

На правах рукописи

**Зайцева
Юлия Анатольевна**

**ПАРТЕНОГЕНЕТИЧЕСКАЯ АКТИВАЦИЯ И ХИМИЧЕСКАЯ ЭНУКЛЕАЦИЯ
ООЦИТОВ КРЫС. ПРОЦЕССЫ ДЕМЕТИЛИРОВАНИЯ ДНК У РАННИХ
ПРЕДИМПЛАНТАЦИОННЫХ ЭМБРИОНОВ КРЫС И МЫШЕЙ**

03.00.25

Гистология, цитология, клеточная биология

АВТОРЕФЕРАТ
диссертации на соискание учёной степени
кандидата биологических наук

Санкт-Петербург

2008

Работа выполнена в Центре молекулярной медицины имени Макса Дельбрюка (Берлин) и в Институте цитологии Российской академии наук (Санкт-Петербург)

Научные руководители: кандидат биологических наук
Кривохарченко Александр Сергеевич
Центр молекулярной медицины имени Макса Дельбрюка
(Берлин)
доктор биологических наук, профессор
Парфёнов Владимир Николаевич
Институт цитологии РАН

Официальные оппоненты: кандидат биологических наук
Александрова Светлана Алексеевна
Институт цитологии РАН

доктор медицинских наук, профессор
Дыбан Павел Андреевич
ГУ НИИ экспериментальной медицины РАМН

Ведущая организация: Биолого-почвенный факультет
Санкт-Петербургского государственного
университета

Защита состоится на заседании Диссертационного совета Д.002.230.01 при Институте цитологии РАН по адресу: 194064, Санкт-Петербург, Тихорецкий пр., д. 4

e-mail: cellbio@mail.cytspb.rssi.ru
сайт: <http://www.cytspb.rssi.ru>

С диссертацией можно ознакомиться в библиотеке Института цитологии РАН

Автореферат разослан « » 2008 г.

Ученый секретарь
диссертационного совета
кандидат биологических наук

Е.В.Каминская

Общая характеристика работы

Актуальность проблемы. Одной из форм полового размножения является партеногенез. У некоторых организмов естественный партеногенез — нормальный способ размножения в природе. У других организмов партеногенез вызывается экспериментально действием разных факторов на неоплодотворённую яйцеклетку, причём факторы, активирующие ооцит, в основном видоспецифичны. Лучшим критерием успешной активации ооцитов является способность партеногенетических эмбрионов к предимплантационному и постимплантационному развитию. Как известно, активация ооцита-реципиента является важнейшим этапом клонирования млекопитающих. Ко времени проведения данного исследования попытки получить предимплантационное развитие до стадии бластоцисты у активированных ооцитов крыс оказались неудачными, развитие партеногенетического эмбриона останавливалось на 4-клеточной стадии (Zernicka-Goetz, 1991). На данный момент зафиксирован единственный случай получения клонированной крысы (Zhou et al., 2003); повторить успех французских учёных пока никому не удалось.

Другой важный этап процедуры клонирования — энуклеация ооцита-реципиента. Механическая энуклеация обычно сопряжена с высоким повреждающим воздействием. Альтернативой механической энуклеации может быть химическая энуклеация веществами, надёжно блокирующими генетический материал клетки. Одним из них является этопозид — ингибитор ДНК-топоизомеразы 2, которая ответственна за скручивание и разделение цепей ДНК. Одной из задач работы было изучение возможности применения этопозида для химической энуклеации ооцитов крыс.

Как известно, метилирование ДНК является эпигенетическим регулятором генной экспрессии (Reik, Dean, 2001). Проблемы культивирования ранних предимплантационных эмбрионов *in vitro*, низкая эффективность клонирования, сложности партеногенетического развития хорошо коррелируют с ненормальным рисунком метилирования генома. Отклонения в динамике деметилирования у млекопитающих могут служить маркёром дефектного развития эмбриона. В настоящее время имеются работы по изучению динамики деметилирования генома мыши, однако приводимые в них данные сильно различаются (Mayer et al., 2000; Santos et al., 2002). Для крыс такие данные вообще отсутствуют. Вместе с тем, изучение процессов деметилирования у ранних предимплантационных эмбрионов необходимо для решения как фундаментальных, так и прикладных задач биологии развития.

Цель исследования. Цель работы заключалась в подборе оптимальных параметров активации ооцитов крыс (активирующие агенты, время воздействия) и получении жизнеспособных партеногенетических эмбрионов, в изучении возможности химической

энуклеации ооцитов крыс с последующей пересадкой в них ядер соматических клеток и в исследовании динамики деметилирования ДНК зигот (крыса, мышь), развивающихся *in vivo* и *in vitro*.

Конкретные задачи исследования

1. Изучить возможность партеногенетической активации ооцитов крысы различными агентами: этиловым спиртом, стронцием, электроимпульсом.
2. Выяснить зависимость эффективности партеногенетической активации от возраста ооцитов крыс.
3. Исследовать способность партеногенетически активированных ооцитов к развитию *in vivo* и *in vitro*.
4. Изучить возможность химической энуклеации ооцитов крыс с помощью этопозида. Сравнить эффективность клонирования при энуклеации химическим и механическим способами.
5. Исследовать динамику деметилирования ДНК у ранних крысиных эмбрионов *in vivo* и *in vitro*, сравнить её с динамикой деметилирования у ранних эмбрионов мышей.
6. Оценить уровень метилирования ДНК у партеногенетических и клонированных эмбрионов крысы.

Основные положения, выносимые на защиту

1. Способность ооцитов крыс к партеногенетической активации существенно варьирует от животного к животному и зависит от времени между инъекцией хорионического гонадотропина человека и моментом извлечения ооцитов.
2. Стронций (Sr^{2+}) является более эффективным активатором партеногенеза по сравнению с электроимпульсом и этанолом. Партеногенетические эмбрионы крысы способны развиваться до стадии бластоцисты *in vitro* и до имплантации *in vivo*.
3. Этопозид не оказывает влияния на партеногенетическую активацию ооцитов крыс и, в то же время, необратимо блокирует их дальнейшее развитие. Доля 2-клеточных эмбрионов после процедуры клонирования практически одинакова как после применения химической энуклеации с использованием этопозида, так и после механической энуклеации.
4. Деметилирование ДНК у зигот крыс и мышей происходит с разной скоростью. Эмбрионы обоих видов, культивируемые *in vitro*, демонстрируют более высокий уровень метилирования по сравнению с развивающимися *in vivo*. Партеногенетические и клонированные 2-клеточные эмбрионы крысы сохраняют высокий уровень метилирования.

Научная новизна работы. Впервые получены партеногенетические бластоцисты крысы после активации ооцитов этиловым спиртом, стронцием, электроимпульсом, а также после спонтанной активации. Воздействие стронция давало большую долю активированных

ооцитов, активировались ооциты всех возрастов. Установлено, что активация ооцитов зависит от промежутка времени между процедурой суперовуляции и выделением ооцитов. Более старые ооциты крысы активировались успешнее, чем молодые. Впервые показано, что у ооцитов крыс аутбредной линии Wistar имеет место индивидуальная (от крысы к крысе) реакция на партеногенетическую активацию, не зависящая от активирующего агента. Установлено, что химическая энуклеация ооцитов крысы этопозидом может успешно использоваться при клонировании. Этопозид, являясь специфическим ингибитором фермента ДНК-топоизомеразы 2, не оказывал влияния на партеногенетическую активацию ооцитов и, тем не менее, необратимо блокировал их дальнейшее развитие.

