

Układ nerwowy składa się z sieci komórek nerwowych, które dzięki specjalnemu kształtowi oraz danej pozycji w mózgu (lub w innej strukturze układu nerwowego) mogą utworzyć połączenia między sobą. Dlatego też, aby układ nerwowy pracował we właściwy sposób, w trakcie rozwoju komórki nerwowe uzyskują odpowiedni kształt i pozycję, oraz utworzyły funkcjonalne sieci neuronalne. Komórki nerwowe, zwane też neuronami, uzyskują swój kształt podczas różnicowania poprzez wydłużenie wypustek neuronalnych w różnych kierunkach, charakterystycznych dla danego rodzaju neuronów.

Białko mTOR jest niezbędne w rozwoju komórek nerwowych, a w szczególności w ich różnicowaniu i pozycjonowaniu. Jednak dotychczasowe wyniki nie pozwalają na całkowite zrozumienie roli mTOR w skomplikowanym procesie rozwoju złożonych sieci neuronalnych, składających się z kilku rodzajów neuronów, choć istnieją dowody sugerujące, że w rzeczywistości mTOR kontroluje każdy aspekt tego procesu. **Dlatego celem projektu jest analiza wpływu białka mTOR na kształt i pozycjonowanie komórek nerwowych siatkówki oka w modelu ryby Danio prgowanego oraz zbadanie udziału mTOR w tworzeniu sieci neuronalnych w organizmie żywym.** Ryba Danio należy do grupy kręgowców, a więc jest bliska człowiekowi, a co więcej jej siatkówka oka jest złożona z takich samych rodzajów neuronów u ryby Danio jak u człowieka. Wyniki wcześniejsze wskazują na złożony udział białka mTOR w rozwoju neuronów i w świetle istniejącej literatury sugerują jego wpływ na procesy różnicowania i pozycjonowania poprzez nieznaną do tej pory mechanizmy, a co za tym idzie sugerują kontrolę poprawnej organizacji połączeń nerwowych i tworzenia funkcjonalnych sieci neuronalnych przez białko mTOR. Dodatkowo znaczenie zagadnienia podkreśla istnienie chorób spowodowanych nadmiernie aktywnym białkiem mTOR, takich jak stwardnienie guzowate. Badania będą prowadzone z udziałem ryb bez białka mTOR, jak i z nadmiernie aktywnym białkiem mTOR, co pozwoli na uzyskanie dopełniających się wyników i całkowitego obrazu roli mTOR w rozwoju neuronów.

Aby osiągnąć cel, zostaną użyte narzędzia, pozwalające na precyzyjne obrazowanie mikroskopowe rozwoju komórek nerwowych w siatkówce oka ryby Danio. Komórki nerwowe mają wydłużone wypustki, którymi kontaktują się z innymi komórkami nerwowymi. Takie połączone sieci wypustek nerwowych uniemożliwiają obserwację kształtu neuronów. Dlatego też potrzebna jest metoda obrazowania pojedynczych neuronów, a nie całych grup. We współpracy z Prof. Harrisem z Uniwersytetu w Cambridge stworzyliśmy innowacyjną metodę precyzyjnego obrazowania pojedynczych neuronów siatkówki oka Danio w czasie, co pozwala śledzić rozwój komórek nerwowych. Dzięki stworzonej przez nas metodzie możliwa jest obserwacja mikroskopowa takich procesów jak kształtowanie się losu komórek, uzyskiwanie odpowiedniego kształtu i pozycji przez komórki nerwowe oraz powstawanie i funkcjonowanie sieci neuronalnych. Metoda ta polega na transplatacji kilku komórek ze specjalnej linii ryb Danio, zwanej SoFa, do ryby bez pigmentu, którą uniemożliwia obrazowanie. Pigment odbija i pochłania światło lasera, przez co niemożliwe jest obrazowanie oka. Transplatacje powinny być przeprowadzone w bardzo wczesnym stadium rozwoju, zwanym blastulą, kiedy to wszystkie komórki mają charakter podobny do macierzystego. Linia SoFa charakteryzuje się tym, że różne typy komórek nerwowych siatkówki oka mają różny kolor w obrazowaniu mikroskopowym. To umożliwia śledzenie rozwoju komórek prekursorowych w dojrzałe neurony siatkówki, a dokładnie możliwa jest obserwacja uzyskiwania odpowiedniej pozycji komórek w czasie oraz różnicowania danego typu neuronów. W wyniku transplatacji kilku komórek SoFa do blastuli bez pigmentu otrzymujemy ryby z pojedynczymi komórkami nerwowymi oka więc cymy fluorescencyjnie, z czego różne typy komórek mają inny kolor. Taki zabieg umożliwia obrazowanie rozwoju pojedynczych komórek o skomplikowanym kształcie. Obrazowanie będzie przeprowadzone w trzech wymiarach (3D) z użyciem technologii SPIM (ang. Single-plane Illumination microscopy), w której laser zamiast wiązki ma kształt płaszczyzny. Dzięki temu samo obrazowanie 3D jest wydajniejsze i dużo szybsze, co pozwala na obrazowanie długich procesów takich jak rozwój oraz dodatkowo zredukowana jest m.in. toksyczność spowodowana naświetaniem laserem o dużej mocy. Po analizie wpływu mTOR na rozwój komórek nerwowych siatkówki zostaną przeprowadzone badania funkcji białka mTOR w aktywności sieci neuronalnych na poziomie siatkówki, a także na poziomie połączeń między siatkówką a mózgiem. Dodatkowo, zostanie zweryfikowana rola białka mTOR w funkcjach motorycznych ryb Danio. Badania zostaną przeprowadzone w warunkach braku białka mTOR oraz w warunkach jego nadmiernej aktywacji w kontekście stwardnienia guzowatego i przyczyni się nie tylko do zwiększenia wiedzy na temat mechanizmów kontrolujących rozwój komórek nerwowych i kształtowanie sieci neuronalnych w układzie nerwowym, ale także do lepszego zrozumienia podłoża chorób zwanych neuro-rozwojowymi takich jak stwardnienie guzowate.