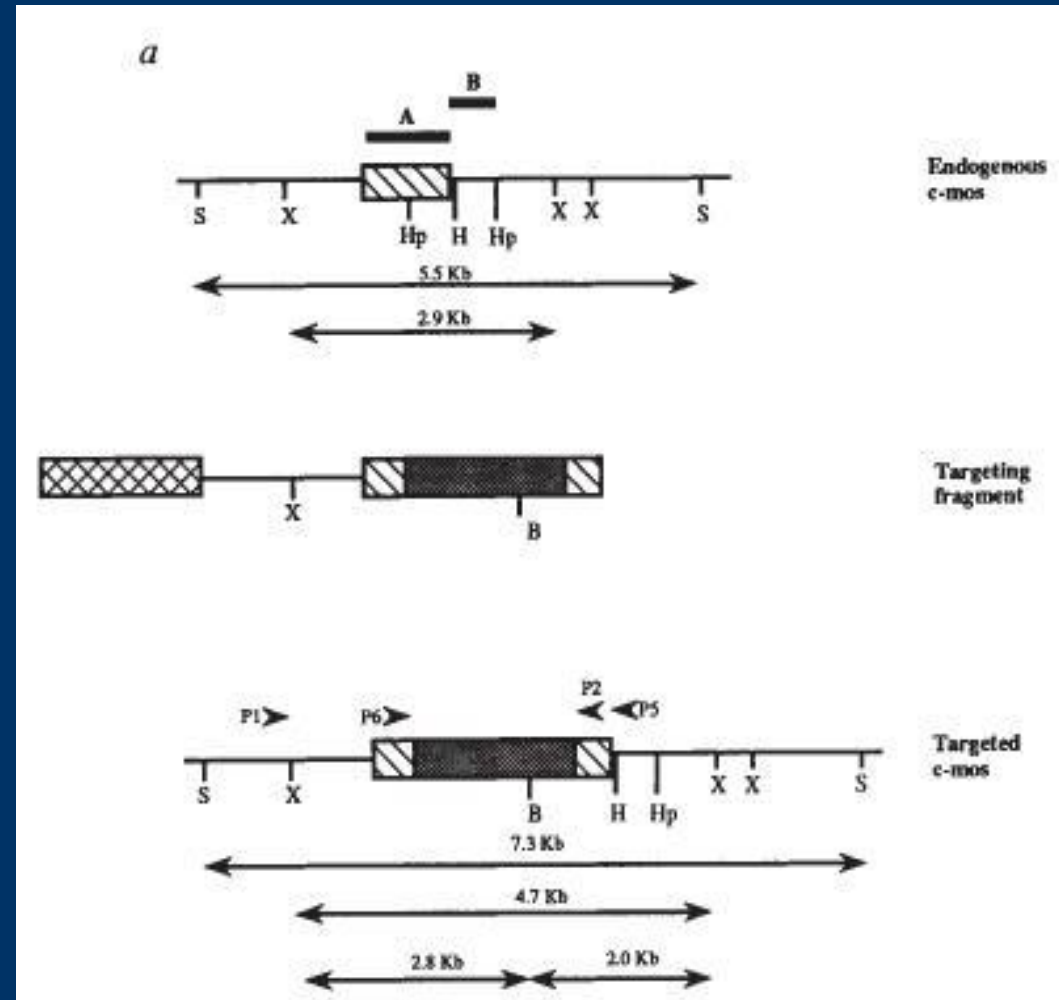


Stworzono homozygotyczne myszy pozbawione funkcjonalnej kopii genu *c-mos*



Jak otrzymano mutanty *c-mos*^{-/-} ?

- Wektor pMS1 zawiera gen *neo^r* wprowadzony do środka pojedynczego eksonu kodującego *c-mos*. Powoduje to wstawienie kodonu UAG do ramki odczytu i tym samym uniemożliwia translację sekwencji kluczowych dla aktywności kinazy pp39^{mos}



Jak otrzymano mutanty c-mos ^{-/-} ?