Впервые исследована динамика деметилирования генома крысы на ранних этапах предимплантационного развития. Показано, что эмбрионы крыс и мышей, культивируемые со стадии ранней зиготы до 2-клеточной стадии в системе *in vitro* имеют более высокий уровень метилирования чем эмбрионы в системе *in vivo*. Впервые изучен уровень метилирования у партеногенетических эмбрионов крысы вплоть до 4-клеточной стадии развития, а также уровень метилирования у 2-клеточных клонированных эмбрионов. Обнаружен высокий уровень метилирования в обеих рассматриваемых группах по сравнению с нормальными эмбрионами.

Научно-практическое значение работы. Результаты тестирования различных активирующих агентов показали, что стронций является наиболее эффективным активационным агентом ооцитов крыс, что важно для технологии клонирования. При работе с аутбредной линией Wistar выявлено индивидуальное (от крысы к крысе) варьирование результатов, не зависящее от протокола эксперимента, что необходимо учитывать при проведении эмбриологических работ. Применение химической энуклеации вместо механической может существенно снизить трудоёмкость процесса клонирования крыс и повысить его эффективность. Разный уровень деметилирования мужского пронуклеуса зигот у крыс и мышей в системах *in vivo* и *in vitro* может служить индикатором качества используемых культивационных сред, в том числе используемых для манипуляций с эмбрионами человека в программах экстракорпорального оплодотворения. В целом полученные результаты могут найти применение в экспериментальной эмбриологии для совершенствовании технологии клонирования млекопитающих, а также при изучении процессов их раннего эмбриогенеза.

Апробация работы. Основные материалы диссертации представлены в 3 печатных работах. Материалы диссертации докладывались на международных конференциях: Scientific Meeting of European Embryo Transfer Association (Rolduc, Niederlande 2002). — Proc. of XVII Working Meeting “Genetic Resource Conservation” (Pushchino, November 19-21, 2003).

Структура и объем диссертации. Диссертация включает в себя введение, обзор литературы, описание материалов и методов, результаты исследования и их обсуждение, заключение, выводы и список цитируемой литературы (110 ссылок). Работа изложена на страницах машинописного текста и содержит 15 рисунков и 10 таблиц.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Получение и культивирование ооцитов и зигот у мышей и крыс

В работе использовали инбредных мышей (СВА х С57BL/6) и аутбредных крыс Wistar и SD. Суперовуляцию вызывали введением гонадотропных препаратов. Для получения зигот самок подсаживали к самцам той же линии на 1 ч при работе с мышами и на 2 ч при работе с крысами. Это позволило определить время копуляции и проследить хронологию развития эмбрионов. Эмбрионы извлекали в предварительно подогретой среде M2 в разное время после копуляции для исследования в системе *in vivo*, либо через 2 ч после копуляции у мышей или 3 ч у крыс для исследований в системе *in vitro*. Кумулюсные клетки отмывали в среде M16, содержащей 0,1 % гиалуронидазы. Эмбрионы культивировали 10 ч в среде M16, а затем в среде mR1ECM (Miyoshi et al., 1997).

Партеногенетическая активация ооцитов крысы

Спонтанная активация. Ооциты помещали в предварительно уравновешенную среду M16. В первой группе кумулюсные клетки отмывали немедленно, а во второй спустя 7 - 8 ч.

Активация электроимпульсом. Ооциты 1 - 2 мин уравнивали в среде, содержащей манитол, затем помещали в камеру для слияния с аналогичной средой. Клетки ориентировали переменным полем, активация индуцировалась при помощи частотного генератора.

Химическая активация. При активации стронцием ооциты инкубировали разное время (15 мин или 2 ч) в среде M16 без кальция и магния, содержащей 2 мМ стронция в инкубаторе при температуре 37 °С и атмосфере, содержащей 5 % углекислого газа. При активации этиловым спиртом ооциты инкубировали в течение 7 мин в среде M16 с 8 % содержанием этилового спирта.

Диплоидизация. Ооциты культивировали 7-8 ч в присутствии цитохалазина Б.

Анализ. Эффективность партеногенетической активации анализировалась через 10 - 12 ч после воздействия активирующего агента. Ооциты оценивали на инвертивном микроскопе с оптикой Номарского. Ооциты с сформировавшимся видимым пронуклеусом считали активированными.

Статистика. Достоверность различия выборочных долей оценивали с помощью критерия χ^2 . Для сравнения средних величин применялся t-критерий Стьюдента (количественный анализ уровня флуоресценции). Достоверным считался уровень значимости $p < 0.05$.

Клонирование крысиных эмбрионов

Химическая энуклеация. В качестве блокатора генетического материала был использован этопозид (Etoposide, Sigma, США) в концентрации 50 мкг на 1 мл в среде M16. Для растворения этопозид использовали диметилсульфоксид. Ооциты находились в растворе этопозид 1,5; 2,5 или 6 ч. Отмывание проводили в течение 5 мин в 1 М растворе сахарозы.

Механическая энуклеация. При клонировании с использованием механической энуклеации удаление генетического материала производилось с использованием микропипетки. Для этого в область грушевидного выпячивания ооцита на стадии метафазы II вводилась пипетка, метафазная пластина удалялась вместе с частью цитоплазмы. Контролем качества служило окрашивание энуклеированных эмбрионов Хёхстом 33342 и кратковременное (5 с) ультрафиолетовое облучение, что позволило отбраковывать ооциты содержащие собственный генетический материал.

Введение и активация генетического материала. Кумулюсную клетку вводили микропипеткой под блестящую оболочку энуклеированного ооцита. Для слияния цитоплазматических мембран кумулюсной клетки и ооцита использовали камеру для слияния и импульсный генератор (Институт инструментов для биологии, Пушино, Россия). Активация генетического материала кумулюсной клетки производилась инкубацией в среде со стронцием в течение 15-20 мин.

Иммунофлуоресцентный анализ метилирования

Оплодотворённые ооциты отмывали в фосфатном буфере (PBS), фиксировали в 3,7 % растворе формальдегида 10 мин, проницаемость клеточной мембраны повышали инкубацией с Triton X-100 в течение 20 мин при комнатной температуре. Сайты неспецифического связывания антител блокировали обработкой клеток 10 % раствором козьей сыворотки. Для получения иммунофлуоресцентного окрашивания эмбрионы инкубировали с моноклональными антителами против 5-MeCytosine (Eurogentec), разведёнными 1:150, а также с 7 ед./мл DnaseI (Promega) в 10 %-ном DNase буферном растворе при 37 °C в течение 60 мин. После трёхкратной отмывки в фосфатном буферном растворе клетки инкубировали 60 мин с FITC-связанными вторыми антителами (Dianova) разведёнными 1:300. Ядра клеток окрашивали ДНК-связывающим красителем DAPI (4', 6-диамидин-2-фенилиндол дигидрохлорид). Слайды заключали в среду Vectashield (Serva).

