

W jajniku ssaków oocyt jest otoczony glikoproteinową osłonką przejrzystą (ZP). U ludzi osłonkę przejrzystą budują cztery glikoproteiny: ZP1, ZP2, ZP3, ZP4. Podstawową rolą osłonki przejrzystej jest udział w zapłodnieniu, zapobieganiu polispermii oraz w rozwoju przedimplantacyjnym zarodków. Osłonka przejrzysta charakteryzuje się immunogennością i była skutecznie wykorzystywana jako docelowy antygen do aktywnej immunizacji w badaniach na zwierzętach. Ekspresja ZP3 w nowotworach stwarza możliwość wykorzystania aktywnej lub biernej immunizacji w terapii. Niespodziewanie wykazaliśmy obecność ZP3 w męskich jądrach. Immunoterapia ZP3 może zatem prowadzić do zmian w jądrze i wywoływać efekt antykoncepcyjny albo jako efekt uboczny uszkodzenie jądra. W związku z tym konieczne jest wyjaśnienie, jaką rolę ZP3 odgrywa w jądrze. Badanie ekspresji ZP3 podczas ontogenezy może pomóc wyjaśnić rolę ZP3 w jądrach. Głównym celem tego projektu jest dokonanie funkcjonalnej charakterystyki ekspresji ZP3 podczas ontogenezy w jądrze u myszy. Cele szczegółowe obejmują: (1) scharakteryzowanie profilu ekspresji ZP3 w męskich jądrach myszy podczas ontogenezy; (2) poznanie mechanizmów odpowiedzialnych za regulację ekspresji ZP3 w jądrze i jej udziału w spermatogenezie; (3) zidentyfikowanie potencjalnych koregulatorów działania ZP3 w jądrze.

W planowanych badaniach wykorzystamy komercyjnie dostępną myszą linię komórkową GC-2spd(ts) oraz mysie tkanki jąder utrwalone w 4% PFA. Z uwagi na znaczące zmiany w poziomie stężenia androgenów i gonadotropin na różnych etapach dojrzewania u samców, przeanalizujemy profil ekspresji genów w jądrach myszy w ontogenezie. Sprawdzimy lokalizację transkryptu ZP3 za pomocą metody hybrydyzacji *in situ* RNAscope, ekspresję białka ZP3 metodą Western Blot oraz ocenimy lokalizację białka metodą immunohistochemiczną. Do tej pory niewiele jest danych na temat czynników, które regulują ekspresję ZP3. Aby przeanalizować czynniki, które mogłyby regulować ekspresję ZP3, będziemy stymulować mysie spermatocyty wybranymi hormonami i gonadotropinami i ocenimy ekspresję ZP3 na poziomie molekularnym oraz lokalizację komórkową ZP3 w teście immunofluorescencyjnym. Metodą edycji genów CRISPR/Cas9 przeprowadzimy nokaut genu ZP3 w linii komórkowej mysich spermatocytów, co pozwoli poznać jak zmieni się funkcja tych komórek po usunięciu genu ZP3. Zbadamy udział ZP3 w proliferacji i przeżyciu komórek oraz aktywacji szlaków apoptycznych w tej linii. Dodatkowo sprawdzimy ekspresję genów biorących udział w szlaku steroidogenezy, receptorów hormonów oraz wybranych białek koregulatorów potencjalnie współdziałających z ZP3.

Spodziewamy się, że wyniki z niniejszego projektu badawczego pomogą jeszcze lepiej zrozumieć funkcję ZP3 w procesie rozwoju gonady męskiej i potencjalnie w badaniach nad antykoncepcją u mężczyzn. Wyniki uzyskane w ramach tego projektu zostaną zaprezentowane podczas kongresów naukowych i opublikowane w czasopiśmie naukowych.