

Streszczenie rozprawy doktorskiej mgr inż. Eweliny Semik pt.:

**„ANALIZA POZIOMU METYLACJI WYSP CpG REGIONÓW KODUJĄCYCH
W DNA TKANKI SARKOIDÓW KOŃSKICH”,**

wykonanej pod kierunkiem: *Dr hab. Tomasza Ząbka, prof. IZ PIB*

Sarkoidy zaliczane są do najczęściej diagnozowanych nowotworów skóry u gatunków zwierząt koniowatych (*Equidae*). Za główny czynnik etiologiczny sarkoidów uznawane są wirusy brodawczaka bydła (BPV). Obecność DNA wirusowego potwierdzono w prawie wszystkich ocenianych zmianach tego typu. Obecnie badanie histologiczne sarkoidów uważane jest za najbardziej niezawodną metodę diagnostyczną. Jednakże jest to metoda czasochłonna i wymagająca stosowania rozpuszczalników organicznych, często szkodliwych dla zdrowia człowieka. Dlatego też, poszukiwane są nowe strategie diagnostyczne, które umożliwią szybką i precyzyjną diagnostykę schorzenia. W ostatnich latach szczególną uwagę poświęcono badaniom mającym na celu zastosowanie i optymalizację epigenetycznych markerów nowotworowych. Termin epigenetyka odnosi się do zmian w dziedzicznym materiale genetycznym, innych niż zmiany w sekwencji nukleotydowej DNA. Jedną z najlepiej poznanych zmian epigenetycznych związanych z procesem kancerogenezy jest nieprawidłowa metylacja DNA.

Celem pracy doktorskiej była ocena profilu metylacji genów o potencjalnym znaczeniu diagnostycznym i/lub prognostycznym w sarkoidach końskich. Analizie metylacji DNA poddano panel dziewięciu genów: *APC*, *CCND2*, *CDNK2B*, *DCC*, *RARB*, *RASSF1*, *RASSF5*, *THBS1* oraz *TRPM1*, wykorzystując technikę łańcuchowej reakcji polimerazy i sekwencjonowania DNA po konwersji bisulfitem (BS-PCR). Poza analizą metylacji poszczególnych genów, w pracy podjęto także próbę identyfikacji regionów genomu charakteryzujących się różnicową metylacją DNA w sarkoidach, w oparciu o technikę RRBS i sekwencjonowanie następnej generacji. Dodatkowo przeprowadzono kompleksową analizę transkryptomu z użyciem mikromacierzy cDNA, w celu identyfikacji różnic w poziomie ekspresji genów pomiędzy sarkoidem a tkanką zdrową oraz powiązania zidentyfikowanych różnic z wytypowanymi zmianami profilu metylacji DNA.

W niniejszych badaniach nie wykazano różnic w poziomie metylacji DNA oraz ekspresji analizowanego panelu dziewięciu genów kandydujących pomiędzy tkanką guza a tkanką kontrolną. Pomimo licznych doniesień opisujących nieprawidłową metylację promotorów analizowanych genów w nowotworach u ludzi, uzyskane dane nie potwierdziły

występowania tego typu zależności w badanych próbach sarkoidu, co wyklucza możliwość wykorzystania wspomnianych genów do diagnostyki tego schorzenia u koni.

Porównawcza analiza metylacji frakcji genomu bogatej w dinukleotydy CpG (technika RRBS), umożliwiła identyfikację 136 regionów wykazujących różnice w poziomie metylacji miejsc CpG (DMR) pomiędzy sarkoidem a tkanką zdrową. Większość spośród zidentyfikowanych DMR, stanowiły niewielkie fragmenty, nieprzekraczające 1 kpz, zlokalizowane w rejonach między genowych, oddalonych od miejsc startu transkrypcji. Spośród genów, w obrębie których zidentyfikowano DMR, *locus SFN* charakteryzowało się obecnością regionu hipermetylowanego oraz obniżoną ekspresją mRNA w tkance guza, co sugerować może, iż metylacja jest elementem mechanizmu odpowiadającego za nieprawidłową ekspresję tego genu w tkance guza.

Przeprowadzona analiza profilu metylacji wybranych DMR na większej grupie badawczej, umożliwiła identyfikację istotnych różnic w poziomie metylacji DNA pomiędzy tkanką zdrową i chorą, w obrębie genów *RALGPS1*, *C1orf106* oraz *EFEMP2*. W tkance nowotworowej stwierdzono także istotnie obniżony poziom metylacji fragmentu DNA, wchodzącego w skład potencjalnej sekwencji promotorowej genu *SPARC*, w przypadku którego odnotowano również podwyższony poziom ekspresji. Wyniki te wskazywać mogą na występowanie zależności pomiędzy hipometylacją tego regionu a nadekspresją *SPARC* w tkance sarkoidów.

Uzyskane w niniejszej pracy wyniki analizy transkryptomu sarkoidów końskich umożliwiły identyfikację 901 genów wykazujących istotne różnice w poziomie ekspresji w tkance guza w odniesieniu do tkanki zdrowej (DGE). W grupie tej odnotowano 628 genów charakteryzujących się obniżoną ekspresją oraz 273 geny o podwyższonej ilości transkryptu w analizowanych tkankach guza. W obrębie wytypowanych DEG stwierdzono obniżoną ekspresję szeregu genów pełniących funkcję supresorową w transformacji nowotworowej oraz nadekspresję genów związanych z procesami pełniącymi kluczową rolę w regulacji wzrostu i progresji nowotworów - związanych głównie z funkcjami immunologicznymi, onkogenezą oraz zaangażowanych w odpowiedź organizmu na infekcję wirusową.

Znajomość zmian zachodzących zarówno w procesie metylacji DNA, jak i ekspresji genów może stanowić podstawę do opracowania nowych alternatywnych podejść diagnostycznych oraz terapeutycznych, mających na celu przywrócenie prawidłowego funkcjonowania genów, których aktywność uległa zaburzeniu związanym z etiologią powstawania sarkoidów.