- Metodą elektroporacji wprowadzono wektor pMS1(neo)tk do zarodkowych komórek macierzystych (CCE)
 - Klony odporne na G418 (antybiotyk na genetycyne) i na gangcyclowir (lek wiriostatyczny) badano na obecność wstawki pMS1(neo)tk
 - Potwierdzono wbudowanie wstawki metodą Southern blot i analizy restrykcyjnej.
-
-

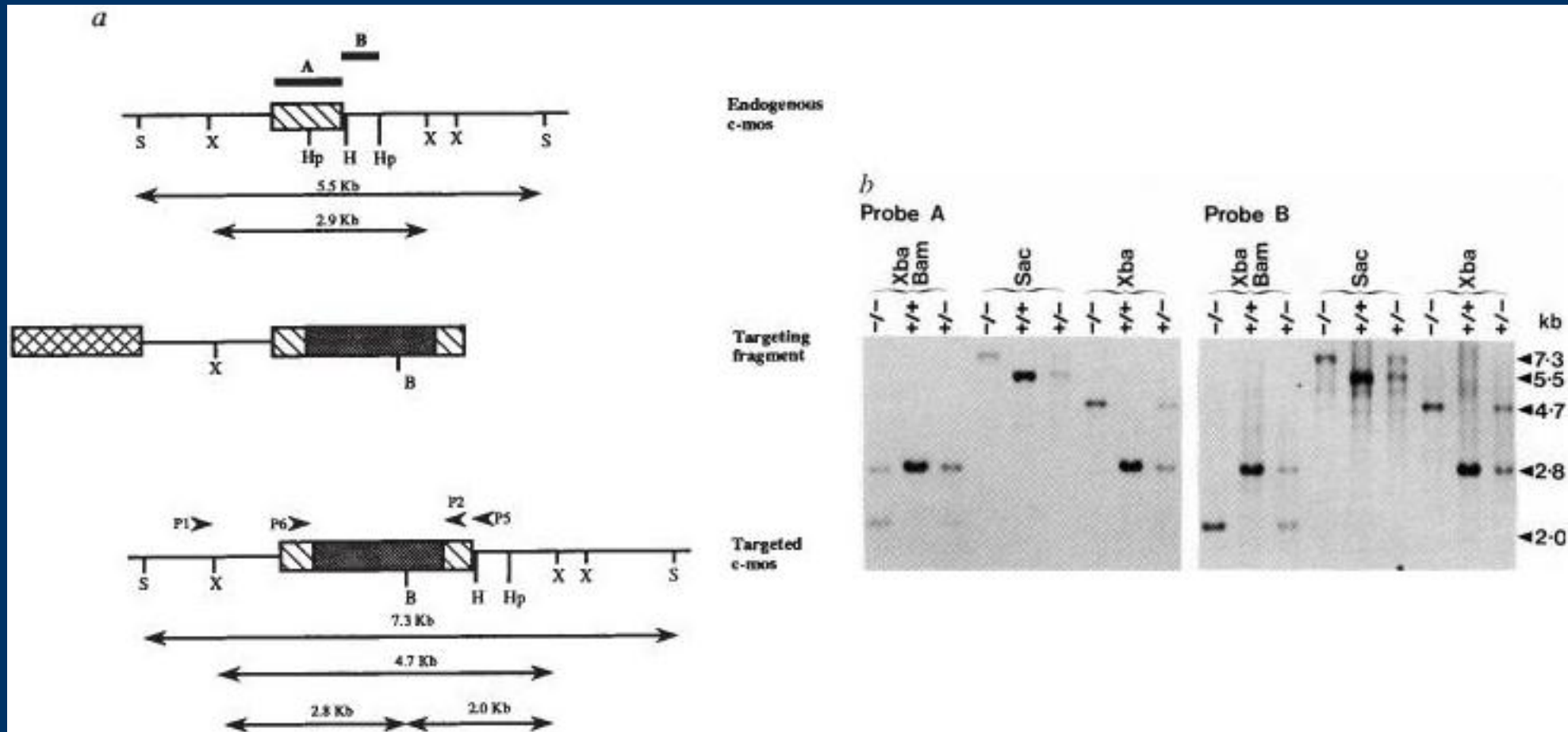


FIG. 1. Targeted disruption of the murine *c-mos* gene. **a**, Targeting vector and recombination at the *c-mos* locus. The *c-mos* 1-kb coding exon is shown hatched, the *neo^r* cassette stippled and the herpes simplex virus (HSV) thymidine kinase gene cross hatched. Bars marked A and B show the location 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).

Skrzyżowano heterozygotyczne myszy $mos^{+/-}$ w celu otrzymania homozygot $mos^{-/-}$

Stwierdzono że homozygoty rodzą się z przewidywaną częstością.

Gen c-mos nie jest konieczny w czasie rozwoju rozwoju embrionalnego.

