

Μεταφορά μητρικής ατράκτου (MST) για την πρόληψη μιτοχονδριακών νόσων και της υπογονιμότητας

*Επιστημονική ομάδα MST Project
Institute of Life – Embryotools*

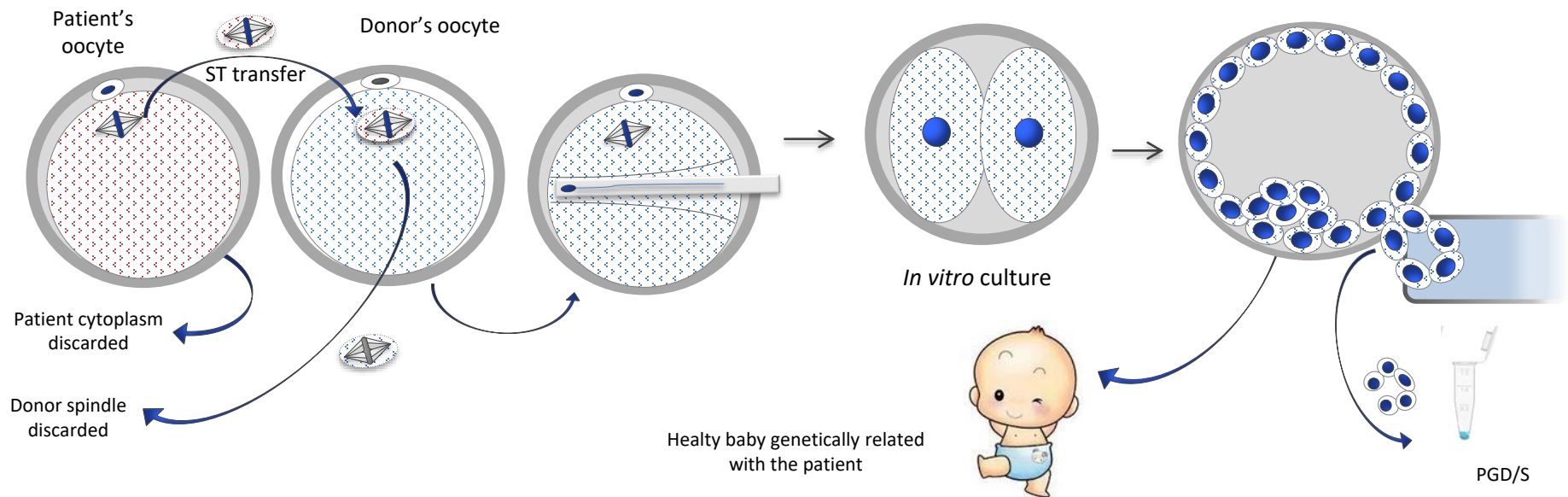


Μεταφορά μητρικής ατράκτου

Οι θεραπείες μιτοχονδριακής αντικατάστασης έχουν προταθεί για την πρόληψη της μετάδοσης μιτοχονδριακών ασθενειών.

Κληρονομούμενο από τη μητέρα | μπορεί να οδηγήσει σε σοβαρές ασθένειες;

Η μεταφορά της μητρικής ατράκτου βασίζεται στη μεταφορά της μειοτικής ατράκτου από ένα δυσλειτουργικό ωκύτταρο σε ένα εκπυρηνισμένο ωκύτταρο υγιούς δότριας;



Μεταφορά μητρικής ατράκτου

Οι θεραπείες μιτοχονδριακής αντικατάστασης έχουν προταθεί για την πρόληψη της μετάδοσης μιτοχονδριακών ασθενειών.

Κληρονομούμενο από τη μητέρα | μπορεί να οδηγήσει σε σοβαρές ασθένειες.

Η μεταφορά της μητρικής ατράκτου βασίζεται στη μεταφορά της μειοτικής ατράκτου από ένα δυσλειτουργικό ωκύτταρο σε ένα εκπυρηνισμένο ωκύτταρο υγιούς δότριας.

Μια πρόσφατη κλινική εφαρμογή αυτής της τεχνικής οδήγησε στη γέννηση του πρώτου παιδιού το 2016.



Article

Live birth derived from oocyte spindle transfer to prevent mitochondrial disease



John Zhang ^{a,b,*}, Hui Liu ^b, Shiyu Luo ^c, Zhuo Lu ^b,
Alejandro Chávez-Badiola ^a, Zitao Liu ^b, Mingxue Yang ^b, Zaher Merhi ^d,
Sherman J Silber ^e, Santiago Munné ^f, Michalis Konstantinidis ^f,
Dagan Wells ^g, Taosheng Huang ^{c,*}

Διερεύνηση της σκοπιμότητας της χρήσης της τεχνικής της μεταφοράς μειωτικής ατράκτου (ST) για την αντιμετώπιση της πτωχής εμβρυικής ανάπτυξης.

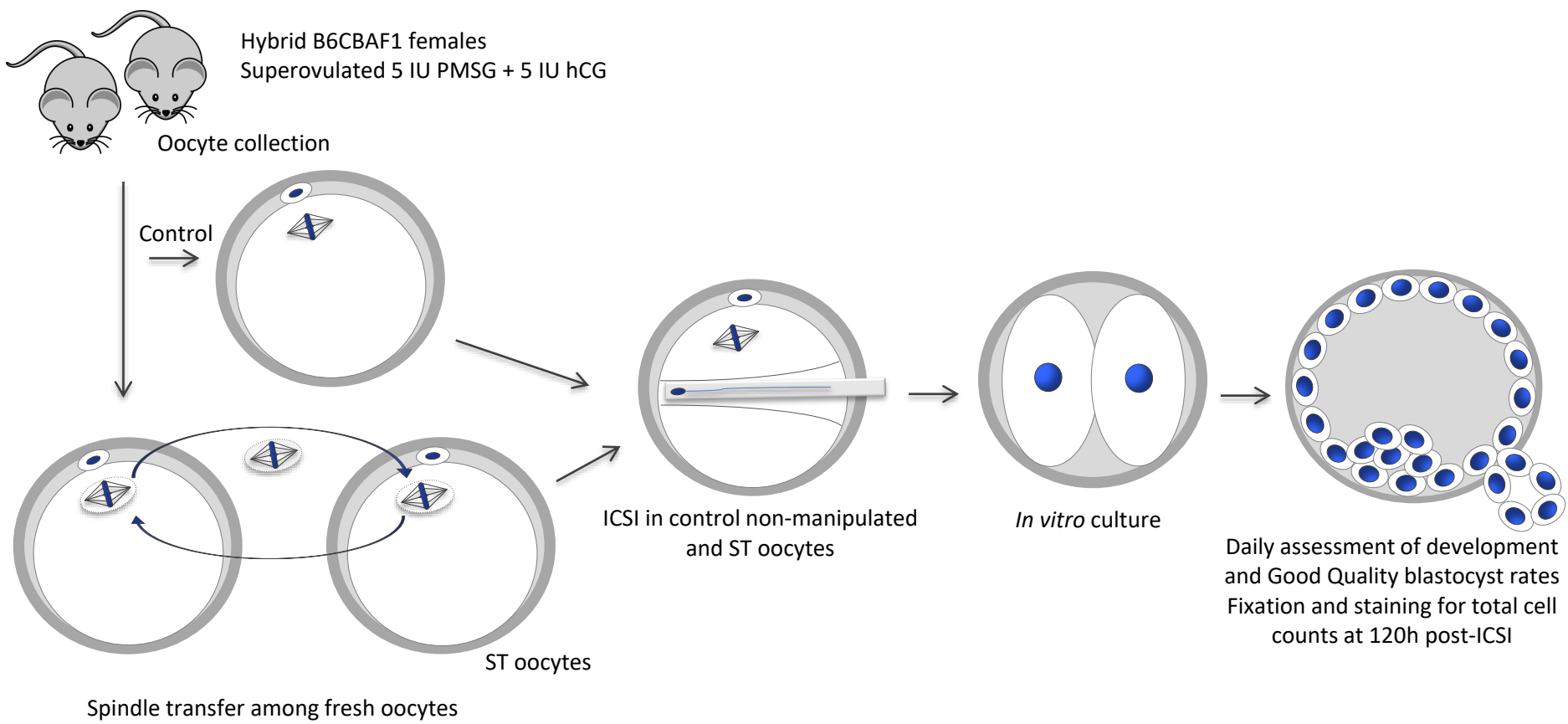
Απόδειξη της έννοιας στο μοντέλο του ποντικιού :

