

Projekt ma na celu przetestowanie hipotez dotyczących mechanizmów określania fenotypu i dalszego rozwoju komórek Purkiniego mózku na modelu oposa laboratoryjnego, który szczególnie dobrze nadaje się do badania wczesnych faz rozwoju układu nerwowego.

Opos krótkoogonkowy (*Monodelphis domestica*) jest torbaczem z rodziny dydelfowatych. Jest to ssak (torbacz) hodowany jako zwierzę laboratoryjne i bierze jednym z najlepszych modeli do badania wczesnych faz rozwoju organizmu ssaków, w tym mechanizmów rozwoju układu nerwowego. Oposy rodzą od 3 do 14 młodych, a ich ciąża trwa 13.5 dnia. Po urodzeniu noworodka waży około 100 mg przyczepia się do sutków matki na około cztery tygodnie. Mózg noworodka oposa jest w stadium rozwojowym porównywalnym do tego, które obserwujemy w 11-12 dniu ciąży u myszy, czy też 40-60 dniu ciąży u człowieka. Tak więc, różne procedury do wiadczenia, które w tym okresie rozwojowym wymagałyby interwencji in utero u ssaków łoskowych, u noworodków oposa mogłyby łatwo zastosowane in vivo.

Kora mózku ssaków, w tym także oposa, składa się z trzech warstw komórkowych: drobinowej, zwojowej i ziarnistej. Warstwa drobinowa składa się z biegnących równoległe do powierzchni kory aksonów interneuronów kory mózku, dendrytów komórek Purkiniego, wypustek komórek glejowych i nielicznych komórek gwiaździstych i koszyczkowych. Drugą warstwę tworzą ciała komórek gruszkowatych (Purkiniego), umiejscowione pojedynczo w płaszczyźnie równoległej do powierzchni kory.

Neurotransmiterem komórek Purkiniego jest kwas gamma-aminomasłowy (GABA). Trzecia, najgłębsza i najszersza warstwa kory mózku, warstwa komórek ziarnistych składa się z ogromnej liczby bardzo małych komórek ziarnistych, komórek gwiaździstych oraz komórek Golgiego, Lugaro i Brucha. Mózg ssaków ma złożony i długi okres rozwoju.

Zgodnie z naszą hipotezą, neuroblasty, z których powstają komórki Purkiniego mózku mają określony fenotyp, mianowicie wszystkie ich komórki potomne uwyarają jako przekaźnika kwasu gamma-aminomasłowego (GABA). Natomiast morfologia rozwijających się neuronów (wielkość i kształt ciała komórkowego i drzewka dendrytycznego), umiejscowienie i połączenia określone głównie lub w przeważającej części przez interakcję z innymi neuronami struktury, w której osiedla się neuroblast, a więc przez środowisko.

Drugim nowatorskim elementem projektu jest plan skonstruowania nowego modelu badania, transgenicznego oposa z genem kodującym zielone białko fluorescencyjne (GFP, green fluorescent protein), którego komórki wykazywałyby naturalną fluorescencję. Przeszczepiając komórki zwierzęcia transgenicznego, mającego ekspresję fluorescencyjnego białka GFP, do mózgu rozwijającego się zwykłego oposa, łatwo można nałedzi przemieszczanie i los tych komórek w rozwoju. Byłby to pierwszy transgeniczny opos na świecie, otwierający nowe możliwości badania, zwłaszcza rozwojowych, oraz badania warunkowanych wadami rozwojowymi powoanych chorób, zwłaszcza układu nerwowego.

Metoda transgenizacji opiera się na izolacji zapłodnionych komórek jajowych i iniekcji do nich genu Sox-2eGFP. Zarodki, które przez transgenizację, na etapie podziałów dwóch komórek bierze przenoszone z hodowli do macicy samic, u których bierze sztucznie wywołany stan hormonalny taki, jaki występuje w ciąży.

Do badania rozwoju mózku opasy w różnym wieku (P1-P60) dostaną iniekcję bromodeoksyurydyny (BrdU), która jest syntetycznym analogiem tymidyny, jednego z nukleozydów występujących w nici DNA. BrdU wbudowuje się do nici DNA w miejsce tymidyny podczas syntezy DNA w fazie S cyklu komórkowego. Przy uyciu przeciwciał można wykryć komórki, w których jądrach znajduje się BrdU. Na tych zwierzętach w wieku 3 miesięcy bierze wykonane barwienia immunohistochemiczne, które pozwolą określić lokalizację i fenotyp komórek z jądrami wyznakowanymi BrdU, a więc powstałymi w czasie iniekcji. Bierze ekspresję różnych genów (np. Shh, Lhx1, Lhx5 i Ptf1a i trk). Pierwszym etapem bierze przygotowanie sond hybrydacyjnych RNA. W tym celu zostaną zaprojektowane startery oraz uzyskany matrycowy cDNA do zapoczątkowania reakcji łańcuchowej polimerazy (PCR). Uzyskany fragment DNA bierze wbudowany do plazmidu, przepisany na RNA i wykorzystany do syntezy znakowanej digoksygeniną sondy hybrydacyjnej.

Komórki progenitorowe komórek Purkiniego mózku, wyizolowane ze ścian komory czwartej mózgowia bierze hodowane in vitro a następnie poddawane transfekcji, co pozwoli na zbadanie wpływu obniżenia ekspresji wybranych białek na losy komórek progenitorowych mózku. Następnie przy zastosowaniu elektroporacji komórek progenitorowych in vivo zostanie zbadany wpływ obniżonego podwyższonego poziomu ekspresji wybranych genów na rozwój komórek Purkiniego w mózgu oposów.

Kolejnym etapem badania bierze sprawdzenie na ile genetyczny program rozwoju komórek Purkiniego jest realizowany poprzez interakcję z sąsiadującymi komórkami. Wykonane zostaną transplantacje progenitorów komórek Purkiniego pobranych od oposów z ekspresją GFP do mózgu oposów nie zmienionych genetycznie, w miejsce to samo z miejscem ich pobrania, lub do strefy przykomorowej komory bocznej mózgu, u oposów w różnym wieku rozwojowym. Po trzech tygodniach od transplantacji zostanie zbadany fenotyp komórek z ekspresją GFP u oposa-biorcy. Przypuszczamy, że w zależności od miejsca przeszczepu i fazy rozwoju biorcy, komórki z ekspresją GFP bierze zbliżone fenotypem odpowiednio do komórek Purkiniego, interneuronów kory nowej mózgu, bierze do interneuronów opuszki w chowej. Zgodnie z naszą hipotezą, wszystkie one bierze uwyarają GABA jako neurotransmitera.

Dzięki planowanym przez nas badaniom zamierzamy uzyskać wiedzę o poziomie, czasie i miejscu ekspresji niektórych ważnych genów uczestniczących w morfogenezie mózku oposa. Wyniki tych badań mogą się przyczynić do wypracowania metod wspomagania prawidłowego rozwoju mózku u przedwcześnie urodzonych dzieci, oraz dzieci, u których stwierdzono wczesne uszkodzenia mózku, na przykład na skutek wylewu lub urazu. Wiedza ta może również umożliwić rozszerzenie badań dotyczących podobieństwa różnych mechanizmów rozwoju mózku, co pozwoli poszerzyć wiedzę o molekularnych podstawach ewolucji mózgu ssaków.