



AKTIVÁCIA GENÓMU EMBRYÍ OŠÍPANEJ PO PRENOSE JADIER

Activation of embryonic genome in cloned porcine embryos

F. STREJČEK¹, B. BJERREGAARD³, O. ŠVARCOVÁ¹, I. PETROVIČOVÁ¹, H. NIEMANN²,
P. HYTTEL³, J. LAURINČÍK^{1,4}

¹Constantine the Philosopher University in Nitra, Slovak Republic; ²Institut für Tierzucht und Tierverhalten (FAL), Germany; ³The Royal Veterinary and Agricultural University, Denmark; ⁴Slovak Agricultural Research Centre Nitra, Slovak Republic

ABSTRACT

The rapid expansion of cloning technology has not been without problems, thus increasing the focus on embryo quality and viability. One factor that may deviate from the normal development of the embryo is the sequential activation of the embryonic genome, which is a crucial event in normal embryonic development. The initiation of ribosomal RNA (rRNA) synthesis, which is observed during the late half of the late 4-cell stage in porcine embryos developed *in vivo*, was studied in porcine embryos produced by nuclear transfer (NT). In the 143 NT embryos investigated, all 2-cell embryos and early 4-cell embryos were transcriptionally inactive as judged by the absence of specific silver stain of the rRNA clusters. First signs of ribosomal rRNA transcription occurred in the late 4-cell stage embryos (48% nuclei). In the 8-cell stage embryos there were 46% and in the 16-cell stage embryos there were 86% transcriptionally active nuclei. The blastocyst stage embryos contained only transcriptionally active cells. NT embryos in general are similar to *in vivo* produced embryos because transcriptional initiation pattern is strikingly resembles the *in vivo* produced embryos.

Key words: pig, embryo, nuclear transfer, transcription of rDNA

ÚVOD

Ošipaná patrí medzi modelové živočíšne druhy v biotechnologickom výskume. Avšak kultivácia embryí tohto živočíšneho druhu v laboratórnych podmienkach nie je jednoduchá, keďže sa často stretávame s polyspermiou, sterilitou oocytov, ako aj s nízkou efektívnosťou zisku blastocýst. Aj preto bola prvá ošipaná narodená po prenose jadier až v roku 2000 (Poleajeva a kol.). Jedným z limitujúcich faktorov je reaktivácia embryonálneho genómu spojená so začiatkom transkripcie rDNA. Preto sme našu prácu zamerali na monitorovanie začiatku transkripčnej aktivity u embryí ošipanej po prenose jadier.

MATERIÁL A METÓDA

Produkcia embryí

Oocyty boli získané z ovárií ošipaných zabitých na miestnom bitúnku a kultivované podľa Rath a kol. (1999). Po 42-44 hodinovej kultivácii (oocyty sa nachádzajú v metafáze II) sme uskutočnili enukleáciu oocytov. Jednotlivé fibroblasty okrúhleho tvaru získané z 30 dňových embryí ošipanej boli trypsinizované a následne zmrazené v 10% DMSO v konečnej koncentrácii 1 milión buniek/ml. Pred samotným použitím sme fibroblasty rozmrazili a vložili po dobu troch dní do starvačného média (serum starvation – obsahujúcom 0,5% FCS) s cieľom získať fibroblasty vo fáze G₀. Takto ošetrené

Correspondence: E-mail: fstrejcek@ukf.sk

fibroblasty boli transportované do perivitelinneho priestoru pomocou pipety slúžiacej aj na enukleáciu oocytu. Následne boli bunky elektricky fúzané (1,2 kV/cm, 30 μ s) podľa metodiky Lai a kol., 2002. Takto ošetrované embryá boli kultivované v médiu NCSU 23 s 4 mg/ml BSA až do fixácie (2-blastomérové, rané a neskoré 4-blastomérové, 8- a 16-blastomérové embryá a blastocysty). Ako kontrolnú skupinu sme použili embryá produkované *in vivo* (štádium 4-blastomérové neskoré, 8-blastomérové embryá a štádium blastocysty), ktoré sme vyplavovali z hormonálne ošetrovaných prasničiek (Laurinčík a kol., 1994).