- Σύγκριση της ανάπτυξης in vitro και in vivo των εμβρύων που παράγονται από το ST και των αντίστοιχων εμβρύων μαρτύρων.
- Αξιολόγηση των επιπέδων mtDNA που μεταφέρονται κατά τη διάρκεια ST τόσο σε προεμφυτευτικά έμβρυα όσο και σε διαφορετικά όργανα (πλακούντα, ουρά, εγκεφάλου, νεφρού, ήπατος και καρδιάς) των παραγόμενων ποντικών.
- Παρακολούθηση της κατάστασης της υγείας, της συμπεριφοράς και της γονιμότητας των ST ποντικών σε διάφορες γενιές.

ΠΕΙΡΑΜΑ 1

Πειραματικός σχεδιασμός

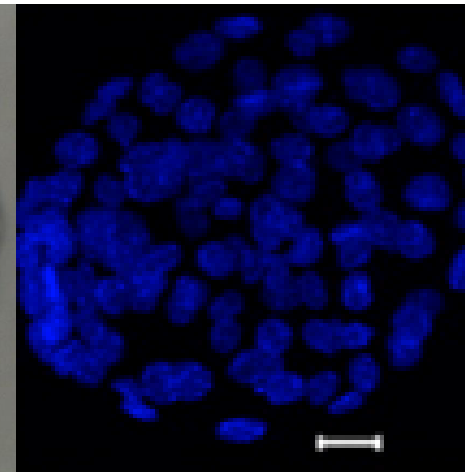
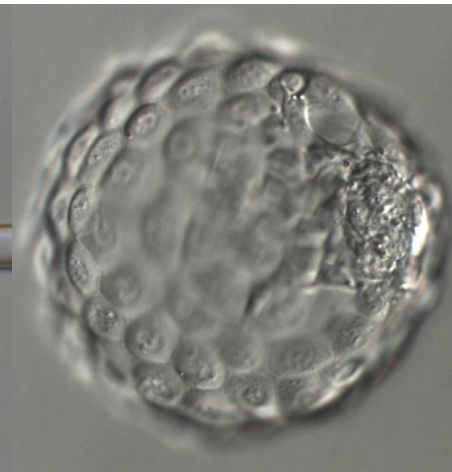
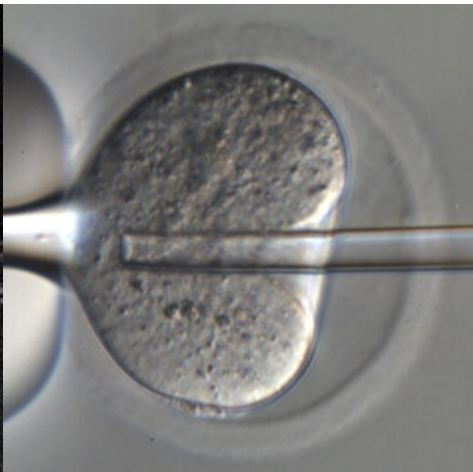
Πείραμα 1: Επικύρωση πρωτοκόλλου με αμοιβαία ST σε υβριδικά ωκύτταρα ποντικού B6CBAF1. Ποσοστό επιτυχούς εκπυρήνιση και σύντηξης | Μορφολογία ατράκτου | *in vitro* ανάπτυξη | αριθμός κυττάρων



Μεθοδολογία και αποτελέσματα

Πείραμα 1: Επικύρωση πρωτοκόλλου με αμοιβαία ST σε υβριδικά ωκύτταρα ποντικού B6CBAF1. Ποσοστό επιτυχούς εκπυρήνιση και σύντηξης | Μορφολογία ατράκτου | *in vitro* ανάπτυξη | αριθμός κυττάρων

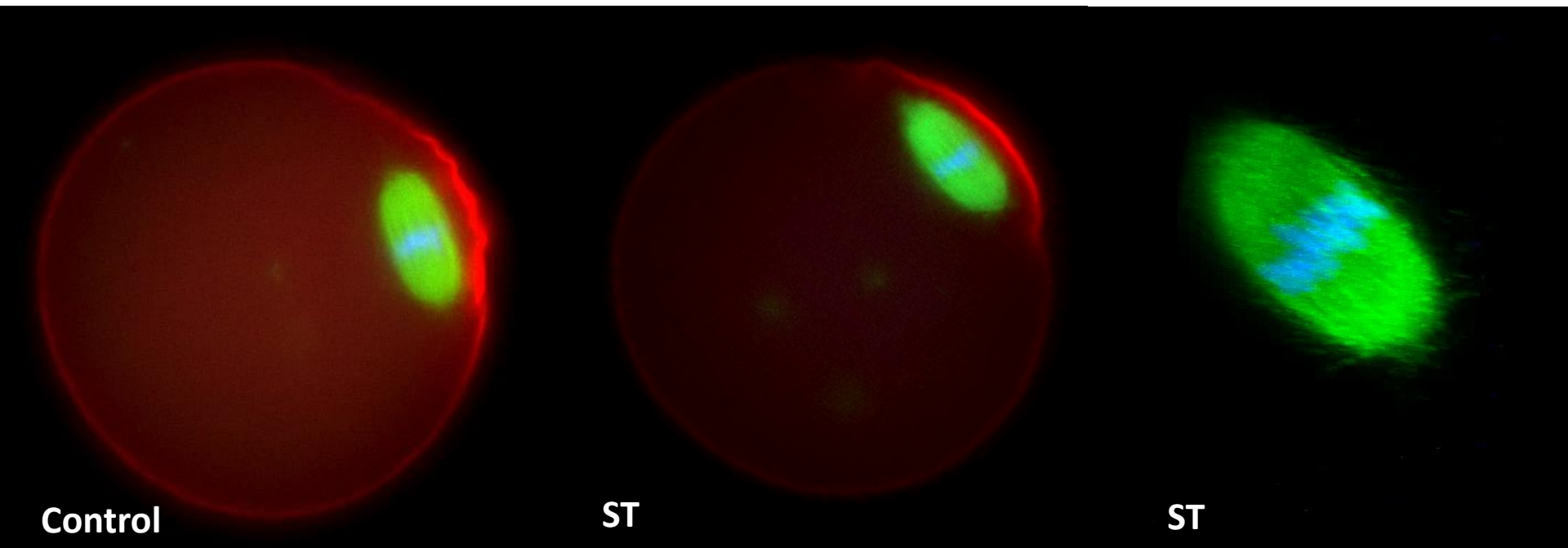
	n	n Εκπυρηνισμένα (%)	n Συντιγμένα (%)	n Επιβίωση ICSI (%)	n Ποσοστό βλαστοκύστεων (%)	n Άριστη μορφολογία (%)	Αριθμός κυττάρων mean ± SD
Control ICSI	85	N/A	N/A	85 (94.3)	77 (90.5)	72 (92.2)	193.5 ± 45.3
ST + ICSI	107	102 (95.3)	100 (98.0)	91 (91.0)	81 (89.0)	68 (84.0)	177.8 ± 48.2