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Партеногенетическое развитие эмбрионов крыс

Для оптимизации протокола клонирования у крыс тестировали различные методы партеногенетической активации, такие как электроимпульс, этиловый спирт, стронций, в зависимости от возраста ооцита. Максимально ранние ооциты удалось получить через 10 - 12 ч после инъекции хорионического гонадотропина человека (ХГЧ). Была замечена вариабельность эффективности активации в зависимости от индивидуальных особенностей конкретной крысы, поэтому животных разделяли на «активные» (эффективность активации более 40 %) и «неактивные» (эффективность активации менее 20 %). Данные, полученные в работе, представлены с учётом этого фактора. Наблюдаемую вариабельность можно объяснить генетическими различиями в аутбредной линии Wistar, влиянием материнского генома на партеногенетическую активацию ооцитов крыс. Подобное влияние материнского генома на партеногенетическую активацию прослеживается и у мышей (Marcus 1990; Rybouchkin et al., 1996). Генетические различия сильнее проявляются при работе с ранними ооцитами крыс. Экспериментальные данные отражены на рис. 1.

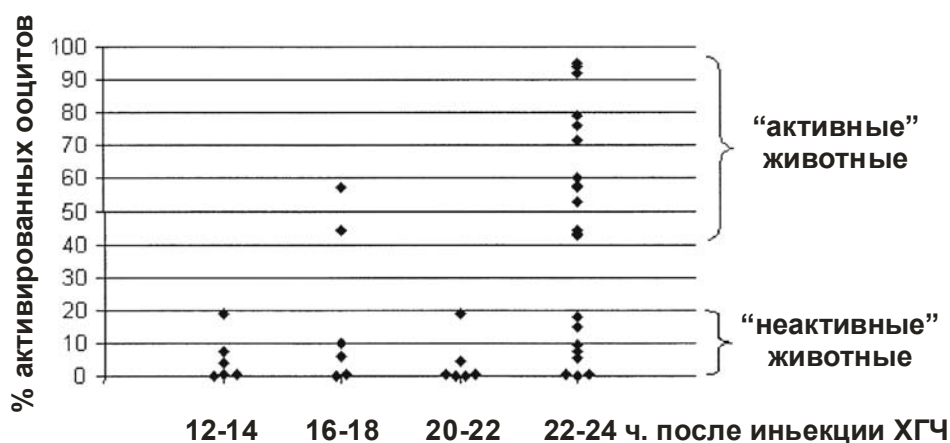


Рис. 1. Доля активированных этиловым спиртом ооцитов от всех ооцитов, полученных из животного, в зависимости от времени после инъекции хорионического гонадотропина человека.

Исходя из представленных результатов можно утверждать, что индивидуальные различия от крысы к крысе менее заметны и число «активных» животных возрастает с увеличением времени после инъекции ХГЧ.

Этиловый спирт – наиболее часто используемый активирующий агент для ооцитов млекопитающих. Как видно на рис. 1, использование этилового спирта для партеногенетической активации эффективно только для старых ооцитов крыс (22-24 ч после инъекции ХГЧ). Доля «активных животных», а также эффективность формирования пронуклеуса и дробления ооцитов крыс выше у данной возрастной группы (табл. 1).

Табл. 1. Индуцированная этиловым спиртом партеногенетическая активация у крыс.

| Время после инъекции ХГЧ, ч | Число животных | «Активные» / «неактивные» животные, % | Ооциты с сформировавшимся пронуклеусом, % | Дробящиеся ооциты, % |
|-----------------------------|----------------|---------------------------------------|---|-----------------------------|
| 12-14 | 6 | 0 (0/6) / 100 (6/6) | - / * 5 (6/120) | - / * 100 (6/6) |
| 16-18 | 6 | 33 (2/6) / 66 (4/7) | 50 (16/32) ^a / 5 (5/90) | 87 (14/16) / 0 (0/5) |
| 20-22 | 6 | 0 (0/6) / 100 (6/6) | - / * 4 (4/136) | - / * 0(0/4) |
| 22-24 | 24 | 62 (15/24) / 37 (9/24) | 73 (255/347) ^b / 7 (19/265) | 94 (107/113) / 47 (9/19) |

* Отсутствие «активных» животных. Различия в группе «активных» крыс достоверны ($P \leq 0.05$): а – б. В скобках — абсолютные значения.

Стимуляция электроимпульсом также эффективна для партеногенетической активации ооцитов крыс (табл. 2). У молодых ооцитов (12-14 ч после инъекции ХГЧ) доля ооцитов с сформировавшимся пронуклеусом и доля дробящихся ооцитов существенно выше по сравнению со стимуляцией этиловым спиртом той же возрастной группы.

Табл. 2. Электроактивация ооцитов крыс.

| Время после инъекции ХГЧ, ч | Число животных | «Активные» / «неактивные» животные, % | Ооциты с сформировавшимся пронуклеусом, % | Дробящиеся ооциты, % |
|-----------------------------|----------------|---------------------------------------|---|----------------------------|
| 12-14 | 6 | 50 (3/6) / 50 (3/6) | 44 (34/76) ^a / 20 (16/79) | 38 (13/34) / 31 (5/16) |
| 16-18 | 7 | 71 (5/7) / 28 (2/7) | 71 (97/136) ^b / 0 (0/57) | 62 (61/69) / - * |
| 20-22 | 13 | 61 (8/13) / 38 (5/13) | 77 (147/189) / 4 (6/131) | 66 (85/128) / 100 (6/6) |

* Отсутствие активированных ооцитов. В скобках — абсолютные значения. Различия в группе «активных» крыс достоверны ($P \leq 0.05$): а – б.

В проведённых экспериментах партеногенетическую активацию очень эффективно вызывало культивирование крысиных ооцитов в среде, содержащей ионы стронция (2 мМ Sr²⁺). Как видно на табл. 3, кратковременное воздействие ионами стронция (15 мин) оказалось вполне достаточным для партеногенетической активации ооцитов крыс. Количество «активных»

животных в группе, соответствующей 16-18 ч после инъекции ХГЧ, было значительно ниже, чем у более старых ооцитов. Доля ооцитов с сформировавшимся пронуклеусом и доля дробящихся ооцитов была практически одинакова у всех возрастных групп.

Табл. 3. Активация эмбрионов крысы 15-минутной обработкой ионами стронция.

| Время после инъекции ХГЧ, ч | Число животных | «Активные» / «неактивные» животные, % | Ооциты с сформировавшимся пронуклеусом, % | Дробящиеся ооциты, % |
|-----------------------------|----------------|---------------------------------------|---|-----------------------------|
| 16-18 | 6 | 33 (2/6) / 66 (4/6) | 85 (41/48) / 15 (14/89) | 92 (38/41) / 100 (14/14) |
| 20-22 | 5 | 80 (4/5) / 20 (1/5) | 81 (77/95) / 0 (0/15) | 85 (66/77) / _ * |
| 22-24 | 5 | 100 (5/5) / 0 (0/5) | 84 (89/105) / _ # | 94 (84/89) / _ # |

Отсутствие активированных ооцитов. # Отсутствие «неактивных» животных. В скобках — абсолютные значения.

Повышение времени инкубации с 15 мин до 2 ч не приводило к существенным изменениям в эффективности формирования пронуклеуса и дробления, доля «активных» животных росла вместе с увеличением времени после инъекции ХГЧ (табл. 4).