Fluorescenčná *in situ* hybridizácia a značenie jadierkových proteínov

Jadrá boli extrahované z embryí v daných vývojových štádiách a fixované použitím metódy pre FISH (Viuff a kol., 1998). Jednotlivé embryá boli rýchlo premyté v lyzačnom pufrí [0,01 N HCl, 0,1% Tween 20 (Merck, S 31 926 043)] a prenesené v malých kvapkách (2-6 μ l) na podložné sklíčko SuperFrost Plus (Menzel Gläser, Braunschweig, Nemecko). Po pridaní lyzačného pufru sa cytoplazma blastoméru postupne rozpúšťala a krátko pred vyschnutím izolovaných jadier sa pridala kvapka fixačného roztoku [3:1 metanol : ľadová kyselina octová (Roth 4627.2; Roth 3738.1, Carl Roth GmbH, Karlsruhe, Nemecko)]. Zafixované jadrá sa uskladnili na 24 h vo fixačnom roztoku pri 4°C. Po 24 h sa sklíčka so zafixovanými jadrami nechali vyschnúť a inkubovali pri 60°C cez noc. Sklíčka, ktoré neboli bezprostredne použité na hybridizáciu, sa uskladnili pri -80°C až do doby použitia.

FISH

Embryá boli hybridizované podľa protokolu, ktorý popísal Viuff a kol. (2002) s malými modifikáciami. Použili sme prasačí klon genomického kozmidu F6 ako rDNA prípravu. Špecifita F6 rDNA prípravy bola testovaná hybridizáciou dig-oxigenovanej prípravy s prasačimi metafázovými preparátmi. Hybridizácia potvrdila konštantne silné značenie v chromozomálnej oblasti 18S/5,8S/28S rRNA génov. rDNA bola digoxigenovaná pomocou nick-translácie. Denaturovaná príprava bola hybridizovaná pri 37°C cez noc s denaturovanou chromozomálnou DNA v konečnej koncentrácii hybridizačného roztoku 20 ng/ml (50% deionizovaný formamid, 10% dextransulfát, 2xSSC, 0,1% DNA zo spermii lososa, 0,1% prasačej genomickej DNA) a uskladnená pri -20°C až do použitia.

Potom boli prasačie vzorky 2 x 2 min premyté v 0,15 M PBS (pH 7,4) pri izbovej teplote (RT), 2 min fixované v 1% formaldehide (Sigma, F 1268) a 2 x 2 min premyté v PBS. Chromozomálna DNA z izolovaných jadier sa denaturovala 2 min v 70% formamide (Art.

6749 Carl Roth GmbH, Karlsruhe, Nemecko) v 2 x SSC (pH 7) pri 71-72°C, následne dehydratovala v vzostupnej ľadovej etanovej rade a vysušila. rDNA príprava sa denaturovala 5 min pri 75°C, preannealovala 30-60 min pri 37°C a následne centrifugovala 1 min pri 13 000 rpm. Do oblasti izolovaných jadier sa pridali 3 μ l hybridizačnej zmesi, prekryli sa krycím sklíčkom, zapečatili vulkanickým leptom a nechali hybridizovať cez noc pri 42°C. Po hybridizácii sa sklíčka premyli 2x10 min a 1 x 3min v 0,05 x SSC pri 37°C. Po premytí sa sklíčka preinkubovali 10 min v roztoku 4 x SSC+0,1% Tween 20+5% prášku z odstredeného mlieka pri 37°C na zabránenie nešpecifickej väzby protilátok.

Hybridizačné miesta boli vizualizované použitím Anti-Dig-Flouresceínu (FITC) (Boehringer Mannheim, Mannheim, Nemecko) po predchádzajúcej amplifikácii FITC-avidínu (Boehringer Mannheim, Mannheim, Nemecko). Celková DNA bola značená diamínofenylindolom (DAPI, 1 μ g/ml) vo Vectashielde (Sigma). Vzorky boli vyhodnocované pomocou epifluorescenčnej mikroskopie a spracované použitím CCD kamery (Leica) s príslušným softwarom.

Silver staining

Silver staining (SS) bol pripravený podľa Lindnera (1993). Sklíčka boli inkubované 12 min v 1% dithiothreitolu pri RT a následne premyté v destilovanej vode. Na sklíčka sa pridalo 100 μ l roztoku AgNO₃ [čerstvo pripravená zmes 3:1 50% AgNO₃ : 2% gelatíny : 1% formic acid (Merck, Rahway, NJ; Sigma)], prekryli sa a inkubovali 1h pri 37°C. Vzorky boli následne premyté v destilovanej vode a zafixované pomocou roztoku Dabco antifade (pH 8). Jadrá, pre ktoré boli výsledky FISH uložené, boli porovnané s výsledkami silver stainingu vyhodnocovaným svetelnou mikroskopiou.

VÝSLEDKY A DISKUSIA

Celkovo sme vyhodnotili 178 embryí (143 embryí po prenose jadier – tab.1 a 35 embryí kontrolná skupina – tab. 2). Jadrá, v ktorých bolo zaznamenané slabé kondenzované značenie FITC a nebolo značenie silver stainingu sme považovali za transkripčne neaktívne. U jadier, kde sme zaznamenali jednoznačné značenie FITC ako aj silver staining (kolokalizácia oboch značení) sme považovali za transkripčne aktívne. Avšak mali sme aj jadrá, kde sme zaznamenali dekonenzované značenie FITC a nezaznamenali sme značenie pomocou silver staining. Vysvetľujeme si to ako procesingovo neaktívne štádium, kde rDNA pod vplyvom nukleoplazmatických faktorov ukončila transkripciu rRNA, ale molekuly transkriptu zostali spojené s rDNA.