Μεθοδολογία και αποτελέσματα

Πείραμα 1: Επικύρωση πρωτοκόλλου με αμοιβαία ST σε υβριδικά ωκύτταρα ποντικού B6CBAF1. Ποσοστό επιτυχούς εκπυρήνιση και σύντηξης | Μορφολογία ατράκτου | *in vitro* ανάπτυξη | αριθμός κυττάρων

	n	n ωκυττάρων που αναλύθηκαν (%)	
		Ομαλές μορφολογικά άτρακτοι (%)	Ομαλή χρωμοσωμική διανομή(%)
Control fresh	13	13 (100.0)	13 (100.0)
ST (Fresh-fresh)	20	20 (100.0)	20 (100.0)



ΠΕΙΡΑΜΑ 2

Πειραματικός σχεδιασμός

Πείραμα 2: Απόδειξη της έννοιας με χρήση ωοκυττάρων ποντικού NZB και B6CBAF1 Ποσοστό επιτυχούς εκπυρήνιση και σύντηξης | *in vitro* and *in vivo* ανάπτυξη



Research Models and Services
Inbred Mice



NZB (New Zealand Black)

Origin
Inbred mice from Imperial Cancer Research Fund, London, to University of Chicago Medical School in 1930. Inbred by Bleschowsky in 1948. A number of other strains, including NZC, NZC, NZX and NZY, were developed from the same stock (Bleschowski and Goodwin, 1970). Strain NZW was derived from the same outbred stock, but was inbred independently by Hall (Hall and Swegen, 1973).

NZB/OlaHsd
To Laboratory Animals Centre, Carshalton in 1964, to OLAC (now Envigo) in 1979.

Research applications
Autoimmunity, behavior, immunology, reproduction, lupus erythematosus, neurone ectopia, nephropathy, hippocampus.

Characteristics

Animal model
The NZB is a mouse model for autoimmune anemia, immune complex glomerulonephritis, systemic lupus erythematosus.

Anatomy
About 30-40% develop neocortical ectopic thymic tissue with incomplete penetrance (Festing, 1976). High bone density of femur (Festing, 1976). The comparative study of changes in autoimmune and normal strains, very important changes of the large medullary cells, involved in the formation of Hassall's corpuscles occur in NZB, NZW and NZB x NZW F1. The NZB mice the large epithelial cells decreased in number in the first weeks after birth. The depletion of epithelial cells, ascribed to a secondary degeneration soon after birth (De Vries and Hignam, 1973).

Behavior
High balsam wood gnawing activity (Fawcington and Festing, 1990).


Drugs
High coumarin hydroxylating ability (Lush and Arnold, 1973). Fenobarbital (p. induces hepatic epoxide hydrolase (Desch et al, 1973). Sensitive to lethal effects of ozone (Goldstein et al, 1973). Resistant to the induction of atherosclerosis by an atherogenic diet (Paigen et al, 1990). The administration of synovial fluid of rheumatoid arthritis patients induced production of autoantibodies in NZB, NZW and NZB x NZW F1 mice but not in CBA mice (Abedi-Valugi et al, 1994).

Genetics
Coat color genes - a, B, C, D: black.
Histocompatibility - H-2^d.
Biochemical markers - Apoa-1, Car-2^d, Es-1^d, Es-2^d, Es-3^d, Gpi-1^d, Gpi-1^d, Hbbf, Igh-1^d, Ldl-1^d, Mod-1^d, Pgm-1^d.

Reproduction


Poor reproductive performance. Litter size 3.8 at weaning, colony output 0.5 young/ female/week (Festing, 1976). First litter size high but fourth litter low. Low proportion of females produce four or more litters and low percentage of fertile matings (Fernandes et al, 1973). Intermediate breeding performance (Hansen et al, 1973).

Divergent mitochondrial haplotypes (SNP located at position m.3932)



RESEARCH MODELS

Rats
Mice
Other rodents



B6CBAF1 Mouse

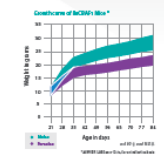
- Strain name: B6CBAF1/JRj
- Type: Hybrid mouse
- Origin: from ♀ C57BL/6J and ♂ CBA/JRj (from JANVIER LABS)
- Colour and related genotype: Agouti mouse, A/a, Pde6b^{+/+}, MHC: Haplotype H2^{Db}
- Breeding: Easy to rear, good maternal instinct

Description of our model

These F1 hybrids are the result of a cross between a C57BL/6J female and a CBA/JRj male. F1 hybrids are heterozygous at every locus provided that the parental strains have different alleles. As is the case with inbred strains, they are genetically and phenotypically uniform.

F1 hybrids are often used for their hybrid vigour (resistance and activity). They are especially interesting as genetic background (vigour and repeatability of genetic inheritance) for harmful phenotype models, for tissue transplantation, to determine mechanisms of inheritance, to create or improve expression of polygenic disease.

F1 hybrid females are used at JANVIER LABS' as surrogate mothers for embryo transfer thanks to their maternal qualities.

