



Европейски социален фонд

Проект BG051PO001-3.3.06-0025 “Подкрепа за изграждане и развитие на млад конкурентоспособен научен потенциал в областта на физиологията, фитохимията, геномиката, протеомиката и биоразнообразието на еукариотните организми”

Десислава Б. Стоименова - Манова

Институт по Физиология на растенията и Генетика - БАН

Разработка на нови и оптимизация на съществуващи методи за *in vitro* култивирание на до- и постимплантационни зародиши при бозайници.

Геномен импринтинг

Геномният импринтинг е част от епигенетичните процеси, които контролират растежа и развитието на еукариотните организми. Наблюдава се както при животните така и при растенията, но е най-ясно изразен при бозайниците.

Геномният импринтинг се изразява в това, че алелите на някои гени се експресират само от майчиния геном, а други само от бащиния, като двата хаплоидни генома взаимно се допълват за да обезпечат нормалното развитие (Surani et al., 1984; McGrath and Solter, 1984).

Механизмите на геномния импринтинг не са окончателно изяснени, но в тях участвуват както глобални процеси като метилирането на ДНК и хистоновите модификации, така и строго специфични като некодиращи РНК и специфични транскрипционни фактори.

До момента са идентифицирани над 100 импринтирани гени, които са локализирани в различни хромозомни участъци и са групирани в клъстери.

Control (P+M)