Табл. 4. Активация крысиных эмбрионов 2-часовой обработкой стронцием.

| Время после инъекции ХГЧ, ч | Число животных | «Активные» / «неактивные» животные, % | Ооциты с сформировавшимся пронуклеусом, % | Дробящиеся ооциты, % |
|-----------------------------|----------------|---------------------------------------|---|------------------------------|
| 12-14 | 53 | 35 (19/53) / 64 (34/53) | 89 (501/559) / 8 (85/971) | 93 (266/284) / 75 (64/68) |
| 16-18 | 37 | 75 (28/37) / 24 (9/37) | 90 (858/947) / 9 (21/226) | 89 (457/510) / 85 (18/21) |
| 20-22 | 23 | 95 (22/23) / 4 (1/23) | 88 (691/781) / 5 (1/20) | 87 (395/450) / 0 (0/1) |

Крысиные ооциты подвержены спонтанной активации с формированием пронуклеуса и делением без какой-либо обработки и без применения гиалорунидазы (табл. 5). Способность к формированию пронуклеуса и эффективность активации зависит от возраста ооцита.

Спонтанная активация возможна у ооцитов начиная с 22–24-го ч после инъекции ХГЧ и максимальна у очень старых ооцитов 25–27 ч. Тем не менее, остаётся неизвестным фактор, вызывающий спонтанную активацию. У мышей триггером является гиалуронидаза (Kaufman 1973; O'Neill and Kaufman 1998; Henery and Kaufman 1993). В проведённых экспериментах старые ооциты были изолированы без участия гиалуронидазы и, тем не менее, спонтанно активировались. Этот эффект может вызвать охлаждение ооцитов во время извлечения из яйцевода (Jiang et al., 2002).

Табл. 5. Спонтанная активация крысиных ооцитов.

| Время после ХГЧ инъекции, ч | Число животных | «Активные» / «неактивные» животные, % | Ооциты с сформировавшимся пронуклеусом, % | Дробящиеся ооциты, % |
|-----------------------------|----------------|---------------------------------------|---|----------------------------|
| 12-14 | 27 | 0 (0/27) / 100 (27/27) | —* / 2 (7/351) | —* / 14 (1/7) |
| 16-18 | 12 | 0 (0/12) / 100 (12/12) | —* / 8 (17/209) | —* / 52 (9/17) |
| 20-22 | 6 | 0 (0/6) / 100 (6/6) | —* / 1 (1/93) | —* / 100 (1/1) |
| 22-24 | 19 | 15 (3/19) / 84 (16/19) | 40 (27/67) / 4 (16/394) | 77 (21/27) / 87 (14/16) |
| 25-27 с гиалуронидазой | 11 | 54 (6/11) / 45 (5/11) | 56 (131/232) / 14 (37/252) | 87 (41/47) / 56 (21/37) |
| 25-27 без гиалуронидазы | 9 | 33 (3/9) / 66 (6/9) | 65 (112/170) / 10 (28/277) | 91 (22/24) / 67 (19/28) |

* Отсутствие активированных ооцитов.

Различия в группе «активных» крыс достоверны ($P \leq 0.05$).

Этиловый спирт, электроимпульс, стронций, активируют ооциты крыс, однако развитие эмбриона без диплоидизации останавливается на 2-клеточной стадии (Jiang et al., 2002). Проблема преодолевается использованием цитохалазина Б, который подавляет выделение второго полярного тельца, и в результате получается зигота с двумя пронуклеусами (Liu et al., 1998). Впервые, после партеногенетической активации и диплоидизации при помощи цитохалазина Б, были получены партеногенетические бластоцисты крысы (табл. 6). Не наблюдалось значительной разницы в дроблении и формировании бластоцист между экспериментальными и контрольной группами. Доля

ооцитов, сформировавших бластоцисты, чрезвычайно низка при активации стронцием 12–14-часовых ооцитов по сравнению с контрольной группой.

Табл. 6. Развитие in vitro партеногенетически активированных крысиных ооцитов.

| Активирующий фактор | Время после инъекции ХГЧ, ч | Дробящиеся ооциты, % | Доля ооцитов, сформировавших бластоцисты % |
|--------------------------------|-----------------------------|----------------------|--|
| Спонтанная активация | 22-24 | 80 (12/15) | 13 (2/15) |
| Электронимпульс | 16-18 | 95 (42/44) | 13 (6/44) |
| | 20-22 | 77 (21/27) | 29 (8/27) |
| Этиловый спирт | 22-24 | 81 (26/32) | 25 (8/32) |
| Стронций 2 часа | 12-14 | 93 (139/149) | 12 (18/149) ^a |
| | 16-18 | 91 (103/112) | 17 (20/112) |
| | 20-22 | 83 (77/92) | 19 (18/92) |
| Контроль (естественные зиготы) | — * | 92 (156/169) | 27 (47/169) ^b |

* Естественное оплодотворение. Различия достоверны ($P \leq 0.05$): а – б.

Изучение возможности применения этопозида для химической энуклеации ооцитов крыс на стадии метафазы II

Одним из важных этапов клонирования является энуклеация – удаление генетического материала ооцита. В настоящее время для энуклеации ооцитов млекопитающих существуют два различных подхода: механический и химический. Механический способ заключается в извлечении хромосом при помощи микропипетки. Этот метод связан с высокой степенью травматичности, что снижает эффективность всей манипуляции. Химический способ привлекателен возможностью существенно упростить и ускорить процедуру энуклеации. На данный момент опубликованы данные, указывающие на возможность применения этопозида для химической энуклеации мышинных ооцитов на стадиях метафазы I (Fulka et al., 1993) и метафазы II (Elsheikh et al., 1998).

Как видно на табл. 7, культивирование ооцитов крыс в среде, содержащей этопозид не оказывало влияния на способность ооцитов к активации стронцием. В то же время этопозид достоверно снижал процент активированных ооцитов, достигших 2-клеточной стадии по сравнению с контролем (естественные зиготы) ($P < 0.05$). Этопозид является специфическим ингибитором фермента ДНК-топоизомеразы 2, который ответственен за скручивание и разделение цепей ДНК. В наших опытах этопозид не оказывал влияния на

партеногенетическую активацию ооцитов и, в то же время, необратимо блокировал их дальнейшее развитие. Поэтому можно предположить, что химическая энуклеация ооцитов этопозидом может быть использована при клонировании крысы.

Табл. 7. Влияние этопозида на развитие крысиных эмбрионов.

| Время воздействия этопозид, ч | Число животных | Число ооцитов | Активированные ооциты, % | Эмбрионы, достигшие 2-клеточной стадии, % |
|-------------------------------|----------------|---------------|--------------------------|---|
| 1.5 | 4 | 148 | 88 (131/148) | 19 (26/131) |
| 2.5 | 3 | 134 | 89 (120/134) | 9 (11/120) |
| 4 | 6 | 163 | 87 (143/163) | 4 (6/143) |
| 6 | 6 | 172 | 93 (160/172) | 7 (11/160) |
| Контроль (DMSO) 6 | 6 | 178 | 93 (167/178) | 83 (140/167) |

Были проведены сравнительные эксперименты по выяснению процента выживания эмбрионов крыс после процедуры клонирования как при помощи химической энуклеации с использованием этопозид, так и после механической энуклеации (табл. 8). В качестве донора генетической информации использовали кумулюсные клетки.