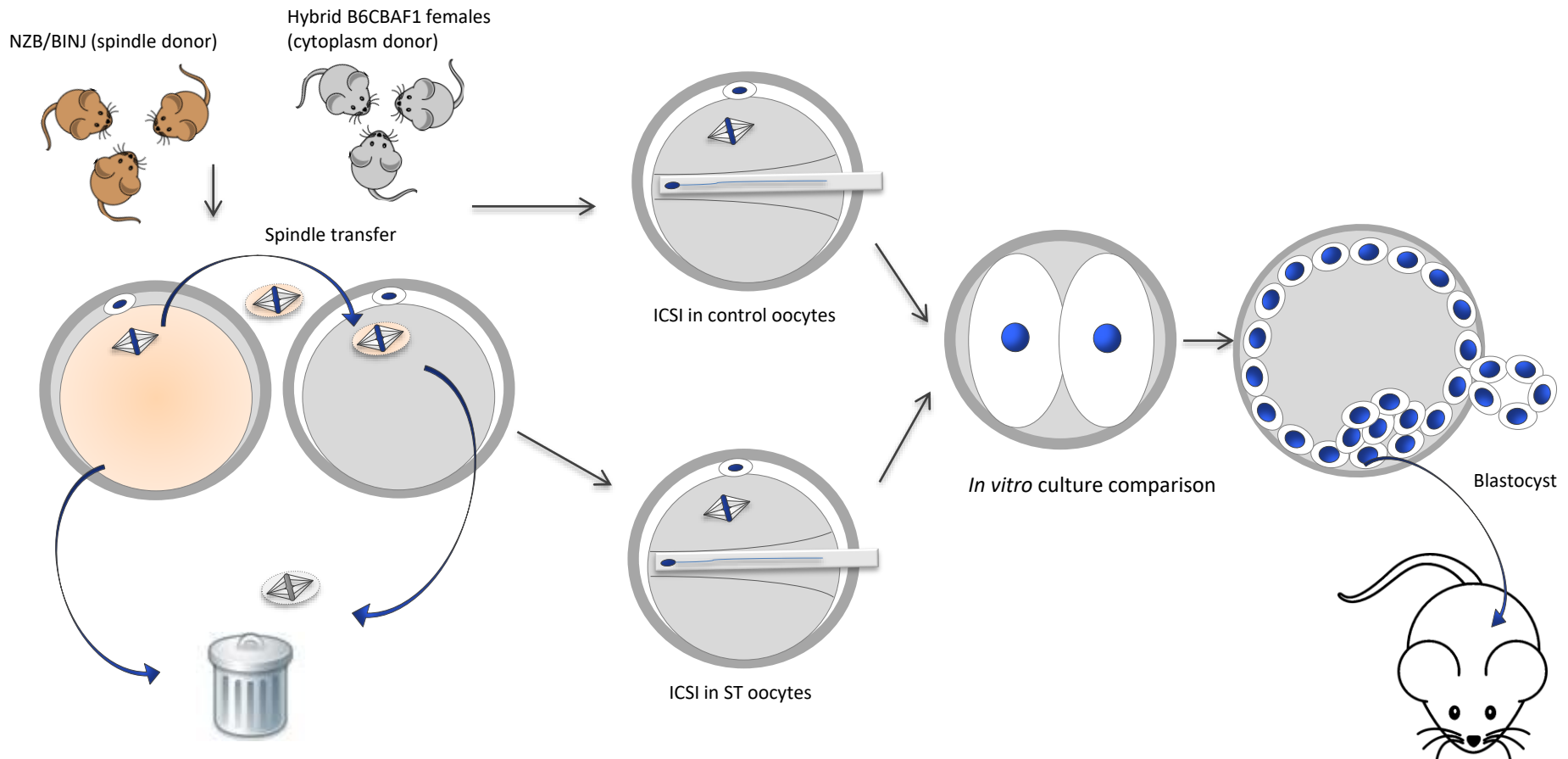


Graph showing Mean Weight (g) vs Age (days) for B6CBAF1 Mice. The graph shows a steady increase in weight over time, reaching approximately 25g by 77 days.

Excellent reproductive performance

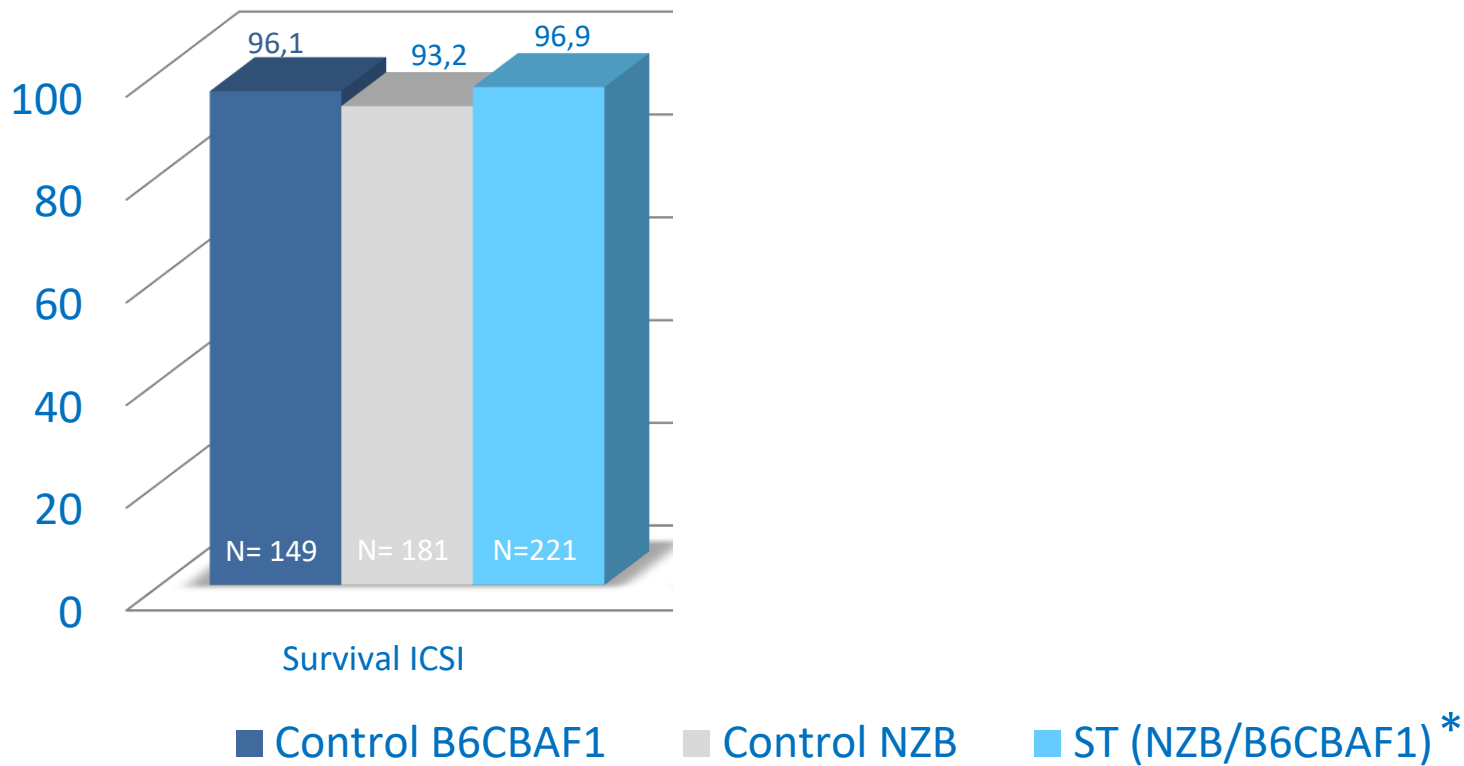
Πειραματικός σχεδιασμός

Πείραμα 2: Απόδειξη της έννοιας με χρήση ωοκυττάρων ποντικού NZB και B6CBAF1 Ποσοστό επιτυχούς εκπυρήνιση και σύντηξης | *in vitro* and *in vivo* ανάπτυξη



