



KAPITAŁ LUDZKI
NARODOWA STRATEGIA SPÓJNOŚCI



UNIA EUROPEJSKA
EUROPEJSKI
FUNDUSZ SPOŁECZNY



Kamila Hryniewicz
Uniwersytet Przyrodniczy w Poznaniu
Katedra Genetyki i Podstaw Hodowli Zwierząt

Stypendystka projektu pt. „Wsparcie stypendialne dla doktorantów na kierunkach uznanych za strategiczne z punktu widzenia rozwoju Wielkopolski”, Poddziałanie 8.2.2 Programu Operacyjnego Kapitał Ludzki

Wpływ inhibitorów ścieżek różnicowania blastomerów na rozwój i jakość blastocyst bydła *in vitro*.

Wyprowadzenie linii zarodkowych komórek macierzystych bydła (bESCs – ang. *bovine embryonic stem cells*) stworzy przełom w badaniach embriologicznych zwierząt gospodarskich szczególnie w aspekcie poznawczym (zrozumienie mechanizmów różnicowania komórek zarodkowych). Korzyści aplikacyjne tych badań dotyczą możliwości uzyskiwania genetycznie zmodyfikowanych zwierząt (np. produkcja mleka zawierającego białka o znaczeniu terapeutycznym, pozyskiwanie zwierząt odpornych na choroby). Pomimo wieloletnich badań i zaangażowania wielu zespołów badawczych na świecie, zarodkowe komórki macierzyste o potwierdzonych właściwościach pluripotencyjnych tzw. *true ES cells* (m.in. zdolność do samo-odnawiania się, tworzenia chimer i *embryoid bodies* (EB)) dotychczas udało się otrzymać tylko z blastocyst myszy, człowieka i ostatnio szczura. Istnieje szereg przesłanek ku temu, aby wnioskować, że bydło domowe jest lepszym gatunkiem modelowym dla rozwoju przedimplantacyjnego człowieka niż mysz, a także dla badań nad mechanizmami regulującymi wczesny rozwój ze względu na większe podobieństwo profili ekspresji genów istotnych dla rozwoju, podobieństwo chronologii rozwoju przedimplantacyjnego, a także czasu uruchomienia genomu zarodka. Obecnie w wielu ośrodkach naukowych na świecie prowadzi się szczegółowe badania dotyczące wyprowadzania, utrzymania i wykorzystania linii komórek macierzystych. Wykorzystanie gatunku jakim jest bydło domowe pozwoli na częściowe rozwianie wątpliwości związanych z aspektami etycznymi w momencie, gdy w grę wchodzi życie i zdrowie człowieka. Ważnym aspektem, jest fakt, iż pomimo udanego wyprowadzenia linii komórek macierzystych szczura i myszy nie udało się uzyskać stabilnych, w pełni pluripotencyjnych linii komórek macierzystych bydła domowego. Jednym z czynników ograniczających uzyskanie zarodkowych komórek

macierzystych z blastocyst zwierząt kopytnych, w tym bydła, jest brak molekularnych markerów, które pozwoliłyby na weryfikację ich poziomu pluripotencji. Zestaw takich markerów został już bardzo dobrze scharakteryzowany dla zarodków myszy, zarówno dla transkryptów jak i białek. Kluczowymi czynnikami regulującymi proces różnicowania komórek ICM blastocysty myszy są Oct4, Nanog i Gata6. Nanog i Oct4 ulegają ekspresji wyłącznie w epiblaście zarodka myszy podczas, gdy ekspresja Gata6 ujawnia się w endodermie pierwotnej (PrE). Nie ma wątpliwości, że wspomniane powyżej markery pluripotencji opisywane dla zarodków myszy są obecne w zarodkach bydła i wykazują podobną lokalizację. Projekt ten daje możliwość opracowania nowatorskiej techniki pozyskiwania ESCs za pomocą wykorzystania inhibitorów ścieżek sygnalizacyjnych odpowiedzialnych za mechanizmy różnicowania się komórek na wczesnym etapie rozwoju. Istnieje prawdopodobieństwo, iż ścieżki te są na tyle zakonserwowane ewolucyjnie, że w przyszłości możliwe będzie pozyskiwanie ESCs tą metodą od szerszej gamy gatunków. Dodatkowo istnieją doniesienia, że dzięki zastosowaniu inhibitorów udało się przeprowadzić deróżnicowanie dojrzałych komórek epidermalnych (technologia indukowanej pluripotencji komórek macierzystych - iPS), co niesie ze sobą ogromne możliwości i wyklucza aspekty etyczne w leczeniu wielu chorób takich jak, cukrzyca, Alzheimer czy Parkinson. Ponadto wyniki realizowanego projektu pozwolą na bliższą charakterystykę mechanizmów odpowiedzialnych za różnicowanie blastomerów i formowanie linii komórkowych. Mogą także przyczynić się do opracowania bardziej efektywnego protokołu wyprowadzania zarodkowych komórek macierzystych bydła.

