

Rozwój zarodkowy ssaków jest procesem, w trakcie którego potencjał rozwojowy komórek ulega stopniowemu ograniczeniu. W wyniku zapłodnienia oocyta przez plemnik powstaje zygota, która przechodzi kolejne podziały mitotyczne zwane bruzdkowaniem. Powstające w ich wyniku komórki (blastomery) stopniowo tracą swe potencje rozwojowe, różnicując i tworząc pierwotne linie komórkowe, z których w dalszym rozwoju powstaną wszystkie tkanki płodu oraz błony płodowe i łożysko. W ten sposób powstaje blastocysta – pęcherzyk wypełniony płynem, którego ścianę tworzy pojedyncza warstwa ściśle przylegających do siebie komórek trofektodermi (TE, ang. *trophectoderm*) - pierwszej pozazarodkowej linii komórkowej, która w trakcie dalszego rozwoju utworzy zarodkową część łożyska. Wewnątrz, na jednym z biegunów trofektodermi znajduje się grupa pluripotencjalnych komórek wężła zarodkowego (ICM, ang. *inner cell mass*), która w 3,5-dniowej blastocystie zawiera wymieszane komórki prekursorowe dwóch linii komórkowych: pierwotnej endodermi (PE, ang. *primitive endoderm*) i epiblastu (EPI, ang. *epiblast*). Gdy 4,5-dniowa blastocysta implantuje się w macicy, ma miejsce wyodrębnienie na powierzchni wężła zarodkowego warstwy pierwotnej endodermi, która następnie wejdzie w skład jednej z błon płodowych - pęcherzyka żółtkowego. Z kolei, pomiędzy pierwotną endodermą a trofektodermą lokalizuje się pluripotencjalny epiblast, stanowiący materiał na ciało płodu i większość błon płodowych.

Do badania potencjału rozwojowego komórek zarodka wykorzystuje się chimery, czyli agregaty dwóch zarodków lub fragmentów zarodków, które ulegają integracji i tworzą jeden zarodek. W latach 60. XX wieku Profesor Andrzej Krzysztof Tarkowski z Zakładu Embriologii Wydziału Biologii Uniwersytetu Warszawskiego udowodnił, że agregacja dwóch kilkukomórkowych zarodków myszy prowadzi do powstania jednej prawidłowej blastocysty, która po transplantacji do jajowodu samicy rozwija się w zdrową i płodną mysz. Doświadczenie to pokazało, że przedimplantacyjny zarodek ssaka, w odróżnieniu od zarodków innych kręgowców, a także bezkręgowców, charakteryzuje się bardzo dużą zdolnością do regulacji własnego rozwoju w odpowiedzi na eksperymentalną zmianę liczby tworzących go komórek. Komórki zarodka komunikując się ze sobą "wyczuwają" ten nadmiar lub niedobór i wykorzystują różne strategie, aby się dostosować i kontynuować z powodzeniem dalszy rozwój. Ta wiedza znalazła zastosowanie, m.in. w diagnostyce preimplantacyjnej do badania genetycznego zarodków przed przeniesieniem ich do macicy przyszłej matki, a także pomogła wyjaśnić przyczyny powstawania ciąży bliźniaczych jednojajowych, które są wynikiem podziału jednej zapłodnionej komórki jajowej na dwa odrębne zarodki.

Jedną ze ścieżek sygnalizacyjnych potencjalnie zaangażowanych w regulację rozwoju zarodka myszy jest ścieżka Fgf4/MAPK (ang. *fibroblast growth factor 4/mitogen-activated protein kinase*). Szlak ten pełni kluczową rolę w wyodrębnianiu dwóch linii komórkowych w węźle zarodkowym: epiblastu i pierwotnej endodermi. Celem proponowanego projektu jest zbadanie czy interakcje międzykomórkowe, w których uczestniczy ścieżka sygnalizacyjna Fgf4/MAPK, są odpowiedzialne za regulację rozwoju zarodka myszy oraz stanowią podłoże jego plastyczności, warunkującej prawidłowe wyodrębnienie wszystkich linii komórkowych, niezbędnych do pomyślnego rozwoju zarodka w macicy. Jako narzędzie w moich badaniach wykorzystam zarodek chimerowy zbudowany z dwóch elementów znacząco różniących się stadium rozwoju. Aby sprawdzić czy obie komponenty budujące zarodek chimerowy komunikują się za pośrednictwem wspomnianego szlaku i, czy sygnalizacja ta warunkuje jego pomyślny rozwój, postanowiłam eksperymentalnie zaburzyć interakcje między tymi dwiema komponentami i zbadać konsekwencje tych manipulacji. Doświadczenie będzie polegało na zablokowaniu możliwości odbioru sygnału w postaci Fgf4, wysyłanego przez komórki wężła zarodkowego, na skutek obniżenia ekspresji wybranych genów kodujących białka szlaku przekazywania Fgf4/MAPK za pomocą siRNA (ang. *short interference RNA*) wprowadzonego metodą mikroiniekcji do cytoplazmy zygot myszy. Po osiągnięciu przez zarodki stadium 8-komórkowego będą one agregowane z węzłami zarodkowymi 3,5-dniowych blastocyst myszy. Chimerowe agregaty będą hodowane do stadium blastocysty, a udział komórek pochodzących z obu komponent w poszczególnych liniach komórkowych (EPI, PE, TE) chimerowej blastocysty będzie określany metodą immunofluorescencji pośredniej za pomocą przeciwciał wykrywających białka charakterystyczne dla tych linii. Dzięki zastosowaniu zarodków ekspresujących białka czerwonej i zielonej fluorescencji oraz techniki filmowania poklatkowego możliwe będzie również śledzenie interakcji między komórkami obu komponent oraz ich losu w chimerowym zarodku.

Wykorzystanie zarodka chimerowego jako narzędzia może pozwolić na uzyskanie wiedzy na temat mechanizmów, które regulują rozwój zarodka myszy, będącego organizmem modelowym w badaniach nad biologią rozwoju ssaków.