Μεθοδολογία και αποτελέσματα

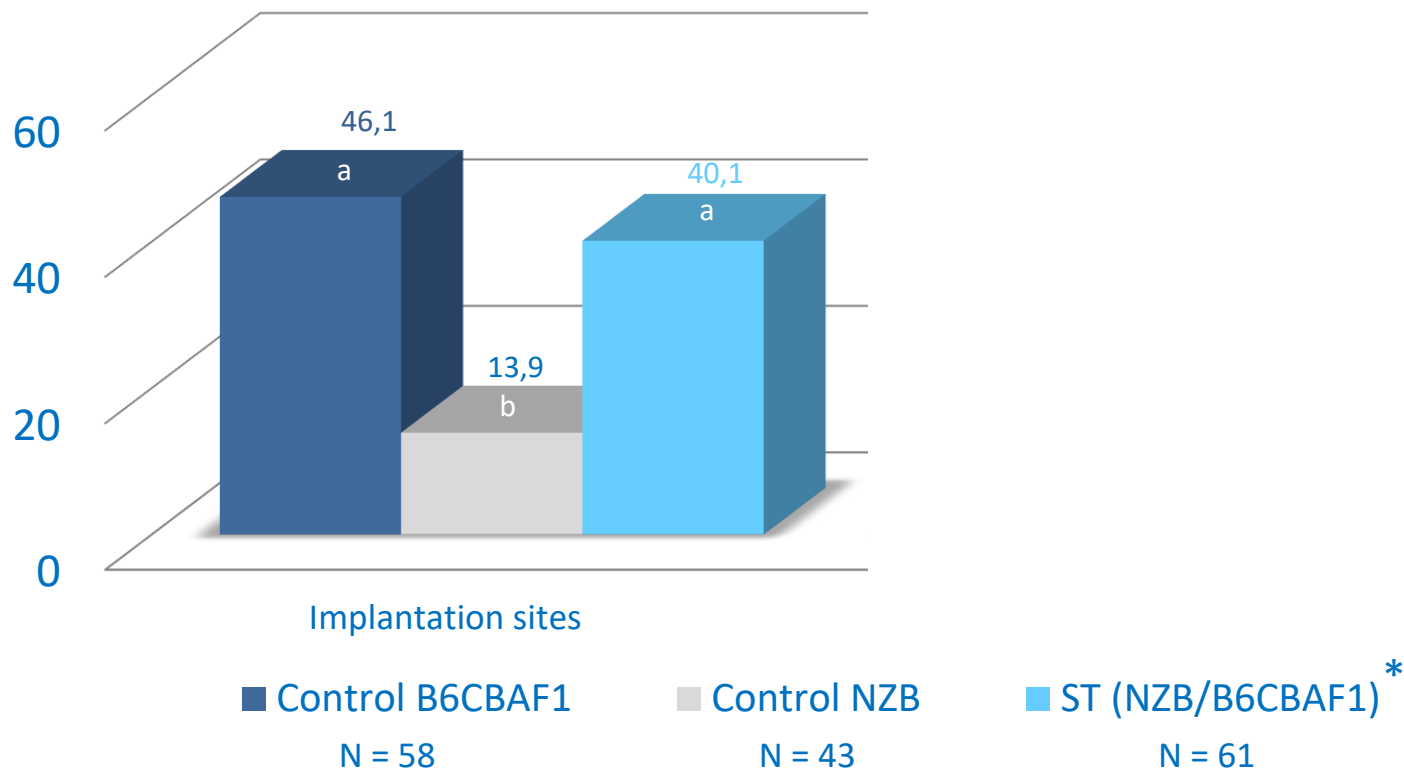
Πείραμα 2: *in vitro* ανάπτυξη



* NZB spindle transferred into B6CBAF1 cytoplasm (ST Group: N = 275 | 98% Enucleation rates | 95.7% Fusion rates).
^{a,b} differ statistically significantly $p < 0.05$.

Μεθοδολογία και αποτελέσματα

Πείραμα 2: *in vivo* development



* NZB spindle transferred into B6CBAF1 cytoplasm.

^{a,b} differ statistically significantly $p < 0.05$.

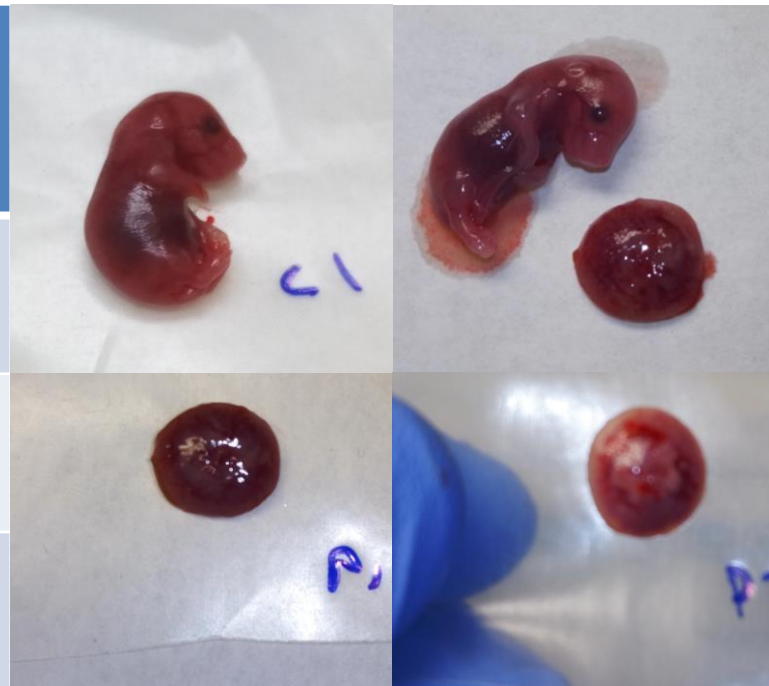
Μεθοδολογία και αποτελέσματα

Πείραμα 2: Βάρος πλακούντα και νεογνών

	Μέσο βάρος πλακούντα (\pm SD)	Μέσο βάρος νεογνών (\pm SD)
Control ICSI (B6CBAF1)	N/A	N/A
Control ICSI (NZB)	171.1 mg (27.9)	747 mg (76.9)
ST (NZB/B6CBAF1)*	168.3 mg (14.0)	923.5 mg (146.5)

Control

ST



* Spindle from B6CBAF1 strain transferred into NZB cytoplasm

Μεθοδολογία και αποτελέσματα



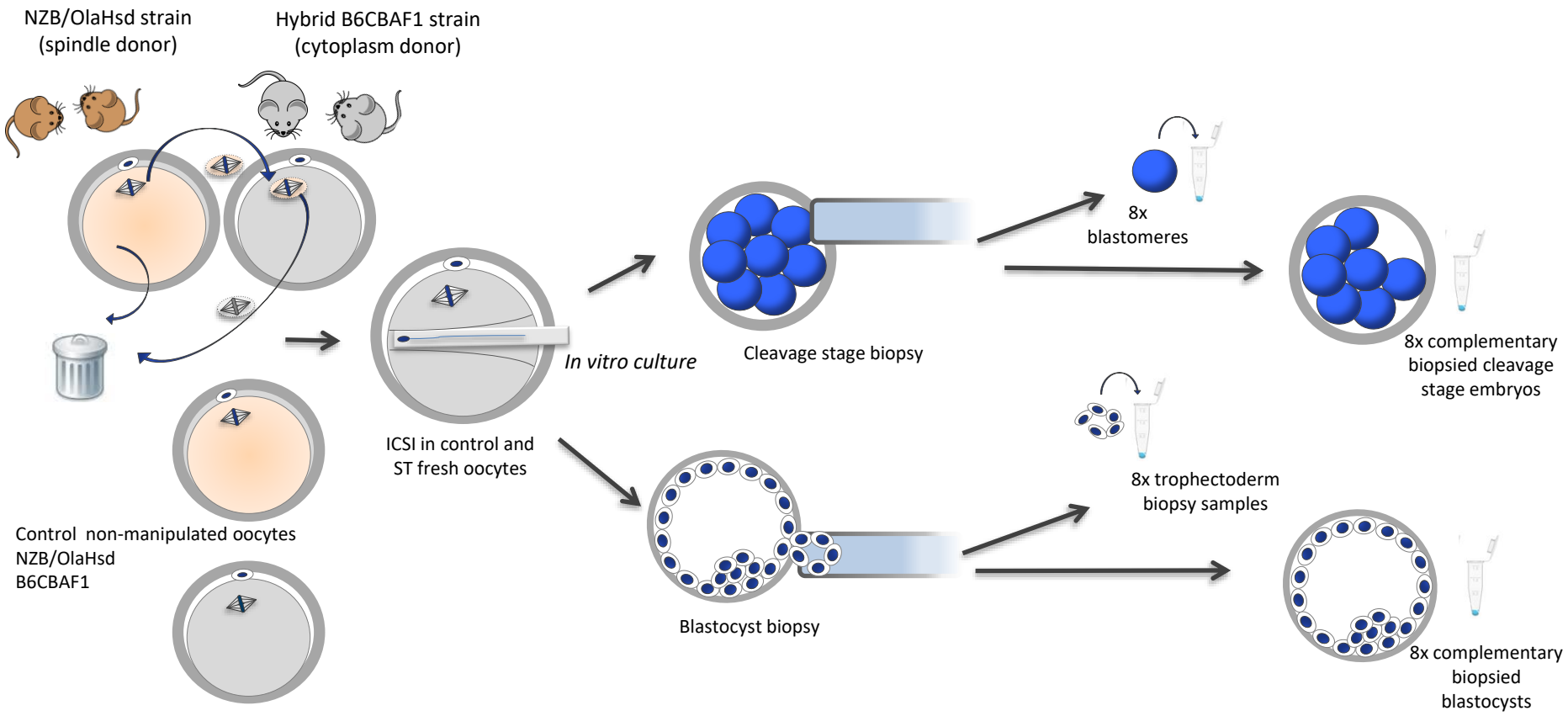
Πείραμα 2: ST (NZB/B6CBAF1) νεογνά μερικών ημερών



