

Streszczenie rozprawy doktorskiej mgr inż. Natalii Dzięgiel pt.:

„Opracowanie metody transfekcji zygot królika z zastosowaniem nanocząstek”

Promotor: dr hab. Jacek Jura, prof. IZ

Data wykonania streszczenia 19.04.21 r.

Praca wykonana w Instytucie Zootechniki, Państwowym Instytucie Badawczym

Stosowane obecnie metody transfekcji zygot ssaków, są skomplikowane i pracochłonne. Ich efektywność jest nadal niezadawalająca. Metody efektywnie stosowane do transfekcji komórek somatycznych, których procedury są obecnie wystandaryzowane i metodycznie proste, w odniesieniu do zygot są nieskuteczne. Nanocząstki stanowią potencjalny nośnik dla kwasów nukleinowych czy białek w aplikacjach biotechnologicznych oraz w kontrolowanym przenoszeniu leków. Stanowią o tym ich niewielkie rozmiary w połączeniu ze zdolnościami wiązania oraz ochrony transportowanych substancji. Niemniej jednak ich zastosowanie jako nośników dla kwasów nukleinowych w transfekcji zygot ssaków nie zostało jeszcze dostatecznie poznane.

Zastosowanie wysokiego ciśnienia hydrostatycznego (HHP), korzystnie wpływa na dojrzewanie gamet *in vitro* oraz korzystnie wpływa na przebieg kriokonserwacji gamet i zarodków ssaków. Potwierdzono jego korzystny wpływ na komórki użyte w procesie klonowania. W literaturze brak jednak informacji, dotyczących zastosowania HHP w procesie transfekcji zygot ssaków.

Celem pracy było opracowanie skutecznej metody transfekcji zygot królika z zastosowaniem kompleksu utworzonego przez nanocząstki i DNA, oraz zbadanie wpływu wysokiego ciśnienia hydrostatycznego, zastosowanego jako czynnik wspomagający rozwój zygot poddanych transfekcji kompleksem nanocząstki/DNA – prekondukcjonowanie zygot.

W pierwszej fazie realizacji badań, w oparciu o literaturę wybrano jako potencjalny nośnik DNA, 10nm sferyczne nanocząstki złota z modyfikacją powierzchniową polietylenoiminy (PEI) (czystość BioPure, Nanocomposix, USA). Nanocząstki złota charakteryzują się stosunkowo niską toksycznością w stosunku do komórek, inercyjnością oraz stosunkowo łatwo można uzyskać odpowiedni ich kształt i wymiary. Ponadto, mogą być

produkowane z różnorodnymi modyfikacjami powierzchniowymi, które mogą ułatwiać wiązanie z DNA, oraz wpływać na proces ich wejścia do komórek. Zastosowanie modyfikacji powierzchniowej z polietylenoiminy, powoduje, że ujemnie naładowany DNA jest stabilnie wiązany w odpowiedniej kondensacji i formuje z nanocząstkami stabilne kompleksy.

Pierwszym etapem badań było ustalenie optymalnego, nietoksycznego dla zygot królika stężenia 10nm sferycznych nanocząstek złota z powierzchniową modyfikacją polietylenoiminy (PEI) do zastosowania w procesie transfekcji. W tym celu zygoty królika poddano iniekcji wodnym roztworem 10nm, sferycznych nanocząstek złota z powierzchniową modyfikacją polietylenoiminy o stężeniach 5, 25, 50 oraz 100ng/μl, do przestrzeni okołozótkowej. Następnie zygoty hodowano *in vitro* do stadium blastocysty. Badania wykazały, że iniekcja roztworu zawierającego 100ng/μl nanocząstek złota skutkowała prawie trzykrotnym obniżeniem odsetka zarodków w stadium blastocysty oraz zwiększeniem liczby zarodków zdegenerowanych w odniesieniu do grupy kontrolnej (zygoty niemanipulowane). W grupie tej uzyskano 24,23% zarodków w stadium blastocysty, gdzie w grupie kontrolnej odsetek ten wyniósł 66,67%. W przypadku zastosowania stężenia o wartościach 5, 25, 50ng/μl, odsetek uzyskanych blastocyst wynosił odpowiednio 76,19%, 41,94% oraz 86,57%. W oparciu o uzyskane wyniki, oraz w celu zapewnienia odpowiedniego stężenia DNA umożliwiającego efektywną transfekcję, do dalszych badań wybrano stężenie nanocząstek o wartości 50ng/μl.

W następnym etapie badań, przy pomocy testu retardacji ustalono optymalną proporcję do powstania stabilnego kompleksu nanocząstki/DNA. Jako plazmid referencyjny do transfekcji wybrano wersję zawierającą gen reporterowy czerwonego białka fluorescencyjnego - Pmax FP-Red-N (Lonza). Przeprowadzony w żelu agarozowym test retardacji wykazał, że optymalny stosunek dla utworzenia stabilnego kompleksu nanocząstki/DNA wynosi 2:1, co przekłada się odpowiednio na stężenia 50ng/μl nanocząstek:25ng/μl DNA. Określono również optymalne warunki inkubacji mieszaniny. Mieszanina była wykonana poprzez zmieszanie równych objętości roztworów plazmidowego DNA oraz nanocząstek w wodzie wolnej od DNaz oraz RNaz w stosunku ilościowym określonym dzięki wcześniej wykonanym testom retardacji w żelu agarozowym. Następnie mieszaninę poddawano worteksowaniu przez 5 s, poziom 2, a w dalszej kolejności inkubacji w temperaturze pokojowej przez 45 min. Wyselekcjonowane, morfologicznie prawidłowe zygoty królika (dwa ciała kierunkowe, widoczne przedjądrza) transfekowano na drodze mikroiniekcji, poprzez wprowadzenie do przestrzeni okołozótkowej mieszaniny