Maternal

Paternal

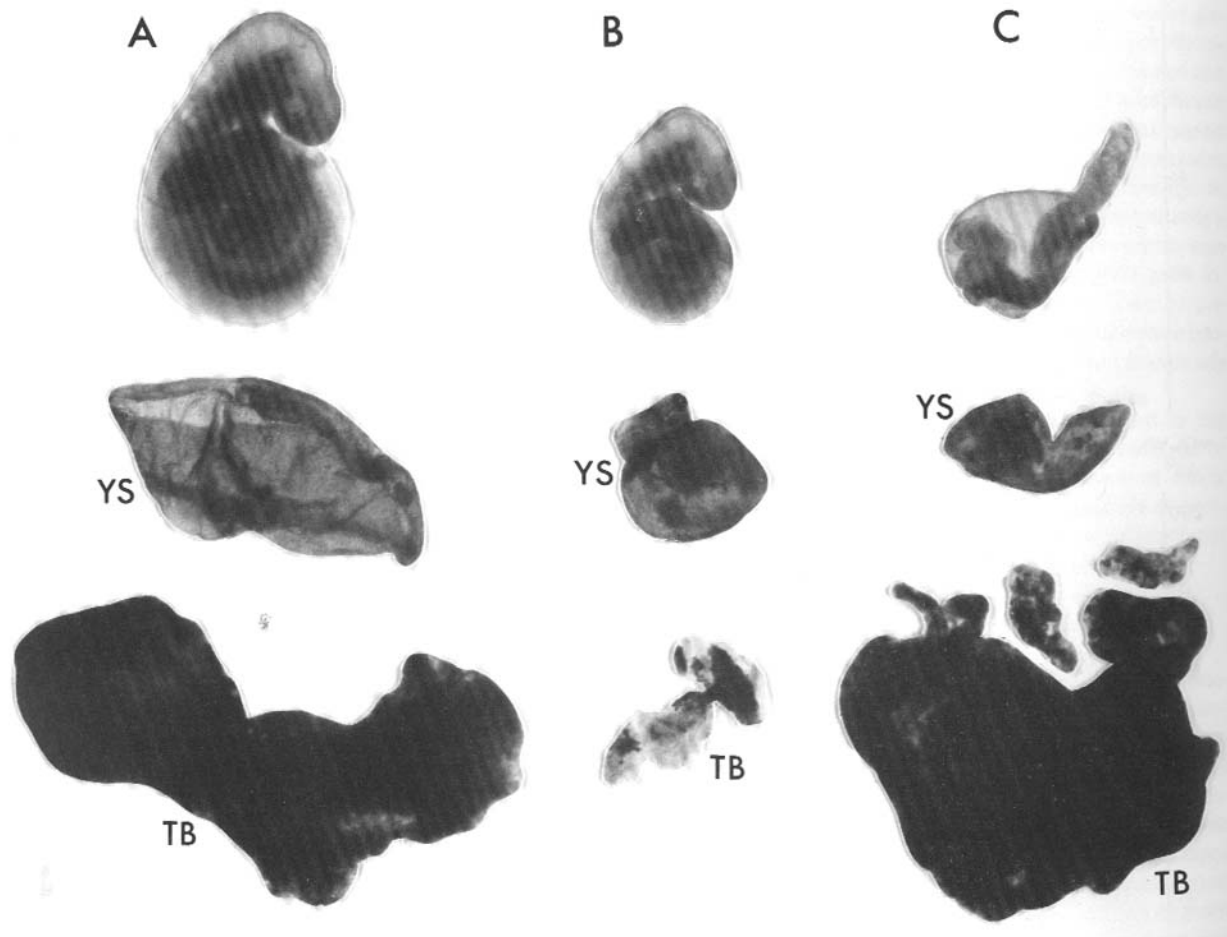


Figure 3. Development of Reconstituted Eggs on Day 10 of Gestation

Compare development of control embryo (A) with that obtained from eggs with two maternal genomes (B) in which a small but well advanced 25-somite embryo was the maximum development but with poor extraembryonic tissues. The eggs with two paternal nuclei developed maximally to about the 6- to 8-somite stage but with extensive trophoblast development (C). YS, yolk sac; TB, trophoblast. Scale bar, 1 mm.

Партеногенетични миши ембриони

В нашите експерименти за изучаване на различни фактори репрограмиращи генома използваме моделна система от нормални и партеногенетични миши ембриони, развиващи се както *in vivo*, така и *in vitro*.

Защо партеногенетични (полуклонирани) ембриони? – Защото технически се получават много по-лесно и по-бързо от клонираните ембриони и може да се работи едновременно със стотици яйцеклетки.

Партеногенетичните ембриони (PE) при бозайниците (мишки) умират на ранни стадии от развитието като резултат от геномния импринтинг.

Установено е, че около 75% от PE умират скоро след имплантацията и само малка част от тях се развива до различни стадии сомити (зачатъци на прешлените) (Kaufman et al., 1977; Surani and Barton, 1983; Penkov and Platonov, 1992).

Гибелта на тези ранни стадии се обяснява с деградация и загуба на тотипотентните свойства вътрешната клетъчна маса (ICM) на партеногенетичните бластоцисти (Newman-Smith and Werb, 1995).

Слабо развитият трофобласт (плацентата) и недоразвитите мезодермални производни са типични за PE на стадий сомити (Kaufman et al., 1977; Surani and Barton, 1983; Penkov and Platonov, 1992).

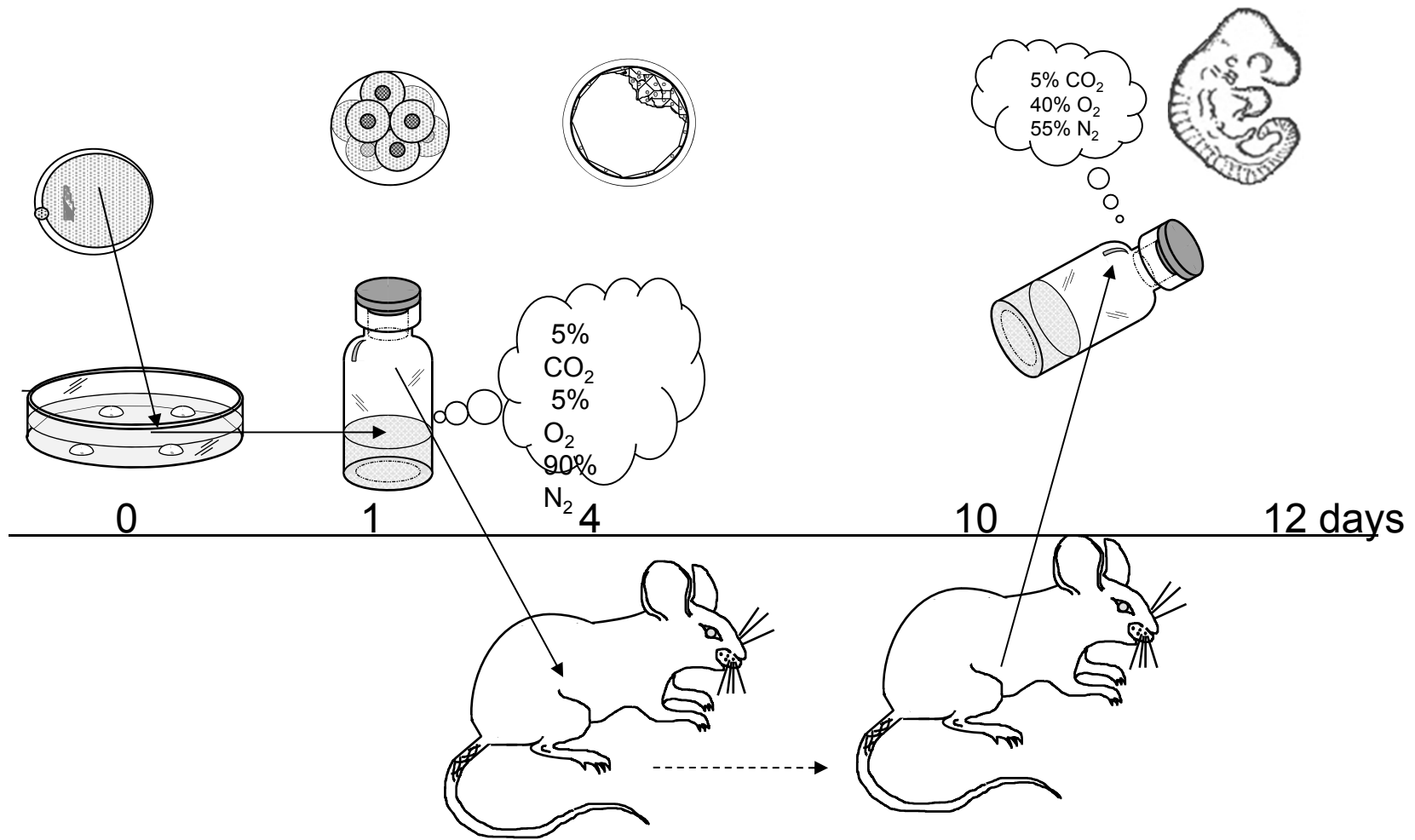
Разработените от нас ефективни методики за култивиране на предимплантационни партеногенетически зародиши а относително неотдавна и за постимплантационни партеногенетически зародиши, представляват много ефективна моделна система не само за изучаване механизма на геномния импринтинг и програмираната клетъчна смърт на партеногенетическите зародиши, но и са удобни за експериментално изучаване на факторите участващи в репрограмирането на генома.