Табл. 8. Сравнительная таблица выживания ооцитов и эмбрионов крыс на разных этапах клонирования при использовании химической или механической энуклеации.

| | Число ооцитов крыс | Ооциты выжившие после воздействия этопозид, % | Ооциты выжившие после энуклеации и инъекции кумулюсной клетки, % | Ооциты выжившие после электрон-пульса, % | Ооциты выжившие после воздействия стронция, % | 1-клеточные эмбрионы с видимыми пронуклеусами, % | 2-клеточные эмбрионы, % |
|--|--------------------|---|--|--|---|--|-------------------------|
| Клонирование при помощи механической энуклеации | 142 | - * | 54 (78/142) | 45 (64/142) | 45 (64/142) | 28 (40/142) | 16 (23/142) |
| Клонирование при помощи химической энуклеации (этопозид) | 85 | 89 (76/85) | 68 (58/85) | 49 (42/85) | 49 (42/85) | 43 (37/85) | 16 (14/85) |

* Воздействие этопозидом не проводилось

Как видно на табл. 8, выживаемость эмбрионов крыс от этапа к этапу клонирования практически одинакова вне зависимости от способа энуклеации ооцитов. Доля 2-клеточных клонированных эмбрионов крысы составляет 16 % как при клонировании с применением химической энуклеации, так и при клонировании с применением механической энуклеации. К сожалению, дальнейшая оценка выживаемости клонированных крысиных эмбрионов *in vitro* практически невозможна, поскольку развитие останавливается на 2-клеточной стадии вне зависимости от применяемого протокола клонирования (Jiang et al., 2002; Popova et al., 2006). Подобная особенность не встречается у клонированных эмбрионов других животных.

Динамика деметилирования у ранних крысиных и мышинных эмбрионов при развитии *in vivo* и *in vitro*

Для лучшего понимания процессов, происходящих в ранних предимплантационных эмбрионах, была исследована динамика деметилирования ДНК у эмбрионов крыс и мышей при помощи иммуноокрашивания с антителами против 5-Мес группы.

Впервые детальный анализ динамики деметилирования был проведён у эмбрионов крыс, развивающихся в системе *in vivo*. При помощи окрашивания на 5-Мес группу были проанализированы 205 эмбрионов различных возрастов в системах *in vivo* и *in vitro*. Доля эмбрионов с характерным рисунком метилирования (т. е. наиболее часто встречающимся рисунком метилирования для данной временной точки) варьирует от 67 до 100 % (табл. 9). Нехарактерный рисунок метилирования может служить индикатором ненормального развития эмбриона (Barton et al., 2001; Shi and Haaf, 2002).

Табл. 9. Доля эмбрионов крыс с характерным рисунком ДНК метилирования; развитие *in vivo* и *in vitro*

| Время после копуляции, ч | Развитие <i>in vivo</i> | | Развитие <i>in vitro</i> | |
|--------------------------|-------------------------|--|--------------------------|--|
| | Число эмбрионов | Эмбрионы с характерным рисунком ДНК метилирования, % | Число эмбрионов | Эмбрионы с характерным рисунком ДНК метилирования, % |
| 6 | 17 (1-клеточные) | 100 (17/17) | 20 (1-клеточные) | 100 (20/20) |
| 10 | 23 (1-клеточные) | 78 (18/23) | 14 (1-клеточные) | 85 (12/14) |
| 16 | 28 (1-клеточные) | 67 (19/28) | 25 (1-клеточные) | 76 (19/25) |
| 24 | 21 (2-клеточные) | 71 (15/21) | 20 (2-клеточные) | 80 (16/20) |
| 30 | 18 (2-клеточные) | 77 (14/18) | 19 (2-клеточные) | 78 (15/19) |

Чтобы выяснить временную хронологию деметилирования генома крысы, был использован метод датированной беременности для определения времени копуляции. Первый контакт ооцита и сперматозоида у крыс наблюдался через 4 ч после копуляции. Через 6 ч у зигот, развивавшихся в системах как *in vivo* так и *in vitro*, пронуклеусы при окрашивании на 5-MeC группу выглядели одинаково, причём мужской пронуклеус был более деконденсирован и выглядел крупнее чем женский пронуклеус крысы (рис. 2, А, - *in vivo*, С, - *in vitro*). Через 10 ч после копуляции мужской пронуклеус в системе *in vivo* частично метилирован в сравнении с сильно метилированным мужским пронуклеусом в системе *in vitro* (рис. 2, Е, - *in vivo*, G, - *in vitro*). Через 16 ч после копуляции у крысиной зиготы мужской пронуклеус в системе *in vitro* сохраняет высокий уровень метилирования по сравнению с практически полностью деметилированным мужским пронуклеусом в системе *in vivo* (рис. 2, I, - *in vivo*, K, - *in vitro*). Женский пронуклеус в обеих группах остаётся полностью метилированным.

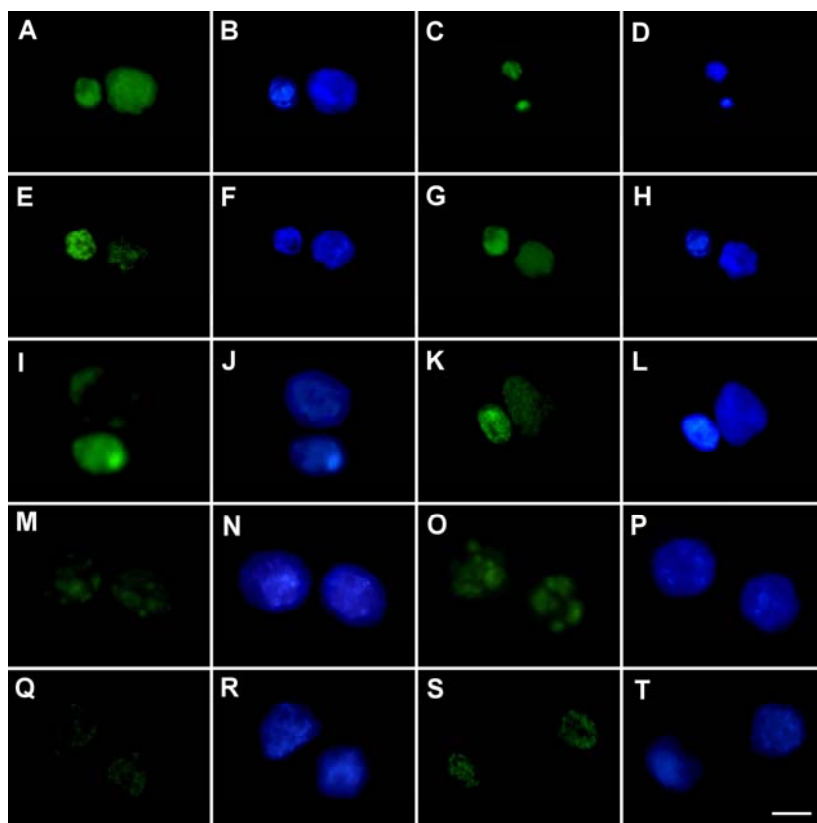


Рис. 2. Деметилирование мужского пронуклеуса у ранних крысиных эмбрионов, развивавшихся *in vivo* и *in vitro*.