nanocząstki/DNA (2: 1), do momentu zaobserwowania ekspansji osłonki przejrzystej. Po zabiegu transfekcji zygoty oceniano ponownie pod względem morfologicznym. Zygoty z morfologicznie prawidłową cytoplazmą przenoszono do hodowli *in vitro* - zastosowano medium TCM199 z suplementacją 10% surowicy płodowej bydłowej. Zarodki hodowano w temp. 37 °C oraz stężeniu CO₂ równym 5% przez okres 5 dni. W trakcie hodowli, co 48 godz. monitorowano jej przebieg i wymieniano medium hodowlane. Po zakończonej hodowli, oceniano stadia rozwojowe, grupowano zarodki a następnie pod mikroskopem fluorescencyjnym przeprowadzano ocenę ekspresji - stosując filtr dla długości fali światła od 510 do 560 nm. Za pozytywny wynik transfekcji przyjmowano emisję czerwonego światła wynikającą ze wzbudzenia białka FP-Red-N w zarodkach w stadium blastocysty. Ekspresję transgenu stwierdzono u 18,7 % blastocyst. Procentowy udział zarodków, które osiągnęły stadium blastocysty po transfekcji kompleksem nanocząstki/DNA, był zbliżony do uzyskanego w niemanipulowanej grupie kontrolnej.

Kolejny etap badań stanowiło określenie wpływu wysokiego ciśnienia hydrostatycznego na niemanipulowane oraz poddane transfekcji kompleksem nanocząstki/DNA zygoty królika. W obu grupach zygot poddanych wpływowi wysokiego ciśnienia hydrostatycznego (HHP) o wartościach 20 i 40MPa, przed hodowlą *in vitro* procentowy udział zarodków w stadium blastocysty był wyższy niż w grupie kontrolnej. W grupie poddanej działaniu HHP o wartości 20MPa uzyskano 65,4% zarodków w stadium blastocysty, natomiast w grupie poddanej HHP o wartości 40MPa -72,9%, podczas gdy w grupie kontrolnej odsetek uzyskanych blastocyst wynosił 40,75%.

Zastosowanie wysokiego ciśnienia hydrostatycznego (HHP) o wartościach 20 i 40MPa do zygot przed transfekcją kompleksem nanocząstki/DNA obniżyło efektywności transfekcji. Ekspresję transgeny, w tych grupach, uzyskano na poziomie 13,47% (20MPa) oraz 13,67% (40MPa). Ponadto zastosowanie wysokiego ciśnienia hydrostatycznego spowodowało zmniejszenie odsetka uzyskanych blastocyst z zygot po transfekcji: 31,65 % (HHP 20MPa) oraz 23,02% (HHP 40MPa). W obu tych grupach wartość ta była niższa niż w niemanipulowanej grupie kontrolnej.

Ostatni etap badań stanowiło porównanie w obrębie wszystkich grup doświadczalnych poziomu ekspresji wybranych genów: genu OCT4 regulującego rozwój zarodkowy oraz CASP7 i BCL2 uczestniczących w procesie apoptozy. Analizy ekspresji OCT4, CASP7 i BCL2, wykazały, że zastosowanie HHP istotnie wpływa na poziom ich ekspresji. Podniesienie poziomu ekspresji genów regulujących proliferację, rozwój zarodkowy czy

procesy apoptotyczne spowodowane oddziaływaniem wysokiego ciśnienia hydrostatycznego, uruchamia molekularny mechanizm, który pozytywnie stymuluje rozwój zarodków królika. Natomiast u zarodków poddanych działaniu wysokiego ciśnienia hydrostatycznego oraz transfekcji kompleksem nanocząstki/DNA stwierdzono wysoce istotnie wyższy poziom ekspresji genów z grupy regulującej procesy apoptotyczne – BCL2 i CASP7, co może wskazywać na indukowanie procesów apoptotycznych przez połączenie tych zabiegów.

Zastosowanie do transfekcji zygot królika kompleksu 10nm sferycznych nanocząstek złota z powierzchniową modyfikacją polietylenoiminy (AuPEI) oraz DNA (plazmid Pmax FP Red-N, Lonza) w stosunku ilościowym 2: 1 (stężenia 50ng/μl: 25ng/μl) pozwala na uzyskanie efektywności na poziomie 18,7 %. Uzyskana na tym poziomie efektywność jest wielokrotnie wyższa od tej jaką można uzyskać stosując standardową mikroiniekcję DNA do przedjądrza zygoty. Jest ona niewiele niższa od efektywności osiągananej z zastosowaniem systemu CRISP/Cas9. Metoda transfekcji z zastosowaniem kompleksu 10nm AuPEI/ DNA jest mniej złożona oraz prostsza do przeprowadzenia niż wyżej wspomniane metody. Zastosowanie wysokiego ciśnienia hydrostatycznego wpłynęło pozytywnie na rozwój niemanipulowanych zarodków królika, co potwierdza analogiczną zależność odnotowaną w przypadku gamet i zygot innych gatunków zwierząt. Nie odnosi się to jednak do użycia wysokiego ciśnienia hydrostatyczne o wartościach 20 i 40MPa przed transfekcją zygot kompleksem AuPEI/DNA, kiedy obserwowano obniżenie efektywności tego procesu.