V 2-blastomérových embryách (N=34), kde sme vyhodnotili 66 jadier, sme zaznamenali u 32%

analyzovaných jadier značenie FITC avšak bez značenia SS tj. jadrá v tomto štádiu boli transkripčne neaktívne. Zvyšných 68% jadier vykazovalo slabé dekonenzované značenie FITC bez značenie SS tj. v týchto jadrách absentuje transkripčný a post-transkripčný aparát, ako aj kondenzácia rRNA génov. Podobný výsledok sme zaznamenali aj v 4-blastomérových raných embryí (N=12), kde sme zaznamenali u všetkých 48 jadier slabé dekonenzované značenie FITC bez značenia SS. Prvé transkripčne aktívne jadrá sa objavili v 4-blastomérových neskorých embryách (N=33), kde sme u 52% jadier zo 113 analyzovaných zaznamenali kolokalizáciu značenia FITC a SS. Pri 9% analyzovaných jadier tohto štádia sme zaznamenali typické značenie pre transkripčne neaktívne štádium. U zvyšných 39% jadier sme zaznamenali atypické dekonenzované značenie FITC bez značenia SS. V 8-blastomérových embryách (N=24) sme zaznamenali u 49% analyzovaných jadier transkripčne aktívne štádium. Zvyšné jadrá vykazovali slabé dekonenzované značenie FITC bez značenia SS. U 16-blastomérových embryí (N=21), kde sme

analyzovali 267 jadier, sme zaznamenali iba transkripčne aktívne jadrá. Rovnaký výsledok sme zistili u blastocýst (N=19), kde sme analyzovali 489 jadier. Všetky jadrá blastocýst boli transkripčne aktívne.

Viuf a kol. (2002) realizoval identický experiment s ranými embryami ošípanej získanými *in vivo*, a preto sme sa rozhodli analyzovať v kontrolnej skupine iba štádiá 4-blastomérové neskoré, 8-blastomérové embryá a blastocysty (Tab. 2). Naše výsledky sa zhodovali s výsledkami už spomínaných autorov.

Zaujímavé je porovnanie začiatku transkripčnej aktivity u embryí produkovaných *in vivo* a po prenose jadier. Zistili sme, že vývoj týchto embryí je veľmi podobný tj. začína sa v druhej polovici tretieho embryonálneho cyklu. V *in vitro* produkovaných embryí bol zaznamenaný nástup transkripčnej aktivity až u 8- až 16-blastomérových embryí (Laurinčík a kol., 2004). Pritom takmer rovnaké kultivačné podmienky majú ako embryá produkované *in vitro* tak aj klonované embryá. Pri produkcii klonovaných embryí nepochybne dochádza k narušeniu cytoskeletu i k nutnému jadrovému

Tabuľka 1: Vyhodnotenie transkripčnej aktivity v jadrách embryí ošípanej po prenose jadier
Table 1: Proportion of transcriptionally active nuclei in porcine embryos produced by nuclear transfer

³ Embryonálne štádium	⁴ Počet analyzovaných embryí	² Embryá s transkripčne aktívnymi jadrami			
		<10% N(%)	10-50% N(%)	51-90% N(%)	>91% N(%)
2-blastom.	34	34(100)	0 (0)	0 (0)	0 (0)
4-blastom. Rané	12	12 (100)	0 (0)	0 (0)	0 (0)
4-blastom. Neskoré	33	16 (48)	1 (3)	0 (0)	16 (48)
8-blastom.	24	12 (52)	0 (0)	1 (4)	11 (46)
16-blastom.	21	1 (5)	0 (0)	2 (10)	18 (86)
Blastocysta	19	0 (0)	0 (0)	0 (0)	19 (100)

¹Embryos produced by nuclear transfer; ²Embryos with transcriptionally active nuclei; ³Developmental stage; ⁴Number of embryos analyzed

Tabuľka 2: Vyhodnotenie transkripčnej aktivity v jadrách embryí ošípanej produkovaných *in vivo*
Table 2: Proportion of transcriptionally active nuclei in porcine embryos produced *in vivo*