Niniejszy projekt koncentruje się na analizie dwóch systemów inhibitorów (3i/2i) odpowiedzialnych za blokowanie ścieżek sygnalizacyjnych MEK/ERK (inhibitor MEK oraz inhibitor receptora membranowego FGF) oraz Wnt/ β -katenina. Ścieżka ta jest kluczowa dla rozwoju zarodka i obejmuje zespół białek regulujących ekspresję czynników sygnalizacyjnych Wnt oraz ich interakcję ze specyficznymi receptorami w komórkach docelowych. W 2011 roku doniesiono, że ekspresja Oct4 może być regulowana poprzez aktywną ścieżkę sygnalizacyjną Wnt/ β -katenina. Ścieżka Wnt jest aktywna w ESC myszy, a kompleks β -kateniny z czynnikami jądrowymi TCF często podlega deregulacji, co powoduje obniżenie ekspresji części genów regulujących rozwój zarodka. β -katenina podlega akumulacji w jądrze i cytoplazmie komórek ESC myszy, wskazując na wysoką aktywność szlaku Wnt w tych komórkach. Kinaza 3 syntazy glikogenu (GSK-3) jest kluczowym enzymem w ścieżce Wnt. Wykazano, że komórki myszy traktowane inhibitorem GSK-3 zachowują zdolność do samo-odnawiania się oraz wysoki poziom ekspresji genu *Oct4*. Dodatkowo komórki te wykazują znaczną akumulację β -kateniny w cytoplazmie, co wskazuje na wzmożoną aktywność szlaku Wnt. Sugeruje się, że aktywny szlak Wnt utrzymuje komórki w stanie niezróżnicowanym. Dodatkowo zaobserwowano wyższy poziom ekspresji genu

Nanog w niezróżnicowanych komórkach myszy. Transkrypcja genu *Nanog* powiązana jest z aktywnością genów kodujących czynniki transkrypcyjne *Oct4* i *Sox2*, które tworząc heterodimer regulują transkrypcję genu *Nanog*.

HIPOTEZA

Zakłada się, że blastocysty bydlęce hodowane w systemach inhibitorów 3i/2i powinny reprezentować odmienny (w odniesieniu do grupy kontrolnej) profil ekspresji czynników transkrypcyjnych będących markerami pluripotencji takich jak: *Nanog*, *Oct-4*, *SOX-2*, *CDX-2*, *Gata-6*, *KRT18*, *FN1*, *Rex1*, *KLF4*, *C-Myc* ze szczególnym uwzględnieniem *Oct-4*, którego poziom regulowany jest przez jedną ze ścieżek sygnalizacyjnych różnicowania komórkowego - *Wnt*, której aktywność sztucznie regulowana jest poprzez inhibitor enzymu kinazy 3 glikogenu (*GSK-3*) *CHIR99021* obecny zarówno w systemie inhibitorów 3i jak i w 2i. Dodatkowo zarodki te powinny posiadać zwiększoną liczbę komórek w węźle zarodkowym (*ICM*), ponieważ istnieją doniesienia, że zastosowanie wspomnianych inhibitorów wpływa na wzmożenie proliferacji komórek. Dodatkowo zakłada się, że zarodki hodowane w systemach inhibitorów powinny być bardziej kompetentne i przydatne do wyprowadzania i utrzymania *bESCs*. Najprawdopodobniej system 3i będzie mniej optymalny ze względu na obecność mniej specyficznego inhibitora receptora *FGF* w ścieżce *MEK/ERK*. Dowiedziono, że działanie tego inhibitora (*SU5402*) nie jest ograniczone tylko do wspomnianego receptora, ale inaktywuje również inną ścieżkę *PI3K* zaangażowaną w kluczowe funkcje komórkowe takie jak wzrost i różnicowanie.