ΠΕΙΡΑΜΑ 3

Πειραματικός σχεδιασμός

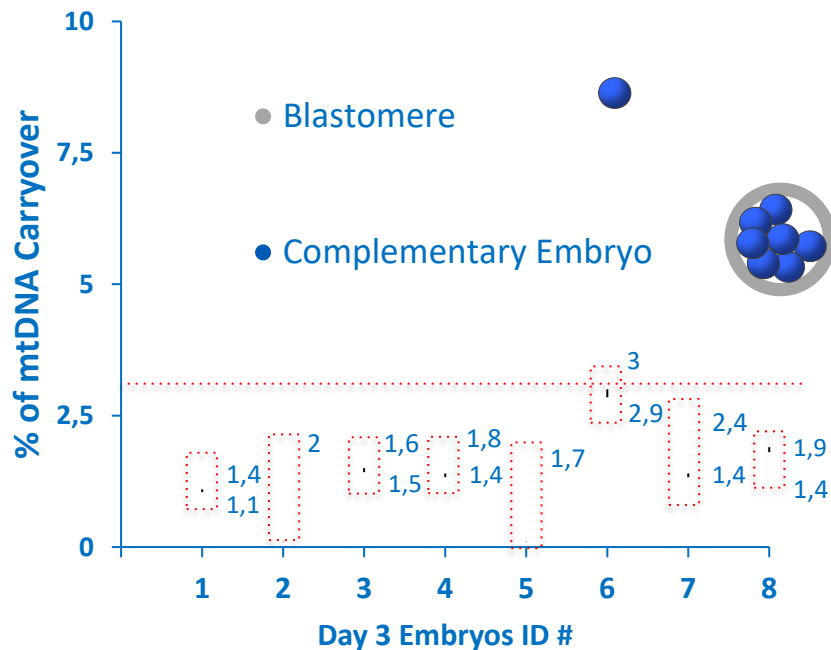
Πείραμα 3: mtDNA carryover σε δείγματα βιοψίας και συμπληρωματικά έμβρυα



Μεθοδολογία και αποτελέσματα

Πείραμα 3: mtDNA carryover σε δείγματα βιοψίας και συμπληρωματικά έμβρυα

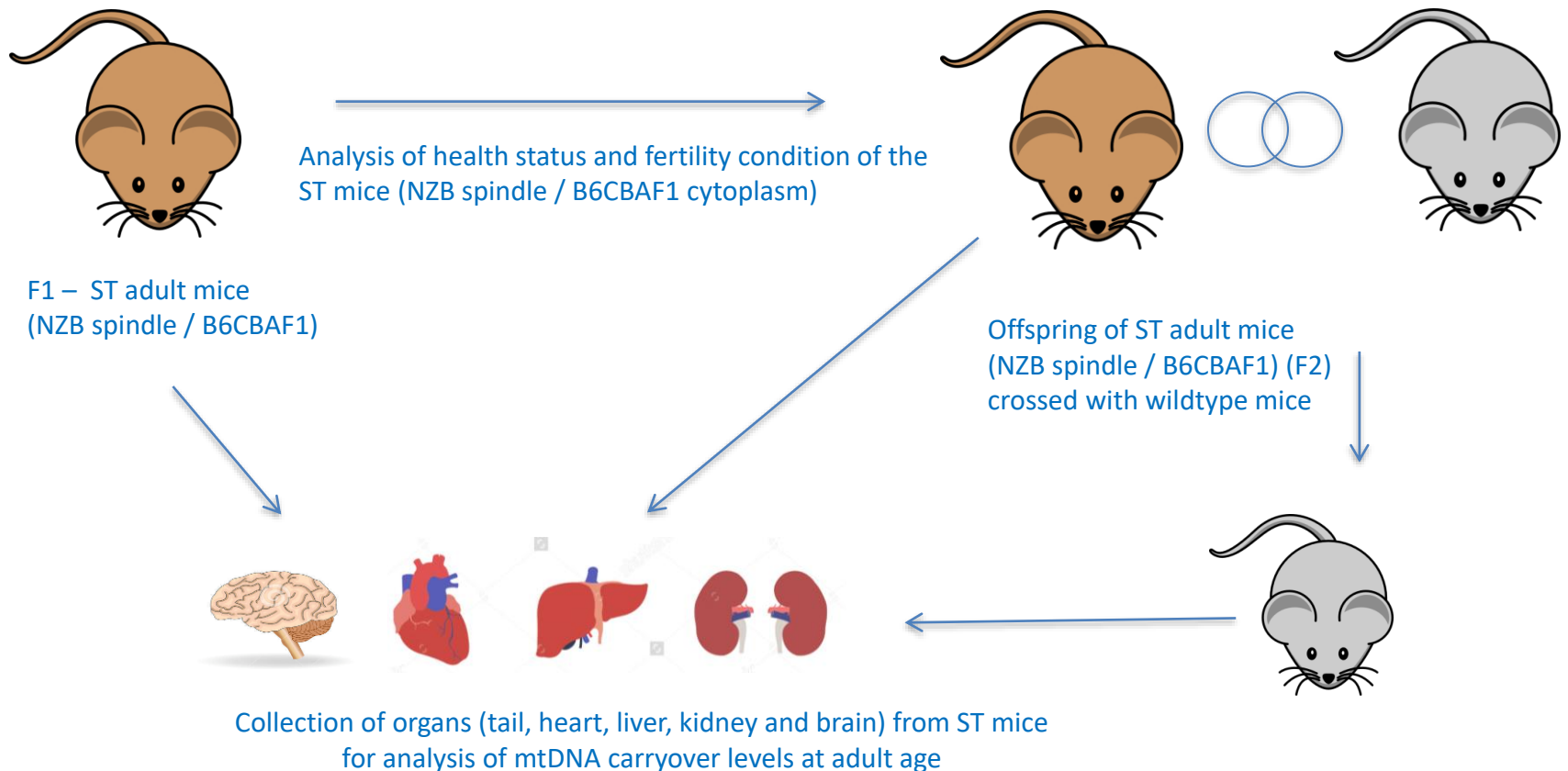
Ετεροπλασμία σε δείγματα βιοψίας και συμπληρωματικά έμβρυα (Day 3 & Day 5)