PCR i Southern blot nie wykazały obecności dzikiego eksonu c-mos u myszy $mos^{-/-}$

Northern blot- brak normalnego sygnału hybrydyzacji RNA pochodzącego z $mos^{-/-}$ z fragmentami eksonu c-mos z myszy $mos^{+/+}$

Skutek: rozbitcie genu c-mos powoduje zakłócenia w transkrypcji lub destabilizuje transkrypt.

Płodność myszy $c\text{-mos}^{-/-}$

Samce $\text{mos}^{-/-}$ -podobna ilość potomstwa jak $\text{mos}^{+/+}$ lub $\text{mos}^{+/-}$. Brak statystycznych różnic w morfologii jąder i obecności dojrzałego nasienia.
Gen $c\text{-mos}$ nie jest konieczny w procesie spermatogenezy.

Samice $\text{mos}^{-/-}$ -mają obniżoną płodność. Statystycznie posiadają mniej potomstwa ($P < 0.005$) .

Np. Myszy $\text{mos}^{-/-}$ 7 par \rightarrow 12 potomstwa

Myszy $\text{mos}^{+/+}$ i $\text{mos}^{+/-}$ 12 par \rightarrow 85 potomstwa

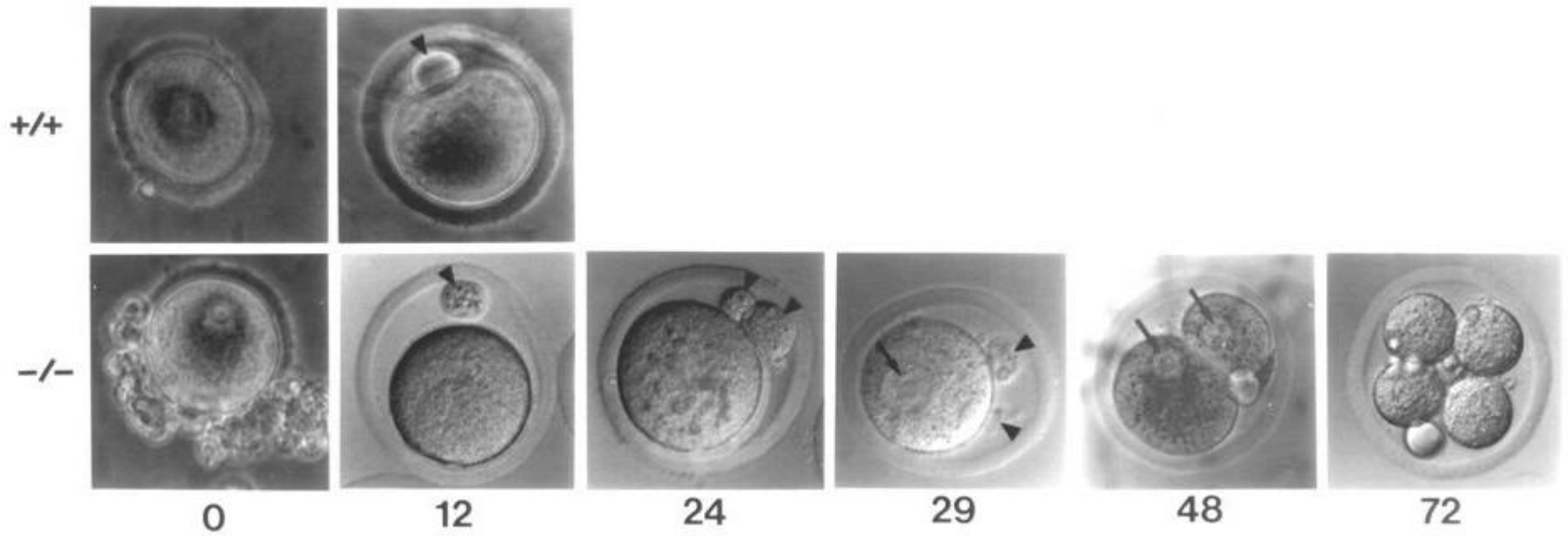
Brak białka powoduje niezahamowanie mejozy w procesie oogenezy