CELE

Celem naukowym pracy doktorskiej jest analiza wpływu systemów inhibitorów 3i/2i na rozwój przedimplantacyjnych zarodków bydła domowego *in vitro* ze szczególnym uwzględnieniem ekspresji markerów różnicowania komórek węzła zarodkowego (*ICM*) i trofoblastu (*TE*) oraz jakości blastocyst w 9 dniu po inseminacji wyrażonej za pomocą ekspresji panelu genów markerowych jakości blastocyst bydlęcych oraz indeksu apoptotycznego. W końcowym etapie dokonana zostanie kompleksowa analiza i porównanie danych dla zarodków inkubowanych w obecności inhibitorów z informacjami uzyskanymi dla zarodków kontrolnych w celu wykazania ewentualnych różnic rozwojowych, które pozwolą na lepsze zrozumienie oddziaływania inhibitorów na zarodki bydła w aspekcie dalszego przełożenia tych informacji na wyprowadzanie i utrzymanie stabilnych linii zarodkowych komórek macierzystych bydła.

METODYKA

Materiał wyjściowy dla niniejszych badań stanowią kompleksy oocyt-kumulus (KOK) aspirowane z jajników krów rzeźnych oraz nasienie buhajów. Pozyskiwanie zarodków bydłych *in vitro* obejmuje etapy takie jak: dojrzewanie oocytów *in vitro* (IVM), zapłodnienie *in vitro* (IVF), hodowla zarodków *in vitro* (IVC).

Warunki hodowli zarodków w warunkach *in vitro*: pożywka SOF (kontrola bez inhibitorów), SOF + 3i (inhibitor GSK-3 CHIR99021 - 3 μ M, inhibitor MEK/ERK PD184352 – 0.8 μ M, inhibitor FGFR SU5402 - 2 μ M), SOF + 2i (inhibitor GSK-3 CHIR99021 - 3 μ M, inhibitor MEK/ERK PD0325901 - 1 μ M).

Wykonywane analizy: z części blastocyst każdej grupy (a także z blastocyst poddanych dissekcji na ICM i TE) wyizolowane zostanie całkowite RNA i przeprowadzona precypitacja. Kolejnymi etapami będą: oznaczanie koncentracji RNA, synteza cDNA oraz analiza transkryptów na poziomie mRNA za pomocą techniki Real-Time PCR. Przeanalizowanych zostanie: 10 genów markerowych pluripotencji: *NANOG*, *OCT4*, *SOX2*, *CDX2*, *GATA6*, *KRT18*, *FN1*, *REX1*, *KLF4*, *C-MY*, 5 genów markerowych jakości blastocyst bydła (*HSP70*, *Cx43*, *Glut-1*, *GDF9*, *IFNT2*). Kolejna grupa blastocyst poddana zostanie utrwaleniu i barwieniu immunofluorescencyjnemu na obecność białek markerowych pluripotencji takich jak: Oct-4, Nanog, CDX-2 i Gata6. Ostatnim etapem badań będzie Analiza indeksu apoptotycznego z wykorzystaniem procedury TUNEL oraz określenie całkowitej liczby blastomerów.