*Ядра эмбрионов окрашены FITC-связанными антителами против 5-MeC группы (зелёный цвет) (A, C, E, G, I, K, M, O, Q, S) и контрастированы DAPI (голубой цвет) (B, D, F, H, J, L, N, P). Масштабная линейка 20 мкм. A, B, E, F, I, J, M, N, Q, R: развитие *in vivo*. C, D, G, H, K, L, O, P, S, T: развитие *in vitro*.*

Количественный анализ уровня флуоресценции показывает, что разница в метилировании мужского пронуклеуса зиготы крысы через 10, а также через 16 ч после копуляции в системах *in vivo* и *in vitro* достоверно различается ($P < 0.05$), в то время как уровень ДНК-метилирования в женском пронуклеусе остаётся неизменным (рис. 3). Эмбрионы крысы, развивавшиеся до 2-клеточной стадии в разных условиях (24 или 30 ч после копуляции, *in vivo* и *in vitro*), показывают разный уровень метилирования - более высокий в системе *in vitro* (рис. 2, M, Q, O, S). Данный факт согласуется с исследованиями других авторов. Так, в работе Ши (Shi and Naaf, 2002) показано, что у эмбрионов мыши, культивируемых в системе *in vitro*, ненормальное метилирование согласуется с качеством среды культивирования.

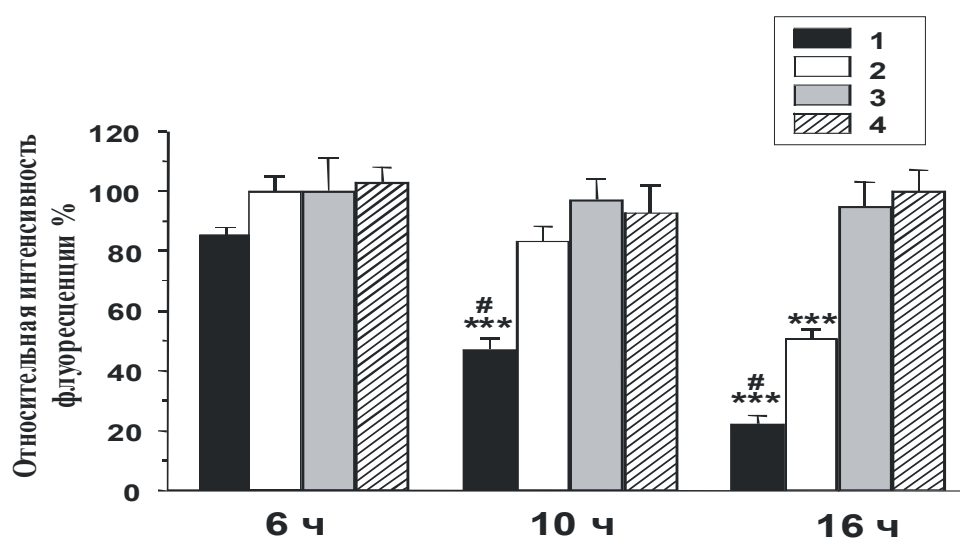


Рис. 3. Изменения уровня метилирования в мужском пронуклеусе у ранних эмбрионов крысы, развивавшихся *in vivo* и *in vitro*.

1 - мужской пронуклеус зиготы в системе *in vivo*

2 - мужской пронуклеус зиготы в системе *in vitro*

3 - женский пронуклеус зиготы в системе *in vivo*

4 - женский пронуклеус зиготы в системе *in vitro*

Уровень метилирования оценивался по интенсивности флуоресценции метки на 5-MeC, нормированной на размер ядра (формула 1). Интенсивность флуоресценции мужского пронуклеуса через 6 ч после копуляции в системе *in vitro* была принята за 100%. На диаграмме представлены интенсивности флуоресценции в мужском (1, 2) и женском (3, 4) пронуклеусе в разное время после копуляции в системах *in vivo* и *in vitro*.

Процессы деметилирования ДНК мыши были описаны в нескольких работах (Mayer et al., 2000; Santos et al., 2002; Beaujean et al., 2004c; Young and Beaujean, 2004). Однако время деметилирования мужского пронуклеуса мыши, указываемое разными авторами, различно. Данный факт можно объяснить тем, что использовались различные методы оплодотворения и отсчёта времени. Так, по данным Майер (Mayer et al., 2000), мужской пронуклеус мыши

сохраняет очень слабое метилирование через 8 ч после оплодотворения. К сожалению, авторы не описывают способ оплодотворения. В исследованиях, предпринятых Сантос (Santos et al., 2002), время деметилирования мужского пронуклеуса варьирует между 3 и 6 ч после микроинъекции спермы. Чтобы уточнить временную динамику деметилирования генома мыши, в диссертационной работе использовали метод датированной беременности для определения момента копуляции. 73 эмбриона мыши было проанализировано через разные промежутки времени после копуляции. Процент эмбрионов с характерным рисунком метилирования изменялся от 75 до 87 % (табл. 10). Первый контакт ооцита и сперматозоида мыши обнаруживался через 2 ч после копуляции. Как видно на рис. 4, А через 3 ч после копуляции можно наблюдать материнский и отцовский пронуклеусы идентично высокометилированные. У 1-клеточного эмбриона через 4 ч после копуляции отцовский пронуклеус существенно больше, чем материнский (рис. 3, С). Через 8 ч после копуляции отцовский пронуклеус окрашен менее интенсивно, чем женский и через 10 ч полностью деметилирован (рис. 3, Е, G). Проанализированы также эмбрионы, развивавшиеся в условиях *in vivo* и *in vitro*. Было найдено, что эмбрионы *in vitro* более метилированы, чем эмбрионы *in vivo* (рис. 3, I – *in vitro*, K – *in vivo*).

Табл. 10 Процент *in vivo* развившихся эмбрионов мыши с характерным рисунком ДНК метилирования

| Время после копуляции ч | Число эмбрионов | Эмбрионы с характерным рисунком метилирования ДНК, % |
|-------------------------|------------------|--|
| 3 | 16 (1-клеточные) | 87 (14/16) |
| 4 | 20 (1-клеточные) | 85 (17/20) |
| 8 | 17 (1-клеточные) | 76 (13/17) |
| 10 | 20 (1-клеточные) | 75 (15/20) |

Таким образом, у зигот как крыс, так и мышей происходит изменение рисунка метилирования ДНК, но с разной динамикой. Первое обнаружение мужского и женского пронуклеуса возможно через 3 ч после копуляции у мыши и через 6 ч у крысы. В 10 ч после копуляции мужской пронуклеус у мыши полностью деметилирован, а у крысы в то же время частично. Эти отличия можно объяснить видовой спецификой. Обнаружены различия в уровне метилирования ДНК у эмбрионов, развивающихся *in vitro* по сравнению с эмбрионами, развивающимися *in vivo* как у крыс, так и у мышей.

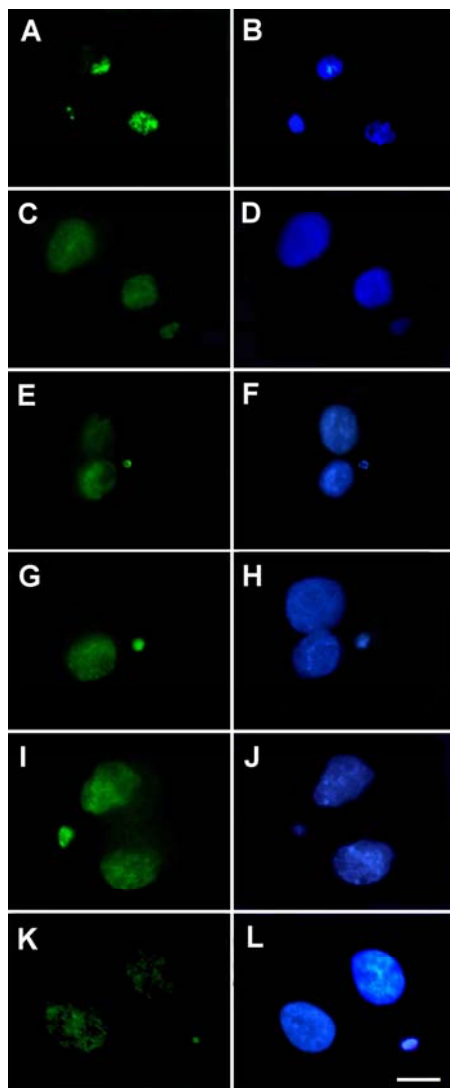


Рис. 4.

