



KAPITAŁ LUDZKI  
NARODOWA STRATEGIA SPÓJNOŚCI



SAMORZĄD WOJEWÓDZTWA  
WIELKOPÓLSKIEGO  
WOJEWÓDZKI URZĄD PRACY  
W POZNANIU

UNIA EUROPEJSKA  
EUROPEJSKI  
FUNDUSZ SPOŁECZNY



**Maciej Orsztynowicz**  
**Uniwersytet Przyrodniczy w Poznaniu**  
**Katedra Genetyki i Podstaw Hodowli Zwierząt**

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

## Architektura jąder interfazowych blastomerów zarodków bydła z uwzględnieniem genów *CDX2* i *OCT4*

Praca doktorska wiąże się z naukowo atrakcyjnym zagadnieniem zarodkowych komórek ssaków. Wybranie bydła, jako gatunku, na którym badania są realizowane ma znaczenie wymierne. Ze względu na duże podobieństwo wczesnego rozwoju zarodkowego bydła i człowieka (m.in. profile ekspresji genów istotnych dla rozwoju, chronologia rozwoju przedimplantacyjnego, moment uruchomienia genomu zarodka), bydło uznaje się za gatunek modelowy do badań mechanizmów regulujących wczesny rozwój zarodkowy człowieka. Doświadczenia na bydle umożliwiają kompleksową, nieograniczoną aspektami etycznymi, szczegółową analizę zagadnień dotyczących zarodków. Inspiracją do zapoczątkowania badań była mysz, u której zidentyfikowano szereg specyficznych markerów różnicowania komórek, między innymi *Cdx2* dla trofoektodermi (TE) oraz *Oct4* dla wężła zarodkowego (ICM) blastocysty, ostatniego przedimplantacyjnego stadium rozwojowego zarodka.

Co ciekawe w przypadku komórek somatycznych stwierdzono, że położenie terytoriów chromosomowych uzależnione jest między innymi od wielkości chromosomu, gęstości genów na chromosomie oraz wykazuje powiązanie z aktywnością transkrypcyjną genów. Zatem badania nad architekturą jąder interfazowych w zarodkach ssaków mogą być źródłem cennych informacji na temat aktywności transkrypcyjnej genów i częściowo bazują na teoriach zakładających nieprzypadkowe położenie terytoriów chromosomowych (CT) oraz genów w obrębie jąder interfazowych komórek somatycznych.

**Sugeruje się, że lokalizacja terytoriów chromosomowych (CT) wybranych chromosomów w zarodkach bydła zmienia się po uruchomieniu genomu i zależy m.in. od wielkości chromosomu oraz liczby genów zlokalizowanych w danym chromosomie.** Ponieważ efektem stopniowej utraty pluripotencji mogą być istotne przegrupowania terytoriów chromosomowych w blastomerach zarodków, analiza CT mieszczących loci genów markerowych może przynieść ciekawe informacje na temat mechanizmu

różnicowania. W blastocyście była potwierdzono ekspresję niektórych markerów różnicowania typowych dla myszy, nie wiadomo jednak w jakim stadium rozwoju przedimplantacyjnego zarodka była dochodzi do uruchomienia transkrypcji tych genów i jak lokalizują się poszczególne geny w stosunku do terytorium chromosomowego. Weryfikacji poddana jest hipoteza badawcza, że lokalizacja markerów różnicowania się komórek będzie uzależniona od stadium rozwojowego zarodka, ze szczególnym uwzględnieniem np. uruchomienia genomu zarodka (tzw. MET, 8-16-bl), kompaktacji blastomerów (morula) czy powstawania i wylęgania się blastocysty.

**Celem pracy jest opisanie zmian położenia terytoriów chromosomowych oraz *loci* genów markerowych w jądrach interfazowych blastomerów we wszystkich przedimplantacyjnych stadiach zarodków hodowanych *in vitro* (od stadium zygoty do stadium blastocysty).** Analiza dotyczy 2 par chromosomów bydła (12, 23) mieszczących geny markerowe *CDX2* (12), *OCT4* (23). Szczególne znaczenie w badaniach ma zastosowanie trójwymiarowej techniki fluorescencyjnej hybrydyzacji *in situ* (3D FISH), która umożliwia przestrzenną analizę tzw. terytoriów chromosomowych (CT) w jądrach interfazowych blastomerów oraz wskazanie miejsca danego genu w tym terytorium. Warto podkreślić, że dotychczas w literaturze odnotowano tylko jedną pracę oryginalną wykorzystującą technikę 3D FISH na zarodkach bydła. Nieodłącznym elementem wykorzystania procedury fluorescencyjnej hybrydyzacji *in situ* 3D FISH na zarodkach bydłych jest konieczność pracy z mikroskopem fluorescencyjnym (Carl Zeiss Axiovert 200) i konfokalnym (ZEISS Axiovert 200 z modułem konfokalnym), które stanowią niezbędne zaplecze aparaturowe. Mikroskopia fluorescencyjna umożliwia podgląd sygnałów fluorescencyjnych z utrwalonych i wyznakowanych preparatów cytogenetycznych, natomiast mikroskopia konfokalna umożliwia archiwizację serii obrazów wysokiej jakości oraz ich następną rekonstrukcję w trzech wymiarach z wykorzystaniem dodatkowego oprogramowania. Do opracowania oraz oceny rekonstrukcji obrazów uzyskiwanych z mikroskopu konfokalnego wykorzystuje się programy komputerowe takie jak m.in. AxioVision Rel. 4.8 oraz NEMO (Iannuccelli i in. 2010).