

TYTUŁ: Charakterystyka i biologiczna rola wydzielniczego białka bogatego w cysteinę (CRISP) w układzie rozrodczym indora (*Meleagris gallopavo*)

POPULARNONAUKOWE STRESZCZENIE PROJEKTU

Cel projektu. Wydzielnicze białko bogate w cysteinę (cysteine rich secretory protein; CRISP) jest jednym z dominujących białek plazmy nasienia indora o niepoznanej dotąd strukturze oraz roli biologicznej. W związku z tym, proponowany projekt badawczy został opracowany w celu przeprowadzenia szczegółowych analiz biochemicznych, fizjologicznych i funkcjonalnych CRISP plazmy nasienia indora. Cele szczegółowe projektu obejmują: (1) izolację CRISP z plazmy nasienia indora oraz charakterystykę jego właściwości fizykochemicznych, (2) analizę transkryptomu układu rozrodczego i osłonki witelinowej oocytów w odniesieniu do *CRISP* mRNA, (3) lokalizację tkankową w układzie rozrodczym indora oraz analizę porównawczą CRISP z nasieniem innych gatunków ptaków, 4) określenie związku pomiędzy CRISP a parametrami jakości nasienia oraz (5) sprawdzenie udziału CRISP w zapłodnieniu *in vivo* w celu określenia jego roli w interakcji plemnik-osłonka witelinowa podczas zapłodnienia u ptaków.

Badania realizowane w projekcie. Technologie „omiczne” (genomika, transkryptomika, proteomika i bioinformatyka) zastosowane zostaną po raz pierwszy do szczegółowych analiz CRISP plazmy nasienia indora. Na wstępie chromatografia oddziaływań hydrofobowych i filtracja żelowa zostaną wykorzystane do wydajnej izolacji CRISP. Przy użyciu technik elektroforetycznych i spektrometrii mas scharakteryzowane zostaną właściwości fizykochemiczne CRISP, tj. masa cząsteczkowa, punkt izoelektryczny, glikoproteinowa struktura i miejsca fosforylacji. Następnie stosując RNA-seq, sekwencjonowanie nowej generacji, uzyskana zostanie sekwencja nukleotydowa *CRISP* mRNA i dziesiątek tysięcy transkryptów obecnych na terenie układu rozrodczego co dostarczy precyzyjnych informacji na temat ekspresji genów zaangażowanych w reprodukcję ptaków z udziałem CRISP. Przeciwciała poliklonalne wyprodukowane zostaną po raz pierwszy przeciwko indycemu CRISP i zastosowane zostaną do określenia miejsc sekrecji CRISP na terenie układu rozrodczego, opracowania testu ELISA oraz analiz porównawczych z nasieniem innych gatunków ptaków. Ekspresja genu *CRISP* sprawdzona zostanie na terenie układu rozrodczego. Przy wykorzystaniu cytometru przepływowego i systemu do analizy ruchu plemników (CASA) analizowana będzie biologiczna rola CRISP pod kątem związku z jakością nasienia. Właściwości CRISP jako chemoatraktantu zdolnego do modulowania orientacji plemników podczas zapłodnienia sprawdzone zostaną przy zastosowaniu szkiełek μ -Slide Chemotaxis oraz systemu CASA. Ostatecznie, udział CRISP w interakcji plemnik-osłonka witelinowa i w fuzji gamet zostanie sprawdzony podczas testu zapłodnienia *in vivo*.

Powody podjęcia danej tematyki badawczej. Obecność CRISP w plazmie nasienia indora została wykazana w prowadzonych przez nas badaniach z wykorzystaniem technik proteomicznych (Słowińska i wsp., 2015). W przeciwieństwie do ssaków, gdzie CRISP odgrywa rolę w interakcji plemnik-osłonka przejrzysta i fuzji gamet, brak jest informacji na temat funkcji białka CRISP w nasieniu ptaków. W związku z tym, CRISP plazmy nasienia indora zostanie poddany szczegółowym analizom biochemicznym, fizjologicznym i funkcjonalnym. Charakterystyka właściwości fizykochemicznych indyczego CRISP dostarczy danych do międzygatunkowego porównania ptasiego i ssaczego białka. Ponadto, w plazmie nasienia indora CRISP obecny jest w postaci 17 proteoform, dlatego tak ważne jest opisanie potranslacyjnych modyfikacji odpowiedzialnych za wysoki poziom zróżnicowania CRISP. Analiza genomu indora jest utrudniona z powodu braku informacji o całym genomie indora *Meleagris gallopavo*. W związku z tym, sekwencjonowanie transkryptomów układu rozrodczego indora pozwoli na poznanie nukleotydowej sekwencji *CRISP* mRNA i dziesiątek tysięcy transkryptów obecnych na terenie układu rozrodczego co dostarczy precyzyjnych informacji na temat ekspresji genów zaangażowanych w reprodukcję ptaków z udziałem CRISP. Poznanie nukleotydowej sekwencji *CRISP* mRNA z jąder, najądrzy czy nasieniowodów pozwoli na analizę alternatywnych miejsc składania genu, opisanie fuzji i mutacji genu oraz określenie poziomu ekspresji genu CRISP na terenie poszczególnych odcinków układu rozrodczego. Analizy ekspresji genów i immunohistochemia pozwoli na potwierdzenie syntezy CRISP na terenie układu rozrodczego. Doświadczenia zaplanowane na poznanie biologicznej roli CRISP pozwolą na uzyskanie odpowiedzi: i) czy ptasi CRIS, podobnie jak ssaczy, może modulować ruch plemników i orientację podczas zapłodnienia? oraz czy CRISP nasienia indora odgrywa rolę w interakcji plemnik-witelinowa podczas zapłodnienia u ptaków?