

Technologie sztucznego wspomaganie rozrodu (ART) są potencjalnie cennymi narzędziami w hodowli bydła. Rozwój ciąży zależy od kompetencji rozwojowej zarodka, a uzyskanie odpowiedniej liczby zarodków kwalifikowanych do embriotransferu – od kompetencji rozwojowej oocyty rozumianej jako zdolność do prawidłowego dojrzewania jądrowego i cytoplazmatycznego. W proponowanym projekcie zostaną przeprowadzone multiomiczne badania oparte na sekwencjonowaniu genomu nowej generacji (NGS) w celu zrozumienia i zbadania molekularnych mechanizmów i procesów dojrzewania oocytów oraz wczesnych etapów embrionalnych rozwoju płodu bydłęcego u polskiego bydła rasy holsztyńsko-fryzyjskiej (HF).

Hipoteza badawcza zakłada, że:

- ❖ istnieje ścisła, przeciwstawna zależność między kompetencją rozwojową i zmianami ekspresji genów w okresie dojrzewania oocytów, a wczesnymi embrionalnymi stadiami rozwojowymi płodu, które mogą być wykryte za pomocą technologii multiomicznych NGS i metod bioinformatycznych u polskiego bydła rasy HF;
- ❖ zastosowanie analizy *scRNA-seq* i *metyl-seq* u oocytów i zarodków będzie pomocne w identyfikacji potencjalnych biomarkerów i genów kandydujących istotnych dla cech rozrodczości i płodności bydła rasy HF;
- ❖ spodziewamy się, że zastosowanie zaawansowanych narzędzi NGS *scRNA-seq* i *metyl-seq* pozwoli na identyfikację nowej zmienności w ekspresji genów kandydujących, sieci genów, sieci genów ulegających koekspresji i szlaków metabolicznych oraz identyfikacji nowych biomarkerów dla cech rozrodczości i płodności.

Badanie to dostarczy odpowiedzi na następujące kluczowe pytania:

- Jaki jest fizjologiczny profil oocytów i wczesnych, embrionalnych stadiów rozwoju płodu bydłęcego w kontekście sekwencjonowania RNA u pojedynczych komórek (*scRNA-seq*) i profilowania epigenomu (*metyl-seq*) u bydła rasy HF?
- Czy profile transkryptomowe (*scRNA-seq*) i epigenomiczne (*metyl-seq*) oocytów i zarodków bydła rasy polskiej holsztyńsko-fryzyjskiej mają wpływ na płodność i inne cechy związane z reprodukcją?
- Czy stan fizjologiczny transkryptomu i epigenomu oocytów/zarodków bydła rasy holsztyńsko-fryzyjskiej ma istotny wpływ na ekspresję prenatalną kluczowych genów i białek kandydujących, które mogą być wykorzystywane jako geny kandydujące i biomarkery płodności i cech związanych z reprodukcją?

W zaplanowanych badaniach cele naukowe ze szczególnym uwzględnieniem innowacyjnego charakteru projektu badawczego będą realizowane poprzez realizację trzech zadań badawczych w postaci pakietów roboczych [WP1-WP3]:

- ✚ W ramach WP1, wykonane zostanie pobranie oocytów i zarodków we wczesnych embrionalnych etapach rozwoju u polskiego bydła rasy holsztyńsko-fryzyjskiej. W pakiecie WP1 zostaną przeprowadzone dwa eksperymenty pilotażowe. W eksperymencie 1 (Exp-1) zostaną przeprowadzone badania morfologiczne in vitro oraz ocena oocytów i zarodków. W doświadczeniu 2 (Exp-2) zostaną przeprowadzone badania morfologiczne in vivo oraz ocena zarodków.
- ✚ W ramach WP2, przeprowadzone zostaną badania laboratoryjne nad sekwencjonowaniem RNA u pojedynczych komórek (*scRNA-seq*) oraz sekwencjonowaniem epigenomu (*metyl-seq*) oocytów i zarodków we wczesnych stadiach rozwoju. Po sekwencjonowaniu NGS przeprowadzona zostanie walidacja badań z udziałem jednokomórkowego mRNA (*mRNA-seq*) i *miRNA-seq* wykorzystaniem RT-PCR.
- ✚ W ramach WP3, opracowane zostaną trzy schematy analizy bioinformatycznej oparte na danych *mRNA-seq*, *miRNA-seq* i *metyl-seq*. Nasza analiza bioinformatyczna będzie opierać się na (i) porównaniu zarodków pomiędzy Exp-1 i Exp-2 w trzech schematach analizy (dane *sc-mRNA-seq*, *sc-miRNA-seq* oraz dane *metyl-seq*); oraz (ii) w Exp-1, porównaniu oocytów i zarodków w trzech schematach analizy *RNA-seq*. W pakiecie WP3 wykorzystamy szeroki zakres zaawansowanych narzędzi bioinformatycznych: np. pakiet SAMtools mPileUp do identyfikacji SNP i indeli, trzy pakiety Biokonduktora R: EdgeR, DESeq i DESeq2 do identyfikacji genów różnicowej ekspresji (DEG), pakiet R do analizy sieci korelacji ważonej (WGCNA) pozwalający na identyfikację koekspresji genów, GO i KEGG do analizy ontologii i szlaków metabolicznych, pakiet R do analizy zintegrowanego protokołu ChAMP, w tym QC, desntifyPlot, dendrogram itp. ChAMP.norm do standaryzacji danych *metyl-seq*, ChAMP.DMP i Champ.DMR do filtrowania pojedynczych miejsc CpG i klastrów wysp CpG, Champ.GSEA do wzbogacania funkcji i analizy ścieżek metabolicznych, wizualizacji danych przez oprogramowanie CIRCOS, unikalne wzorce metylacji DNA i skorelowane z nimi wyspy CpG będą analizowane za pomocą R pakiet "coMET".

Wyniki badań pozwolą na: i) scharakteryzowanie mechanizmów biologicznych i molekularnych dojrzewania oocytów i wczesnego rozwoju zarodkowego u bydła rasy HF; ii) identyfikację genów/biomarkerów kandydujących dla cech płodności i rozrodu bydła; iii) wyniki wypełnią lukę w wiedzy na temat integracji profilowania transkryptomowego i epigenomowego w dojrzewania oocytów i wczesnym rozwoju zarodkowym.