

Untersuchungen zur mRNA-Expression histonmodifizierender Gene in bovinen präimplantatorischen Embryonen

M. Nowak-Imialek, C. Wrenzycki, D. Herrmann, A. Lucas-Hahn, E. Lemme, K.-G Hädeler,
H. Niemann

Institut für Tierzucht (FAL), Mariensee, Forschungsbereich Biotechnologie
31535 Neustadt am Rübenberge

Eine bedeutende Rolle in der Regulation der embryonalen Genexpression spielen epigenetische Mechanismen, wie z.B. DNA-Methylierung und Histonmodifikationen. Histone dienen nicht nur als Verpackungsmaterial der DNA, sondern können auf verschiedene Arten chemisch modifiziert sein und in Folge davon das Expressionsmuster der Gene verändern. Eine Acetylierung der Histone findet sich im aktiv transkribierten Chromatin (Euchromatin). Durch Histonacetyltransferasen (HAT) werden Acetylreste auf bis zu 4 Lysin-Reste in den Histonen H2A, H2B, H3 und H4 übertragen. Acetylierungen sind reversibel durch Deacetylasen, die die Bindungsfähigkeit von Aktivierungsfaktoren beschränken und dadurch die Genexpression hemmen. Störungen, die das Gleichgewicht zwischen Acetylierung und Deacetylierung beeinträchtigen, führen zu Veränderungen in der Expression bestimmter Gene. Die Anheftung von Methylgruppen an die Aminogruppe der Lysin-Reste bei den Histonen H3 und H4 entscheidet darüber, welche Gene bei der Entwicklung abgeschaltet werden.

Während unserer Untersuchungen wurden Gene, die bei der Histonmodifizierung beteiligt sind, in geklonten, parthenogenetischen, androgenetischen, in vivo und in vitro produzierten bovinen präimplantatorischen Embryonen mittels eines semi-quantitativen Endpunkt-RT-PCR-Assays nachgewiesen. Es wurden Histonacetyltransferase 1 (HAT1) und Histondeacetylase 2 (HDAC2) sowie Histonmethyltransferasen (G9A, Suv39H1) und das Heterochromatin-assoziierte Protein 1 (HP1) untersucht. Weiterhin wurde ZAR1 (zygotisch arrest gen 1) das nur vom maternalen Genom transkribiert wird und wahrscheinlich an der chromatinvermittelten Transkriptionsregulation beteiligt ist, untersucht.

ZAR1-mRNA zeigte einen signifikanten Abfall während der Eizellreifung und ebenso nach der Befruchtung. In Morulae- und Blastozystenstadien konnte das Transkript nicht nachgewiesen werden.

Ein signifikanter Abfall der HDAC2-mRNA konnte nach artifizieller Aktivierung, Befruchtung und nach somatischem Kerntransfer in Zygoten im Vergleich zu unreifen und gereiften Eizellen beobachtet werden. Blastozystenstadien zeigten Unterschiede im Transkriptgehalt zwischen androgenetischen und parthenogenetischen, SOF- und Kerntransferembryonen, die mit weiblichen Spenderzellen erstellt wurden.

Die HAT1-Transkripte waren signifikant unterschiedlich zwischen unreifen Eizellen und solchen nach der Eukleation sowie nach Eukleation und Aktivierung. HAT1-mRNA zeigte weiterhin einen erhöhten Transkriptgehalt zwischen Zygoten nach Kerntransfer, die mit weiblichen Spenderzellen erstellt worden waren, im Vergleich zu SOF- und parthenogenetischen Zygoten sowie solchen nach artifizieller Aktivierung. Im 8-16-Zell-Stadium sowie im Blastozystenstadium wurden keine Unterschiede im Transkriptgehalt nachzuweisen.

Die Histonmethyltransferasen (Suv39H1, G9A) und HP1 zeigten einen signifikanten Abfall im Transkriptgehalt in Eizellen nach der Eukleation und nach artifizieller Aktivierung im Vergleich zu unreifen Eizellen. Weiterhin wiesen Kerntransferzygoten, die mit weiblichen Spenderzellen erstellt worden, eine signifikante Erhöhung des Transkripts im Vergleich zu artifiziell aktivierten Eizellen auf. Unterschiede im Gehalt an Suv39H1-mRNA konnte auch zwischen Zygoten nach Kerntransfer (weibliche Spenderzellen) und parthenogenetischen, sowie in Zygoten aus dem SOF- und TCM-System nachgewiesen werden. Im 8-16-Zell-Stadium zeigten nur Suv39H1-Transkripte signifikante Unterschiede zwischen parthenogenetisch aktivierten Embryonen im Vergleich zu androgenetischen und TCM-Embryonen sowie solchen Embryonen, die mit weiblichen und männlichen Spenderzellen erstellt worden waren. Im Blastozystenstadium zeigten die Transkripte der Histonmethyltransferasen und HP1 signifikante Unterschiede zwischen nach Kerntransfer erstellten (männliche Spenderzellen) Embryonen und in vivo gewonnenen Embryonen. HP1-mRNA unterschied sich zwischen Blastozysten nach Kerntransfer mit männlichen Spenderzellen im Vergleich zu parthenogenetischen und Kerntransfer-Embryonen, die mit weiblichen Spenderzellen erstellt worden waren. Weiterhin unterschieden sich im Transkriptgehalt SOF- und TCM-Blastozysten von in vivo gewonnenen Blastozysten. Suv39H1-mRNA war signifikant unterschiedlich zwischen parthenogenetisch aktivierten und SOF-erzeugten Blastozysten im Vergleich zu In vivo-Blastozysten. Signifikante Unterschiede wurden auch im Transkriptgehalt von G9A-mRNA zwischen Embryonen nach Kerntransfer mit männlichen Spenderzellen im Vergleich zu solchen, die mit weiblichen Spenderzellen erstellt worden waren, nachgewiesen.

Diese Ergebnisse zeigen, dass der Nachweis der Gene, die bei den Histonmodifikationen beteiligt sind, einen detaillierten Einblick in die Transkriptionsaktivität präimplantatorischer Rinderembryonen ermöglichen. Es wurde gezeigt, dass in vitro produzierte bovine Blastozysten sich von in vivo generierten Blastozysten im Expressionmuster dieser Gene unterscheiden. Deutliche Unterschiede zwischen geklonten weiblichen Zygoten im Vergleich zu den anderen Versuchsgruppen bei Histonmethyltransferasen, -acetylasen und Heterochromatin-assoziiertem Protein 1 könnten auf einen Reprogrammierungseffekt hindeuten. Die Techniken der In-vitro-Manipulation können während der Embryonalentwicklung zur einer erhöhten sowie herabgesetzten Genexpression führen.

Wir bedanken uns für die Erstellung der androgenetischen Blastozysten bei I.Lagutina und C.Galli aus Laboratorio di Tecnologie della Riproduzione, Istituto Sperimentale Italiano Lazzaro Spallanzani, Ceramona (Italien).