Izolowano oocyty z pęcherzyków Graffa, które dojrzewały in vitro-zarówno u mutantów jak i wild type (wt) doszło do rozpadu pęcherzyka zarodkowego i wyrzucenia I ciała kierunkowego

Wt pp39mos nie jest niezbędny do normalnego dojrzewania oocytów.

Oocyty myszy wt-blok metafazowy

Oocyty mysz mos^{-/-} nie wchodziły w blok metafazowy tylko wyrzucały drugie ciało kierunkowe



Partenogentyczna aktywacja oocytów $mos^{-/-}$

Xenopus:

-gromadzenie pp39^{mos} w czasie dojrzewania meiotycznego i jego szybka degradacja po zapłodnieniu

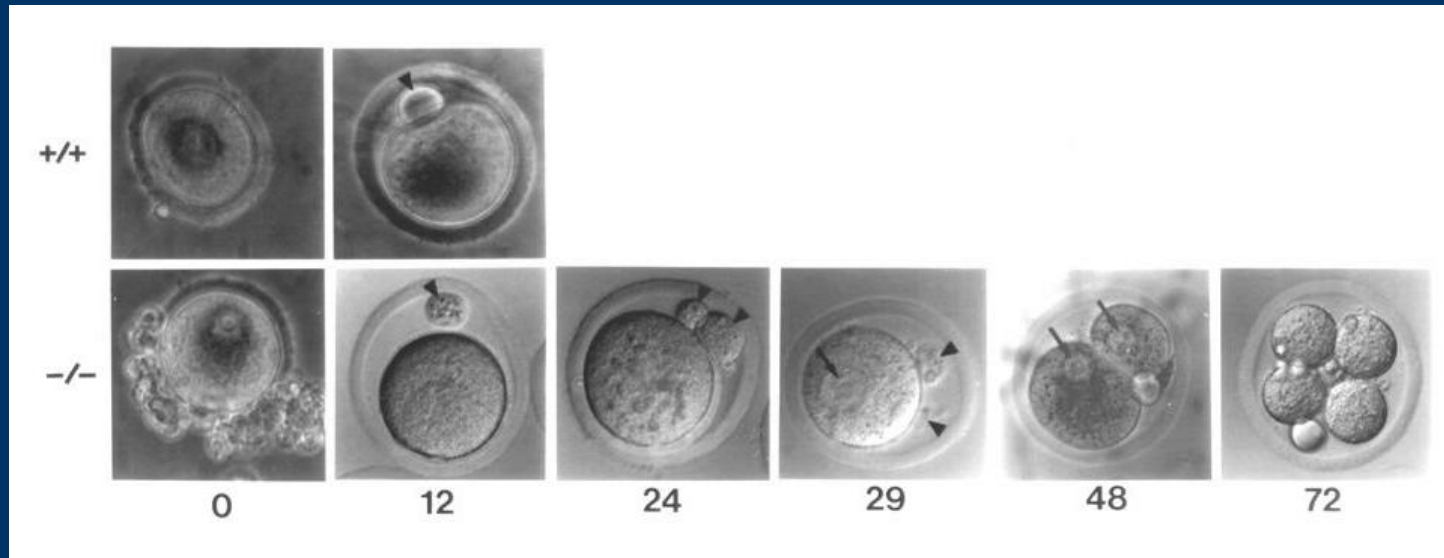
-mikroiniekcja syntetycznego mosRNA wstrzymuje podziały mitotycznie blastomerów.