ΠΕΙΡΑΜΑ 4

Πειραματικός σχεδιασμός

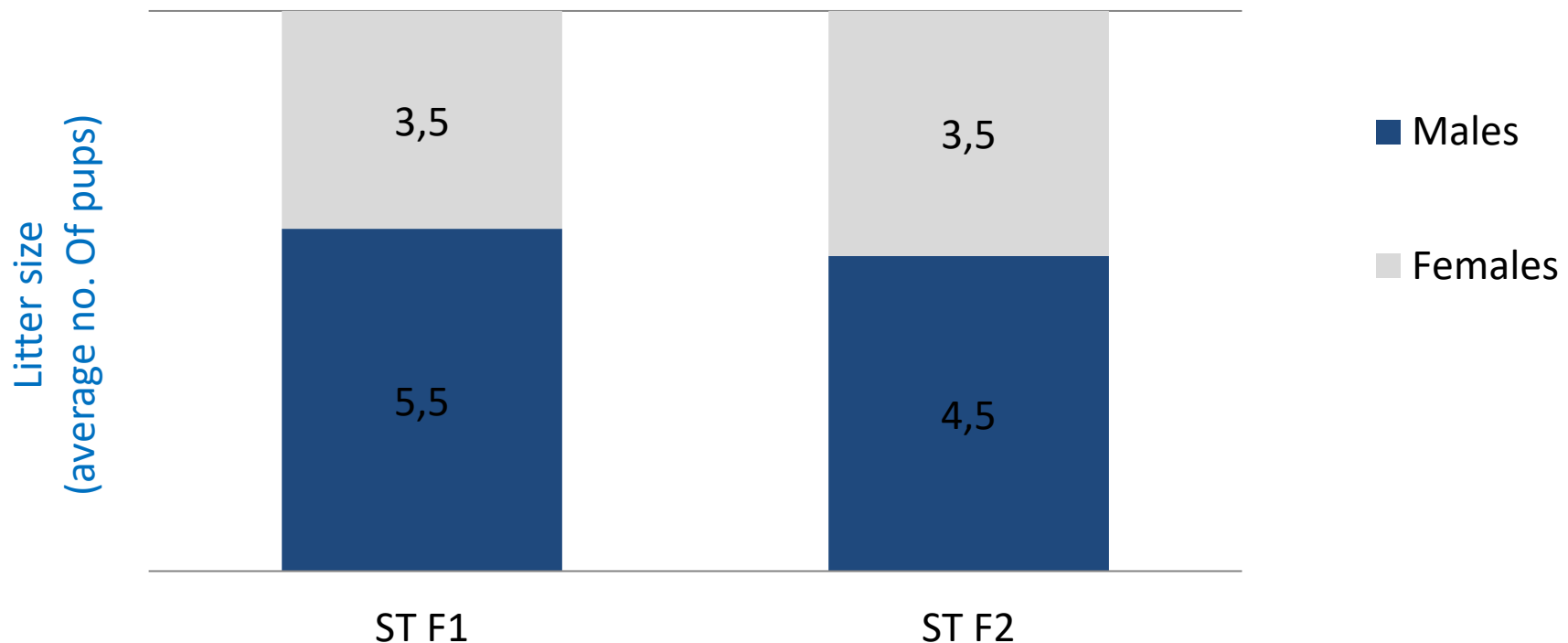
Πείραμα 4: Γονιμότητα και ποσοστό ετεροπλάσμιας σε όργανα ενηλίκων ST ποντικών



Μεθοδολογία και αποτελέσματα

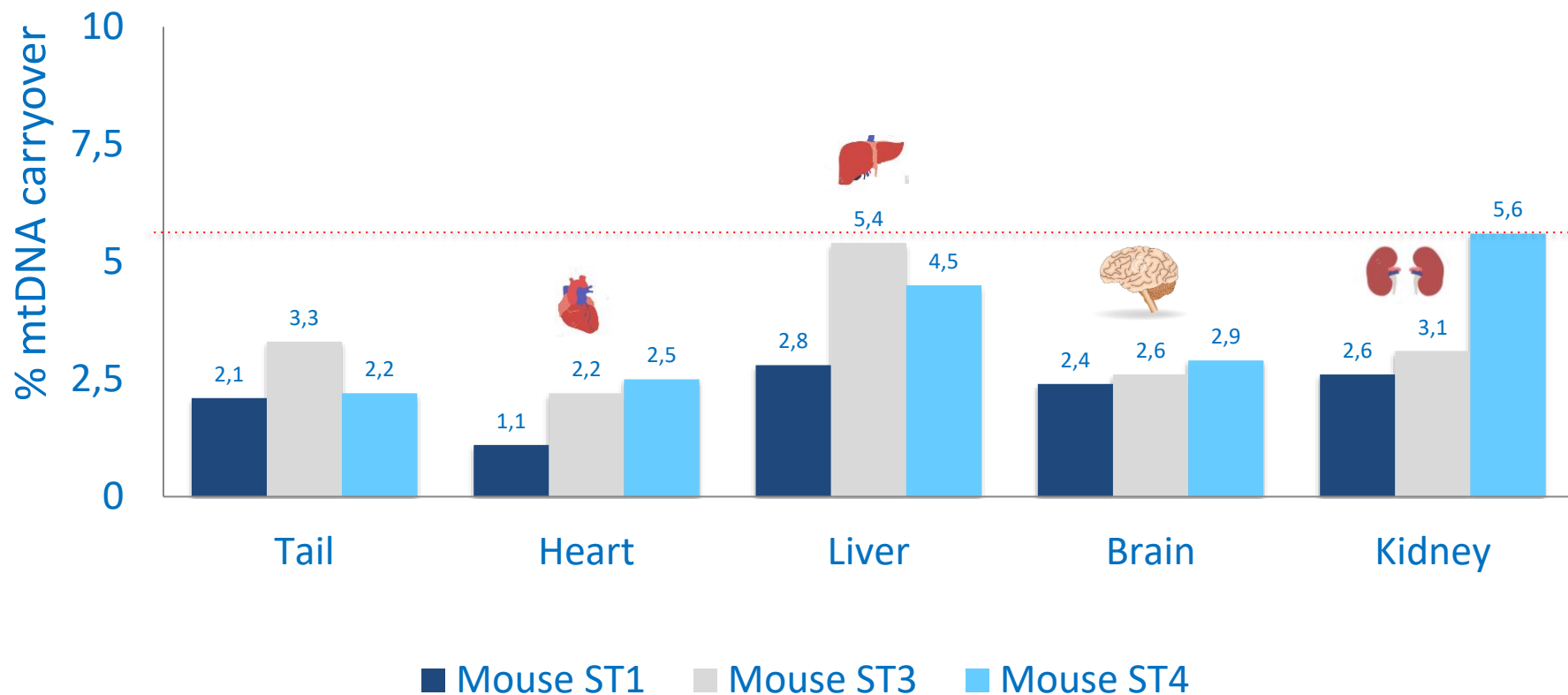
Πείραμα 4: Γονιμότητα των ST ποντικών

Όλα τα ST ποντίκια καθώς και οι απόγονοι τους ήταν γόνιμα με μέσο αριθμό απογόνων παρόμοιο με τους μάρτυρες



