

STRESZCZENIE

Niepłodność dotyka około 15% par na świecie i często spowodowana jest czynnikami genetycznymi. NANOS1 to białko oddziałujące z 3'UTR cząsteczek mRNA, o kluczowej roli w potranskrypcyjnej regulacji rozwoju komórek gametogenicznych, od muszki owocowej po człowieka. Specyficzny wariant p.[Pro34Thr; Ser78del] (MUT-NANOS1) białka NANOS1 powiązany jest z brakiem komórek gametogenicznych w kanalikach plemnikotwórczych pacjentów, wskazując potencjalny mechanizm patologiczny. Wstępne badania nadekspresji MUT-NANOS1 wykonanej na linii ludzkich komórek gametogenicznych TCam-2 wyprowadzonej z ludzkiego nasieniaka pokazały istotne osłabienie żywotności komórek w porównaniu z komórkami z nadekspresją WT-NANOS1, w których zaobserwowano efekt anty-apoptotyczny.

Celem badań była próba wyjaśnienia jaki jest wpływ powyższego wariantu białka NANOS1 na wczesny etap rozwoju ludzkich komórek gametogenicznych (hPGC). W badaniach zastosowano wcześniej scharakteryzowany model linii ludzkich komórek hESC podarowany przez prof. Azima Suraniego z Uniwersytetu Cambridge. W zdefiniowanych warunkach *in vitro*, uzyskiwano najpierw przejściowy etap prekursorów mesendodermalnych (pre-me) stopniowo agregujących tworząc ciała embroidowe. W ich wnętrzu dochodziło do różnicowania komórek podobnych do pierwotnych komórek gametogenicznych (PGCLCs) pod wpływem stymulacji BMP z wydajnością 10-40%. Opisana wyżej linia ludzkich komórek embrionalnych (46,XY) W15 zaopatrzona we fluorescencyjny reporter NANOS3-dtTomato, umożliwiała obserwację powstawania PGCLCs w czasie rzeczywistym. Na podstawie powyższej linii komórkowej W15 wygenerowano linie komórkowe z nadekspresją MUT- oraz WT-NANOS1 indukowaną doxycykliną. Zastosowano technikę eCLIP celem identyfikacji mRNA z którymi każde z tych białek oddziałuje oraz RNAseq by uchwycić zmiany poziomu tych mRNA.

Badania pokazały represywny efekt „zysku funkcji” (gain of function) wariantu p.[Pro34Thr; Ser78del] przejawiający się m. in., osłabieniem kanonicznej sygnalizacji WNT w stadium pre-me. Konsekwencją było zaburzenie regulatorów różnicowania takich jak EOMES oraz obniżenie kompetencji komórek do różnicowania jako PGCLCs. Białko MUT-NANOS1 niewystarczająco obniżało komponenty ścieżki WNT/TGF- β , co prowadziło do nieprawidłowej aktywacji ścieżki WNT, podobnej do EMT tranzycji oraz przesunięcia różnicowania ku mesendodermalnemu/mezodermalnemu. Efekt ten był wsparty oddziaływaniem MUT-NANOS1 z 5'UTR mRNA NANOG oraz 3'UTR OCT4. Konsekwencją była supresja głównych czynników pluripotencji oraz redukcja markerów PGC takich jak, SOX17, TFAP2C oraz NANOS3. Powyższe zmiany pozwalają wyjaśnić obniżoną liczbę komórek PGCLC *in vitro* oraz brak w gonadach pacjentów z wariantem MUT-NANOS1. Należy podkreślić że zahamowanie ścieżki WNT skutkuje częściowym odtworzeniem pluripotencji oraz markerów PGC z jednoczesnym obniżeniem poziomu BMP4. Wskazuje to na istotne wzajemne oddziaływanie pomiędzy BMP, WNT oraz TGF- β ochraniające komórki gametogeniczne. Badania pokazują zaburzenie transkryptomu oraz dynamiki sygnalizacyjnej przez mutację p.[Pro34Thr; Ser78del], istotnych dla wczesnych etapów rozwoju komórek płciowych i pozwalają wnikać w przyczynę niepłodności pacjentów obarczonych tą mutacją.