-co sugeruje, że pp39^{mos} jest składnikiem czynnika cytotatycznego CSF, odpowiedzialnego za blok metafazowy II?

Biologiczna funkcja pp39^{mos}

Przeprowadzono superowulację 4 tygodniowych myszy-dziewic szukano oocytów które pominęły blok metafazowy.

- Izolacja oocytów z $mos^{-/-}$ po 18h po podaniu hCG
- $mos^{-/-}$ miały dwa ciała kierunkowe z DNA
- kontrola- jedno ciało kierunkowe



Dalsza hodowla:

-40% mutantów $mos^{-/-}$ miało przedjądrze, rozwój partenogentyczny

-30% z nich podzieliło się na dwie komórki, każda z nich zawierała jądro

-Czasami dzieliły się na cztery komórki

-Nie zaobserwowano rozwoju powyżej stadium czterech komórek.

-Dziki oocyty nigdy nie wyrzuciły drugiego ciała kierunkowego

Oocyty mos-/- które nie przeszły podziału komórkowego , często przechodziły cytoplazmatyczną fragmentację, co rzadko można było zaobserwować w oocytach wt.

Cytoplazmatyczną fragmentację można było zaobserwować po 32h po podaniu hCG.

U mutantów zaobserwowano partenogentyczną aktywację oocytów- **pp39^{mos} bierze udział w podtrzymaniu II bloku metafazy**

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.

Mała ilość potomstwa u myszy $mos^{-/-}$ pochodzi z komórek zapłodnionych tuż po dojrzewaniu i przed aktywacją partenogenetyczną co spowodowało niemożliwość zapłodnienia ich.



Brak funkcjonalnej kopii genu c-mos – aktywacja partenogenetyczna oocytów

Mikroiniekcja mosRNA lub ektopowa ekspresja c-mos – wstrzymanie podziałów mitotycznych komórek. Zatrzymanie niezapłodnionych jaj w metafazie II

