

Tytuł pracy: Analiza transkryptomu wczesnych stadiów rozwoju zarodków bydła uzyskanych in vivo od krów rasy polskiej holsztyńsko-fryzyjskiej.

Abstrakt

Wprowadzenie:

Celem badań było określenie wpływu wieku matki oraz sezonu na transkryptom zarodków bydła uzyskanych in vivo od krów rasy holsztyńsko-fryzyjskiej. Badanie miało na celu analizę zmian w ekspresji genów oraz szlakach metabolicznych związanych z jakością zarodków i ich potencjałem rozwojowym. Dotychczasowe badania dokumentowały wpływ wieku matki na wyniki rozrodu; jednak mechanizmy leżące u podstaw zmian transkryptycznych we wczesnych zarodkach bydła pozostają nie w pełni poznane. Dlatego, porównując zarodki pozyskane w sezonie ciepłym i chłodnym oraz od krów młodszych i starszych, w niniejszej pracy doktorskiej dążono do identyfikacji molekularnych markerów kompetencji zarodkowej oraz adaptacji środowiskowej.

Metody:

Profilowanie transkryptomu metodą RNA-Seq przeprowadzono na 34 zarodkach uzyskanych in vivo od siedmiu krów mlecznych rasy polskiej holsztyńsko-fryzyjskiej, różniących się wiekiem (2–7 lat) oraz sezonem pozyskania (wiosna i lato). Zarodki uzyskano po superowulacji, inseminacji sztucznej oraz płukaniu macicy zgodnie z wytycznymi IETS, oceniono morfologicznie i przechowywano w temperaturze -80 °C. Izolację RNA, syntezę cDNA, amplifikację oraz przygotowanie bibliotek przeprowadzono zgodnie z protokołem Takara Smart-seq2. Sekwencjonowanie wykonano na platformie Illumina NovaSeq6000 (2×150 pz, 30 mln odczytów na zarodek). Surowe odczyty poddano filtracji jakościowej i mapowano do genomu referencyjnego *Bos taurus* UMD3.0 (numer akcesyjny GCA_002263795.3). Analizę różnicowej ekspresji genów przeprowadzono w pakiecie DESeq2, porównując zarodki według wieku matki i sezonu. Funkcjonalną anotację genów różnicowo ekspresjonowanych wykonano z wykorzystaniem baz danych PANTHER i STRING. Analizę wzbogacenia procesów biologicznych Gene Ontology oraz szlaków KEGG przeprowadzono w programie Cytoscape (v3.9.1) z użyciem wtyczki ClueGO (v2.5.9), stosując korektę Bonferroniego step-down (p skorygowane $<0,05$). Sieci wzbogaconych terminów funkcjonalnych wygenerowano oddzielnie dla zbiorów genów nad- i niedoregulowanych w celu wizualizacji procesów molekularnych potencjalnie zależnych od wieku i warunków sezonowych. Dodatkowo zastosowano analizę dekonwolucji z wykorzystaniem algorytmów MuSiC i DeTREM w celu oszacowania udziału poszczególnych stadiów rozwojowych zarodka w profilach transkryptycznych typu bulk, wykorzystując referencyjne dane single-cell RNA-seq.

Wyniki:

Analiza transkryptomu wykazała, że zarówno zaawansowany wiek matki, jak i warunki sezonowe istotnie wpływają na profile ekspresji genów w zarodkach bydła, oddziałując na szlaki kluczowe dla rozwoju zarodkowego, metabolizmu, implantacji, regulacji immunologicznej oraz adaptacji do stresu.

W kontekście wieku matki zidentyfikowano 30 najwyżej nadekspresjonowanych transkryptów genów zależnych od wieku oraz 30 genów o obniżonej ekspresji.

W odniesieniu do sezonu zidentyfikowano 30 najwyżej nadekspresjonowanych oraz 30 najistotniej niedoregulowanych transkryptów genów zależnych od sezonu.