Деметилирование мужского пронуклеуса у ранних эмбрионов мыши.

Ядра эмбрионов окрашены FITC-связанными антителами против 5-MeC группы (зелёный цвет):

(A, C, E, G, I, K)

и контрастированы DAPI (голубой цвет):

(B, D, F, H, J, L)

развитие in vivo: A - J

система in vitro: K, L

Масштабная линейка 20

мкм.

Метилирование у партеногенетических и клонированных эмбрионов

Был исследован уровень метилирования у партеногенетических и клонированных эмбрионов крысы. У партеногенетических эмбрионов наблюдался высокий уровень метилирования ДНК как на 1-клеточной стадии, так и на 2- и 4-клеточной стадии по сравнению с контролем (естественное оплодотворение), динамика деметилирования отсутствует. Клонированные 2-клеточные эмбрионы также отличаются высоким уровнем метилирования.

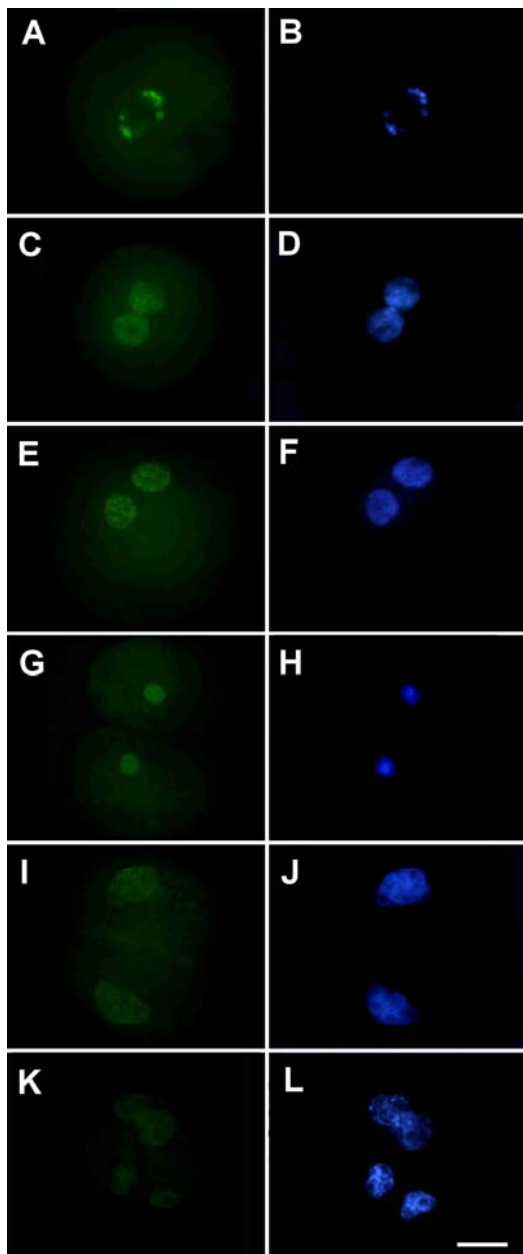


Рис. 5. Метилирование у партеногенетических эмбрионов крысы.

Ядра эмбрионов окрашены FITC связанными антителами против 5-МeС группы (зелёный цвет) (A, C, E, G, I, K) и контрастированы DAPI (голубой цвет) (B, D, F, H, J, L). Масштабная линейка 20 мкм.

A-5 ч после активации ооцита. C – 1-клеточный партеногенетический эмбрион через 10 ч после активации ооцита. E – 1-клеточный партеногенетический эмбрион через 16 ч после активации ооцита. G – 2- клеточный партеногенетический эмбрион через 24 ч после активации ооцита. I – 2- клеточный партеногенетический эмбрион через 30 ч после активации ооцита. K – 4 клеточный партеногенетический эмбрион через 48 ч после активации ооцита. Все партеногенетические эмбрионы сильно метилированы.

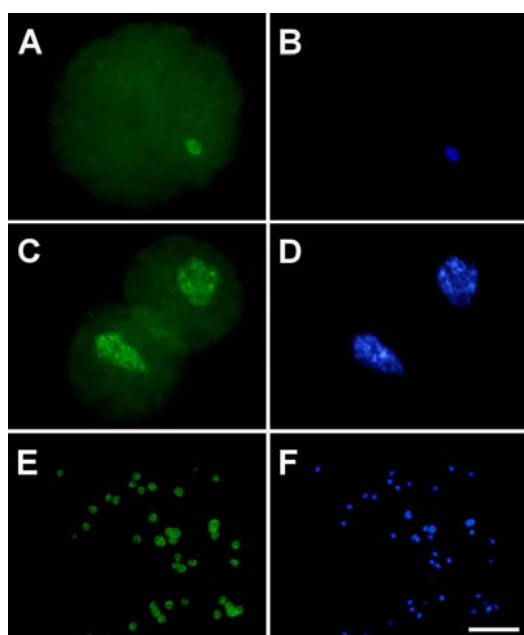


Рис. 6. Метилирование у клонированных эмбрионов крысы.

Ядра эмбрионов и кумюльных клеток окрашены FITC-связанными антителами против 5-МeС группы (зелёный цвет) (A, C, E) и контрастированы DAPI (голубой цвет) (B, D, F).

Масштабная линейка 20 мкм.

A, B – 1-клеточный клонированный эмбрион, 10 ч после активации ионами стронция.

C, D – 2-клеточный клонированный эмбрион, 30 ч после активации ионами стронция

E, F – кумюльные клетки

Выводы

1. Партеногенетическую активацию ооцитов крыс удаётся получить при действии различных активационных агентов: стронция, электроимпульса, этилового спирта. Воздействие ионов стронция (Sr^{2+}) оказалось наиболее эффективным. Этот агент подходит для активации ооцитов крыс всех возрастов, даёт большую долю животных, ооциты которых активируются с высокой частотой (так называемые «активные» животные) и обеспечивает высокую эффективность активации. Старые ооциты крыс (22-27 ч после инъекции хорионического гонадотропина человека — ХГЧ) склонны к спонтанной партеногенетической активации.

2. Способность ооцитов крыс к партеногенетической активации зависит от времени между инъекцией ХГЧ и моментом извлечения ооцитов из животного; более старые ооциты активируются с большей частотой (у «активных» животных). Эффективность партеногенетической активации у «неактивных» крыс не изменяется с увеличением возраста ооцита.

3. У крыс после активации стронцием, электроимпульсом, этиловым спиртом, а также после спонтанной активации с последующей диплоидизацией при помощи цитохалазина Б ооциты способны развиваться до стадии бластоцисты *in vitro* и до имплантации *in vivo*.