³ Embryonálne štádium	⁴ Počet analyzovaných embryí	² Embryá s transkripčne aktívnymi jadrami			
		<10% N(%)	10-50% N(%)	51-90% N(%)	>91% N(%)
4-blastom. Neskoré	12	0 (0)	0 (0)	1 (8)	11 (92)
8-blastom.	18	0 (0)	1 (6)	1 (6)	16 (89)
Blastocysta	5	0 (0)	0 (0)	0 (0)	5 (100)

¹Control group (embryos produced *in vivo*); ²Embryos with transcriptionally active nuclei; ³Developmental stage; ⁴Number of embryos analyzed

reprogramovaniu, ktoré je sprevádzané stratou značenie SS typické pre transkripčne aktívne štádium. Je preto prekvapujúce, že model aktivácie embryonálneho genómu embryí po prenose jadier je tak podobný embryám produkovaným *in vivo*. Vzhľadom na veľké rozdiely v klonovacích technikách a ich úspešnosti nemožno tvrdiť, že tento model je zhodný s modelom embryí získaných *in vivo*.

Naše výsledky nasvedčujú tomu, že transkripcia rDNA je dobrým markerom životaschopnosti embryí.

Uvedená štúdia bola podporená grantom VEGA (1/2327/05).

LITERATÚRA

- LAI, L. – KOLBER-SIMONDS, D. – PARK, K. W. – CHEONG, H. T. – GREENSTEIN, J. L. – IM, G. S. – SAMUEL, M. – BONK, A. – RIEKE, A. – DAY, B. N. – MURPHY, C. N. – CARTER, D. B. – HAWLEY, R. J. – PRATHER, R. S. 2002. Production of alpha-1,3-galactosyltransferase knockout pigs by nuclear transfer cloning. In: *Science*, 2002, no. 295, p. 1089–1092.
- LAURINČÍK, J. – RATH, D. – NIEMANN, H. 1994. Differences in pronucleus formation and first cleavage following *in vitro* fertilization between pig oocytes matured *in vivo* and *in vitro*. In: *J Reprod Fertil.*, 1994, vol. 102, no. 2, p. 277-84.
- LAURINČÍK, J. – BJERREGAARD, B. – STREJČEK, F. – RATH, D. – NIEMANN, H. – ROSENKRANZ, C. – OCHS, R. L. – MADDOX-HYTTEL, P. 2004. Nucleolar ultrastructure and protein allocation in *in vitro* produced porcine embryos. In: *Mol Reprod Dev.*, 2004, vol. 68, no. 3, p. 327-34.
- LINDNER, L. E. 1993. Improvements in the silver-staining technique for nucleolar organizer regions (AgNOR). In: *J Histochem Cytochem.*, 1993, vol. 41, no. 3, p. 439-45.
- RATH, D. – LONG, C. R. – DOBRINSKY, J. R. – WELCH, G. R. – SCHREIER, L. L. – JOHNSON, L. A. 1999. *In vitro* production of sexed embryos for gender preselection: high-speed sorting of X-chromosome-bearing sperm to produce pigs after embryo transfer. In: *J Anim Sci.*, 1999, vol. 77, no. 12, p. 3346-52.
- VIUFF, D. – HYTTEL, P. – AVERY, B. – VAJTA, G. – GREVE, T. – CALLESEN, H. – THOMSEN, P. D. 1998. Ribosomal ribonucleic acid is transcribed at the 4-cell stage in *in vitro*-produced bovine embryos. In: *Biol Reprod.*, 1998, vol. 59, no. 3, p. 626-31.
- VIUFF, D. – GREVE, T. – HOLM, P. – CALLESEN, H. – HYTTEL, P. – THOMSEN, P. D. 2002. Activation of the ribosomal RNA genes late in the third cell cycle of porcine embryos. In: *Biol Reprod.*, 2002, vol. 66, no. 3, p. 629-34.

Adresa autorov RNDr. František Strejček PhD., Katedra botaniky a genetiky, UKF v Nitre, Nábřežie mládeže 91, 94901 Nitra, Slovakia;

Ing. Ida Petrovičová, PhD., RNDr. Oľga Švarcová, Katedra zoológie a antropológie, UKF v Nitre, Nábřežie mládeže 91, 94901 Nitra, Slovakia;

Prof. Dr. Heiner Niemann Institut für Tierzucht und Tierverhalten (FAL), Mariensee, Neustadt 31535, Germany;

Bolette Bjerregaard PhD., Prof. Dr. Poul Hyttel, Dept. of Basic Animal and Veterinary Science, The Royal Veterinary and Agricultural University, DK-1870 Frederiksberg C, Denmark;

Prof. Dr. MVDr. Jozef Laurinčík, DrSc, VÚŽV, Hlohovecká 2, 94992 Nitra, Slovakia; Katedra zoológie a antropológie, UKF v Nitre, Nábřežie mládeže 91, 94901 Nitra, Slovakia