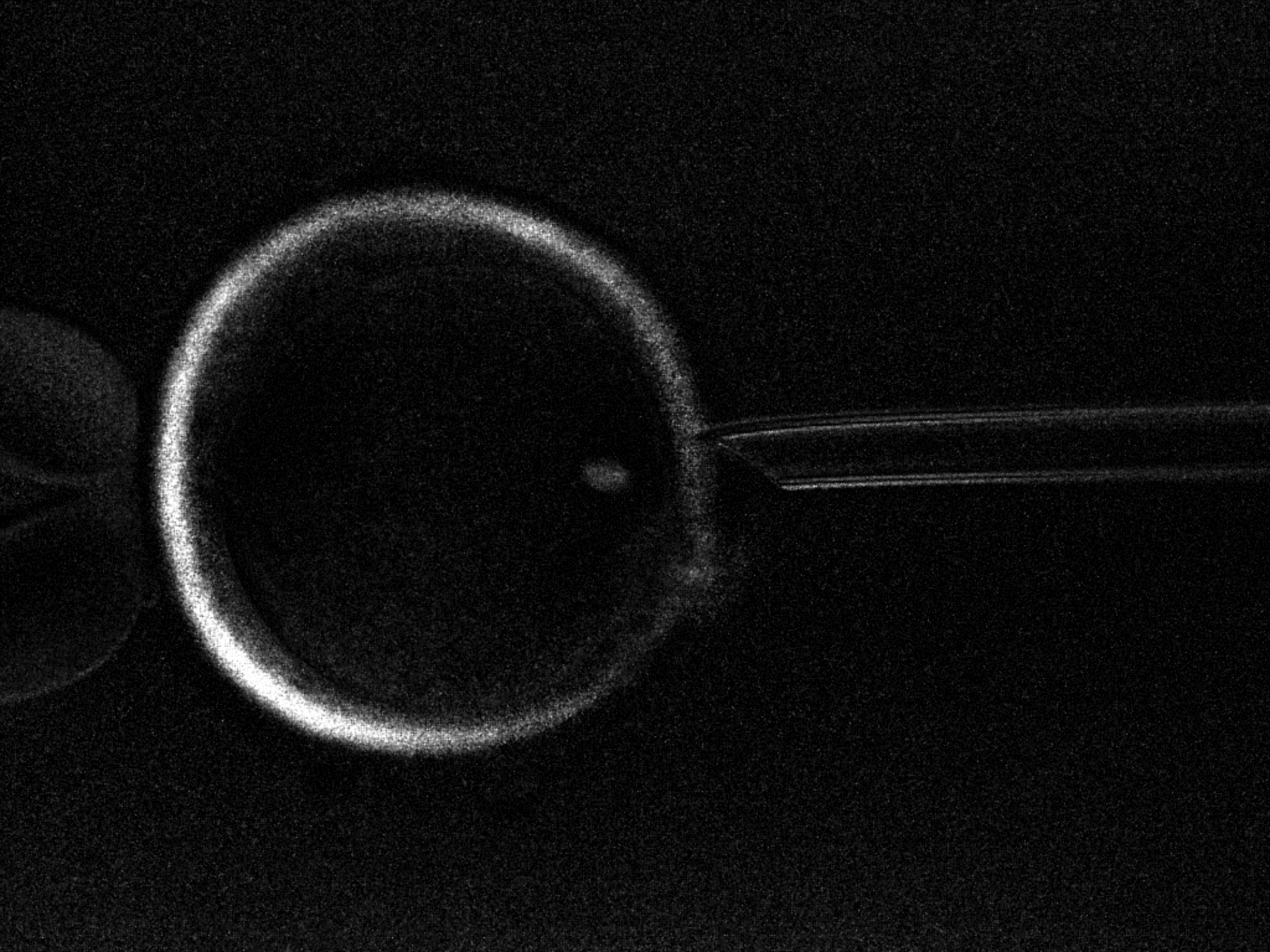
Μεθοδολογία και αποτελέσματα

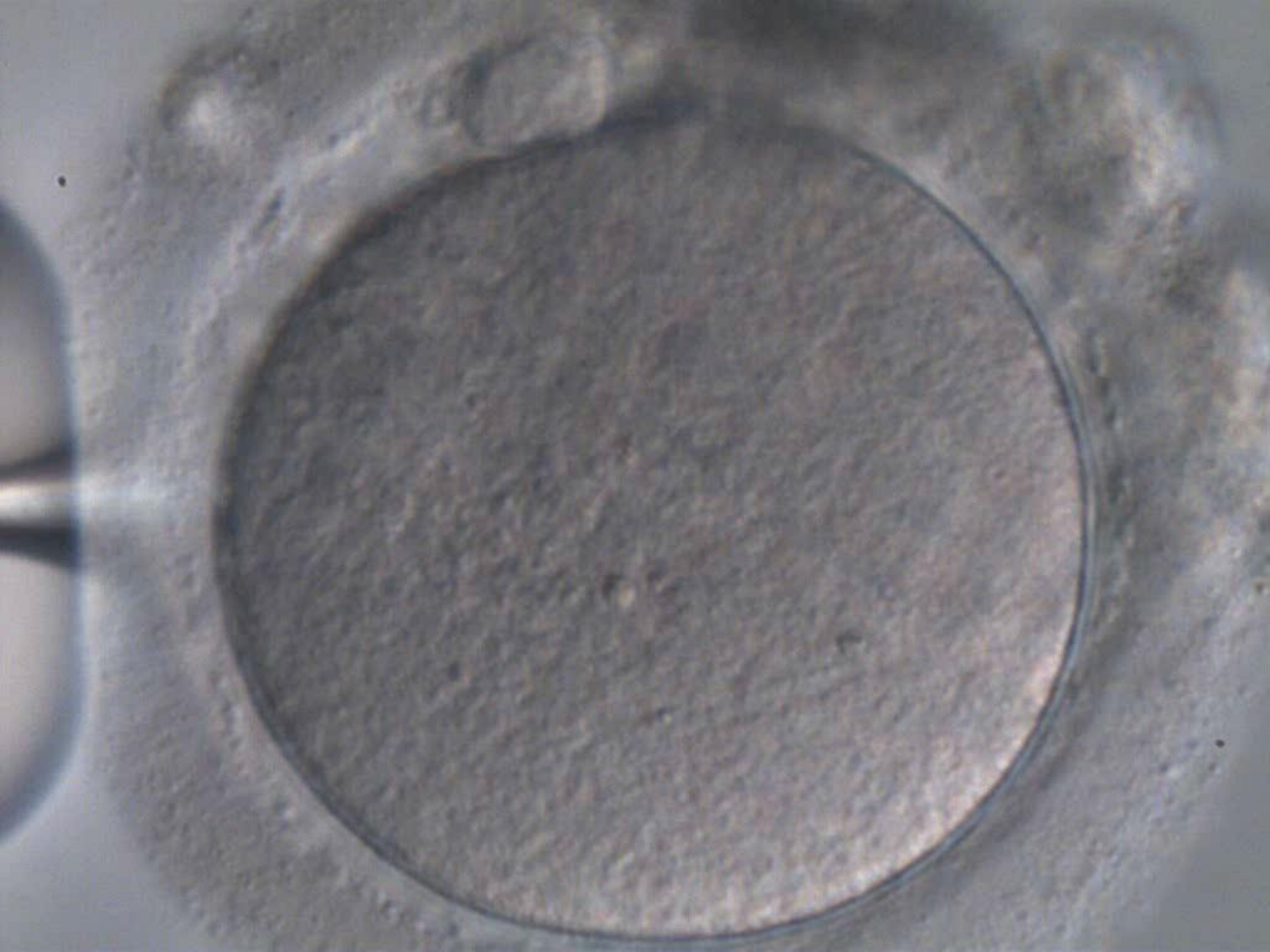
Πείραμα 4: Ετεροπλασμία στα όργανα ενηλίκων ST ποντικών



Συμπεράσματα

1. Το κυτταρόπλασμα του ωοκυττάρου διαδραματίζει ζωτικό ρόλο στην ανάπτυξη του εμβρύου.
2. Η μεταφορά της μητρικής ατράκτου επιτρέπει την αντικατάσταση του κυτταροπλάσματος των ποιοτικά πτωχών ωοκυττάρων ποντικών για την αντιμετώπιση της πτωχής εμβρυικής ανάπτυξης.
3. Τα MST ποντίκια παρουσιάζουν χαμηλά και σταθερά επίπεδα ετεροπλασμίας mtDNA στα όργανα που αναλύονται σε ενήλικη ηλικία και κατάσταση υγείας και συμπεριφοράς παρόμοια με τα ποντίκια μάρτυρες.
4. Εάν αποδειχθεί επιτυχής η εφαρμογή στον άνθρωπο, το MST μπορεί να αποτελέσει ένα πολύτιμο εργαλείο, όχι μόνο για την πρόληψη μιτοχονδριακών κληρονομικών νόσων, αλλά και για τη θεραπεία της υπογονιμότητας που προκαλείται από τις κυτταροπλασματικές δυσλειτουργίες των ωαρίων.







Acknowledgements



Gloria Calderon, PhD
Klaus Rink, PhD
Enric Mestres, MSc
Maria Garcia, MSc
Ivette Vanrell, MSc
Alba Casals
David Raga
Luz Garcia



PCB-PRBB ANIMAL FACILITY ALLIANCE

Jesus Gonzalez, DVM, MSc
Rosa Balmaseda
Javier Palacios



This study was partially financed by the Acció-Generalitat de Catalunya and the European Regional Development funds (ERDF) Ref. RD 15-1-0011.

embryotools 



Ευχαριστώ για την προσοχή σας !!!

Έρως Νικητός
(enikitos@iaso.gr)