4. Этопозид не влияет на партеногенетическую активацию ооцитов крыс (формирование видимого пронуклеуса) и, в то же время, необратимо блокирует их дальнейшее развитие. При пересадке в такие ооциты ядер кумулюсных клеток (клонирование) процент получающихся 2-клеточных эмбрионов практически одинаков как после химической энуклеации с использованием этопозида, так и после механической энуклеации.

5. Эмбрионы, культивируемые *in vitro* со стадии ранней зиготы до 2-клеточной стадии, имеют более высокий уровень метилирования чем эмбрионы *in vivo* (то же наблюдается и у мышей).

6. Динамика деметилирования ДНК в нормальных зиготах крыс и мышей различна. Впервые мужской и женский пронуклеусы можно наблюдать у крыс через 6 ч после копуляции и через 3 ч у мышей. Через 10 ч после копуляции мужской пронуклеус у мыши полностью деметилирован, в то время как у крысы при аналогичных условиях — частично. Эти особенности можно объяснить видовыми различиями.

7. У партеногенетических эмбрионов вплоть до 4-клеточной стадии наблюдается высокий уровень метилирования, деметилирование отсутствует. Клонированные 2-клеточные эмбрионы также отличаются высоким уровнем метилирования.

Список публикаций по теме диссертации

Krivokharchenko A., Popova E., Zaitseva I., Vil'ianovich L., Ganten D., Bader M. 2003. Development of parthenogenetic rat embryos. *Biol. Reprod.* 68:829-36.

Zaitseva I., Zaitsev S., Alenina N., Bader M., Krivokharchenko A. 2007. Dynamics of DNA-demethylation in early mouse and rat embryos developed in vivo and in vitro. *Mol. Reprod. Dev.* 74:1255-61.

Зайцева Ю.А., Бадер М., Кривохарченко А.С. 2008. Получение двухклеточных реконструированных эмбрионов крысы после химической инактивации этопозидом хромосом ооцитов на стадии метафазы II. *Онтогенез.* 38: 340-344

Krivokharchenko A., Popova E., Zaitseva I., Vil'ianovich L., Ganten D., Bader M. 2002.

Parthenogenetic activation of rat embryos Abstract Book, p.196. 6-7 18-th Scientific Meeting of European Embryo Transfer Association, Rolduc, Niederlande.

Zaitseva I., Krivokharchenko A., Popova E., Vil'ianovich L., Ganten D., Bader M. 2003.

Chemical enucleation of rat oocytes. Proceed of XVII Working Meeting "Genetic Resource Conservation", 19-21 November, Pushchino, Russia.

Список цитируемой литературы

Barton S. C., Arney K. L., Shi W., Niveleau A., Fundele R., Surani M. A., Haaf T. 2001. Genome-wide methylation patterns in normal and uniparental early mouse embryos. *Hum. Mol. Genet.* 10: 2983-7. — *Beaujean N., Taylor J. E., McGarry M., Gardner J. O., Wilmut I., Loi P., Ptak G., Galli C., Lazzari G., Bird A. 2004c.* The effect of interspecific oocytes on demethylation of sperm DNA. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A* 101: 7636-40. — *Bjerregaard B., Wrenzycki C., Strejcek F., Laurincik J., Holm P., Ochs R. L., Rosenkranz C., Callesen H., Rath D., Niemann H. 2004.* Expression of nucleolar-related proteins in porcine preimplantation embryos produced in vivo and in vitro. *Biol. Reprod.* 70: 867-76. — *Elsheikh A. S., Takahashi Y., Katagiri S., Kanagawa H. 1998.* Functional enucleation of mouse metaphase II oocytes with etoposide. *Jpn. J. Vet. Res.* 45: 217-20. — *Fulka J., Jr., Notarianni E., Passoni L., Moor R. M. 1993.* Early changes in embryonic nuclei fused to chemically enucleated mouse oocytes. *Int. J. Dev. Biol.* 37: 433-9. — *Henery C. C., Kaufman M. H. 1993.* The incidence of aneuploidy after single pulse electroactivation of mouse oocytes. *Mol. Reprod. Dev.* 34: 299-307. — *Jiang J. Y., Mizuno S., Mizutani E., Sasada H., Sato E. 2002.* Parthenogenetic activation and subsequent development of rat oocytes in vitro. *Mol. Reprod. Dev.* 61: 120-5. — *Kaufman M. H. 1973.* Parthenogenesis in the mouse. *Nature.* 242: 475-6. — *Liu L., Trimarchi J. R., Keefe D. L. 2002.* Haploidy but not parthenogenetic activation leads to increased incidence of apoptosis in mouse embryos. *Biol. Reprod.* 66: 204-10. — *Marcus G. J. 1990.* Activation of cumulus-free mouse oocytes. *Mol. Reprod. Dev.* 26: 159-62. — *Mayer W., Niveleau A., Walter J., Fundele R., Haaf T. 2000.* Demethylation of the zygotic paternal genome. *Nature.* 403: 501-2. — *Miyoshi K., Kono T., Niwa K. 1997.* Stage-dependent development of rat 1-cell embryos in a chemically defined medium after fertilization in vivo and in vitro. *Biol. Reprod.* 56: 180-5. — *Niemann H., Wrenzycki C. 2000.* Alterations of expression of developmentally important genes in preimplantation bovine embryos by in vitro culture conditions: implications for subsequent development. *Theriogenology.* 53: 21-34. — *Niemann H., Wrenzycki C., Lucas-Hahn A., Brambrink T., Kues W. A., Carnwath J. W. 2002.* Gene expression patterns in bovine in vitro-produced and nuclear transfer-derived embryos and their implications for early development. *Cloning. Stem. Cells.* 4: 29-38. — *O'Neill G. T., Kaufman M. H. 1988.* Influence of postovulatory aging on chromosome segrega-

tion during the second meiotic division in mouse oocytes: a parthenogenetic analysis. *J. Exp. Zool.* 248: 125-31. — *Popova E., Bader M., Krivokharchenko A.* 2006. Full-term development of rat after transfer of nuclei from two-cell stage embryos. *Biol. Reprod.* 75: 524-30. — *Reik W., Dean W.* 2001. DNA methylation and mammalian epigenetics. *Electrophoresis.* 22: 2838-43. — *Rybouchkin A., Dozortsev D., de Sutter P. D., Dhont M.* 1996. Factors affecting the role of the spindle during early response of mouse oocytes to ethanol stimulation. *J. Exp. Zool.* 275: 469-75. — *Santos F., Hendrich B., Reik W., Dean W.* 2002. Dynamic reprogramming of DNA methylation in the early mouse embryo. *Dev. Biol.* 241: 172-82. — *Shi W., Haaf T.* 2002. Aberrant methylation patterns at the two-cell stage as an indicator of early developmental failure. *Mol. Reprod. Dev.* 63: 329-34. — *Young L. E., Beaujean N.* 2004. DNA methylation in the preimplantation embryo: the differing stories of the mouse and sheep. *Anim. Reprod. Sci.* 82-83: 61-78. — *Zernicka-Goetz M.* 1991. Spontaneous and induced activation of rat oocytes. *Mol. Reprod. Dev.* 28: 169-76. — *Zhou Q., Renard J. P., Le Friec G., Brochard V., Beaujean N., Cherifi Y., Fraichard A., Cozzi, J.* 2003. Generation of fertile cloned rats by regulating oocyte activation. *Science* 302: 1179.