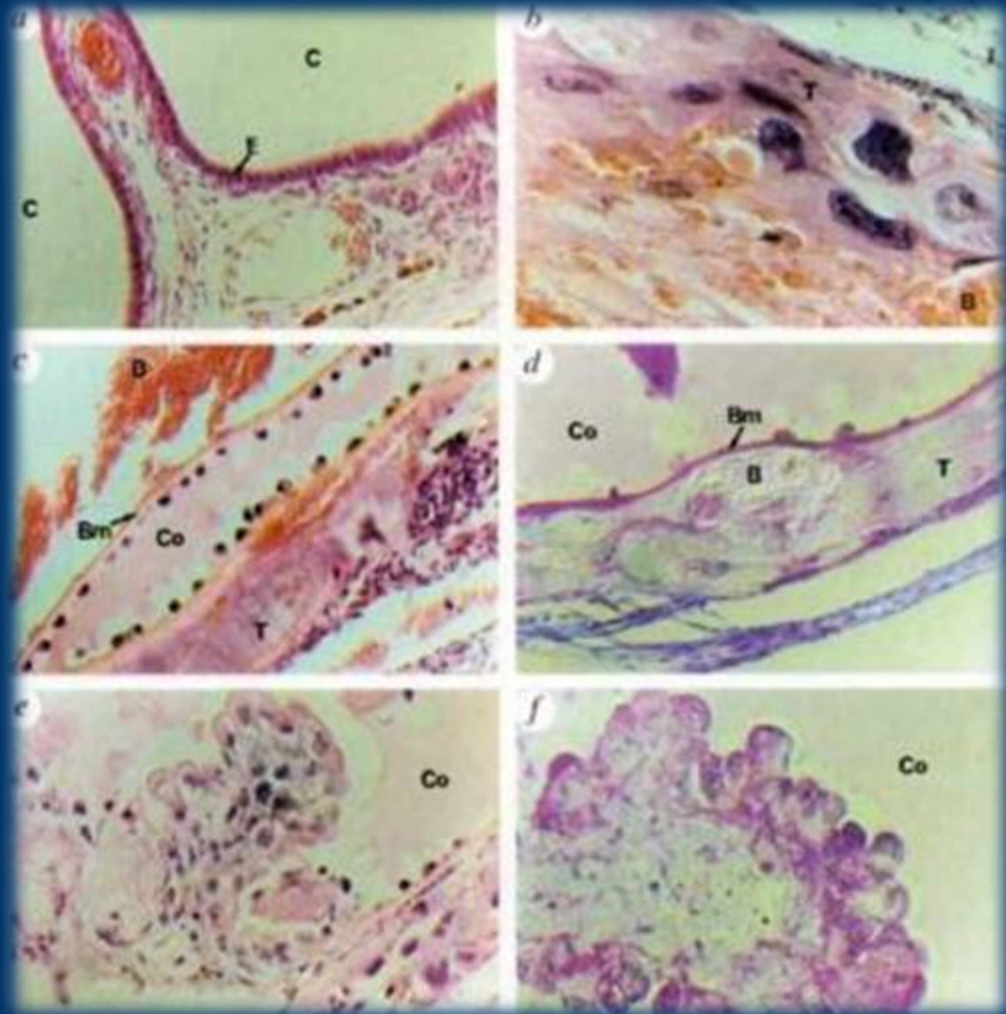
Mikroiniekcja anisensownego c-mos oligonucleotydów do dojrzewających oocytów – de kondensacja chromosomów i przekształcenie jądra po mejozie I.



POTWORNIAKI

10% oocytów myszy
LT/Sv przechodzi
spontaniczną aktywację
partenogentyczną

U tych myszy rozwijają się
potworniaki-nowotwory
rozzrastające i różnicujące
się w linie zawierające
cechy wszystkich listków
zarodkowych



Znaleziono cysty w jajnikach myszy $mos^{-/-}$ (5) jednak nigdy u $mos^{+/+}$ (19) i u $mos^{+/-}$ (10)

Cysty wystąpiły u myszy starszych niż sześć miesięcy (4/7), ale znaleziono małe cysty u osobników miesięcznych.

U 2/4 myszy cysty były przesączone krwią

Zaobserwowano dwa rodzaje cyst:

3/5 z tkanek nabłonka

2/5 z różnych tkanek co jest typowe dla potworniaków.

WNIOSKI

-pp39mos odpowiada za zatrzymanie oocytów w bloku metafozowym przed zapłodnieniem

-oocyty bez funkcjonalnego pp39^{mos} przechodzą spontaniczną aktywację partenogenetyczną → dokończenie podziału mejozy → wyrzucenie drugiego ciała kierunkowego → wytworzenie przedjądrza

-w mutantach zaobserwowano cysty na jajnikach - potworniaki - brak funkcjonalnej kopii genu c-mos

-główną rolą pp39mos -zapobieganie spontanicznej partenogenetycznej aktywacji niezapłodnionych jaj.

Dziękuję za uwagę

Monika Pióhun-Noyszewska