W analizie opartej na dekonwolucji zidentyfikowano nakładające się geny markerowe czterech kolejnych stadiów rozwoju zarodka: stadium wczesnego (2- i 4-komórkowe), stadium 8-komórkowe, morulę oraz późną blastocystę. Większość genów markerowych wykazywała specyficzność stadium, przy czym największa liczba była charakterystyczna dla stadium 8-komórkowego (2832; 45,6%) oraz stadium wczesnego (1444; 23,3%), następnie dla moruli (895; 14,4%) i późnej blastocysty (640; 10,3%). Stwierdzono jedynie ograniczone nakładanie się genów pomiędzy klastrami, co wskazuje, że każde stadium rozwojowe cechuje odrębny profil ekspresji genów.

Wnioski:

Uzyskane wyniki wskazują, że wiek matki oraz sezon wspólnie kształtują transkryptom zarodków bydła, wpływając na kluczowe procesy rozwojowe, metaboliczne i adaptacyjne do stresu. Wiedza ta może przyczynić się do udoskonalenia kryteriów selekcji zarodków, optymalizacji protokołów wspomaganego rozrodu u bydła oraz dostarczyć istotnych informacji dla zarządzania rozrodem u innych gatunków ssaków.

W kontekście wieku matki wykazano, że w porównaniu z zarodkami pochodzącymi od krów młodszych, zarodki od krów starszych charakteryzowały się zwiększoną ekspresją genów związanych ze steroidogenezą, regulacją metaboliczną oraz sygnalizacją immunologiczną, w tym CYP11A1, PDK4, HPRT1, STAT4 i EGR2, co sugeruje kompensacyjną aktywację szlaków endokrynnych i metabolicznych. Jednocześnie w zarodkach od krów starszych obserwowano obniżoną ekspresję kluczowych genów rozwojowych i mitochondrialnych, takich jak AKT2, UQCRC2, FANCA, JMY i PROM1, co wskazuje na zaburzenia metabolizmu energetycznego, organizacji cytoszkieletu, stabilności genomu oraz procesów związanych z implantacją.

W kontekście sezonu wykazano, że zarodki pozyskane w sezonie ciepłym w porównaniu z sezonem chłodnym wykazywały zwiększoną ekspresję genów związanych z odpowiedzią na stres, regulacją endokrynną oraz implantacją (m.in. HSPA6, FSHR, CXCR4, CYP11A1, BMPER i FGB), co może świadczyć o nasilonej adaptacji komórkowej do stresu oraz zmodyfikowanej sygnalizacji hormonalnej. Jednocześnie w zarodkach z sezonu ciepłego stwierdzono obniżoną ekspresję genów związanych z funkcją mitochondrialną, dynamiką cytoszkieletu, transportem pęcherzykowym oraz regulacją epigenetyczną (m.in. UQCRC2,

DNAH12, SYT9, ETV5 i RBMS3), co sugeruje wolniejsze tempo rozwoju oraz zmienioną homeostazę metaboliczną w warunkach podwyższonej temperatury środowiskowej.

Zastosowanie podejścia analitycznego opartego na dekonwolucji do danych bulk RNA-seq z pojedynczych zarodków bydła uzyskanych in vivo umożliwiło ocenę podobieństwa transkryptomycznego pomiędzy stadiów rozwojowych przedimplantacyjnych. Analiza klasteryzacji i redukcji wymiarowości wykazała wyraźne rozdzielenie stadiów rozwojowych, z istotnymi przejściami transkryptomicznymi pomiędzy wczesnymi etapami podziałów a późniejszymi stadiów. Analizy porównawcze z wykorzystaniem MuSiC i DeTREM wskazały na dominację sygnatur transkrypcyjnych charakterystycznych dla późnej blastocysty w transkryptomach całych zarodków, co podkreśla przewagę programów ekspresji genów typowych dla późniejszych stadiów w danych bulk RNA-seq.

Słowa kluczowe:

bydło holsztyńsko-fryzyjskie, zarodki bydła, wiek matki, analiza transkryptomu, RNA-seq

13. 04. 2026 r.

Klaudia
Niszkowska