Задача:

Оптимизиране на разработената от нас моделна система за *in vitro* култивиране на до- и постимплантационни зародиши при различни породи мишки с цел увеличаване на ефективността и удължаване периода на *in vitro* култивиране, което съществено ще улесни и разшири възможностите за изучаване на процеса геномен импринтинг.

Експериментални методи

- 1. Приготвяне на микроинструменти за работа с яйцеклетки и ембриони.**
- 2. Микроманипулации с яйцеклетки и ембриони.**
- 3. Суперовулация**
- 4. Получаване на диплоидни партеногенетични зародиши чрез активация на неоплодени яйцеклетки с етанол и диплоидизация с Цитохалазин Б (подтискане на отделянето на 2-то полярно тяло).**
- 5. Вазектомия и получаване на псевдобременност.**
- 6. Трансплантация на ембриони в яйцепровода и матката на псевдобременни мишки**
- 7. *In vitro* култивиране на нормални и партеногенетически зародиши от инбредни и хибридни мишки през до- и постимплантационният период на ембриогенезата.**
- 8. Хистологични методи**
- 9. *RT-PCR* анализ**
- 10. Real Time *RT-PCR* анализ**



Значение и Перспективи

1. Създадената от нас моделна система за *in vitro* култивиране на нормални и партеногенетични миши ембриони през доимплантационния и постимплантационния периоди, позволява изучаването на ефектите на различни репрограмиращи генома фактори върху експресията на гените контролиращи тотипотентните свойства на клетките и върху експресията на импринтираните гени. Създаването в перспектива на система за пълно *in vitro* развитие на партеногенетични ембриони (включително имплантацията) ще намали рязко използването на животни в експериментите.
2. Резултатите от тези изследвания могат да бъдат използвани за получаването на ембрионални стволови клетки (ES cells), индуцирани плурипотентни стволови клетки (iPS cells), както и за съществено увеличаване на ефективността при клонирането на животни.
3. Създаването на методи за нормализиране на нарушената експресия на импринтирани гени може да намери приложения в медицината.
4. Партеногенетичните миши ембриони могат също така да бъдат използвани като моделна система за изучаване на програмираната клетъчна гибел, както и за изучаване на експресията на гените контролиращи процеса на стареенето.
5. Чрез създадената от нас моделна система могат да бъдат тествани различни хранителни добавки и лекарства които са обект на хранителната геномика и могат да служат за профилактика на определени заболявания.